

Einfluss von kurz-, mittel- und langfristiger Belastung auf physiologische Parameter bei Arbeitshunden

Angelika Scheideler

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department
Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung
der Tierärztlichen Fakultät München
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. M. H. Erhard

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

Einfluss von kurz-, mittel- und langfristiger Belastung auf physiologische Parameter bei Arbeitshunden

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

von
Angelika Scheideler
aus Stuttgart

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Erhard
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Für meine Schwester

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, Corticotropin
CGB	Corticosteroid-bindendes Globulin, Transkortin
CRH	Corticotropin-releasing Hormon, Corticoliberin
DAO	Diaminoxidase
DSH	Deutscher Schäferhund
DTH	Delayed-Type Hypersensitivity, Hypersensitivität vom verspäteten Typ
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Exp	Experiment
GLM	Gemischtes Lineares Modell
GR	Glukokortikoid-Rezeptoren
HDC	Histidindecaboxylase
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue, Mukosa-assoziiertes Immunsystem
MR	Mineralokortikoid-Rezeptoren
NK	Natürliche Killerzellen
OPA	<i>ortho</i> -Phthalidialdehyd
pIgA	Polymeres Immunglobulin A
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Paraventrikulärer Nukleus
SC	Sekretorische Komponente
slgA	Sekretorisches Immunglobulin A
SAM-	sympathico-adrenomedullär, Sympathikus-Nebennierenmark-
ZNS	Zentrales Nervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
<hr/>	
2. LITERATUR	2
<hr/>	
2.1 Stress und Stressreaktionen.....	2
2.2 Stress und Immunsystem	7
2.3 Physiologische Parameter für die Beurteilung von Stress.....	10
2.3.1 Immunglobuline im Plasma: IgG und IgA.....	10
2.3.2 Steroidhormone im Plasma: Kortisol und Kortikosteron.....	13
2.3.3 Histamin im Plasma	16
2.3.4 Serotonin im Plasma	18
2.3.5 sIgA im Speichel	19
<hr/>	
3. FRAGESTELLUNG	22
<hr/>	
4. TIERE, MATERIAL UND METHODEN	24
<hr/>	
4.1 Hunde, Versuchsaufbau und untersuchte Parameter	24
4.1.1 Belastung von Rettungshunden bei Suchübungen auf verschiedenen Geländeformen (Experiment 1)	24
Hunde.....	24
Versuchsaufbau.....	25
Untersuchte Parameter.....	25
4.1.2 Belastung von Rettungshunden während einer 3-tägigen Einsatzübung im Trümmergelände (Experiment 2)	26
Hunde.....	26
Versuchsaufbau.....	26
Untersuchte Parameter.....	27
4.1.3 Belastung von Diensthunden während einer 4-wöchigen Ausbildungsphase (Experiment 3)	28
Hunde.....	28
Versuchsaufbau.....	28
Untersuchte Parameter.....	29

4.2 Gewinnung, Aufarbeitung und Analyse der Plasma- und Speichelproben	30
4.2.1 Probengewinnung und -aufarbeitung.....	30
<i>Plasmaproben</i>	30
<i>Speichelproben</i>	31
<i>Untersuchte Parameter und Nachweismethoden</i>	32
4.2.2 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die ELISA-Analytik	32
4.2.3 Prinzip des Sandwich-ELISAs für die Bestimmung von Immunglobulinen im Probenmaterial	35
4.2.4 Bestimmung von IgG im Plasma	37
4.2.5 Bestimmung von IgA im Plasma und Speichel	38
4.2.6 Bestimmung von Kortisol im Plasma	40
4.2.7 Bestimmung von Kortikosteron im Plasma	43
4.2.8 Bestimmung von Serotonin im Plasma.....	45
4.2.9 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die HPLC-Analytik.....	47
4.2.10 Bestimmung von Histamin im Plasma	48
4.3 Aktivitätsaufzeichnung.....	51
4.4 Datenverarbeitung und Statistik.....	52
5. ERGEBNISSE	53
5.1 Physiologische Parameter im Plasma	53
5.1.1 Immunglobuline.....	53
<i>IgG</i>	53
<i>IgA</i>	55
5.1.2 Steroidhormone.....	56
<i>Kortisol</i>	56
<i>Kortikosteron</i>	57
<i>Kortisol/Kortikosteron-Quotient</i>	59
5.1.3 Histamin.....	60
5.1.4 Serotonin.....	61
5.2 sIgA im Speichel.....	62
5.2.1 Experiment 1	62
5.2.2 Experiment 2.....	65
5.2.3 Experiment 3.....	68
5.2.4 Vergleich der Experimente	71

5.3 Einflussfaktoren.....	72
5.3.1 Einflussfaktoren auf Plasmaparameter.....	72
5.3.2 Einflussfaktoren auf sIgA im Speichel	74
Experiment 1	74
Experiment 2	75
Experiment 3	76
6. DISKUSSION	77
<hr/>	
6.1 Untersuchungsmethoden.....	77
6.1.1 Versuchsdurchführung	77
6.1.2 Probennahmen.....	78
6.1.3 Probenaufarbeitung.....	79
6.1.4 Analytik	79
6.2 Physiologische Parameter im Plasma	81
6.2.1 Immunglobuline.....	81
IgG	81
IgA.....	83
6.2.2 Steroidhormone.....	83
Kortisol	83
Kortikosteron	87
6.2.3 Histamin.....	90
6.2.4 Serotonin.....	91
6.2.5 Zusammenhänge zwischen Plasmaparametern.....	92
6.2.6 Alterseffekt auf Plasmaparameter	95
6.3 sIgA im Speichel.....	97
6.4 Ausblick.....	102
7. ZUSAMMENFASSUNG	103
<hr/>	
8. SUMMARY	106
<hr/>	
9. LITERATURVERZEICHNIS	109
<hr/>	
10. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	128
<hr/>	

1. EINLEITUNG

Arbeitshunde werden vom Menschen für die unterschiedlichsten Aufgabenbereiche ausgebildet, trainiert und eingesetzt. Entsprechend der an sie gestellten Anforderungen müssen diese Hunde sorgfältig ausgewählt und getestet werden, um sicherzustellen, dass grundlegende, für das jeweilige Arbeitsgebiet notwendige Eigenschaften vorhanden sind. Zum Beispiel müssen Hunde, die für den Rettungsdienst ausgebildet werden, ein ausgeglichenes und freundliches Wesen besitzen, wohingegen leicht erregbare und fremden Menschen gegenüber eher misstrauische Hunde für den Dienst als Wach- und Begleithund geeignet sein können. Je nach Aufgabengebiet sind Arbeitshunde den verschiedensten Belastungen ausgesetzt. So können der Transport zum Einsatzort mittels Auto, Hubschrauber oder Flugzeug, extreme Wetterbedingungen, soziale Konfliktsituationen, Lärm oder für das Tier bedrohliche oder unvorhersehbare Situationen als belastende Faktoren bzw. psychische Stressoren wirken. Je besser ein Hund dem Anforderungsprofil entspricht, umso eher kann er solche Belastungen verarbeiten und effektiv die an ihn gestellten Aufgaben erfüllen. Deshalb ist es wichtig, Symptome von Überforderung oder Stress am Tier erkennen zu können, um das Training oder den Einsatz für den einzelnen Hund passend gestalten bzw. ungeeignete Hunde frühzeitig aus der Ausbildung nehmen zu können. Da es beim Tier im Allgemeinen schwierig ist, Stresszustände allein anhand von Verhaltensbeobachtungen zu beurteilen, können zusätzlich physiologische Parameter z. B. aus Blut- oder Speichelproben wichtige Informationen liefern. Dabei kann es hilfreich sein, sich nicht auf die Untersuchung eines oder nur weniger Parameter zu beschränken, sondern zu versuchen, sich ein möglichst umfassendes Bild der physiologischen Veränderungen, die durch eine Stresssituation verursacht werden, zu machen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen an Rettungshunden überprüft, inwiefern Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin A (IgA), die Kortikosteroide Kortisol und Kortikosteron sowie die biogenen Amine Histamin und Serotonin im Plasma eine Aussagekraft als Stressparameter bei langfristiger Belastung haben können. Zum anderen wurde das sekretorische Immunglobulin A (sIgA) im Speichel von Rettungs- und Diensthunden unter kurz-, mittel- und langfristiger Belastung getestet.

2. LITERATUR

2.1 Stress und Stressreaktionen

Bereits 1929 hatte CANNON das Konzept der „Notfallreaktion“ entwickelt, wonach der Körper blitzartig durch die Herstellung einer Flucht- oder Angriffsbereitschaft („Fight-and-flight-Syndrom“) auf eine Bedrohung reagiert (CANNON 1929). SELYE, der „Vater der Stressforschung“, begründete in den 1930ern endgültig die Grundlagen für die Lehre vom Stress und vom „Allgemeinen Adaptationssyndrom“, die auch heute noch ihre Gültigkeit haben (SELYE 1981). Seither versuchen Wissenschaftler in diversen Stresstheorien die genauen Abläufe zu klären, mit denen ein Organismus adäquat auf Stresssituationen reagiert (LADEWIG 1994). Grundsätzlich handelt es sich bei diesen Stress-induzierten, physiologischen Veränderungen um notwendige Anpassungsreaktionen des Körpers, die nicht unbedingt einen negativen Effekt auf das Wohlbefinden des Tieres haben müssen, wenn sie vorübergehend und nicht im Übermaß auftreten (DHABHAR & McEWEN 1997, SAPOLSKY 2000, MOBERG 2001).

Die Einteilung der Stressreize, d. h. die Bedingungen, Zustände oder Faktoren, die eine Stressreaktion auslösen (Stressoren), kann sowohl nach qualitativen als auch nach quantitativen Kriterien erfolgen. Qualitativ können z. B. physikalische Stressoren (Hitze, Kälte, Strom, Lärm), chemische Stressoren (Narkose, Medikamente, chemische Substanzen), soziale Stresssituationen (Isolation, Immobilisation, Fixierung) oder psychische Belastung (Angst, Prüfungssituationen, Trauer) unterschieden werden. Dauer und Intensität der Einwirkung des Stressreizes hingegen bezeichnen seine quantitative Eigenschaft (LADEWIG 1994, CARRASCO & VAN DE KAR 2003). Da die Bestimmung der subjektiven Wahrnehmung der Intensität oft und gerade beim Tier nicht möglich ist, ist die Dauer des einwirkenden Stressors von größerer Bedeutung für die Beurteilung seiner Wirkung. In den meisten Untersuchungen wird deshalb zwischen akutem und chronischem Stress unterschieden (BEERDA ET AL. 1997, DHABHAR 2000). Bei intensiven oder chronischen Stressoren kann die Stressreaktion unverändert bleiben oder es kann ein Anpassungsprozess einsetzen, der sich im Zeitraum von einigen Tagen bis zu mehreren Monaten vollzieht und streng Stressor-spezifisch ist (Sensibilisierung). Im

Gegensatz dazu kann nach schwachen oder kurzzeitigen Stressreizen eine Reduktion der unspezifischen Stressreaktionen auftreten, die als Gewöhnung oder auch Habituation bezeichnet wird (THEWS & VAUPEL 1997). Die im Organismus ausgelösten Stressreaktionen beruhen auf verschiedenen endokrinen und nervösen Systemen, die je nach Stressor unterschiedlich aktiviert werden, letztendlich aber zu einer Intensivierung derjenigen Körperfunktionen führen, die die Reaktionsfähigkeit eines Tieres in Bezug auf Kampf oder Flucht erhöhen oder den Körper gegenüber Stressoren widerstandsfähiger macht.

Eine wesentliche, integrierende Rolle bei der Vermittlung von Stresssignalen im zentralen Nervensystem (ZNS) spielt der Hypothalamus, in dem die sog. neuroendokrine Koppelung, d. h. die Umwandlung von Nervenimpulsen in hormonelle Signale stattfindet (THOMPSON 2001, CARRASCO & VAN DE KAR 2003, VOIGT 2003). Aus den paraventriculären Kernarealen des paraventriculären Nucleus (PVN) des Hypothalamus wird das Corticotropin-releasing Hormon (CRH, Corticoliberin) freigesetzt, das über den hypophysären Pfortaderkreislauf die Hormonfreisetzung aus der Adenohypophyse steuert. Von Bedeutung ist hier im Wesentlichen die Kontrolle der Produktion und Sekretion des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH, Corticotropin), welches in den basophilen Zellen der Adenohypophyse und im Lobus intermedius aus dem Polyprotein Proopiomelanocortin (POMC) gebildet wird. ACTH vermittelt im weiteren Verlauf der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) die Freisetzung von Kortikosteroiden aus der Nebennierenrinde (DÖCKE 1994, THOMPSON 2001).

Außerdem wird durch CRH der Locus coeruleus zur Ausschüttung von Noradrenalin angeregt, so dass es zu einer gesteigerten Sympathikusaktivität und in der Folge zu einer verstärkten Ausschüttung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark kommt (CARRASCO & VAN DE KAR 2003). Dieser Reaktionsablauf stellt eine zweite „Stressachse“ dar, die Sympathikus-Nebennierenmark-Aktivierung (sympathico-adrenomedulläre Aktivierung, SAM-Aktivierung) (LADEWIG 1994). Daneben werden im Gehirn unter Stresseinwirkung aber auch vermehrt Prolaktin, Oxytozin, Wachstumshormon und verschiedene Neuropeptide, z. B. endogene Opioide wie β -Endorphin, produziert und sezerniert, die somit

ebenfalls eine Rolle im komplexen System der Stressantworten übernehmen (CARRASCO & VAN DE KAR 2003).

Eine typische neuroendokrine Stressreaktion umfasst initial innerhalb von Sekunden eine gesteigerte Sekretion von Katecholaminen aus dem sympathischen Nervensystem und dem Nebennierenmark, die Freisetzung von CRH und Vasopressin aus dem Hypothalamus in den Pfortaderkreislauf sowie die Sekretion von Oxytozin und 5 bis 10 Sekunden später von ACTH aus der Hypophyse (VAN DE KAR & BLAIR 1999). Etwa 30 bis 60 Minuten nach Beginn des Stressreizes ist ein Glukokortikoidanstieg im Plasma nachweisbar (SAPOLSKY ET AL. 2000).

Zum Stresssystem des Gehirns gehören neben dem Hypothalamus auch die Amygdala des limbischen Systems und die serotonergen dorsalen Raphe-Kerne. Weiterhin erfolgt die Vermittlung von Stressantworten durch Regionen des limbischen Vorderhirns (Hippocampus, Prefrontaler Cortex) und des limbischen Mittelhirns (Ventrales Tegmentales Areal, mittleren Raphe-Kerne, Zentrales Grau) (MORGANE ET AL. 2005). Alle an den Stressantworten beteiligten Gebiete stehen durch wechselseitige Kommunikation miteinander in enger Verbindung, wobei CRH als Neurohormon und Neurotransmitter eine zentrale Rolle spielt (VAN DE KAR & BLAIR 1999). Eine Stimulierung der CRH-Ausschüttung und noradrenergen Neurone des Sympathikus kann durch Serotonin und Acetylcholin erfolgen, wohingegen Glukokortikoide, γ -Aminobuttersäure, ACTH und Opiode hemmend auf den PVN wirken (CARRASCO & VAN DE KAR 2003).

Es wurde gezeigt, dass der PVN mit der Amygdala in Verbindung steht und dass über sie bei Ratten stimulierende Effekte auf die HHN-Achse und damit die Plasma-Kortikosteronkonzentration ausgeübt werden (FELDMAN & WEIDENFELD 1998). Diese Wirkung wird durch noradrenerge und serotonerge Neurone vermittelt, und durch Läsion der Amygdala-Kerne kann die Ausschüttung von ACTH und Kortikosteron verhindert werden (FELDMAN & WEIDENFELD 1998, WEIDENFELD ET AL. 2005). Zudem wird die Amygdala von serotonergen Neuronen aus den dorsalen Raphe-Kernen und aus katecholaminergen Kerngebieten im Hirnstamm innerviert und umgekehrt projizieren auch Neurone aus der Amygdala in diese Gebiete (WEIDENFELD ET AL. 2002, CARRASCO & VAN DE KAR 2003, LUKKES ET AL. 2008). Weiterhin projizieren vom

PVN CRH-haltige Neurone zu noradrenergen Zellkörpern im Locus coeruleus, wo die Stress-induzierte SAM-Aktivierung kontrolliert wird (VAN DE KAR & BLAIR 1999). Diese Verbindung besteht wiederum auch in der Gegenrichtung, indem noradrenerge Verbindungen vom Locus coeruleus zum Hypothalamus existieren (GAILLET ET AL. 1991). Die Sekretion von ACTH wird damit von α - als auch β -adrenergen Rezeptoren reguliert (CARRASCO & VAN DE KAR 2003). Eine Verbindung vom PVN zu den dorsalen Raphe-Kernen verläuft allerdings nicht nur über die Amygdala, sondern es ziehen auch direkt serotonerge Neurone von den dorsalen Raphe-Kernen in den PVN, und es besteht außerdem eine direkte Verbindung zwischen den serotonergen, dorsalen Raphe-Kernen und dem noradrenergen Locus coeruleus (VAN DE KAR & BLAIR 1999, CARRASCO & VAN DE KAR 2003).

Neben CRH wird in den parvizellulären Neuronen des PVN auch Vasopressin produziert, das synergistisch mit CRH die Freisetzung von POMC-Produkten stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass chronischer Stress die Expression von Vasopressin im PVN und seine Sekretion steigert (CARRASCO & VAN DE KAR 2003). Vasopressin wird zusammen mit Oxytozin auch aus der Neurohypophyse sezerniert, die ebenfalls bedeutsame Einflüsse auf die HHN-Achse hat (ENGELMANN ET AL. 2004).

Die „Alarmreaktion“ der HHN-Achse wird durch einen negativen Feedback-Mechanismus vor allem durch die Konzentration der Kortikosteroide im Plasma kontrolliert, die sowohl zentral als auch auf Ebene der Hypophyse über Mineralokortikoid- (MR) und Glukokortikoid-Rezeptoren (GR) wirken (DE KLOET 2004). Es wird inzwischen angenommen, dass über diese Rezeptoren differenzierte Wirkungen auf das zentralnervöse Stresssystem ausgeübt werden können: Zum einen wird über MR die sofortige „Fight-and-flight“-Antwort auf CRH- und Sympathikus-Stimulation vermittelt, zum anderen kann diese Stressantwort durch die Plasma-Kortisolkonzentrationen über GR auch gehemmt werden (DE KLOET 2004). Bei chronischem Stress kann es dazu führen, dass dieser negative Feedback-Mechanismus gestört wird und es in der Folge zu einer überschießenden, ungehemmten Stressantwort kommt (SAPOLSKY 2000, SAPOLSKY ET AL. 2000, MIZOGUCHI ET AL. 2001).

Das Stresssystem wurde in einigen seiner Aspekte bereits auch beim Hund untersucht. Der negative Feedback-Mechanismus durch Plasma-Glukokortikoide auf die HHN-Achse wurde von KELLER-WOOD und Mitarbeitern studiert (KELLER-WOOD ET AL. 1983, KELLER-WOOD 1990). Außerdem ist bekannt, dass im caninen Stresssystem MR und GR existieren und dass ihre Expression altersabhängig verändert sein kann (REUL ET AL. 1991, ROTHUIZEN ET AL. 1993). Untersuchungen von SHA ET AL. (2004) erbrachten Einblicke in die Morphologie und Elektrophysiologie der Neurone im caninen PVN. Nicht zuletzt ist das serotonerge System des Hundes insbesondere im Zusammenhang mit Verhaltensstörungen wie Angst (VAN DEN BERG ET AL. 2003) oder Aggression (LENTZ 2000, JACOBS ET AL. 2007) von Interesse.

2.2 Stress und Immunsystem

Wenn der Organismus nicht in der Lage ist, mit einer adäquaten Stressantwort auf belastende oder bedrohliche Situationen zu reagieren, kann dies zu längerfristigen und letztendlich gesundheitsschädlichen physiologischen Veränderungen führen (KHANSARI ET AL. 1990, LADEWIG 1994). Nach SAM-Aktivierung erfolgt im Allgemeinen eine Verschiebung von Lymphozyten aus den lymphoiden Organen in den peripheren Kreislauf, um den Organismus widerstandsfähiger gegen Infektionen zu machen. Andererseits scheint die Wirkung der Glukokortikoide nach Aktivierung der HHN-Achse eher für eine Umlagerung der Lymphozyten in die Speicherorgane verantwortlich zu sein (LADEWIG 1994). Zwischen Immun- und Nervensystem bestehen enge Verbindungen und wechselseitige Kontrollmechanismen. Die Immunfunktion wird durch das autonome Nervensystem und von neuroendokrinen Produkten der Hypophyse beeinflusst (KHANSARI ET AL. 1990, MUNCK & GUYRE 1991, ELENKOV ET AL. 2000), wobei auch CRH eine zentrale Rolle spielt (IRWIN 2008). Umgekehrt wirken Hormone und Zytokine, die von aktivierten Zellen des Immunsystems freigesetzt werden, auf neuronale und endokrine Prozesse ein (KHANSARI ET AL. 1990, PERNA ET AL. 1997).

Einen Hinweis für dieses Zusammenwirken liefert z. B. die Möglichkeit eine immunologische Veränderung durch klassische (Pavlov'sche) Konditionierung hervorzurufen (ADER & COHEN 1993, ADER 2003). Solche Einwirkungen des Stresssystems auf Bereiche des Immunsystems werden durch nervale Versorgung von primären (Knochenmark, Thymus) und sekundären (Milz, Lymphknoten) lymphatischen Organen mit noradrenergen Nervenfasern ermöglicht (SCHEDLOWSKI & SCHMIDT 1996). Alle lymphatischen Organe und Leukozyten exprimieren zudem Rezeptoren für Kortikosteroide, insbesondere Glukokortikoide, die auf diesem Weg ihre vielfältigen, immunsuppressiven Wirkungen ausüben, wobei vor allem Lymphozytenfunktionen und -migration sowie Produktion und Sekretion von Zytokinen gehemmt werden (BLALOCK 1994, OTTAWAY & HUSBAND 1994, ELENKOV & CHROUSOS 2006).

Neben den Glukokortikoiden besitzen außerdem noch einige andere Stresshormone und Neurotransmitter immunmodulatorische Eigenschaften (KHANSARI ET AL. 1990, PADGETT & GLASER 2003). Eine Wirkung der Katecholamine auf immunologische Funktionen erfolgt z. B. über β -Adrenozeptoren auf verschiedenen Immunzellen (MADDEN ET AL. 1995, PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ 2000). Dies zeigten auch AYELLI-EDGAR ET AL. (2003), die bei Mäusen unter chronischem Stress eine Veränderung der Reaktivität von Lymphozyten auf Katecholamine fanden. Neuropeptide, wie Neuropeptid Y, Vasoaktives Intestinales Peptid oder Substanz P, sowie endogene Opioide, z. B. β -Endorphin, können Rezeptor-vermittelt stimulierende Effekte auf die primäre und sekundäre Antikörperantwort ausüben, oder eine Verstärkung der T-Zell-Proliferation sowie Veränderungen der zytotoxischen Aktivität der Natürlichen Killerzellen (NK) bewirken (SCHEDLOWSKI & SCHMIDT 1996).

Auch bei physischem Stress wirken Glukokortikoide und Katecholamine differenziert auf das Immunsystem (PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ 2000). Bei akuter Belastung wird im Allgemeinen eine Lymphozytose festgestellt, die auf einer Mobilisierung der Zellen aus dem Marginalpool, den Lymphknoten und der Milz beruht und katecholaminerg vermittelt wird. Dagegen zeigen sich Auswirkungen der Glukokortikoide vermehrt in langfristigen Belastungsphasen bzw. verzögert nach akuter Belastung in einer Lymphozytopenie aufgrund der Umverteilung von Immunzellen in lymphoide Gewebe oder andere Organe (MCCARTHY & DALE 1988, WEICKER & WERLE 1991, BRENNER ET AL. 1998). Diese Wirkungen der Stresshormone werden durch spezifische Rezeptoren auf den Immunzellen und deren Up- bzw. Down-Regulation vermittelt (PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ 2000). Bei körperlicher Belastung haben nicht nur die ausgeschütteten Stresshormone, sondern zudem auch muskuläre Veränderungen Effekte auf das Immunsystem, z. B. durch Zytokinfreisetzung bei Reparatur- und Abräumvorgängen (BAUM & LIESEN 1997).

Insgesamt kann Stress als „Eustress“ stimulierend oder als „Distress“ hemmend auf die Immunantwort wirken (DHABHAR & McEWEN 1997, DHABHAR 2000, MOBERG 2001). Eine Stärkung des Immunsystems kann vor allem bei akuten Stressoren beobachtet werden, während chronischer Stress überwiegend zu einer Dämpfung der Immunantwort führt (MILLAN ET AL. 1996, DHABHAR & McEWEN 1997, 1999). Veränderungen in der zellulären und humoralen Immunität nach Stresseinflüssen

müssen differenziert betrachtet werden (SILBERMAN ET AL. 2003). So kann akuter Stress eine mitogen-induzierte T-Zell-Proliferation (BAUER ET AL. 2001), T-Zell-abhängige Hypersensitivität vom verspäteten Typ (Delayed-type hypersensitivity, DTH) (DHABHAR & MCEWEN 1996) und eine T-Zell-abhängige und -unabhängige Antikörperproduktion (MILLAN ET AL. 1996) bewirken, aber auch zu einer Hemmung der Antwort auf T-Zell-abhängiges Antigen (ZALCMAN & ANISMAN 1993, MILLAN ET AL. 1996) führen. Dagegen scheint chronischer Stress eine Störung der zellulären Immunität (KUSNECOV & RABIN 1993, DHABHAR & MCEWEN 1997), eine Reduktion der mitogen-induzierten T-Zell-Proliferation (SILBERMAN ET AL. 2002) sowie eine geschwächte T-Zell-abhängige Antikörperantwort (FUKUI ET AL. 1997) zu verursachen. Bei Nagern können bei Anstiegen von Kortikosteroidkonzentrationen unter Stress Reduktionen der spezifischen Antikörperproduktion (FLESHNER ET AL. 1988, LAUDENSLAGER ET AL. 1988, JIANG ET AL. 1990, ZALCMAN ET AL. 1991) beobachtet werden.

Beim Hund besteht ein Tagesrhythmus in der Zusammensetzung der Blutleukozyten, mit einem Maximum an Neutrophilen am späten Nachmittag, maximalen Lymphozytenzahlen am späten Abend und ebenfalls einem abendlichen Maximalwert der Eosinophilen (LILLIEHOOK 1997). Während akutem Stress tritt bei Hunden eine generelle Leukozytose, Neutrophilie, Lymphopenie und Eosinopenie auf (KUHN ET AL. 1991, BEERDA ET AL. 1999). Ausführliche Übersichten über die Literatur geben WILHELM (2007) und PAULY (2007) in ihren Dissertationen. Ein Anstieg der Leukozytenzahl zeigte sich sowohl in der Arbeit von WILHELM (2007) als auch bei PAULY (2007) jeweils nach Belastung. BEERDA ET AL. (1999) fanden bei Hunden unter chronischem Stress in Form von sozialer und räumlicher Isolation sowohl ein erhöhtes Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis als auch eine reduzierte Lymphozytenproliferation. Die Autoren führten die Veränderungen in den peripheren Leukozytenzahlen aber eher auf immunologische Antworten gegenüber einer veränderten Antigenstimulation als auf Stresseffekte zurück (BEERDA ET AL. 1999). Bei einer Studie von CLARK ET AL. (1997) zeigte sich bei Hunden in Stresssituationen (Unterbringung im Zwinger, Training) eine Erniedrigung des B-Lymphozyten-Anteils und reduzierte Leukozytenzahlen bei gleichzeitig reduziertem Plasma-Kortisolspiegel.

2.3 Physiologische Parameter zur Beurteilung von Stress

Für die vorliegende Arbeit wurden mehrere Parameter ausgewählt, die die verschiedenen Aspekte der Stressantwort beleuchten sollen. Als Indikatoren für den Immunstatus wurden im Plasma die Immunglobuline IgG und IgA sowie als Vertreter der HCN-Achse die Steroidhormone Kortisol und Kortikosteron untersucht. Zusätzlich wurden als weitere mögliche Stressparameter die biogenen Amine und Mediatoren Serotonin und Histamin im Plasma analysiert sowie sIgA im Speichel bestimmt.

2.3.1 Immunglobuline im Plasma: IgG und IgA

Die Bindung von Antigenen durch Antikörper spielt im Immunsystem der Wirbeltiere eine überaus wichtige Rolle. Diese humoralen Antikörper, die Immunglobuline, werden von B-Lymphozyten bzw. den reifen Plasmazellen etwa 5 bis 7 Tage nach Stimulation gebildet und sezerniert (THEWS & VAUPEL 1997). Strukturell handelt es sich dabei um γ -Globuline, die immunoelektrophoretisch in fünf Klassen aufgetrennt werden können, die Immunglobuline IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (KOOLMANN & RÖHM 2003).

Das am häufigsten vorkommende Immunglobulin im Plasma ist das monomere IgG, das nach einer Infektion zwar verzögert, dafür aber in größeren Mengen produziert wird. Es führt in der Sekundärreaktion zur Opsonierung, Komplementaktivierung, Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität sowie zur Feedback-Hemmung von B-Lymphozyten (ABBAS ET AL. 2007).

Die Bedeutung des IgA liegt primär in der Infektabwehr an den Schleimhautoberflächen des Körpers. Während IgA im Plasma nur 15 bis 20 % des gesamten Immunglobulinpools ausmacht, stellt es das Hauptimmunglobulin des sog. Mukosa-assoziierten Immunsystems (mucosa associated lymphoid tissue, MALT) dar (MESTECKY ET AL. 1986, MESTECKY 1993). Dabei handelt es sich um Lymphfollikel in den Schleimhäuten von Respirations-, Urogenital- und Magen-Darm-Trakt oder diffus in der Lamina propria verteilten Lymphozyten. Im MALT liegt IgA zu ca. 96 % in seiner sekretorischen Form als dimeres sIgA vor (BRANDTZAEG 2007). Antigene, die auf die Schleimhautoberfläche auftreffen, werden zunächst durch sog. M-Zellen

aktiv aufgenommen. Über einen T-Zell-abhängigen Prozess kommt es im weiteren Verlauf zu einer Stimulierung IgA-geprägter B-Vorläuferzellen, die über die efferente Lymphe das MALT verlassen ohne dabei Antikörper zu produzieren. Nach Einschleusung in die Zirkulation siedeln sie sich in den verschiedenen sekretorischen Geweben, z. B. auch den Speicheldrüsen an. Erst am Zielort beenden sie ihre Differenzierung und beginnen mit der Produktion der für die Erreger spezifischen IgA-Moleküle (LEONHARDT 1990). Die für das MALT typischen Eigenschaften wurden auch bei Hunden nachgewiesen und untersucht (SNOECK ET AL. 2006, STOKES & WALY 2006).

Mehrere Studien untersuchten beim Menschen Plasma- oder Serum-Konzentrationen von Immunglobulinen unter Einfluss von Stress und kamen dabei auf uneinheitliche Ergebnisse. NIEMAN & NEHLSSEN-CANNARELLA (1991) fanden nach submaximaler, akuter Belastung einen Anstieg der Serum-Immunglobulinkonzentrationen. Dieser wurde vor allem auf Volumenverschiebungen zurückgeführt, wohingegen moderate, akute Belastungen mit tatsächlichen Anstiegen der Immunglobulinspiegel im Serum in Verbindung gebracht werden konnten. Auch NEHLSSEN-CANNARELLA ET AL. (1991) untersuchten die Effekte von moderatem, akutem Training auf Serum-Immunglobuline und fanden dabei einen signifikanten Anstieg von IgG sowie eine leichte Erhöhung von IgA nach Belastung. Als Ursache für diese Erhöhungen wurden sowohl eine Umverteilung aus dem extravaskulären Pool als auch eine unspezifische Stimulation von B-Lymphozyten diskutiert (NEHLSSEN-CANNARELLA ET AL. 1991). Dagegen wurde von reduzierten Antikörperkonzentrationen beim Menschen z. B. nach Marathonläufen berichtet, was durch Übergang von IgA und IgG in sekretorische Flüssigkeiten des Atemtrakts erklärt wurde (NIEMAN & NEHLSSEN-CANNARELLA 1991). MACKINNON (2000) stellte nur geringe Effekte von Training auf Serum- und Schleimhaut-Immunglobulinkonzentrationen fest, die jedoch bei steigender Intensität des Trainings deutlicher wurden und sich in einer Reduktion der Konzentrationen zeigten. Eine signifikante Reduktion von Serum-IgG und -IgA fanden BØYUM ET AL. (1996) unter einer chronischen Stressbedingung in Form von anstrengender körperlicher Belastung, Kaloriendefizit und Schlafentzug.

Aus Studien mit Versuchspersonen geht hervor, dass der Einfluss von Stress auf die Immunglobulinkonzentrationen im Blut von Dauer, Intensität und Typ des Stressors

abhängig zu sein scheint. Dies zeigte sich auch in Untersuchungen an Tieren. Unter physischem Stress wurde bei Ratten eine Verstärkung der Immunfunktion in Form einer Erhöhung der IgG- und IgM-Konzentrationen beobachtet (KAUFMAN ET AL. 1994). SILBERMAN ET AL. (2003) diskutierten eine vermehrte IgG-Produktion nach akutem Stress gegenüber einer verminderten nach chronischen Stressoren.

Seit Ende der 1960ern werden Immunglobuline in caninem Serum und verschiedenen sekretorischen Flüssigkeiten untersucht (VAERMAN & HEREMANS 1968, 1969, REYNOLDS & JOHNSON 1970). In einer ausführlichen, neueren Studie verglichen GERMAN ET AL. (1998) bei Hunden IgG-, IgA- und IgM-Konzentrationen in Serum, Speichel, Tränen und Gallenflüssigkeit und konnten dabei keine signifikante Korrelation zwischen den Serum- und Sekret-Immunglobulinkonzentrationen nachweisen. Die Autoren kamen daher zu dem Schluss, dass Serum-Immunglobulinkonzentrationen beim Hund keine Prognose für ihre muköse Sekretion zulassen. Zudem fanden sie, dass signifikante intra-individuelle Variationen in sekretorischen Immunglobulinspiegeln bestanden, die nicht auf Probengewinnungstechniken zurückgeführt werden konnten. In dieser Studie betragen die mittleren Serum-IgG- und Serum-IgA-Konzentrationen für adulte Hunde 17,2 g/l bzw. 1,0 g/l (GERMAN ET AL. 1998). Bei WILLARD & TVEDTEN (2006) werden als Referenzwerte für adulte Hunde 9,3 bis 14,5 g/l für IgG sowie 0,79 bis 0,83 g/l für IgA angegeben. PAULY (2007) untersuchte im Rahmen ihrer Arbeit unter anderem auch den Einfluss von Stress auf die Plasma-IgG-Konzentration bei Diensthunden und fand während einer 4-wöchigen Trainingsphase ansteigende IgG-Konzentrationen von 14,5 auf 18,0 g/l (PAULY 2007). Der Anstieg wurde als Resultat einer erhöhten Antigenstimulation des Immunsystems durch die neue Umgebung und der damit verbundenen unbekanntenen Keimflora interpretiert (PAULY 2007).

2.3.2 Steroidhormone im Plasma: Kortisol und Kortikosteron

Die aufgrund ihrer vielfältigen Effekte für die Stressreaktion wichtigsten Steroidhormone sind Kortisol und Kortikosteron, wobei das Verhältnis der beiden Substanzen tierartlich unterschiedlich ist. Es wird allgemein angenommen, dass bei Mensch, Schwein, Rind und auch dem Hund Kortisol in größerer Menge sezerniert wird, während bei Kaninchen, Maus und Ratte Kortikosteron das vorherrschende Kortikosteroid ist (BUSH 1953, KOLB 1993, THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE 1994). Steroidhormone werden von der Nebennierenrinde aus Cholesterol synthetisiert, wobei das Glukokortikoid Kortisol in der Zona fasciculata und das Mineralokortikoid Kortikosteron in der Zona glomerulosa gebildet wird. Während die Sekretion der Glukokortikoide durch ACTH kontrolliert wird, werden die Mineralokortikoide hauptsächlich über das Renin-Angiotensin-System reguliert (THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE 1994, VOIGT 2003). Im Blutkreislauf werden 70 bis 80 % der Glukokortikoide an ein α 1-Globulin (Corticosteroid-bindendes Globulin, CGB, Transkortin) und 10 bis 15 % an Albumin gebunden (THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE 1994, GAYRARD ET AL. 1996). Dies gilt auch für die Mineralokortikoide, wobei allerdings deren Bindung an die Proteine weniger stark ist (VOIGT 2003). Der biologisch aktive freie Hormonanteil wird durch die Sekretionsrate, die Konzentration der Bindungsproteine, die Stoffwechselrate und die Ausscheidungsintensität bestimmt (THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE 1994). Ungebundenes Kortisol kann aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften gut durch Zellmembranen diffundieren und auf diesem Weg auch in den Speichel übertreten, so dass sich dort eine Konzentration einstellt, die etwa 10 % der Plasma-Konzentration entspricht und mit dieser linear korreliert ist (VINCENT & MICHELL 1992, BEERDA ET AL. 1996).

Alle Steroidhormone bilden mit zytoplasmatischen Rezeptoren einen Hormon-Rezeptor-Komplex, der im Zellkern an die DNA bindet und dort die Transkription und damit die Protein- und Enzymsynthese aktiviert (ECKERT 2002). Auf diesem Weg beeinflussen sie den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel und bewirken in Notfallsituationen die schnelle Bereitstellung von Energie an Gehirn und Herz (THEWS & VAUPEL 1997). Nach ihrer Freisetzung in Stresssituationen wirken Steroidhormone in einem Feedback-Mechanismus wiederum hemmend auf das zentralnervöse

Stresssystem (vgl. Kapitel 1.1). Die immunsuppressive Wirkung der Glukokortikoide wurde bereits in Kapitel 1.2 dargestellt.

Kortikosteroide gelten als „klassische“ Parameter für die Bewertung eines Stressors, da im Allgemeinen ein direkter Zusammenhang zwischen der Dauer und Intensität eines Stressors und den Auswirkungen auf die Plasma-Glukokortikoidkonzentration zu beobachten ist (MANSER 1992). Allerdings zweifeln manche Autoren an dieser Aussagekraft, weil sich die Ergebnisse der verschiedenen Studien zur Erfassung von Stress bei Tieren über die HHN-Achse nicht immer erwartungsgemäß kongruent darstellen (RUSHEN 1991). Zudem bleiben Stress-induzierte Veränderungen in Plasma-Glukokortikoidkonzentrationen nur kurze Zeit bestehen, so dass eine Aussagekraft bei langfristigen Stresssituationen zweifelhaft ist (MANSER 1992).

In Untersuchungen über Stress bei Hunden wird häufig Kortisol im Plasma bzw. Serum (ASSIA ET AL. 1989, PALAZZOLO & QUADRI 1987A, KNIES 2005, PAULY 2007), Speichel (VINCENT & MICHELL 1992, BEERDA ET AL. 1996, KÖHLER 2004, WUST 2006, PAULY 2007, WILHELM 2007), Kot (MÖSTL & PALME 2002, PALME ET AL. 2005) oder Urin (BEERDA ET AL. 1996, STEPHEN & LEDGER 2006, ROONEY ET AL. 2007) als physiologischer Parameter zur Bewertung der Stressbelastung herangezogen. Als Normwerte für Plasma-Kortisol beim Hund sind Konzentrationen zwischen 41 bis 179 nmol/l anzusehen (KRAFT & DÜRR 2005), wobei in verschiedenen Studien auch höhere oder niedrigere Ruhewerte angegeben werden (zur Übersicht siehe PAULY 2007). Beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen sind allerdings unterschiedliche Analysemethoden und interindividuelle Variationen zu berücksichtigen. Als psychische Stressoren werden z. B. Transportstress (KUHN ET AL. 1991, BERGERON ET AL. 2002, BEERDA ET AL. 1997), wechselnde Haltungsbedingungen (TUBER ET AL. 1996, CLARK ET AL. 1997, HENNESSY ET AL. 2001, ROONEY ET AL. 2007), soziale Isolation (BEERDA ET AL. 1999), Zwangsmaßnahmen (BEERDA ET AL. 1997, 1998) oder Lärmexposition (BEERDA ET AL. 1997, 1998, KIKKAWA ET AL. 2003) eingesetzt. Andere Studien untersuchten in erster Linie physischen Stress bei Hunden. So unterzogen z. B. HINCHCLIFF ET AL. (1993), KÖHLER (2004), KNIES (2005), WUST (2006) und WILHELM (2007) Hunde einer Laufbelastung, PALAZZOLO & QUADRI (1987A) sowie ASSIA ET AL. (1989) setzten Hunde verschiedenen Umgebungstemperaturen aus und BEERDA ET AL. (1998) sowie STICHNOTH (2002)

behandelten Hunde mit Elektroschocks. In den meisten Studien konnte ein Kortisol-Peak nach Setzen des Stressreizes beobachtet werden. Schließlich kann Stress auch durch chemische Stimulation der HHN-Achse simuliert werden, und sowohl ACTH-Stimulation als auch Hypoglykämie führen zu Anstiegen in den Speichel- und Plasma-Kortisolwerten (KELLER-WOOD ET AL. 1981, VINCENT & MICHELL 1992, KOLB 1993).

Wie bereits von KÖHLER (2004), KNIES (2005), WUST (2006), WILHELM (2007) und PAULY (2007) in deren Arbeiten ausführlich dargestellt, besteht in der Literatur keine Einigkeit darüber, welchen Einfluss das Alter oder das Geschlecht auf die Kortisolkonzentration ausüben. Widersprüchlich sind auch Studien zur Klärung der Frage, ob die Kortisolsekretion beim Hund wie beim Menschen und anderen Tierspezies einen zirkadianen Rhythmus aufweist. Das Vorhandensein der zirkadianen Rhythmik des Kortisolspiegels beim Hund wird von einigen Autoren bestätigt (PALAZZOLO & QUADRI 1987B, KOLEVSKA ET AL. 2003), wohingegen andere keine tagesrhythmische Veränderung in der Kortisolausschüttung feststellen konnten (THUN ET AL. 1990, KOYAMA ET AL. 2003, KNIES 2005). Manche Autoren berichten von einer episodischen Ausschüttung, die zu mehreren Kortisol-Peaks am Tag führen soll (KEMPPAINEN & SARTIN 1984, ORTH ET AL. 1988, BENTON & YATES 1990). Da bereits die Freisetzung von ACTH aus der Hypophyse episodisch erfolgt, kann auch ein episodischer Verlauf der Kortisolkonzentration angenommen werden (LADEWIG 1994, THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE 1994).

Im Gegensatz zu Kortisol ist über Kortikosteron beim Hund nur wenig bekannt, da in der verfügbaren Literatur allgemein davon ausgegangen wird, dass Kortisol das bedeutendere Steroidhormon ist. Laut älteren Untersuchungen kann das Verhältnis von Kortisol zu Kortikosteron beim Hund 3:1 (HECHTER ET AL. 1955) bzw. laut BUSH (1953) bis zu 6:1 betragen. In einer Veröffentlichung von BECKER ET AL. (1976) gibt es Hinweise auf eine Streuung von 20:1 bis hin zu umgekehrten Verhältnissen mit 0,3:1. Bei KUHN ET AL. (1991) finden sich Angaben zur Reaktion des Plasma-Kortikosteronspiegels auf Transportstress mit mittleren Werten von 1 bis 10 ng/ml (etwa 3 bis 30 nmol/l). Der Verlauf der Plasma-Kortikosteronkonzentration entsprach dabei derjenigen des Plasma-Kortisolspiegels, so dass hier von ähnlichen Wirkungen der beiden Steroidhormone ausgegangen werden kann.

2.3.3 Histamin im Plasma

Als klassischer Entzündungsmediator wird das biogene Amin Histamin (2-[Imidazol-4-yl]ethylamin) bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts untersucht (MAŚLIŃSKI 1975A). Ab 1970 wurden vermehrt Hinweise darauf gefunden, dass Histamin auch im ZNS eine Rolle als Neurotransmitter übernehmen könnte (SCHWARTZ ET AL. 1980), bis schließlich PANULA ET AL. (1984, 1985) und WATANABE ET AL. (1984) der Nachweis von histaminergen Neuronen im Gehirn gelang.

Histamin wird in Mastzellen, verschiedenen Leukozytentypen, Thrombozyten, enterochromaffinen Zellen und histaminergen Neuronen produziert und gespeichert (PANULA ET AL. 1984, 1985, MAŚLIŃSKI 1975A, 1975B, BARNES 2001). Im ZNS kommen histaminerge Neurone vor allem im tuberomamillären Nukleus vor und projizieren von dort in verschiedene Gehirnareale (PANULA ET AL. 1984, WATANABE ET AL. 1984). Zudem befinden sich im Gehirn Mastzellen, die nach Stress-induzierter CRH-Stimulation degranulieren und Histamin freisetzen können (THEOHARIDES ET AL. 1995). Allerdings kann dieses Histamin nicht durch die Blut-Hirn-Schranke in die Peripherie übertreten (MAŚLIŃSKI 1975A). In der Peripherie stimuliert Histamin aus Mastzellen oder Neuronen als Mediator sympathische Ganglien (PANULA ET AL. 1985), kann aber auch zur Sekretion von Kortikosteroiden aus der Nebennierenrinde führen (AIKAWA ET AL. 1986). Die Freisetzung von Histamin aus Granulozyten oder Thrombozyten erfolgt nach Stimulation durch z. B. IgE, Zytokinen oder Substanz P (BACHERT 2002). Durch Kortikosteron wird bei Ratten die Histaminfreisetzung aus Mastzellen sehr schnell gehemmt, wodurch Kortikosteroide einen antiallergischen Effekt ausüben können (LIU ET AL. 2007).

Von einer Beteiligung des Histamins an der Aktivierung der HHN-Achse kann ausgegangen werden, da Histamin sowohl die ACTH- als auch die Kortisolsekretion stimuliert (KNIGGE ET AL. 1983). Nach ENDOU ET AL. (2001) stehen Histaminrezeptoren im Hypothalamus in Verbindung mit Stress-induzierter Gehirnaktivität, wobei die Histaminrezeptordichte während akutem und chronischem Stress variiert und der zentrale Histaminspiegel sowie die Histaminsynthese während akutem Stress erhöht sind. ITO ET AL. (1999) beobachteten bei Ratten nach akutem und chronischem „restraint stress“ einen Anstieg der zentralnervösen Histaminkonzentration.

Bei Versuchspersonen trat nach akuter physischer Belastung eine Erhöhung des Blut-Histaminspiegels bei gleichzeitiger SAM-Aktivierung auf (CAMPOS ET AL. 1999). AYADA ET AL. (2000) fanden bei Mäusen unter Stress und körperlicher Belastung einen Anstieg der Histidindecaboxylase-(HDC)-Aktivität im Skelettmuskel und diskutierten eine Freisetzung von Mastzell-Histamin bei Muskelschäden, was zu einer Erhöhung der Blut-Histaminkonzentration während starker physischer Belastung geführt haben soll. Zu einem Anstieg der Histaminkonzentration im Blut von Ratten kam es in Abhängigkeit von der Aktivierung postganglionärer sympathischer Neurone sowohl nach Bewegungs-induziertem Stress als auch nach „Footshock“-Versuchen (ENDO ET AL. 1998, CAMPOS & MONTENEGRO 1998). Eine Stress-induzierte biphasische Erhöhung der Plasma-Histaminkonzentration stellten HUANG ET AL. (1998) bei Studien mit Ratten fest, wobei eine initial akute, vierfache Erhöhung auf Mastzelldegranulation zurückzuführen war und der später langsamer verlaufende Anstieg die Histaminfreisetzung aus enterochromaffinen Zellen widerspiegelte (HUANG ET AL. 1998).

KNIES (2005) untersuchte in ihrer Dissertation den Einfluss von Stress auf die Plasma-Histaminkonzentration von Labor- und Rettungshunden (siehe auch AHRENS ET AL. 2005 und KNIES ET AL. 2005). Dabei konnten aber weder signifikante Stress-induzierte Veränderungen der Plasma-Histaminkonzentrationen noch Korrelationen mit der Plasma-Kortisolkonzentration nachgewiesen werden. Als durchschnittliche Histaminkonzentration im Hundeplasma wurden Werte von 3,6 nmol/l (LORENZ 1973) bis zu 24,2 nmol/l (KNIES 2005) gemessen. Aus der Literatur ist nicht eindeutig zu entnehmen, ob die Plasma-Histaminkonzentration von Geschlecht oder Alter beeinflusst wird. Hinweise auf eine tagesrhythmische Variation der Plasma-Histaminkonzentration konnte KNIES (2005) in ihrer Arbeit ebensowenig finden.

2.3.4 Serotonin im Plasma

Das biogene Amin Serotonin (5-Hydroxytryptamin), das aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan synthetisiert wird, kommt neben Histamin als Entzündungsmediator in der Peripherie häufig vor. Es befindet sich im Blut zu 99 % in den Thrombozyten und nur zu 1 % frei im Plasma sowie in der glatten Muskulatur und dem autonomen Nervensystem des Gastrointestinaltrakts (RIEDERER & YODIM 1990, THOMPSON 2001). Über parakrine Modulation kann Serotonin in der Peripherie die Hormonfreisetzung aus der Nebennierenrinde steuern (LEFEBVRE ET AL. 1998). Außerdem ist es in die Kommunikation zwischen Nerven- und Immunsystem involviert, denn auch auf der Oberfläche von Immunzellen wurden Serotoninrezeptoren und -transporter gefunden und in pathophysiologischen Konzentrationen kann Serotonin zu T-Zell- und NK-Aktivierung, DTH-Antworten, Produktion von chemotaktischen Faktoren sowie der Induktion von Makrophagenaktivität führen (MÖSSNER & LESCH 1998).

Von größerer Bedeutung ist die Funktion des Serotonins als zentraler Neurotransmitter (zur Übersicht siehe JØRGENSEN 2007). Im Gehirn liegen die Somata der serotonergen Neurone in den Raphe-Kernen, die sich im Hirnstamm als schmales Band von der Medulla oblongata zum Mittelhirn erstrecken. Ihre Axone projizieren in die verschiedenen Bereiche des Gehirns und zum Rückenmark (THOMPSON 2001). Serotonin ist über verschiedene Rezeptorsubtypen an der ACTH-Ausschüttung beteiligt. So wurde u. a. nachgewiesen, dass über die Serotoninrezeptoren 5-HT_{1A}, 5-HT_{1C}, 5-HT₂, 5-HT_{2C} und 5-HT₃ die HHN-Achse stimuliert werden kann (OWENS ET AL. 1990, CALOGERO ET AL. 1993, 1995). Zudem interagieren serotonerge Neurone wechselseitig mit CRH-Neuronen (KIRBY ET AL. 1999, HAMMACK ET AL. 2002, PEÑALVA ET AL. 2002, HANLEY & VAN DE KAR 2003, LUKKES ET AL. 2008).

Die Einflüsse von körperlicher Aktivität, d. h. physischem Stress, auf das serotonerge System sind gut untersucht. So wurde regelmäßig ein Anstieg der Serotoninkonzentration im Gehirn von Ratten nach akuter, motorischer Belastung beobachtet (MEEUSEN ET AL. 2001). Diese Erhöhung erfolgt indirekt über eine Steigerung der zentralnervösen Tryptophanverfügbarkeit sowie über Veränderungen der Serotoninrezeptordichte und einer gesteigerten Serotoninfreisetzung (CHAOULOFF

1997). Da Serotonin wie auch Histamin die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann (BULAT & SUPEK 1967), ist umstritten, in welchem Maß der periphere Plasma-Serotoninspiegel Rückschlüsse auf die zentrale serotonerge Aktivität zulässt.

LENTZ (2000) untersuchte Serotoninkonzentrationen bei verhaltensunauffälligen und dominanzaggressiven Hunden und konnte dabei keine Korrelation zwischen Blut- und Liquorkonzentrationen feststellen. Als Serum-Konzentration bei nicht-aggressiven Hunden wurden hier durchschnittlich 69,5 bis 428,4 ng/ml (ca. 0,4 bis 2,5 nmol/l) gemessen, wohingegen im Plasma keine messbaren Konzentrationen nachweisbar waren. Die Autorin fand einen Abfall der Serum-Serotoninkonzentrationen am späten Abend, während sie Einflüsse von Alter oder Geschlecht auf die Serotoninkonzentration weder ausschließen noch bestätigen konnte (LENTZ 2000).

2.3.5 *slgA im Speichel*

Bei den Speicheldrüsen handelt es sich um exokrine Drüsen, deren Epithelzellen am basalen Ende aus der Zwischenzellflüssigkeit Substanzen aufnehmen und an der freien Oberfläche Sekret in ein Lumen abgeben. Die Sekretbildung erfolgt in diesem Fall diskontinuierlich auf auslösende Reize und die Sekretion über merokrine Extrusion (Krinozytose, ekkrine Extrusion) (LEONHARDT 1990, ECKERT 2002). Beim Hund kommen kleine Speicheldrüsen (Glandulae (Gll.) salivariae minores), die über die gesamte Schleimhaut der Mundhöhle verteilt sind sowie die großen Speicheldrüsen wie die Glandula (Gl.) parotis (Ohrspeicheldrüse), Gl. mandibularis (Unterkieferdrüse) oder die Gll. sublinguales (Unterzungendrüsen) vor (THOMÉ 2004). Letztere sezernieren teils seröses dünnflüssiges, teils muköses zähflüssiges und schleimiges Sekret und liefern Verdünnungs- bzw. Gleitspeichel. Alle großen Speicheldrüsen sind sowohl sympathisch als auch parasympathisch innerviert. Je nach Konzentrationsverhältnis der beiden Transmitter Noradrenalin und Acetylcholin in der Nähe der Azinuszellen ändert sich Menge und Zusammensetzung des Speichels. Adrenerge Stimulation führt im Gegensatz zu cholinergem Stimulation zu einer erhöhten Ausscheidung von Glykoproteinen, Amylasen und Saccharidmolekülen. Unstimulierter Gesamtspeichel oder Ruhespeichel wird ohne

mechanische, sensorische oder psychogene Reize gebildet und kontinuierlich abgesondert (ECKERT 2002, YOUNG ET AL. 2003).

Im Gegensatz zur passiven Diffusion von Kortisol in den Speichel beruht die Bildung von sIgA in exokrinen Drüsen und mukösen Membranen auf einer Kooperation zwischen lokalen Plasmazellen, die polymeres IgA (pIgA, v.a. Dimere) produzieren, und Epithelzellen, die den polymerischen Ig-Rezeptor exprimieren, der auch als transmembranöse sekretorische Komponente (SC) bezeichnet wird. Nach der Freisetzung von lokalen Plasmazellen und Diffusion durch das Stroma, wird pIgA an SC gebunden und dann als sIgA aktiv durch die sekretorischen Epithelzellen transportiert, um von dort in Sekrete freigesetzt zu werden (RICKS ET AL. 1970, BRANDTZAEG 2007). Bei diesem Prozess handelt es sich somit um eine aktive, Rezeptor-vermittelte epitheliale Transzytose.

Beim Mensch wird zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Stress und dem Immunsystem häufig Speichel-sIgA als zuverlässiger Parameter, der nicht-invasiv gewonnen werden kann, genutzt. So wurden sowohl bei akuter psychischer (DEINZER & SCHULLER 1998, DEINZER ET AL. 2000) als auch physischer Anstrengung (TOMASI ET AL. 1982) reduzierte sIgA-Konzentrationen im Speichel von Versuchspersonen nachgewiesen. Nach langfristigen, körperlichen Belastungen zeigte sich die Speichel-sIgA-Konzentration ebenfalls meistens reduziert (MACKINNON & JENKINS 1993, MACKINNON ET AL. 1993, MACKINNON & HOOPER 1994, NIEMANN ET AL. 2002) und auch bei chronischem psychischem Stress konnten niedrige sIgA-Konzentrationen gemessen werden (GRAHAM ET AL. 1988). Allerdings gab es auch Studien, die sowohl nach akutem Stress (WILLEMSSEN ET AL. 1998, WALSH ET AL. 2002, LAING ET AL. 2005) als auch bei langfristigen Belastungen (AKIMOTO ET AL. 2003) Anstiege der sIgA-Konzentrationen fanden. Um diese Studien vergleichen zu können, müssen die Einflussfaktoren auf die Speichel-sIgA-Konzentration bekannt sein. So fanden HUCKLEBRIDGE ET AL. (1998) eine Abhängigkeit von der Tageszeit und MILETIC ET AL. (1996) vom Alter der Versuchspersonen. Auch die körperliche Fitness scheint eine Rolle zu spielen (NEHLSSEN-CANNARELLA ET AL. 2000).

Die Mechanismen, die zu Veränderungen in sIgA-Konzentrationen nach Belastung führen, sind noch nicht vollständig geklärt, scheinen aber je nach Stressor von

verschiedenen Stressreaktionen (HHN-Achse, SAM-Aktivierung) vermittelt werden zu können (HUCKLEBRIDGE ET AL. 1998, WINZER ET AL. 1999, RING ET AL. 1999). Vor allem Untersuchungen an Ratten konnten hier einigen Aufschluss geben und weisen sehr deutlich auf eine Beteiligung des sympathischen Nervensystems bei der Regulierung der sIgA-Sekretion hin (CARPENTER ET AL. 1998, 2004, 2005, PROCTOR ET AL. 2003).

Beim Hund haben bisher nur wenige Studien Speichel-sIgA als Stressparameter untersucht. Darum sind Referenzwerte für sIgA-Konzentrationen und diverse Einflussfaktoren beim Hund noch weitgehend unbekannt. HEDDLE & ROWLEY (1975) fanden im Speichel von Hunden sIgA-Konzentrationen von 0,17 bis 1,25 g/l. In einer ersten Studie zur Frage eines möglichen Zusammenhangs zwischen Stressbelastung und der Speichel-sIgA-Konzentration beim Hund berichteten SKANDAKUMAR ET AL. (1995), dass die sIgA-Konzentrationen bei Polizeihunden nach Training oder bei veränderten Umweltbedingungen reduziert waren. Zudem stellten sie fest, dass ein Abfall der sIgA-Konzentration mit steigendem Stress und einer Erhöhung der Speichel-Kortisolkonzentration assoziiert war (SKANDAKUMAR ET AL. 1995). Damit wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen Langzeitstress und der sIgA-Konzentration beim Hund nachgewiesen. In der Folge untersuchten KIKKAWA ET AL. (2003) die sIgA-Tagesverläufe sowie mögliche Einflussfaktoren auf sIgA-Konzentrationen bei Laborhunden (Beaglen). Sie dokumentierten ein konsistentes Tagesmuster der Speichel-sIgA-Konzentration mit niedrigen Werten am Morgen, einem Peak um die Mittagszeit und einem Abklingen am Nachmittag. Wie schon GERMAN ET AL. (1998) fanden auch KIKKAWA ET AL. (2003) eine Tag-zu-Tag-Variation in den Speichelproben, wobei vor allem der Peak zur Mittagszeit und der nachmittägliche Abfall variierten. Die Konzentrationen zwischen 8 und 9 Uhr morgens blieben von Tag zu Tag weitgehend konstant (0,5 bis 1,0 g/l) und stellten somit nach Ansicht von KIKKAWA ET AL. (2003) einen möglichen Normbereich für die Speichel-sIgA-Konzentration bei Laborhunden dar. Außerdem nutzten KIKKAWA ET AL. (2005) die sIgA-Konzentration im Speichel als Marker für die Einsatzfähigkeit eines Hundes als Blindenführhund. Niedrige Konzentrationen wurden hier als Zeichen für Stress interpretiert, höhere Konzentrationen dagegen als Indikator für eine bessere Anpassungsfähigkeit an wechselnde Bedingungen.

3. FRAGESTELLUNG

Die Beurteilung von Stresszuständen ist beim Tier schwierig, weil die Bestimmung von physiologischen Stressparametern mehr oder weniger invasiv erfolgen muss und selbst bereits ein Stressreiz sein kann. Das Stresssystem stellt ein komplexes Netzwerk zwischen Nerven-, Hormon- und Immunsystem dar und verschiedene Neurotransmitter und Hormone können als Marker für seine Aktivierung dienen. Zwei zentrale Mechanismen im Stressgeschehen sind die Aktivierung der HHN-Achse mit den Effektorhormonen Kortisol und Kortikosteron sowie des sympathischen Nervensystems und der Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark. Beide Systeme stehen in enger wechselseitiger Beziehung mit dem Immunsystem und beeinflussen somit langfristig das Wohlbefinden und die Gesundheit des Tieres.

Arbeitshunde sind im Training sowie im Einsatz häufig großen körperlichen und psychischen Belastungen ausgesetzt. In den bereits am Institut vorgelegten Dissertationen von WUST (2006), WILHELM (2007) und PAULY (2007) wurden Rettungs- bzw. Diensthunde unter verschiedenen Belastungsbedingungen untersucht. Die vorliegende Arbeit wurde sowohl aufbauend auf diesen Studien als auch ergänzend zu ihnen durchgeführt. Bei WUST (2006) waren Rettungshunde einer mittelfristigen Belastung mit zwei 20-minütigen Suchübungen pro Versuchstag und mehrtägigen Pausen zwischen den einzelnen Übungen auf verschiedenen Geländeformen ausgesetzt. Speichelproben dieser Hunde wurden in der vorliegenden Arbeit auf sIgA untersucht. In der von WILHELM (2007) beschriebenen Studie absolvierten Rettungshunde über einen 3-tägigen Versuchszeitraum täglich vier 20-minütige Suchen. Dieser Versuchsaufbau stellte eine langfristige und intensivere Belastung dar. Von den hier eingesetzten Hunden wurden Plasmaproben auf Immunglobuline (IgG und IgA), Kortikosteroide (Kortisol und Kortikosteron) und biogene Amine (Histamin und Serotonin) analysiert. Zudem wurde sIgA im Speichel bestimmt. PAULY (2007) beobachtete Diensthunde in einer 4-wöchigen Ausbildungsphase zum Wach- und Begleithund und untersuchte jeweils in der ersten und vierten Woche die Belastung der Hunde während einer 3-minütigen Schutzdienstübung. Hier war einerseits eine kurzfristige, sehr intensive, physische Belastung gegeben, andererseits konnten aber über den gesamten

Versuchszeitraum zusätzlich auch chronische Stresswirkungen erfasst werden. Für die vorliegende Arbeit wurde sIgA in den Speichelproben dieser Hunde gemessen.

Die ausgewählten Untersuchungsparameter sollten die verschiedenen Aspekte einer möglichen Stressantwort beleuchten. Die Plasma-Konzentrationen von IgG und IgA wurden als Indikatoren für die Beeinträchtigung des Immunsystems gewertet. Die Plasma-Kortikosteroide Kortisol und Kortikosteron wurden zur Beurteilung der Stresswirkung auf die HHN-Achse untersucht. Außerdem sollten die biogenen Amine und Mediatoren Serotonin und Histamin auf ihre Tauglichkeit als Stressparameter überprüft werden. Im Speichel wurde sIgA bestimmt, welches zum einen Rückschlüsse auf Veränderungen im Immunsystem zulässt, zum anderen einen Hinweis auf die Auslösung von Stressreaktionen (HHN-Achse, SAM-Aktivierung) liefern könnte.

4. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

4.1 Hunde, Versuchsaufbau und untersuchte Parameter

4.1.1 *Belastung von Rettungshunden bei Suchübungen auf verschiedenen Geländeformen (Experiment 1)*

Das erste Experiment (Exp 1) wurde 2005 im Rahmen der Dissertationsarbeit von WUST (2006) durchgeführt. Es wurde dabei an jeweils einzelnen Tagen auf drei verschiedenen Höhenlagen (600 m, 1600 m und 2600 m über dem Meeresspiegel) und auf zwei verschiedenen Geländeformen (alpine Flächensuche im dichten Bewuchs und alpine Trümmersuche) gearbeitet. Die Übungen auf 600 m fanden in den Monaten Mai bis November statt, in den Monaten Juni bis Oktober wurden die Suchen auf 1600 m und in den Monaten August und September auf 2600 m abgehalten. Insgesamt absolvierte jeder Hund fünf verschiedene Übungen: alpine Flächensuchen im dichten Bewuchs wurden auf 600 m und 1600 m durchgeführt (Übung 1: Bewuchs 600 m, Übung 2: Bewuchs 1600 m), während alpine Trümmersuchen auf allen drei Höhenlagen statt fanden (Übung 3: Trümmer 600 m, Übung 4: Trümmer 1600 m, Übung 5: Trümmer 2600 m).

Hunde

An der Studie nahmen 19 Rettungshunde mit ihren Hundeführern teil. Die Teams gehörten der Suchhundestaffel des Salzburger Roten Kreuzes, der Lawinenhundestaffel der Bergwacht Bayern (Abschnitt Allgäu, Chiemgau und Hochland) und dem Technischem Hilfswerk Garmisch Partenkirchen an. Unter den Hunden waren sieben Deutsche Schäferhunde (DSH), zwei Border Collies und jeweils ein Labrador Retriever, Magyar Vizsla, Chesapeake Bay Retriever, Shapendoe, Golden Retriever, Labrador-Mischling, Hovawart-Mischling, Malinois, DSH-Mischling und Appenzeller-Mischling. Die Hunde wurden in drei Altersgruppen eingeteilt. Der Altersgruppe „jung“ wurden die unter 4-jährigen, der Altersgruppe „mittelalt“ die 4- bis unter 8-jährigen und der Altersgruppe „alt“ die 8-jährigen oder älteren Hunde zugeordnet. Im Einzelnen nahmen sieben junge, acht mittelalte und vier alte Hunde an den Übungen teil. Das Geschlechterverhältnis betrug sieben Hündinnen gegenüber zwölf Rüden.

Die biologischen Daten der eingesetzten Hunde sind bei WUST (2006) zusammengestellt.

Versuchsaufbau

Der Versuchsablauf war bei allen fünf Belastungssituationen identisch und kann im Detail bei WUST (2006) nachgelesen werden. Die Hunde absolvierten an jedem einzelnen Versuchstag jeweils zwei 20-minütige Suchübungen im Abstand von 20 Minuten. Vor der ersten Suche erfolgten zwei Probennahmen im Abstand von 20 Minuten (P1 und P2), außerdem wurden die Hunde direkt nach (P3) und 20 Minuten nach (P4) der ersten Suche sowie direkt nach der zweiten Suche (P5) und dreimal im 20-Minuten-Abstand in der abschließenden Erholungsphase (P6, P7 und P8) beprobt. Während des Versuchsablaufs wurden somit insgesamt acht Probennahmen durchgeführt (siehe Tabelle 1).

Untersuchte Parameter

Es wurde die Konzentration von sIgA in den Speichelproben bestimmt und zusätzlich die von WUST (2006) überprüften Parameter Bewegungsaktivität und Speichel-Kortisolkonzentration zur Auswertung herangezogen. Die Aktivitätsaufzeichnung (vgl. Kapitel 4.3) erfolgte kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum, die Speichelproben wurden zu den bereits beschriebenen Probennahmezeitpunkten gewonnen (vgl. WUST 2006; zur Übersicht siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Übersicht über den Ablauf einer Übung bei Rettungshunden (Exp 1), Aufzeichnung der Bewegungsaktivität und die Probennahmezeitpunkte.

Versuchsabschnitte	Aktivität	Speichelproben
Vorbereitungen		P1
nach 20 min Ruhe		P2
Suche 1 (20 min)		
nach der Suche	kontinuierlich	P3
nach 20 min Ruhe		P4
Suche 2 (20 min)		
nach der Suche		P5
nach 20 min Ruhe		P6
nach 40 min Ruhe		P7
nach 60 min Ruhe		P8

P1-P8: Probennahmezeitpunkte; vgl. WUST (2006)

4.1.2 Belastung von Rettungshunden während einer 3-tägigen Einsatzübung im Trümmergelände (Experiment 2)

Dieses zweite Experiment (Exp 2) wurde in den Monaten April und Mai 2006 auf einem Katastrophenübungsgelände des Österreichischen Bundesheers (dem „Tritolwerk“) in Wiener Neustadt durchgeführt und stellte eine Folgestudie der Arbeit von WUST (2006) dar. Das Experiment wurde von der Niederösterreichischen Landesregierung Abteilung Agrarrecht in St. Pölten genehmigt (Kennzeichen LF1-TVG-27/001-2006). Ein Teil der Ergebnisse aus dieser Untersuchung wurde in der Dissertation von WILHELM (2007) dargestellt.

Hunde

An den Versuchen im „Tritolwerk“ waren 20 Hund-Hundeführer-Teams aus folgenden deutschen und österreichischen Rettungshundeorganisationen beteiligt: Bayerisches Rotes Kreuz, Österreichisches Rotes Kreuz, Rettungshunde Niederösterreich, Österreichische Rettungshundebrigade und Österreichische Hundesportunion. Unter den Hunden waren fünf DSH, drei Labrador Retriever, zwei Border Collies, zwei Labrador-Mischlinge, zwei Mischlinge, und jeweils ein Riesenschnauzer, Shapendoe, Australien Shepherd, Briard und Golden Retriever. Die Altersverteilung war in Anlehnung an Exp 1 (siehe Kapitel 4.1) sechs junge Hunde, zwölf mittelalte Hunde und zwei alte Hunde. Der Anteil der weiblichen bzw. männlichen Hunde betrug jeweils 50 %. Eine detaillierte Übersicht über die teilnehmenden Hunde findet sich in der Arbeit von WILHELM (2007).

Versuchsaufbau

Der Versuchszeitraum für jedes einzelne Hund-Hundeführer-Team erstreckte sich über drei aufeinander folgende Tage, wobei der Versuchsablauf an jedem einzelnen Tag identisch war. An jedem der drei Tage wurden vier 20-minütige Suchen auf jeweils vier unterschiedlichen Trümmerfeldern (Schadstellen) durchgeführt. Die Schadstellen waren für alle Hunde dieselben, allerdings wurden sie nach einem rotierenden System parallel abgesucht. Die Reihenfolge der vier abzusuchenden Schadstellen blieb dabei für jeden Hund an jedem der drei Tage gleich. Zwischen jeder Suche hatten die Hunde jeweils 60 Minuten Pause. Diese teilte sich auf in ca. 40 Minuten reine Erholung und jeweils ca. 10 Minuten für Hin- und Rückweg zu und

von den Schadstellen. Die Probennahmen erfolgten vor der ersten Suche (P1), jeweils direkt nach der Rückkehr von den Schadstellen (P2, P5, P8, P11), nach 20 Minuten Erholung (P3, P6, P9, P12) und nach weiteren 20 Minuten, d. h. nach insgesamt 40 Minuten Erholung bzw. vor der nächsten Suche (P4, P7, P10, P13) (Tabelle 2). Der Ablauf der Studie wurde bei WILHELM (2007) detailliert beschrieben.

Untersuchte Parameter

Es wurden zu den 13 Probennahmezeitpunkten jeden Tages Speichelproben genommen und jeweils vor der ersten Suche (pre) und direkt nach Rückkehr von der letzten Suche (post) wurde zusätzlich eine Blutentnahme durchgeführt. Aus den Speichelproben wurde die sIgA-Konzentration bestimmt, aus den Plasmaproben die Parameter IgG, IgA, Kortisol, Kortikosteron, Histamin und Serotonin analysiert. Für die vorliegende Arbeit wurden außerdem die von WILHELM (2007) untersuchten Parameter Speichel-Kortisol und Bewegungsaktivität zur Auswertung herangezogen. Die Aufzeichnung der Aktivität erfolgte kontinuierlich über den gesamten 3-tägigen Versuchszeitraum (vgl. WILHELM 2007; zur Übersicht siehe Tabelle 2).

Tabelle 2. Übersicht über den Ablauf eines Versuchstags bei Rettungshunden (Exp 2), Aufzeichnung der Bewegungsaktivität und die Probennahmezeitpunkte.

Versuchsabschnitte	Aktivität	Speichelproben	Blutproben
Vorbereitungen		P1	pre
Suche 1 (20 min)			
nach der Suche		P2	
nach 20 min Ruhe		P3	
nach 40 min Ruhe		P4	
Suche 2 (20 min)			
nach der Suche	kontinuierlich	P5	
nach 20 min Ruhe		P6	
nach 40 min Ruhe		P7	
Suche 3 (20 min)			
nach der Suche		P8	
nach 20 min Ruhe		P9	
nach 40 min Ruhe		P10	
Suche 4 (20 min)			
nach der Suche		P11	post
nach 20 min Ruhe		P12	
nach 40 min Ruhe		P13	

P1-P13: Probennahmezeitpunkte; pre: vor der ersten Suche; post: nach der vierten Suche; vgl. WILHELM (2007)

4.1.3 Belastung von Diensthunden während einer 4-wöchigen Ausbildungsphase (Experiment 3)

Dieses dritte Experiment (Exp 3) wurde von PAULY (2007) im Zeitraum Januar 2005 bis August 2005 in der Quarantänestation der Schule für Diensthundewesen der Bundeswehr durchgeführt. Dort wurden die für die Ausbildung zum Diensthund angekauften Hunde im Verlauf von vier Wochen in verschiedenen Ausbildungsbereichen auf ihre Eignung getestet. Die Blutentnahmen wurden unter dem Aktenzeichen 42-34-10/11 beim Sanitätskommando II, Abt. I / Dez. 5, Veterinärwesen, Schloss Oranienstein in 65582 Diez angezeigt.

Hunde

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 35 Hunden durchgeführt (vgl. PAULY 2007), allerdings wurden für die vorliegende Arbeit nur die Daten von 26 Hunden ausgewertet. Bei diesen handelte es sich um 14 Rüden und 12 Hündinnen, die zwischen 11 und 30 Monaten alt waren und damit der Altersgruppe „jung“ zugeordnet wurden. Bezüglich ihrer Rasse handelte es sich um 14 Belgische Hütehunde, 11 DSH und einen Rottweiler.

Versuchsaufbau

Der Versuchszeitraum pro Tier betrug 28 Tage, während derer jeder Hund abgesehen von der Ankaufsuntersuchung zweimal bei der Arbeit im Schutzdienst untersucht wurde. Diese beiden Schutzdienstübungen fanden in der ersten (Übung A) und der vierten Woche (Übung B) des Ausbildungszeitraumes statt und liefen jeweils identisch ab. Die Belastungsphase bestand aus Übungselementen des Schutzdienstes („Bedrohung“, „Anbeißen“, „Überfall“, „Flucht“) und dauerte ca. 3 Minuten. Jeweils vor und nach der Belastung erfolgten die Probennahmen und zwar 20 Minuten vor (P1), direkt vor (P2), direkt nach (P3) der Belastung und in 20-minütigen Abständen in der anschließenden Erholungsphase von 60 Minuten (P4, P5, P6). Einen Überblick über den Ablauf der Schutzdienstübung gibt Tabelle 3, ausführlich erläutert wird der Versuchsaufbau in der Arbeit von PAULY (2007).

Untersuchte Parameter

Aus den Speichelproben wurde die slgA-Konzentration bestimmt und ferner die von PAULY (2007) untersuchten Parameter Bewegungsaktivität und Speichel-Kortisolkonzentration in die weitere Auswertung mit einbezogen. Die Aktivität der Hunde wurde über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich registriert und die Speichelproben jeweils zu den oben beschriebenen Zeitpunkten genommen (vgl. PAULY 2007; zur Übersicht siehe Tabelle 3).

Tabelle 3. Übersicht über den Ablauf einer Schutzdienstübung bei Diensthunden (Exp 3), Aufzeichnung der Bewegungsaktivität und die Probennahmezeitpunkte.

Versuchsabschnitte	Aktivität	Speichelproben
Vorbereitungen	kontinuierlich	P1
nach 20 min Ruhe		P2
Belastung (3 min)		
nach Belastung		P3
nach 20 min Ruhe		P4
nach 40 min Ruhe		P5
nach 60 min Ruhe		P6

P1-P6: Probennahmezeitpunkte; vgl. PAULY (2007)

4.2 Gewinnung, Aufarbeitung und Analyse der Plasma- und Speichelproben

4.2.1 Probengewinnung und -aufarbeitung

Geräte, Reagenzien, Verbrauchsmaterial:

Zentrifuge EBA 12R	Fa. HETTICH
Vortex Genie 2	Fa. SCIENTIFIC INDUSTRIES
Wattestäbchen PP	Fa. ZEFA
PP-Röhrchen	unbekannt
5 ml Einmalspritze	unbekannt
Sterilium®	Fa. BODE
Kanülen Sterican® Gr. 12	Fa. BRAUN
Kalium-EDTA-Röhrchen 10 ml	Fa. SARSTEDT
Lithium-Heparin-Röhrchen 10 ml	Fa. SARSTEDT
Reagenzgefäße 1,5 ml	Fa. EPPENDORF
Pipettenspitzen	Fa. THERMO ELECTRON CORPORATION
Mikropipetten	Fa. EPPENDORF
Aminoguanidinhydrochlorid 98%	Fa. SIGMA-ALDRICH
Natriumdisulfit p.A.	Fa. MERCK
Aqua dest.	eigene Herstellung: deionisiertes Wasser wurde zusätzlich destilliert

Herstellung der Stabilisatoren für die Serotonin- und Histamin-Analytik:

Serotonin-Stabilisator: 0,4 M Natriumdisulfit
76 mg Natriumdisulfit auf 1 ml Aqua dest.

Histamin-Stabilisator: 1 M Aminoguanidin
1,1 mg Aminoguanidin auf 10 ml Aqua dest.

Plasmaproben

Die Blutentnahme erfolgte jeweils zu den vorgegebenen Probennahmezeitpunkten nach Desinfektion mit Sterilium® aus der *Vena cephalica antebrachii* mittels Einmalinjektionskanülen. Das zum einen in ein Kalium-EDTA- zum anderen in ein Lithium-Heparin-Röhrchen aufgenommene Blut wurde sofort nach der Entnahme gekühlt und vor Ort innerhalb von maximal 30 Minuten weiterverarbeitet. Beide Probenröhrchen wurden zur Gewinnung des Plasmas zentrifugiert (4 °C, 10 min, 1200 g) und der Überstand aliquotiert. Aus den Kalium-EDTA-Röhrchen wurden die für die Analyse von IgG, IgA, Kortisol und Kortikosteron vorgesehenen Proben entnommen, welche ohne weitere Behandlung in 1,5 ml Reagenzgefäße pipettiert und bei -20 °C eingefroren wurden. Die Proben für die Histamin- und Serotonin-Analytik stammten aus den Lithium-Heparin-Röhrchen und wurden vor dem

Einfrieren mit entsprechenden Stabilisatoren versehen. Die Histamin-Proben wurden dazu mit 1 mM Aminoguanidin versetzt (11 µl 1 M Aminoguanidin auf 1,1 ml Plasma), während für die Serotonin-Analytik zu jeweils 120 µl Heparin-Plasma 0,5 µl 0,4 M Natriumdisulfit gegeben wurde. Auch diese Proben wurden bis zur Ankunft im Labor bei -20 °C gelagert und dort bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

Speichelproben

Die Speichelproben wurden nach einer bewährten, in mehrjähriger Erfahrung am Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München entwickelten Methode genommen und aufgearbeitet. Zur Gewinnung einer für die vorgesehenen Analysen ausreichenden Probenmenge wurde den Hunden während der Probennahme zur Anregung des Speichelflusses ein geruchsintensives Futterstück, je nach Vorliebe des jeweiligen Probanden, vor die Nase gehalten. Um eine Verunreinigung des Probenmaterials mit den Futterresten zu vermeiden, wurde diese Belohnung den Hunden erst nach Abschluss der Speichelgewinnung gegeben. Die Hunde kauten je nach Speichelfluss unterschiedlich lange auf jeweils zwei Wattestäbchen, bestehend aus einem ca. 1 cm langen Wattekopf an einem ca. 15 cm langen Polypropylenstiel, die möglichst zwischen die hinteren Backenzähne gebracht wurden. Zudem wurden die Innenseiten der Lefzen, die Backentaschen und der Unterzungenbereich ausgestrichen, um möglichst viel Speichelmaterial in den Wattetupfern zu sammeln. Die voll gesaugten Watteköpfe wurden anschließend ohne ihre Stiele in das Außenteil einer 5 ml-Einmalspritze gegeben, die mit dem Konus nach unten in einem 10 cm langen Polypropylen-Röhrchen steckte. Die obere Öffnung wurde mit Klebeband verschlossen und das Röhrchen bis zur Zentrifugation auf Eis gekühlt gelagert. Durch die Zentrifugation (3-8 °C, 10 min, 3500-3700 g) sammelte sich das Speichelmaterial am Boden des PP-Röhrchen und konnte abschließend aliquotiert (jeweils 120-200 µl in 1,5 ml Reagenzgefäße) und bei -20 °C eingefroren gelagert werden.

Untersuchte Parameter und Nachweismethoden

Biochemisch analysiert wurden physiologische Parameter, die im Zusammenhang mit Belastungssituationen als Stressparameter und/oder Immunparameter angesehen werden können. Besonderes Interesse galt dabei Immunglobulinen (IgG, IgA), Effektorhormonen der HHN-Achse (Kortisol, Kortikosteron), dem Transmitter Serotonin und dem Mediator Histamin. Mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurden IgG und IgA (beides Sandwich-ELISA), Kortisol (kompetitiver ELISA), Kortikosteron (kompetitiver Sandwich-ELISA) und Serotonin (kompetitiver Sandwich-ELISA) bestimmt. Die Analyse von Histamin erfolgte mittels Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit Fluoreszenz-Detektion.

4.2.2 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die ELISA-Analytik

Geräte und Software:

Waage L420P+	Fa. SARTORIUS
Feinwaage Research RC210D	Fa. SARTORIUS
Magnetrührer RCT basic	Fa. IKA LABORTECHNIK
pH-Meter pH3000	Fa. WTW
Zentrifuge Biofuge stratos	Fa. THERMO ELECTRON CORPORATION
Vortex Genie 2	Fa. SCIENTIFIC INDUSTRIES
Schüttler MS1 Minishaker	Fa. IKA LABORTECHNIK
Washer ELx 405	Fa. BIO-TEC INSTRUMENTS INC.
Reader GENios	Fa. TECAN
Software MikroWin® 2000 V. 4.23	Fa. MIKROTEK LABORSYSTEME GMBH
Mikropipetten (Finnpipetten)	Fa. THERMO ELECTRON CORPORATION
Multistepper (Finnpipetten)	Fa. THERMO ELECTRON CORPORATION
Mehrkanalpipetten	Fa. EPPENDORF
Multipipette	Fa. EPPENDORF

Chemikalien und Reagenzien:

Natriumchlorid	Fa. MERCK
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, reinst	Fa. APPLICHEM
Kaliumdihydrogenphosphat, z.A.	Fa. MERCK
Kaliumchlorid, z.A.	Fa. MERCK
Tween 20	Fa. MERCK
Natriumcarbonat, wasserfrei, z.A.	Fa. MERCK
Natriumhydrogencarbonat, z.A.	Fa. MERCK
Natriumacetat, z.A.	Fa. MERCK
Citronensäure-Monohydrat, buffer grade	Fa. APPLICHEM
Tetramethylbenzidin (TMB)	Fa. SIGMA
Dimethylsulfoxid 99,5 % (DMSO)	Fa. SIGMA
Wasserstoffperoxid 30 %	Fa. MERCK
Schwefelsäure 96 %, z.A.	Fa. MERCK
Ethanol, z.A.	Fa. APPLICHEM
Gelatine	Fa. SIGMA

Kaninchen-anti-Hund-IgG 1 µg/ml	Fa. SIGMA
Kaninchen-anti-Hund-IgG-POD (1:10 verdünnt)	Fa. SIGMA
IgG-Referenzserum 3,1 µg/µl Dog IgG	Fa. BETHYL LABORATORIES
Ziege-anti-Hund-IgA 1 mg/ml	Fa. NATUTECH A40-104A
Ziege-anti-Hund-IgA-POD (1:10 verdünnt)	Fa. NATUTECH A40-104P
IgA-Referenzserum 0,15 µg/µl Dog IgA	Fa. BETHYL LABORATORIES
Maus-anti-Kortisol-3	Fa. NATUTECH
Kortisol-3-CMO-HRP	Fa. NATUTECH
Hydrocortisone	Fa. SIGMA H4001
Kortikosteron Testkit („AssayMax“)	Fa. ASSAYPRO
Serotonin Testkit	Fa. LABOR DIAGNOSTIKA NORD
Salzsäure 37 %	Fa. MERCK
Aqua dest.	eigene Herstellung

Verbrauchsmaterial:

96-Loch-Mikrotiterplatte	Fa. NUNC
Reagenzgefäße 1,5 ml	Fa. EPPENDORF
Pipettenspitzen	Fa. THERMO ELECTRON CORPORATION
Combitips	Fa. EPPENDORF

Herstellung von Puffern und Lösungen:

Allgemein:

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): pH 7,2 (Einstellen mit Salzsäure)

8,00 g Natriumchlorid, 1,45 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,2 g Kaliumchlorid, ad 1 Liter Aqua dest.

PBS-Tween (PBS-T): 500 µl Tween 20 auf 1 Liter PBS

Beschichtungspuffer: pH 9,6

3,11 g Natriumcarbonat, 6,00 g Natriumhydrogencarbonat, ad 1 Liter Aqua dest.

TMB-Puffer: Natriumacetat-Citrat-Puffer, pH 5,0

8,20 g Natriumacetat, 3,15 g Citronensäure-Monohydrat, ad 1 Liter Aqua dest.

TMB-Stammlösung: 60 mg TMB, 10 ml DMSO

Substrat-Lösung: 10 ml TMB-Puffer, 322 µl TMB-Stammlösung, 3 µl H₂O₂ 30 %

Stopplösung: 1M H₂SO₄

27,8 ml H₂SO₄ 96 %, ad 500 ml Aqua dest.

Blockierungslösung: 0,5% Gelatine

10 ml PBS, 50 mg Gelatine

IgG-ELISA:

IgG-Beschichtungsantikörper: 1 µg/ml Kaninchen-anti-Hund-IgG

10 µl Stock (1 µg/ml) in 10 ml Beschichtungspuffer

IgG-Konjugat: 1:16000 Kaninchen-anti-Hund-IgG-POD

6 µl Stock (1:10) in 10 ml PBS-T

IgG-Referenzserum: 1 µg/ml Dog IgG

1. Verdünnung: 1,3 µl Stock (3,1 µg/µl) in 2 ml PBS-T = 2 µg/ml

2. Verdünnung: 500 µl (2 µg/ml) in 500 µl PBS-T

IgA-ELISA:

IgA-Beschichtungsantikörper: 0,5 µg/ml Ziege-anti-Hund-IgA

5 µl Stock (1 mg/ml) in 10 ml Beschichtungspuffer

IgA-Konjugat: 1:150000 Ziege-anti-Hund-IgA-POD

0,7 µl Stock (1:10) in 10 ml PBS-T

IgA-Referenzserum: 2,5 µg/ml Dog IgA

10 µl Stock (0,15 µg/µl) in 600 µl PBS-T

Kortisol-ELISA:

Kortisol-Beschichtungsantikörper: 1,5 µg/ml Maus-anti-Kortisol-3
33 µl Stock (570 µg/ml) in 12,067 ml Beschichtungspuffer
Kortisol-Konjugat: 1:1000 Kortisol-3-CMO-HRP
5,3 µl Stock in 5,245 ml PBS-T
Kortisol-Standard: 50 ng/ml Kortisol (Hydrocortisone in Ethanol gelöst)
10 µl Stock (10 µg/ml) in 1,990 ml PBS-T

Kortikosteron-ELISA:

Kortikosteron-Beschichtung: bereits auf der Mikrotiterplatte des Testkits
EIA-Diluent: 1:10 Verdünnung in Aqua dest.
20 ml EIA-Diluent-Konzentrat in 180 ml Aqua dest.
Waschpuffer: 1:10 Verdünnung in Aqua dest.
60 ml Konzentrat in 540 ml Aqua dest.
Kortikosteron-Standard: 1:4 Verdünnungen aus Stock (400 ng/ml)
50 µl Stock in 150 µl EIA-Diluent = Standardpunkt 1 (100 ng/ml), daraus 1:4 Verdünnungen für Standardpunkte 2-6
Biotin-Kortikosteron: 1:50 Verdünnung in EIA-Diluent
56 µl Stock in 2,744 ml EIA-Diluent
SP-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat 1:100 Verdünnung in EIA-Diluent
57 µl Stock in 5,643 ml EIA-Diluent
Substratlösung: enthält TMB, gebrauchsfertig
Stopplösung: 0,5N HCl, gebrauchsfertig

Serotonin-ELISA:

Azylierungspuffer und -reagenz: gebrauchsfertig
Beschichtung: derivatisiertes Serotonin, auf der Mikrotiterplatte vorbeschichtet
Waschpuffer: 20 ml Konzentrat in 480 ml Aqua dest.
Serotonin-Antiserum: Kaninchen-anti-Serotonin, gebrauchsfertig
Serotonin-Standards: 6 Standardpunkte, gebrauchsfertig
Enzymkonjugat: Kaninchen-anti-IgG-POD, gebrauchsfertig
Substratlösung: enthält TMB, gebrauchsfertig
Stopplösung: enthält 0,25M H₂SO₄, gebrauchsfertig
0,05N HCl: 0,41 ml HCl 37 % auf 100 ml Aqua dest.

4.2.3 *Prinzip des Sandwich-ELISAs für die Bestimmung von Immunglobulinen im Probenmaterial*

Die Konzentration von Immunglobulinen in den Plasma- und Speichelproben wurde mit einem am Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der LMU München etablierten Sandwich-ELISA bestimmt.

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit einem für das jeweils nachzuweisende Immunglobulin spezifischen Antikörper (Beschichtungsantikörper) vorbeschichtet. Dazu wurde der Beschichtungsantikörper in definierter Konzentration im Beschichtungspuffer angesetzt und daraus jeweils 100 µl in jede Kavität der Platte pipettiert. Die so vorbereitete Platte musste über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubieren. Vor den weiteren Arbeitsschritten erfolgte ein Waschvorgang bestehend aus zweimaligem Waschen am mechanischen Washer und Ausklopfen der Restflüssigkeit auf Zellstoff. Anschließend wurden freie, unspezifische Bindungsstellen durch Aufbringen einer 0,5 % Gelatine-Lösung (jeweils 200 µl pro Kavität) blockiert. Die Inkubationszeit für die Blockierung betrug eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden das Probenmaterial und das Referenzserum gemäß Pipettierschema (Abbildung 1) aufgetragen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	LW	Probe	Probe	Probe	Probe	STD	POOL	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	
B													
C													
D													
E		jeweils log 2-Verdünnung											
F													
G													
H													

Abbildung 1. Schematische Darstellung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Angaben zum Probenauftrag für den Nachweis von Immunglobulinen mittels ELISA. A-H: Bezeichnung der Reihen; 1-12: Bezeichnung der Spalten; LW: Leerwert; STD: Standard, Referenzserum; POOL: Pool-Probe, Qualitätskontrolle

Die Spalte 1 enthielt nur PBS (50 µl pro Kavität) zur Bestimmung des Leerwertes, in Spalte 6 wurde in jedem Assay das Referenzserum und in Spalte 7 jeweils die Qualitätskontrolle (Pool-Probe) aufgetragen. Der Probenauftrag erfolgte jeweils mit 100 µl in Reihe A, daraus wurde dann eine log₂-Verdünnung (50 µl) in PBS (50 µl Vorlage) über alle Reihen pipettiert. Danach fand wieder eine einstündige Inkubation bei 37 °C mit anschließendem Waschvorgang statt. Es folgte der konjugierte Antikörper, indem jeweils 100 µl eines an Peroxidase (POD) gekoppelten Immunglobulin-Antikörpers in definierter Konzentration abhängig vom nachzuweisenden Antikörper in jede Kavität pipettiert wurde. Nach erneuter Inkubation (37 °C, 1 Stunde) und Waschvorgang konnte die jeweils frisch zubereitete Substratlösung mit jeweils 100 µl Volumen aufgebracht werden. Die Reaktion mit zunehmender Blaufärbung wurde nach genau 10 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur mittels 1 M H₂SO₄ (50 µl pro Kavität) gestoppt. Die photometrische Messung der entstandenen Gelbfärbung erfolgte innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm. Mit Hilfe des Programms MikroWin[®] 2000 (Fa. MIKROTEK LABORSYSTEME GmbH) wurde die optische Dichte (OD) aufgezeichnet und die Standardkurven und Messbereiche (Intercept) für jeden Assay ermittelt. Die gewonnenen Daten wurden in Excel[®] (Fa. MICROSOFT) importiert und die OD in die entsprechenden Konzentrationen umgerechnet. Die Konzentration einer Probe wurde als Mittelwert aus den Werten aller Verdünnungsstufen im Intercept-Bereich der Standardkurve bestimmt.

4.2.4 *Bestimmung von IgG im Plasma*

Die Konzentration von IgG in den Plasmaproben wurde im Juli 2006 mittels der oben beschriebenen ELISA-Methode gemessen (Kapitel 4.2.3).

Protokoll:

Beschichtung: Kaninchen-anti-Hund-IgG-Antikörper; 1 µg/ml
 Blockierung: 0,5 % Gelatine
 Probenauftrag: Plasma Hund 1:5000 verdünnt mit PBS-T
 Standard: Hund-IgG-Referenzserum; 1 µg/ml
 Konjugat: Kaninchen-anti-Hund-IgG-POD; 1:16000
 Substrat: TMB
 Stopplösung: 1 M H₂SO₄
 Wellenlänge: 450 nm

Genauigkeit (Präzision):

Als Qualitätskontrolle und zur Überprüfung der Assaygenauigkeit dienten Aliquots einer angesetzten Hundeplasmaprobe, die bei jedem Assay wie die Proben behandelt und gemessen wurden. Aus ihnen konnte schließlich die Varianz zwischen den einzelnen Assays (Inter-Assay) ermittelt werden. Sie betrug bei 16 an verschiedenen Tagen durchgeführten Assays 13,4 % (Tabelle 4). Zur Überprüfung der Präzision innerhalb eines Assays (Intra-Assay) wurde einmalig ein Mehrfachansatz (n=8) der Hundeplasma-Pool-Probe gemessen und dadurch ein Variationskoeffizient von 6,2 % ermittelt.

Tabelle 4. Inter-Assayvarianz des IgG-ELISAs.

	MW (g/l)	SD	n	VK (%)
Pool Hundeplasma	17,53	2,35	16	13,4

MW: Mittelwert der IgG-Konzentration (g/l), SD: Standardabweichung, n: Anzahl der Assays, VK: Variationskoeffizient (%)

Richtigkeit:

Über die Richtigkeit der Analysemethode kann keine Aussage getroffen werden. Es wurde darauf geachtet, dass alle Proben eines Hundes innerhalb eines Assays gemessen wurden.

Spezifität:

Laut Angaben der Hersteller treten bei den verwendeten Antikörpern keine Kreuzreaktionen mit anderen Substanzen auf. Der ELISA ist somit als spezifisch für canines IgG anzusehen.

4.2.5 Bestimmung von IgA im Plasma und Speichel

In den Monaten August 2006 bis Januar 2007 wurde die Konzentration von IgA in den Plasma- und Speichelproben mittels der in Kapitel 4.2.3 beschriebenen ELISA-Methode bestimmt.

Protokoll:

- Beschichtung: Ziege-anti-Hund-IgA-Antikörper; 0,5 µg/ml
- Blockierung: 0,5 % Gelatine
- Probenauftrag: Plasma/Speichel Hund 1:100 verdünnt mit PBS-T
- Standard: Hund-IgA-Referenzserum; 2,5 µg/ml
- Konjugat: Ziege-anti-Hund-IgA-POD; 1:150.000
- Substrat: TMB
- Stopplösung: 1 M H₂SO₄
- Wellenlänge: 450 nm

Genauigkeit (Präzision):

Als Qualitätskontrolle und zur Überprüfung der Assaygenauigkeit dienten Aliquots einer angesetzten Hundeplasma- sowie -speichelprobe, die bei jedem Assay wie die Proben behandelt und gemessen wurden. Aus ihnen konnte schließlich die Inter-Assayvarianz ermittelt werden. Sie betrug für die Messungen von IgA in den Plasmaproben bei 13 durchgeführten Assays 12,4 %, in den Speichelproben des ersten Experiments 12,5 % (n=81), des zweiten Experiments 12,9 % (n=107) und des dritten Experiments 17,1 % (n=45) (Tabelle 5). Die Intra-Assayvarianz wurde einmalig durch einen 10-fach-Ansatz der Hundespeichel-Pool-Probe geprüft und daraus ergab sich ein Variationskoeffizient von 4,7 %.

Tabelle 5. Inter-Assayvarianz des IgA-ELISAs.

	MW (g/l)	SD	n	VK (%)
Pool Hundeplasma	0,70	0,09	13	12,4
Pool Hundespeichel				
Exp 1	0,60	0,08	81	12,5
Exp 2	0,62	0,08	107	12,9
Exp 3	0,58	0,10	45	17,1

MW: Mittelwert der IgA-Konzentration (g/l), SD: Standardabweichung, n: Anzahl der Assays, VK: Variationskoeffizient (%)

Richtigkeit:

Die Richtigkeit der Methode wurde einmalig durch die Bestimmung der Wiederfindung für IgA im Hundespeichel überprüft und mit 100,7 % Wiederfindung als ausreichend richtig beurteilt. Dennoch wurde darauf geachtet, dass alle Proben eines Hundes innerhalb eines Assays gemessen wurden.

Spezifität:

Es kann von der Spezifität der Methode ausgegangen werden, da keine Kreuzreaktionen gegenüber anderen Proteinen oder Immunglobulin-Typen bestehen. Über Kreuzreaktionen mit IgA-Molekülen anderer Spezies ist nichts bekannt.

4.2.6 Bestimmung von Kortisol im Plasma

Die Konzentration von Kortisol in den Plasmaproben wurde in den Monaten August und September 2006 mit einem am Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der LMU München entwickelten kompetitiven ELISA bestimmt.

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit monoklonalem Antikörper (Maus-anti-Kortisol-3) beschichtet und über zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang und Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 0,5 % Gelatine-Lösung. Diese blieb wiederum eine Stunde bei 37 °C auf der Platte bevor erneut ein Waschvorgang erfolgte. Eine zweite Mikrotiterplatte diente als Vorplatte, auf der die Proben und das Konjugat (Kortisol-3-CMO-HRP) pipettiert wurden, um eine Vorinkubation bzw. ein Austrocknen der beschichteten Platte während dieses Vorganges zu vermeiden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LW	STD 50		POOL		Probe		Probe		Probe		Probe
B	LW	STD 25		Probe		Probe		Probe		Probe		
C	LW	STD 12,5		Probe		Probe		Probe		Probe		Probe
D	LW	TB		Probe		Probe		Probe		Probe		
E	LW	STD 6,25		Probe		Probe		Probe		Probe		Probe
F	LW	STD 3,125		Probe		Probe		Probe		Probe		
G	LW	STD 1,56		Probe		Probe		Probe		Probe		Probe
H	LW	STD 0,78		Probe		Probe		Probe		Probe		

Abbildung 2. Schematische Darstellung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Angaben zum Probenauftrag für den Nachweis von Kortisol mittels ELISA.

A-H: Bezeichnung der Reihen; 1-12: Bezeichnung der Spalten; LW: Leerwert; STD: Standard; POOL: Pool-Probe; TB: Total Binding; Probe: Ansatz der Proben jeweils in Doppelbestimmung

Das Pipettierschema ist in Abbildung 2 dargestellt. In Spalte 1 wurde in alle 8 Kavitäten der Leerwert angesetzt, d. h. jeweils 50 µl Standard (50 ng/ml) und 50 µl PBS-T. Für die Standardkurve wurde in den Spalten 2 und 3 (Doppelansatz) jeweils in Reihe A der Standard (50 ng/ml) mit 100 µl pro Kavität pipettiert, in den übrigen Kavitäten der Spalten 2 und 3 wurden jeweils 50 µl PBS-T vorgelegt und absteigend

von Reihe B bis H eine log₂-Verdünnung durchgeführt. Dabei wurde Reihe D übersprungen, in der dadurch der Nullstandard (Total Binding, TB) angesetzt wurde. Die Proben wie auch die Qualitätskontrolle wurden in den Spalten 4 bis 11 horizontal in Zweifachbestimmung pipettiert, jeweils mit 50 µl pro Kavität. In Spalte 12 wurden vier weitere Proben vertikal in Doppelansatz pipettiert. Das Konjugat (Kortisol-3-CMO-HRP) wurde anschließend in alle Spalten außer in Spalte 1 mit 50 µl pro Kavität zugegeben. Nach vollständigem Auftragen aller Proben, Standards und des Konjugats wurde der Inhalt aller Kavitäten zügig mit einer Mehrkanalpipette auf die bereits beschichtete Hauptplatte übertragen und zur Inkubation in den Brutschrank gegeben. Nach einer Stunde bei 37 °C und einem Waschvorgang wurde die Substratlösung pipettiert (100 µl pro Kavität) und die Platte 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Gelbfärbung innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm photometrisch gemessen. Die Aufzeichnung der OD-Werte, die Anpassung der Standardkurve und die Berechnung der Konzentrationen der einzelnen Proben erfolgten mittels des Programms MikroWin[®] 2000. Die gewonnenen Daten wurden in Excel[®] importiert und anschließend weiter verarbeitet (vgl. Kapitel 4.4).

Protokoll:

Beschichtung: Maus-anti-Kortisol-3-Antikörper; 1,5 µg/ml
 Blockierung: 0,5 % Gelatine
 Probenauftrag: 1:16 verdünnt mit PBS-T
 Standardkurve: Kortisol; 50 ng/ml, log₂-Verdünnungsreihe
 Konjugat: Kortisol-3-CMO-HRP; 1:1000
 Substrat: TMB
 Stopplösung: 1 M H₂SO₄
 Wellenlänge: 450 nm

Empfindlichkeit:

Die untere Nachweisgrenze dieses ELISAs lag bei etwa 3 nmol/l (errechnet aus den durchschnittlichen Intercept-Bereichen der einzelnen Assays).

Genauigkeit (Präzision):

Als Qualitätskontrolle und zur Überprüfung der Assaygenauigkeit dienten Aliquots einer angesetzten Hundeplasmaprobe, die bei jedem Assay wie die Proben behandelt und gemessen wurden. Aus ihnen konnte schließlich die Inter-Assayvarianz ermittelt werden. Sie betrug bei 5 durchgeführten Assays 14,1 % (Tabelle 6). Zur Überprüfung der Intra-Assayvarianz wurde einmalig eine Mehrfachbestimmung (n=8) derselben Hundeplasmaprobe, die auch als Qualitätskontrolle der Inter-Assayvarianz eingesetzt wurde, durchgeführt. Dies ergab eine Intra-Assayvarianz von 8,7 % für diesen ELISA.

Tabelle 6. Inter-Assayvarianz des Kortisol-ELISAs.

	MW (nmol/l)	SD	n	VK (%)
Pool Hundeplasma	64,22	9,03	5	14,1

MW: Mittelwert der Kortisolkonzentration (nmol/l), SD: Standardabweichung, n: Anzahl der Assays, VK: Variationskoeffizient (%)

Richtigkeit:

Die Richtigkeit der Methode wurde einmalig durch die Bestimmung der Wiederfindung und der Linearität überprüft. Dies ergab eine hinreichende Linearität des ELISAs und eine Wiederfindung für Kortisol im Hundeplasma von 110 %. Letztere wurde bei der Auswertung der Messwerte mit eingerechnet. Alle Proben eines Hundes wurden jeweils innerhalb eines Assays analysiert.

Spezifität:

Es kann davon ausgegangen werden, dass der ELISA spezifisch für den Nachweis von Kortisol ist. Als Kreuzreaktionen werden für den Maus-anti-Kortisol-3-Antikörper vom Hersteller folgende Angaben gemacht: Kortisol 100 %, Prednisolon 5,1 %, 11-Desoxykortisol 0,6 %, Kortikosteron 0,3 %, 11-Desoxykortikosteron, Progesteron, 17-OH-Progesteron, Estradiol und Testosteron <0,1 %.

4.2.7 Bestimmung von Kortikosteron im Plasma

Die Konzentration von Kortikosteron in den Plasmaproben wurde im November 2006 mit einem ELISA-Testkit für Kortikosteron bestimmt. Das Testprinzip entsprach dem eines kompetitiven Sandwich-ELISAs, Angaben zur Durchführung und Testcharakteristik sind der Anleitung der Herstellerfirma zu entnehmen.

Protokoll:

Beschichtung: polyklonaler anti-Kortikosteron-Antikörper (vorbeschichtet)
 Blockierung: nicht bekannt
 Probenauftrag: 1:10 verdünnt
 Standard: Kortikosteron 400 ng/ml (daraus Standardwerte: 100; 25; 6,25; 1,563; 0,319 und 0,098 ng/ml)
 Konkurrent: biotinyliertes Kortikosteron
 Konjugat: Streptavidin-POD
 Substrat: TMB
 Stopplösung: 1 M H₂SO₄
 Wellenlänge: 450 nm

Empfindlichkeit:

Die untere Nachweisgrenze dieses ELISAs wurde vom Hersteller mit 40 pg/ml (= 0,116 nmol/l) angegeben.

Genauigkeit (Präzision):

Laut Hersteller betrug die Inter-Assayvarianz 8,5 % und die Intra-Assayvarianz 5,5 %. Durch Messung der eigenen Qualitätskontrollen (d. h. Aliquots einer angesetzten Hundeplasmaprobe) in jedem Assay wurde ein Inter-Variationskoeffizient von 19,6 % bei 5 durchgeführten Assays ermittelt (Tabelle 7). Zur Überprüfung der Intra-Assayvarianz wurde einmalig eine Mehrfachbestimmung (n=8) der Qualitätskontrolle durchgeführt. Dabei ergab sich ein Variationskoeffizient von 20,5 %.

Tabelle 7. Inter-Assayvarianz des Kortikosteron-ELISAs.

	MW (nmol/l)	SD	n	VK (%)
Pool Hundeplasma	35,74	7,02	5	19,6

MW: Mittelwert der Kortikosteronkonzentration (nmol/l), SD: Standardabweichung, n: Anzahl der Assays, VK: Variationskoeffizient (%)

Richtigkeit:

Die Richtigkeit der Methode wurde einmalig durch die Bestimmung der Wiederfindung überprüft, die bei 120,8 % lag. Dies wurde bei der Auswertung der Messwerte mit eingerechnet. Alle Proben eines Hundes wurden jeweils innerhalb eines Assays analysiert.

Spezifität:

Vom Hersteller wurden verschiedene Substanzen angegeben, bei denen Kreuzreaktionen auftreten können, wobei außer Desoxykortikosteron mit bis zu 30 %, sowie Progesteron und Aldosteron mit bis zu 2 %, alle unter 1 % liegen. Da der Testkit für den Nachweis von humanem Kortikosteron entwickelt wurde, ist über potentielle Kreuzreaktionen im caninen System nichts bekannt.

4.2.8 Bestimmung von Serotonin im Plasma

Die Konzentration von Serotonin in den Plasmaproben wurde im Januar 2008 mit einem kommerziellen ELISA-Testkit bestimmt. Das Testprinzip entsprach dem eines kompetitiven Sandwich-ELISAs mit vorangestellter Azylierung des in der Probe nachzuweisenden Serotonins. Angaben zur Durchführung und Testcharakteristik sind in der Anleitung der Herstellerfirma aufgeführt.

Protokoll:

Azylierung:	Azylierungsplatte mit Azylierungsreagenz
Probenauftrag:	1:25 verdünnt mit 0,05 N HCl
Standards:	Serotonin 0, 15, 50, 150, 500, 2500 ng/ml
Beschichtung:	Mikrotiterplatte vorbeschichtet mit derivatisiertem Serotonin
Antiserum:	Kaninchen-anti-Serotonin
Konjugat:	Anti-Kaninchen-IgG-POD
Substrat:	TMB
Stopplösung:	0,25 M H ₂ SO ₄
Wellenlänge:	450 nm

Empfindlichkeit:

Die untere Nachweisgrenze dieses ELISAs wurde vom Hersteller mit 0,3 ng/ml (= 0,002 nmol/l) angegeben.

Genauigkeit (Präzision):

Laut Hersteller betrug die Inter-Assayvarianz 6,0 % und die Intra-Assayvarianz 3,9 bis 5,4 %. Aus der Messung der im Testkit enthaltenen Kontrollen (K1: 4 ng/ml; K2: 14 ng/ml) ergab sich für die vorliegende ELISA-Methode eine Inter-Assayvarianz von 12,9 % für K1 und 8,9 % für K2 (Tabelle 8). Eine Intra-Assayvarianz konnte aus Mangel an Probenmaterial nicht bestimmt werden.

Tabelle 8. Inter-Assayvarianz des Serotonin-ELISAs.

	MW (ng/ml)	SD	n	VK (%)
Kontrolle K1	4,853	0,627	4	12,9
Kontrolle K2	14,038	1,252	4	8,9

MW: Mittelwert der Serotoninkonzentration (ng/ml), SD: Standardabweichung, n: Anzahl der Assays, VK: Variationskoeffizient (%)

Richtigkeit:

Für die Richtigkeit der Methode wurde vom Hersteller eine Wiederfindungsrate von 97 % angegeben.

Spezifität:

Vom Hersteller wurden verschiedene Substanzen angegeben, bei denen Kreuzreaktionen auftreten können, wobei die höchste Kreuzreaktivität für Tryptamin mit 0,19 % aufgeführt wird. Über potentielle Kreuzreaktionen im caninen System ist nichts bekannt.

4.2.9 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die HPLC-Analytik

Geräte und Software:

Waage L420P+	Fa. SARTORIUS
Feinwaage Research RC210D	Fa. SARTORIUS
Magnetrührer RCT basic	Fa. IKA LABORTECHNIK
pH-Meter pH3000	Fa. WTW
Zentrifuge Biofuge stratos	Fa. THERMO ELECTRON CORPORATION
Vortex Genie 2	Fa. SCIENTIFIC INDUSTRIES
Vortex Genie 2T	Fa. SCIENTIFIC INDUSTRIES
Rührer MINI-MR	Fa. IKA LABORTECHNIK
System Gold 126 Solvent Module	Fa. BECKMAN COULTER
System Gold 508 Autosampler	Fa. BECKMAN COULTER
Säulenofen Jetstream Plus	Fa. BECKMAN COULTER
Fluoreszenzdetektor RF-10AXL	Fa. SHIMADZU
Interface SS420x	Fa. SCIENTIFIC SOFTWARE INC
32 Karat Software V. 5.0	Fa. BECKMAN COULTER
Wasserstrahlpumpe	Fa. BRAND
Vakuum-Filtrationssystem	Fa. SCHOTT, Fa. SARTORIUS
Mikropipetten (Finnpipetten)	Fa. THERMO ELECTRON CORPORATION

Chemikalien und Reagenzien:

Acetonitril Rotisol [®] , HPLC ultra gradient grade	Fa. ROTH
Methanol LiChrosolv [®] , gradient grade	Fa. MERCK
n-Heptan Rotisol [®] HPLC	Fa. ROTH
Bis-(2-ethylhexyl)hydrogenphosphat	Fa. SERVA
Histamindihydrochlorid	Fa. SIGMA
Phosphorsäure	Fa. SIGMA
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, z.A.	Fa. MERCK
Kaliumdihydrogenphosphat, z.A.	Fa. MERCK
di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei, z.A.	Fa. MERCK
<i>ortho</i> -Pthaldialdehyd, z.A. (OPA)	Fa. SERVA
Natriumhydroxidplättchen, reinst, z.A.	Fa. MERCK
Salzsäure 37 %	Fa. MERCK
Aqua dest.	eigene Herstellung
Chromanorm, Wasser für die HPLC	Fa. VWR

Verbrauchsmaterial:

Vorsäule CC 8/4 Nucleosil 100-5 C6H5	Fa. MACHEREY-NAGEL
Trennsäule CC 250/4 Nucleosil 100-5 C6H5	Fa. MACHEREY-NAGEL
Reaktionsgefäß 15 ml (Falcon, Bluecaps)	Fa. GREINER
Membranfilter	Fa. SARTORIUS
Gewindeflasche mit Schraubkappe (Vial)	Fa. CHROMATOGRAPHIE SERVICE GmbH
Dichtscheibe (Teflonliner)	Fa. CHROMATOGRAPHIE SERVICE GmbH
Mikroeinsatz (Insert)	Fa. CHROMATOGRAPHIE SERVICE GmbH
Feder	Fa. CHROMATOGRAPHIE SERVICE GmbH
Reagenzgefäße 1,5 ml	Fa. EPPENDORF
Pipettenspitzen	Fa. THERMO ELECTRON CORPORATION

Herstellung von Puffern und Lösungen:

Phosphatpuffer: 5 mM KH_2PO_4 / 20 mM K_2HPO_4 , pH 7,4 (eingestellt mit Phosphorsäure)

0,68 g KH_2PO_4 , 3,48 g K_2HPO_4 , in 1 Liter Wasser

OPA: eisgekühlt, lichtgeschützt, bei -20 °C gelagert

0,5 mg/ml in Methanol

25 mM NaH_2PO_4 : 3,45 g NaH_2PO_4 auf 1 Liter Wasser

Laufmittel: entgast, gefiltert

A: 25 mM NaH_2PO_4 in Acetonitril/Wasser (5:95; v/v)

B: 25 mM NaH_2PO_4 in Acetonitril/Wasser (50:50; v/v)

Extraktionsmittel: 50 mM B-2-EHPH in n-Heptan

405 μl B-2-EHPH in 25 ml n-Heptan

Histamin-Standard-Lösung: 20 mM im Phosphatpuffer

3,68 g Histamin in 1 Liter Phosphatpuffer

Waschflüssigkeit für Autosampler: Methanol : H_2O 1:10

1 N NaOH: 40 g NaOH auf 1 Liter Wasser

0,1 N HCl: 8,28 ml HCl 37 % auf 1 Liter Wasser

3 N HCl: 248 ml HCl 37 % auf 1 Liter Wasser

4.2.10 Bestimmung von Histamin im Plasma

Die Konzentration von Histamin in den Plasmaproben wurde in den Monaten Februar bis Mai 2007 mit einer leicht modifizierten HPLC-Methode nach ASCHENBACH (1997) bestimmt.

Die Probengewinnung und -vorbereitung wurde bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Die eingefrorenen Plasmaproben wurden aufgetaut, geschüttelt (Vortex Genie 2) und zentrifugiert, um eventuelle Verunreinigungen oder Gerinnungsprodukte, die das Pipettiervolumen verfälschen könnten, zu entfernen. Als Probenansatz wurde jeweils 1 ml Heparinplasma auf 1 ml Phosphatpuffer in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Falcon, Bluecap) gegeben. Um natives Histamin aus den Proben zu erhalten, erfolgte eine 2-phasige Extraktion mit 50 mM Bis-(2-ethylhexyl)hydrogenphosphat (B-2-EHPH) in n-Heptan. Im ersten Schritt wurde zu jedem Probenansatz 6 ml des Extraktionsmittels B-2-EHPH gegeben, 5 min geschüttelt (Stufe 10, Vortex Genie 2T) und anschließend zentrifugiert (20 min, 4 °C, 3500 g). Dies führte zur Chelatbildung zwischen den Histaminmolekülen und B-2-EHPH und dadurch zu ihrer Überführung in die organische n-Heptan-Phase. Nach der Zentrifugation wurden vom Überstand, d. h. der organischen Phase, 4 ml abgenommen und in vorbereitete Bluecaps gegeben. Durch die Zugabe von 500 μl 0,1 N HCl und 2-minütigem Schütteln (Stufe 10, Vortex Genie 2T) wurden die Histaminmoleküle wieder aus dem B-2-EHPH-Chelat gelöst und in die wässrige Phase der Salzsäure überführt. Diese befand sich

nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4 °C, 3500 g) in der unteren Schicht im Röhrchen und wurde in vorbereitete 1,5 ml Reagenzgefäße pipettiert. Pro Probenansatz wurden 2 x 200 µl Aliquots mit nativem Histamin gewonnen, wobei jeweils ein Aliquot weiter analysiert wurde, während das zweite für eventuelle Nachbestimmungen kühl gelagert wurde. Die gewonnenen aufkonzentrierten Histamin-Proben wurden im weiteren Verlauf über eine Vorsäulenderivatisierung mit *ortho*-Pthaldialdehyd (OPA) für die HPLC-Analyse aufbereitet. Jede Probe (200 µl) wurde mit 40 µl einer 1 N NaOH-Lösung alkalisiert und 30 Sekunden auf dem Vortex (Vortex Genie 2) durchmischt. Anschließend wurden die Proben mit 20 µl Derivat-Substrat (OPA) versetzt und wieder 30 Sekunden geschüttelt (Vortex Genie 2). Die OPA-Lösung blieb während des gesamten Vorgangs der Derivatisierung auf Eis gekühlt und wurde permanent mittels Magnetrührer gerührt. Nach exakt 4 Minuten Inkubation wurde die Derivatisierungsreaktion durch Zugabe von 40 µl einer 3 N HCl-Lösung gestoppt und stabilisiert. Die derivatisierte Probe (ca. 260 µl) wurde in einen Mikroinsert (Insert) für eine Gewindeflasche mit Schraubkappe (Vial) überführt und mit einer Dichtscheibe (Liner) abgedeckt in den auf 4 °C vorgekühlten Autosampler zur Analyse bereitgestellt. Die Analyse erfolgte jeweils innerhalb weniger Stunden durch Aufbringen der Proben auf die Säule.

Für die Analyse wurde ein HPLC-System bestehend aus zwei Pumpen, einem Autosampler, einem Säulenofen und einem Fluoreszenzdetektor verwendet. Das System war mit einem PC verbunden, auf dem die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme mittels der Software 32 Karat (V.5.0, Fa. BECKMAN COULTER) vorgenommen wurde. Die Auftrennung der Proben erfolgte als Reversed-Phase-Chromatographie über eine Vorsäule (CC 8/4 Nucleosil 100-5) und eine analytische Trennsäule (CC 250/4 Nucleosil 100-5 C6H5). Die mobile Phase stellte ein Gemisch aus 25 mM NaH₂PO₄ und Azetonitril dar, dessen Azetonitril-Anteil im Lauf der Analyse entsprechend einem festgelegten Protokoll verändert wurde. Dies war möglich durch die Verwendung zweier Ansätze der mobilen Phase (Laufmittel A und B), die in definiertem Gradienten durch Steuerung der Flussraten der jeweiligen Pumpen miteinander gemischt werden konnten. Eine Übersicht über die chromatographischen Bedingungen gibt Tabelle 9.

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels einer Eichreihe, die aus einer 20 mM Histamin-Stammlösung in Phosphatpuffer erstellt wurde. Die Histaminlösung wurde über zwei Verdünnungsstufen (jeweils 1:100) auf Konzentrationen von 2 µM und dann im Weiteren durch eine geometrische Verdünnungsreihe bis auf 3,9 nM verdünnt. Von den Konzentrationen 2 µM bis 3,9 nM wurde jeweils eine Extraktion und anschließende Derivatisierung durchgeführt und die nach HPLC-Messung gewonnenen Werte für die Erstellung der Eichgerade herangezogen. Die Linearität der Eichgeraden wies eine Korrelation von 0,997 auf und war damit ausreichend für die Ermittlung der Probenkonzentrationen.

Tabelle 9. Übersicht über die chromatographischen Bedingungen der Histamin-Analytik

stationäre Phase:	
Vorsäule	CC 8/4 Nucleosil 100-5 C6H5
Trennsäule	CC 250/4 Nucleosil 100-5 C6H5
mobile Phase:	
Laufmittel A	25 mM NaH ₂ PO ₄ in Acetonitril/Wasser (5:95; v/v)
Laufmittel B	25 mM NaH ₂ PO ₄ in Acetonitril/Wasser (50:50; v/v)
Gradient:	
00-02 min	A: 100 %; B: 0 %
02-07 min	A: 100-0 %; B: 0-100 %
07-12 min	A: 0 %; B: 100 %
12-16 min	A: 100 %; B: 0 %
Fluss:	1,2 ml · min ⁻¹
Temperatur:	4° C Autosampler; 30° C Säulenofen
Injektionsvolumen:	100 µl
Detektion:	Exzitation: 350 nm; Emission: 450 nm

4.3 Aktivitätsaufzeichnung

Die Bewegungsaktivität der Hunde wurde kontinuierlich mittels Aktometern vom Typ ActiTrac[®] (Fa. SOMNOMEDICS) registriert und aufgezeichnet. Ein Aktometer registriert physikalische Aktivität bzw. Bewegung mit Hilfe eines biaxialen, piezoelektrischen Beschleunigungssensors und zeichnet sie in zwei Ebenen auf. Die Aktivität wird in der Maßeinheit der Erdbeschleunigung (G) erfasst und in mG angegeben. Vor dem jeweiligen Testbeginn wurde jedes Aktometer auf eine Empfindlichkeit von 2,5 G, eine Epochenlänge von zwei Sekunden und eine Datenrate von 30/min eingestellt. Außerdem wurden für die spätere Übertragung und Auswertung am Rechner Datum und Uhrzeit der verwendeten Aktometer mit denen des auswertenden PC synchronisiert. Die Aktometer wurden jeweils mit Hilfe von individuell einstellbaren Klettbändern am Hals der Hunde angebracht und so eng anliegend befestigt, dass keine Eigendynamik der Geräte die Messungen verfälschen konnte. Nach Abschluss der Untersuchungen wurden die aufgezeichneten Daten mittels Datenkabel, 9 pol-Sub-Stecker und dem Programm ActiTrac[®] (Version V8.29, Fa. IMSYSTEMS) zur Auswertung auf den PC übertragen, mit Hilfe der Monitor-Koppelsoftware[®] (Fa. SOMNOMEDICS) ausgewertet und anschließend zur weiteren Verarbeitung in die Programme Excel[®] (Microsoft[®] Office Excel 2003, Fa. MICROSOFT) und SPSS[®] (Version 15.0.1 für Windows[®], Fa. SPSS INC.) importiert.

4.4 Datenverarbeitung und Statistik

Für jeden Parameter wurde zu jedem Probennahmezeitpunkt das arithmetische Mittel (Mittelwert, MW) und der Standardfehler (SE) über alle Individuen berechnet und so Verlaufskurven über die einzelnen Übungen erstellt. Zur Auswertung dieser Verläufe wurden t-Tests für gepaarte Stichproben zwischen den jeweiligen Daten zu den einzelnen Probennahmezeitpunkten durchgeführt. Abweichungen in der Anzahl (n) bei einzelnen Messparametern ergaben sich durch Probenverluste während der Probennahme oder der Analytik sowie durch Ausfall bzw. Ausscheiden einzelner Hunde. Um einen möglichen Einfluss von Alter und Geschlecht auf die einzelnen Parameter zu den verschiedenen Probennahmezeitpunkten oder Zusammenhänge zwischen verschiedenen Parametern zu ermitteln, wurde jeweils eine Analyse von gemischten linearen Modellen (GLM) durchgeführt. Mittels GLM wurde außerdem für jeden Parameter auf Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstagen bzw. Übungen über ihren gesamten Verlauf betrachtet geprüft. Ein Vergleich der drei Experimente hinsichtlich des Niveaus der Speichel-sIgA-Konzentration erfolgte mittels univariater Varianzanalyse (ONE-WAY ANOVA) mit anschließendem Post-hoc-Test nach Scheffé. Durch Korrelationsanalysen nach Pearson wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Kortisol und Kortikosteron überprüft. Kriterium für die Annahme statistisch signifikanter Unterschiede bzw. Einflüsse war eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$.

Die statistische Auswertung wurde vom statistischen Beratungslabor (STABLAB, LMU) überprüft.

Die Berechnung der MW und SE sowie von Variationskoeffizienten (VK) erfolgte in Excel[®] (Microsoft[®] Office Excel 2003, Fa. MICROSOFT). Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms SPSS[®] (Version 15.0.1 für Windows[®], Fa. SPSS INC.) vorgenommen. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse (Box- & Wisker-Plots, Line-/Scatterplots, Vertical Bar Charts) wurde das Programm SigmaPlot[®] 2004 für Windows (Version 9.01, Fa. SYSTAT SOFTWARE INC.) verwendet.

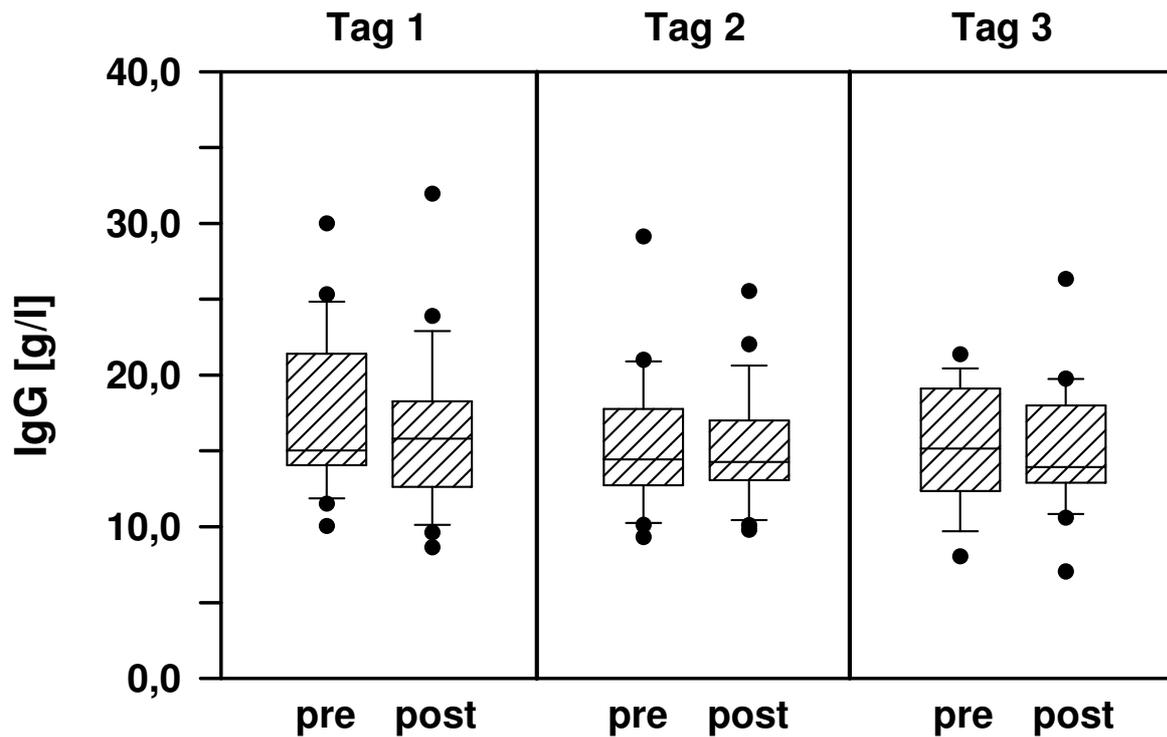
5. ERGEBNISSE

5.1 Physiologische Parameter im Plasma

5.1.1 *Immunglobuline*

IgG

Abbildung 3 zeigt den Verlauf der IgG-Konzentration [g/l] im Plasma von 20 Rettungshunden während der drei Versuchstage des Exp 2. Der Ausgangswert der Plasma-IgG-Konzentration lag am Morgen des ersten Tages im Durchschnitt bei $17,13 \pm 1,23$ g/l. Im Verlauf der weiteren Probennahmen nahm die mittlere IgG-Konzentration kontinuierlich bis auf $15,03 \pm 1,07$ g/l am Ende des letzten Tages ab. Dieser Abfall vom Ausgangswert des ersten Tages auf den Nachbelastungswert des letzten Tages erwies sich im Student'schen t-Test für gepaarte Stichproben als statistisch hoch signifikant ($t(15)=4,930$; $p<0,001$). Die Veränderungen der Plasma-IgG-Konzentration waren über alle Probennahmezeitpunkte betrachtet statistisch hoch signifikant (GLM: $F(5)=4,368$; $p=0,001$). Ebenso waren die Unterschiede zwischen den drei Versuchstagen mit $F(2)=9,527$; $p<0,001$ hoch signifikant. Im Durchschnitt lag der dritte Tag um 1,85 g/l niedriger als der erste ($p<0,001$).

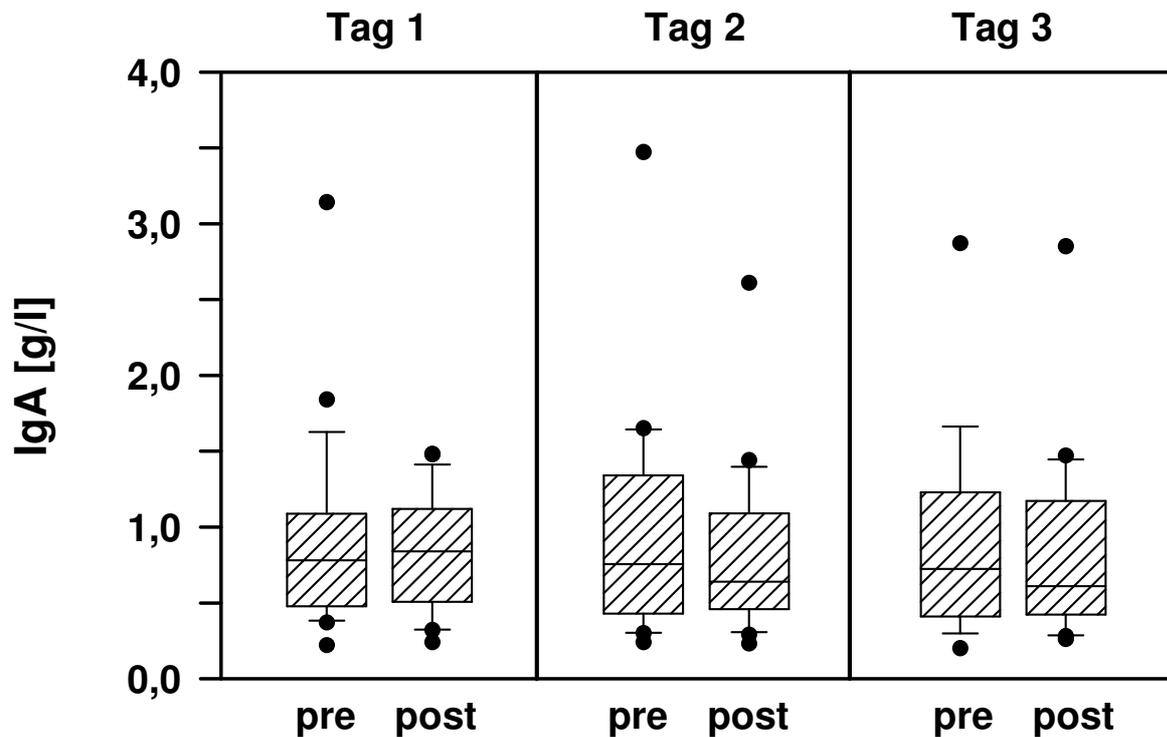


IgG [g/l]	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
	pre	post	pre	post	pre	post
MW	17,13	16,19	15,65	15,08	15,12	15,03
± SE	± 1,23	± 1,25	± 1,14	± 0,92	± 1,09	± 1,07
n	19	19	18	18	14	17

Abbildung 3. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor (pre) und nach (post) einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-IgG-Konzentration [g/l]. Oben: Darstellung in Box- & Wisker-Plots; unten: Mittelwerte (MW ± SE) über die Plasma-IgG-Konzentrationen [g/l] der bei den einzelnen Probennahmen getesteten Hunde (n: Anzahl).

IgA

Die während der 3-tägigen Trümmersuche bei den 20 eingesetzten Hunden des Exp 2 gemessenen Plasma-IgA-Konzentrationen [g/l] sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Mittelwerte der morgendlichen Konzentrationen lagen an jedem Tag höher als die jeweiligen Nachbelastungswerte. Die durchschnittliche IgA-Konzentration im Plasma fiel am ersten Tag von $0,89 \pm 0,15$ auf $0,81 \pm 0,09$ g/l, am zweiten Tag von $0,97 \pm 0,18$ auf $0,82 \pm 0,13$ g/l und am letzten Tag von $0,90 \pm 0,19$ auf $0,84 \pm 0,16$ g/l. Diese Veränderungen erwiesen sich aber statistisch als nicht signifikant. Weder über den gesamten Versuchsablauf noch an den einzelnen Tagen hatte der Probennahmezeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die Plasma-IgA-Konzentration.



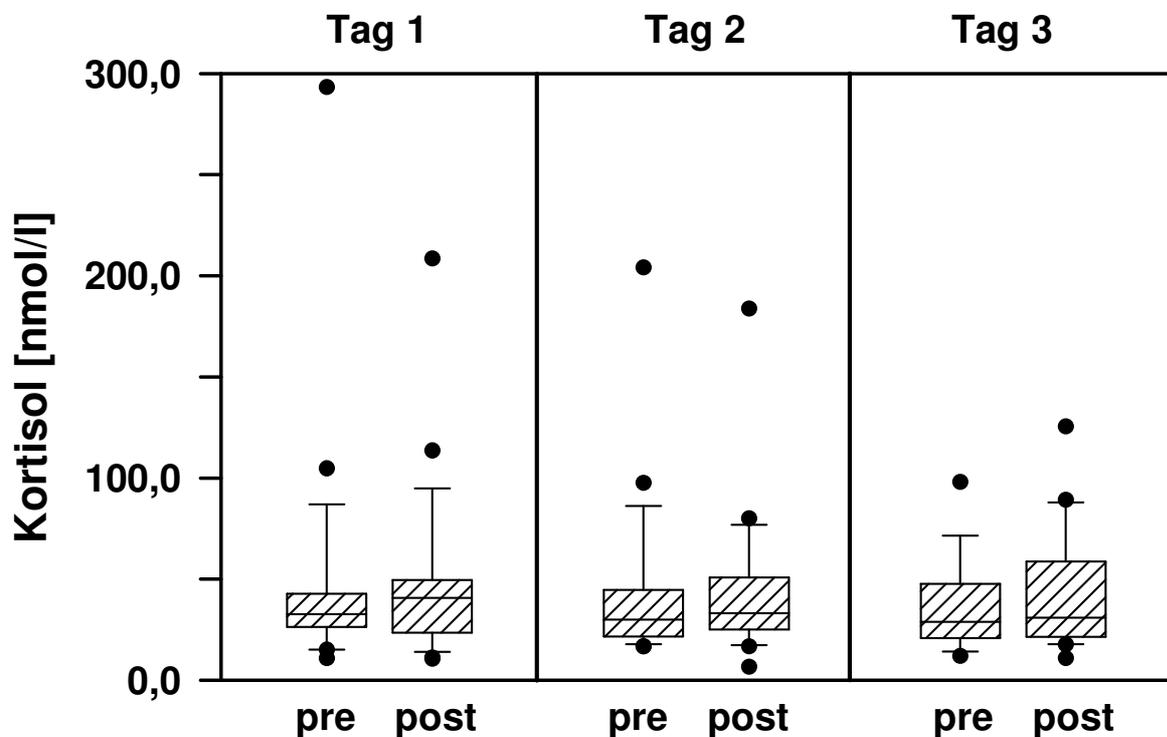
IgA [g/l]	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
	pre	post	pre	post	pre	post
MW ± SE	0,89 ± 0,15	0,81 ± 0,09	0,97 ± 0,18	0,82 ± 0,13	0,90 ± 0,19	0,84 ± 0,16
n	19	19	18	18	14	17

Abbildung 4. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor (pre) und nach (post) einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-IgA-Konzentration [g/l]. Oben: Darstellung in Box- & Wisker-Plots; unten: Mittelwerte (MW ± SE) über die Plasma-IgA-Konzentrationen [g/l] der bei den einzelnen Probennahmen getesteten Hunde (n: Anzahl).

5.1.2 Steroidhormone

Kortisol

Einen Überblick über die Plasma-Kortisolkonzentrationen [nmol/l] der Rettungshunde (n=20) während der drei Versuchstage des Exp 2 gibt Abbildung 5. Im Durchschnitt lagen die Werte zwischen $36,01 \pm 6,38$ nmol/l und $49,17 \pm 14,35$ nmol/l, ohne dass signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Probennahmen festzustellen waren. Weder über den gesamten Versuchsablauf noch an den einzelnen Tagen hatte der Zeitpunkt der Probennahme einen signifikanten Einfluss auf die Plasma-Kortisolkonzentration.

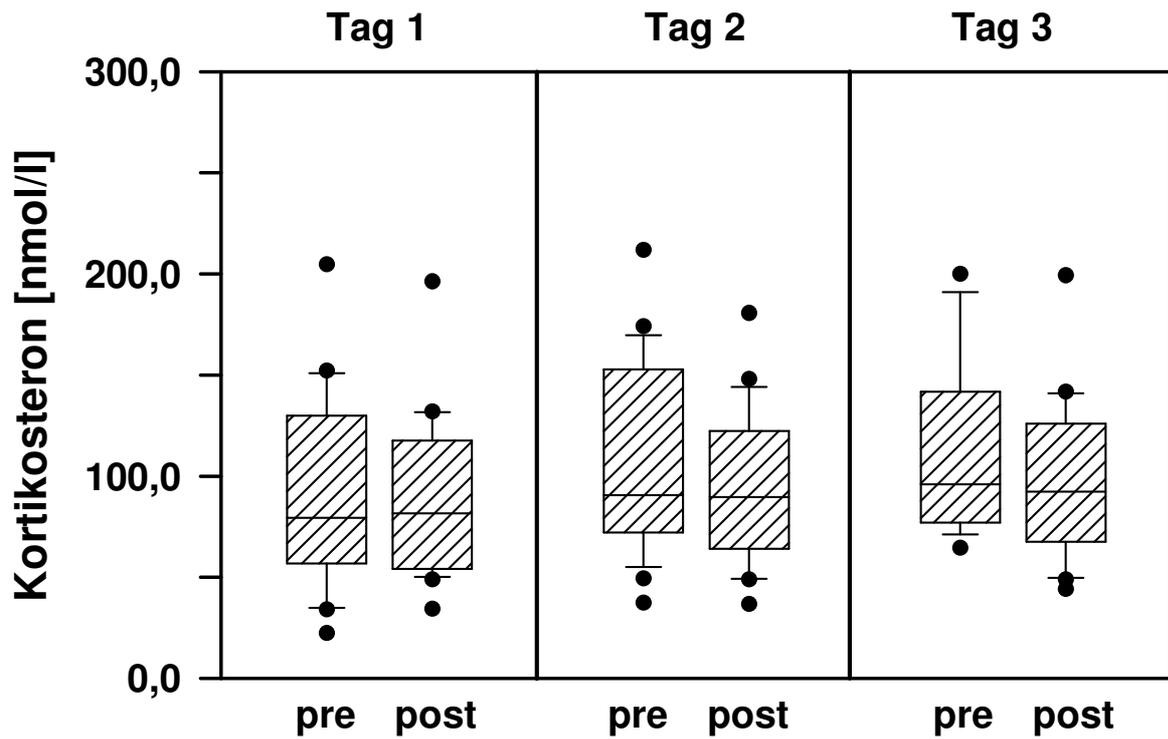


Kortisol [nmol/l]	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
	pre	post	pre	post	pre	post
MW ± SE	49,17 ± 14,35	48,19 ± 10,37	44,03 ± 10,47	44,95 ± 9,29	36,01 ± 6,38	43,05 ± 7,51
n	19	19	18	18	14	17

Abbildung 5. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor (pre) und nach (post) einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-Kortisolkonzentration [nmol/l]. Oben: Darstellung in Box- & Wisker-Plots; unten: Mittelwerte (MW ± SE) über die Plasma-Kortisolkonzentrationen [nmol/l] der bei den einzelnen Probennahmen getesteten Hunde (n: Anzahl).

Kortikosteron

Abbildung 6 dokumentiert den Verlauf der Plasma-Kortikosteronkonzentration [nmol/l] bei 20 Rettungshunden während der 3-tägigen Trümmersuche des Exp 2. An jedem der drei Tage sank die mittlere Plasma-Kortikosteronkonzentration im Lauf des Versuchstages vom morgendlichen Ausgangswert zum Nachbelastungswert ab, von $92,38 \pm 11,10$ nmol/l auf $86,08 \pm 9,33$ nmol/l am ersten, von $108,20 \pm 11,41$ nmol/l auf $95,61 \pm 9,47$ nmol/l am zweiten und von $115,51 \pm 12,64$ nmol/l auf $99,01 \pm 9,92$ nmol/l am dritten Tag (Abbildung 6). Diese Veränderungen erwiesen sich in t-Tests statistisch jedoch als nicht signifikant. Allerdings bestanden signifikante Unterschiede im Niveau der einzelnen Tage, sowohl in den jeweiligen Ausgangskonzentrationen als auch in den Nachbelastungswerten. Der gemittelte Ausgangswert des erstens Tages war signifikant niedriger als der des zweiten ($t(16)=-2,768$; $p=0,014$) und des dritten ($t(12)=-2,210$; $p=0,047$) Tages und auch die Nachbelastungswerte waren am zweiten ($t(16)=-3,261$; $p=0,005$) und dritten Tag ($t(15)=-2,690$; $p=0,017$) im Durchschnitt signifikant höher als am ersten Tag. Die Veränderungen der Plasma-Kortikosteronkonzentration waren über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet statistisch signifikant ($F(5)=2,535$; $p=0,035$). Mittels der Analyse von GLM konnte ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den an den drei Tagen ermittelten Werten festgestellt werden ($F(2)=5,178$; $p=0,008$), wobei die Werte am ersten Tag im Durchschnitt um $18,26$ nmol/l niedriger lagen als am dritten ($p=0,004$).

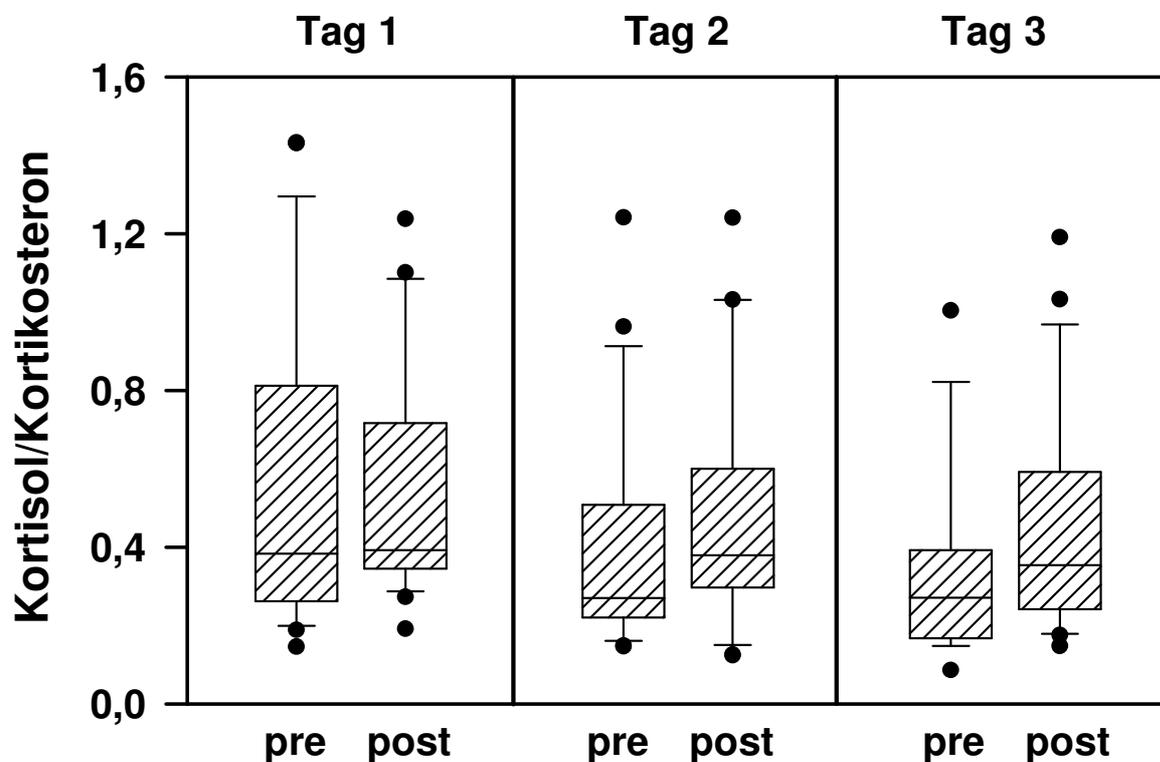


Kortikosteron [nmol/l]	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
	pre	post	pre	post	pre	post
MW	92,38	86,08	108,20	95,61	115,51	99,01
± SE	± 11,10	± 9,33	± 11,41	± 9,47	± 12,64	± 9,92
n	19	19	18	18	14	17

Abbildung 6. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor (pre) und nach (post) einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-Kortikosteronkonzentration [nmol/l]. Oben: Darstellung in Box- & Whisker-Plots; unten: Mittelwerte (MW ± SE) über die Plasma-Kortikosteronkonzentrationen [nmol/l] der bei den einzelnen Probenahmen getesteten Hunde (n: Anzahl).

Kortisol/Kortikosteron-Quotient

Aus den Kortisol- und Kortikosteronkonzentrationen der 20 Rettungshunde des Exp 2 wurde zudem der Kortisol/Kortikosteron-Quotient ermittelt (Abbildung 7), der im Durchschnitt zwischen $0,35 \pm 0,07$ und $0,55 \pm 0,09$ lag. Die Analyse mittels GLM ergab statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchstagen ($F(2)=3,832$; $p=0,026$). T-Tests für gepaarte Stichproben zeigten, dass der Morgenwert des dritten Tages von $0,35 \pm 0,07$ signifikant niedriger lag als die am ersten Tag ermittelten Werte von $0,55 \pm 0,09$ und $0,54 \pm 0,07$ ($t(12)=2,690$); $p=0,020$ bzw. $t(12)=4,298$; $p=0,001$). Veränderungen jeweils nach Belastung erwiesen sich weder in t-Tests noch in der Analyse mittels GLM als signifikant.

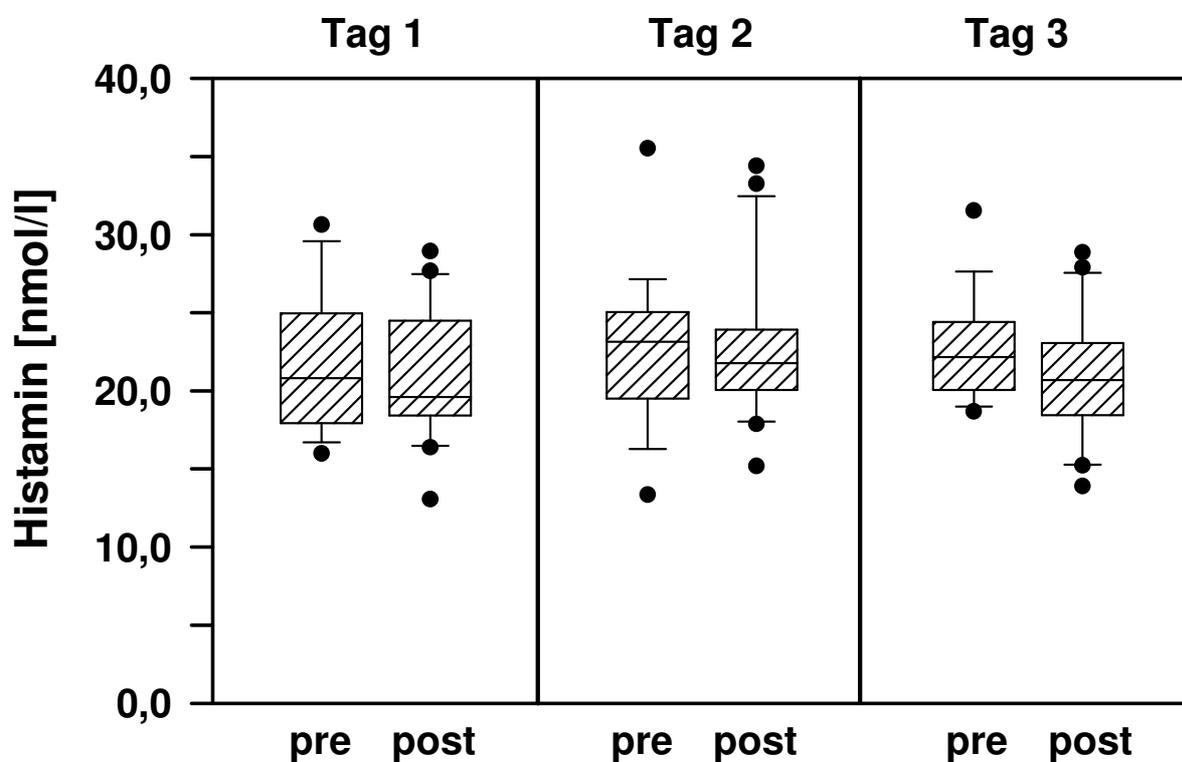


Kortisol/ Kortikosteron	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
	pre	post	pre	post	pre	post
MW ± SE	0,55 ± 0,09	0,54 ± 0,07	0,43 ± 0,07	0,49 ± 0,08	0,35 ± 0,07	0,46 ± 0,07
n	19	19	18	18	14	17

Abbildung 7. Verteilung des bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor (pre) und nach (post) einem Versuchsdurchgang ermittelten Kortisol/Kortikosteron-Quotienten. Oben: Darstellung in Box- & Wisker-Plots; unten: Mittelwerte (MW ± SE) über die Kortisol/Kortikosteron-Quotienten der bei den zu den einzelnen Probenahmen getesteten Hunde (n: Anzahl).

5.1.3 Histamin

Die über den 3-tägigen Versuchszeitraum bei den 20 Rettungshunden des Exp 2 gemessenen durchschnittlichen Plasma-Histaminkonzentrationen [nmol/l] sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Werte lagen im Mittel zwischen $20,8 \pm 1,03$ nmol/l und $22,7 \pm 1,25$ nmol/l und es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Probennahmen festzustellen. Weder über den gesamten Versuchsablauf noch an den einzelnen Tagen hatte der Zeitpunkt der Probennahme einen signifikanten Einfluss auf die Plasma-Histaminkonzentration.

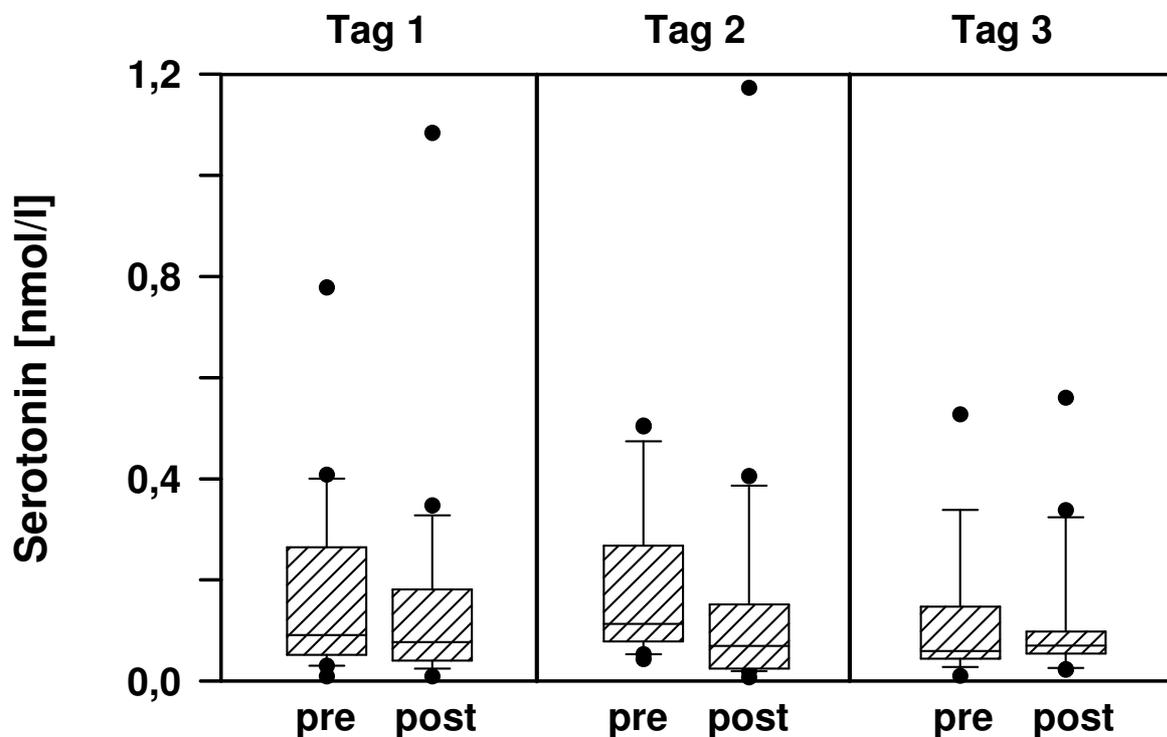


Histamin [nmol/l]	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
	pre	post	pre	post	pre	post
MW	21,6	20,9	22,3	22,7	22,7	20,8
± SE	± 1,18	± 1,05	± 1,44	± 1,25	± 1,01	± 1,03
n	15	17	14	16	13	16

Abbildung 8. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor (pre) und nach (post) einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-Histaminkonzentration [nmol/l]. Oben: Darstellung in Box- & Whisker-Plots; unten: Mittelwerte (MW ± SE) über die Plasma-Histaminkonzentrationen [nmol/l] der bei den einzelnen Probennahmen getesteten Hunde (n: Anzahl).

5.1.4 Serotonin

Abbildung 9 gibt eine Übersicht über die zu den einzelnen Zeiten der Probennahme bei den 20 Rettungshunden des Exp 2 gemessenen durchschnittlichen Plasma-Serotoninkonzentrationen [nmol/l]. Die mittlere Plasma-Serotoninkonzentration fiel am ersten Tag von $0,183 \pm 0,050$ nmol/l auf $0,159 \pm 0,056$ nmol/l, am zweiten Tag von $0,191 \pm 0,037$ nmol/l auf $0,164 \pm 0,072$ nmol/l und lag am dritten Tag zu beiden Probennahmezeitpunkten bei $0,122$ nmol/l. Diese Veränderungen erwiesen sich weder in t-Tests noch in der Analyse mittels GLM als signifikant.



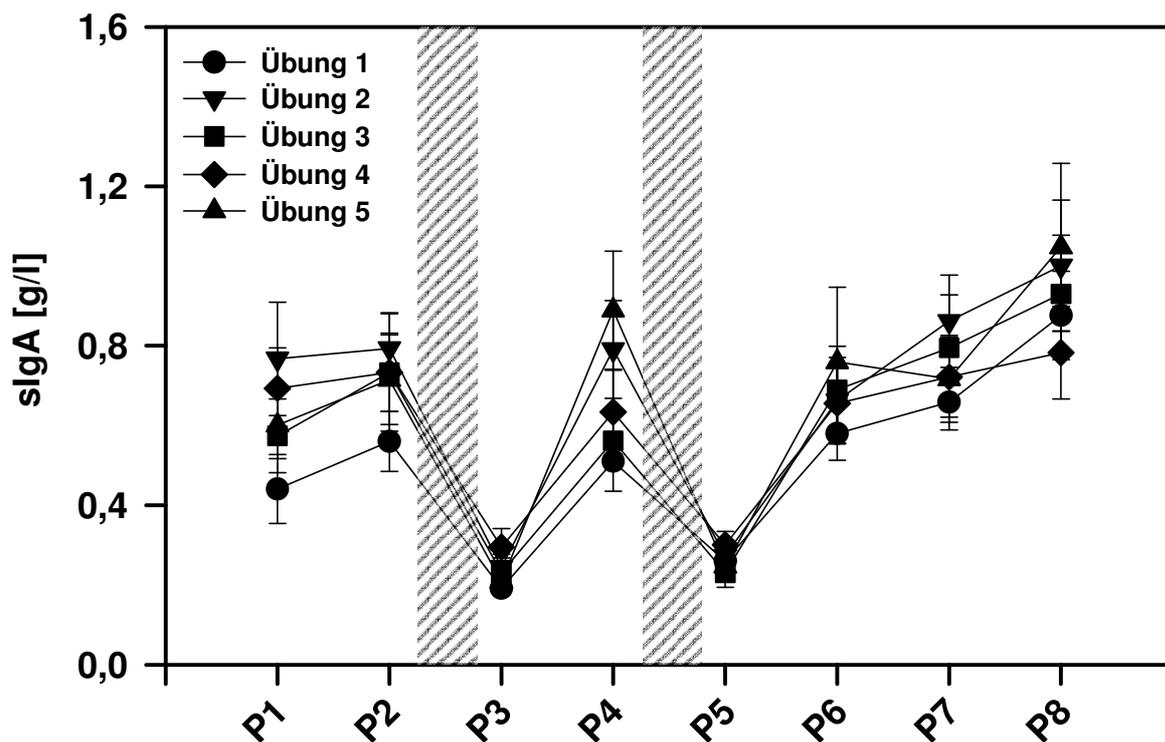
Serotonin [nmol/l]	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
	pre	post	pre	post	pre	post
MW ± SE	0,183 ± 0,050	0,159 ± 0,056	0,191 ± 0,037	0,164 ± 0,072	0,122 ± 0,040	0,122 ± 0,034
n	16	19	17	16	13	17

Abbildung 9. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor (pre) und nach (post) einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-Serotoninkonzentration [nmol/l]. Oben: Darstellung in Box- & Whisker-Plots; unten: Mittelwerte (MW ± SE) über die Plasma-Serotoninkonzentrationen [nmol/l] der bei den einzelnen Probennahmen getesteten Hunde (n: Anzahl).

5.2 sIgA im Speichel

5.2.1 Experiment 1

Abbildung 10 zeigt die Verläufe der Speichel-sIgA-Konzentration [g/l] von 19 Rettungshunden während fünf Suchübungen auf verschiedenen Geländeformen.



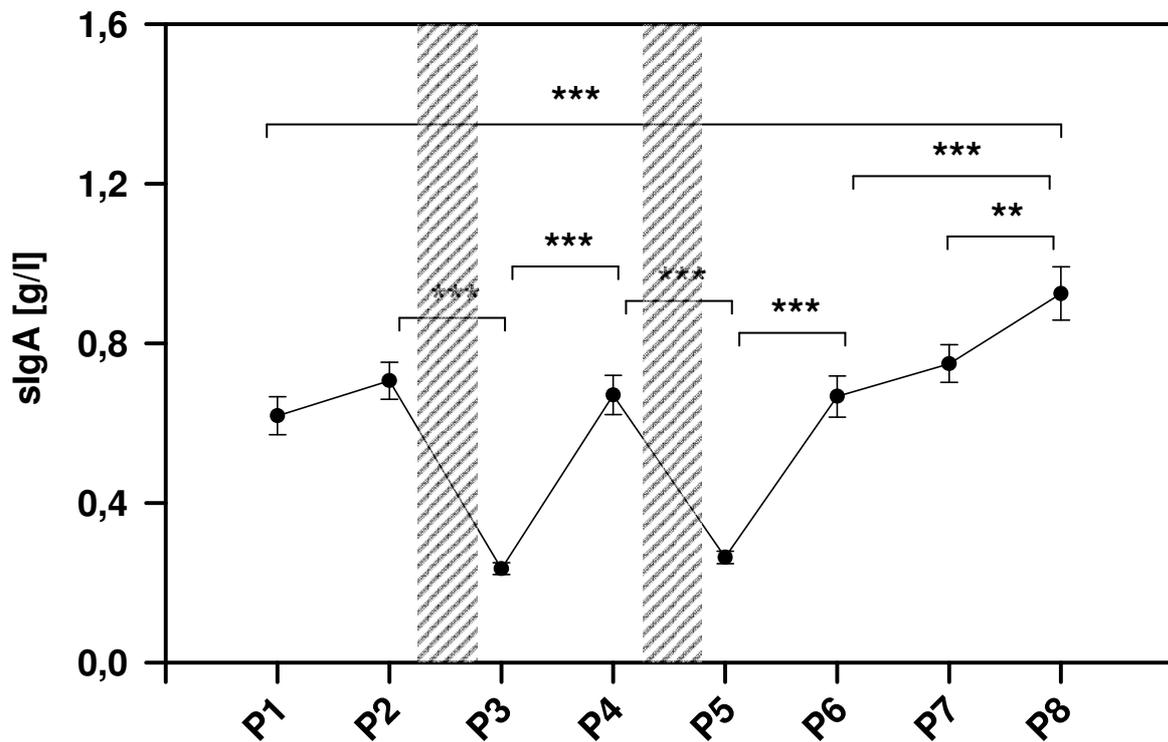
sIgA [g/l]	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Übung 1	0,44 ±0,09	0,56 ±0,08	0,19 ±0,02	0,51 ±0,07	0,26 ±0,04	0,58 ±0,07	0,66 ±0,07	0,88 ±0,11
Übung 2	0,77 ±0,14	0,79 ±0,09	0,24 ±0,03	0,79 ±0,12	0,27 ±0,04	0,66 ±0,11	0,86 ±0,12	1,00 ±0,16
Übung 3	0,57 ±0,09	0,73 ±0,15	0,23 ±0,04	0,56 ±0,07	0,23 ±0,04	0,69 ±0,11	0,80 ±0,13	0,93 ±0,15
Übung 4	0,69 ±0,10	0,73 ±0,10	0,30 ±0,05	0,63 ±0,10	0,30 ±0,03	0,66 ±0,10	0,72 ±0,10	0,78 ±0,12
Übung 5	0,60 ±0,08	0,71 ±0,11	0,21 ±0,02	0,89 ±0,15	0,25 ±0,02	0,76 ±0,19	0,72 ±0,11	1,05 ±0,21

Abbildung 10. Durchschnittlicher Verlauf (MW ± SE) der Speichel-sIgA-Konzentration [g/l] bei Rettungshunden während fünf Übungen auf verschiedenen Geländeformen und in verschiedenen Höhenlagen (Exp 1). P1-P8: Probenahmezeitpunkte; Übung 1 (Bewuchs 600 m): n=18; Übung 2 (Bewuchs 1600 m): n=18; Übung 3 (Trümmer 600 m): n=16; Übung 4 (Trümmer 1600 m): n=16, Übung 5 (Trümmer 2600 m): n=19. Der schraffierte Bereich kennzeichnet jeweils den Zeitraum der Suchübungen.

Die Verläufe der bei den fünf Übungen gemessenen sIgA-Konzentration unterschieden sich signifikant voneinander ($F(4)=5,580$; $p<0,001$). Auch der Zeitpunkt der Probennahme hatte einen signifikanten Einfluss auf die Speichel-sIgA-Konzentration ($F(7)=35,567$; $p<0,001$).

In Übung 1 lag der letzte Erholungswert (P8) mit $0,88 \pm 0,11$ g/l signifikant höher als der morgendliche Ausgangswert (P1) von $0,44 \pm 0,09$ g/l ($t(16)=-3,698$; $p=0,002$). Bei den übrigen Übungen war die durchschnittliche Speichel-sIgA-Konzentration der letzten Probennahme nicht signifikant höher als das jeweilige Ausgangsniveau (Übung 2: von $0,77 \pm 0,14$ g/l auf $1,00 \pm 0,16$ g/l; Übung 3: von $0,57 \pm 0,09$ g/l auf $0,93 \pm 0,15$ g/l; Übung 4: von $0,69 \pm 0,10$ g/l auf $0,78 \pm 0,12$ g/l; Übung 5: von $0,60 \pm 0,08$ g/l auf $1,05 \pm 0,21$ g/l) (Abbildung 10).

Aus Abbildung 11 ist anhand der gemittelten Werte über alle fünf Suchübungen ersichtlich, dass die Speichel-sIgA-Konzentration nach jeder Suche signifikant auf durchschnittlich $0,25 \pm 0,01$ g/l reduziert war und während den ersten 20 Minuten der Erholungsphase signifikant auf $0,67 \pm 0,01$ g/l anstieg. Damit wurde bereits bei der ersten Probennahme nach der Belastung das Ausgangsniveau erreicht.

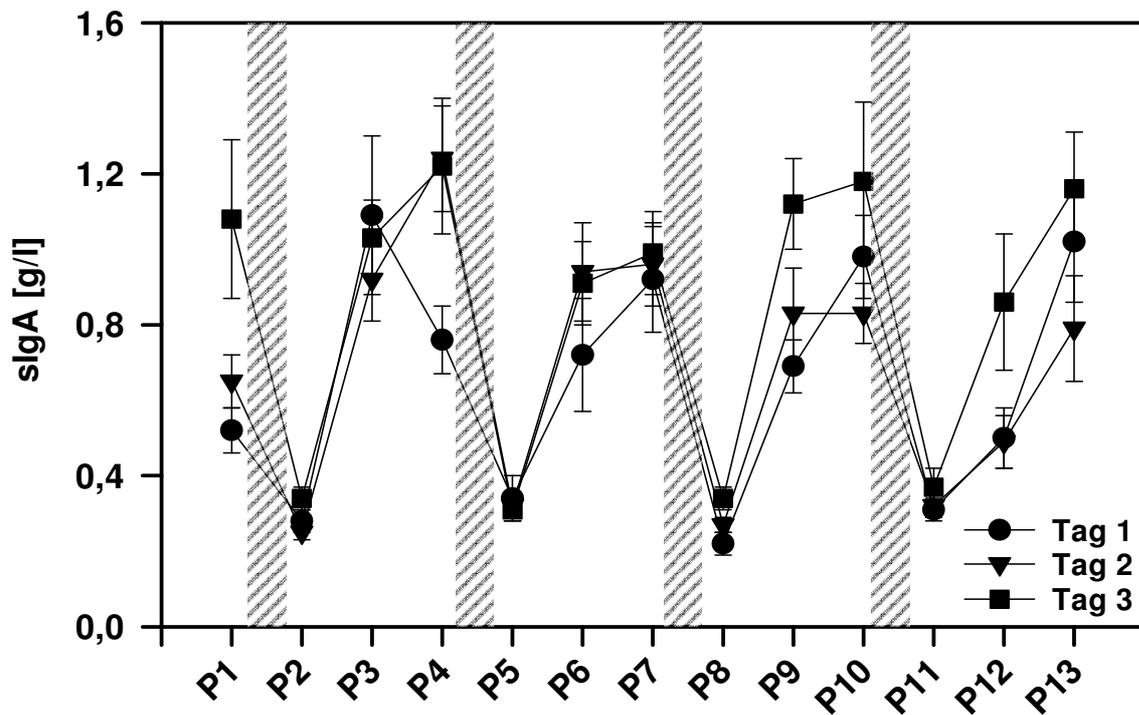


slgA [g/l]	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
MW	0,62	0,71	0,24	0,67	0,26	0,67	0,75	0,93
± SE	±0,05	±0,05	±0,02	±0,05	±0,02	±0,05	±0,05	±0,07

Abbildung 11. Mittlere Speichel-sIgA-Konzentration [g/l] (MW ± SE) zu den 8 Probennahmezeitpunkten gemittelt über die fünf Suchübungen (Exp 1). Signifikante Unterschiede zwischen den Probennahmezeitpunkten wurden mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). P1-P8: Probennahmezeitpunkte; Übung 1 (Bewuchs 600 m): $n=18$; Übung 2 (Bewuchs 1600 m): $n=18$; Übung 3 (Trümmer 600 m): $n=16$; Übung 4 (Trümmer 1600 m): $n=16$; Übung 5 (Trümmer 2600 m): $n=19$. Der schraffierte Bereich kennzeichnet jeweils den Zeitraum der Suchübungen.

5.2.2 Experiment 2

Abbildung 12 gibt einen Überblick über den Verlauf der mittleren Speichel-sIgA-Konzentration [g/l] bei 20 Rettungshunden während eines 3-tägigen Versuchszeitraumes mit Suchübungen im Trümmerfeld.



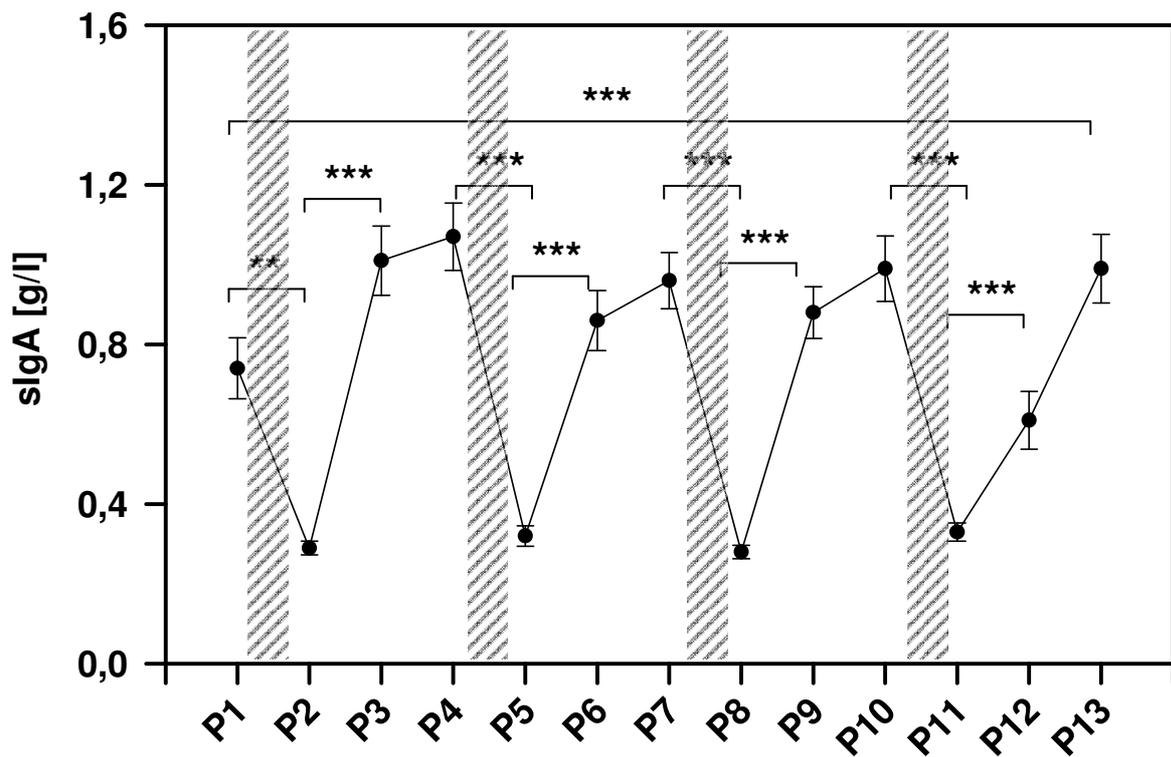
slgA [g/l]	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
Tag 1	0,52 ±0,06	0,28 ±0,03	1,09 ±0,21	0,76 ±0,09	0,34 ±0,06	0,72 ±0,15	0,92 ±0,14	0,22 ±0,03	0,69 ±0,07	0,98 ±0,11	0,31 ±0,03	0,50 ±0,08	1,02 ±0,16
Tag 2	0,65 ±0,07	0,25 ±0,02	0,92 ±0,11	1,24 ±0,14	0,32 ±0,03	0,94 ±0,13	0,96 ±0,11	0,27 ±0,02	0,83 ±0,12	0,83 ±0,08	0,32 ±0,03	0,49 ±0,07	0,79 ±0,14
Tag 3	1,08 ±0,21	0,34 ±0,03	1,03 ±0,10	1,22 ±0,18	0,31 ±0,03	0,91 ±0,11	0,99 ±0,11	0,34 ±0,03	1,12 ±0,12	1,18 ±0,21	0,37 ±0,05	0,86 ±0,18	1,16 ±0,15

Abbildung 12. Durchschnittlicher Verlauf (MW ± SE) der Speichel-sIgA-Konzentration [g/l] bei Rettungshunden während der 3-tägigen Trümmersuche (Exp 2). P1-P13: Probenahmezeitpunkte; Tag 1/Tag 2: n=20, Tag 3: n=19. Der schraffierte Bereich kennzeichnet jeweils den Zeitraum der Suchübungen.

Die Tagesverläufe der während der drei Tage mit Suchübungen im Trümmerfeld ermittelten sIgA-Werte unterschieden sich signifikant voneinander ($F(2)=14,351$; $p<0,001$). Dabei lag die Speichel-sIgA-Konzentration an Tag 3 um durchschnittlich $0,173$ g/l höher als an Tag 2 und um $0,209$ g/l höher als an Tag 1. Der mittlere Unterschied zwischen Tag 2 und Tag 1 betrug $0,036$ g/l sIgA. Außerdem zeigte der Zeitpunkt der Probennahme mit $F(12)=26,488$; $p<0,001$ einen signifikanten Einfluss auf die Speichel-sIgA-Konzentration.

Wie aus Abbildung 12 ersichtlich ist, lag der Ausgangswert am ersten Tag mit durchschnittlich $0,52 \pm 0,06$ g/l nicht höher als am zweiten Tag, an dem $0,65 \pm 0,07$ g/l gemessen wurden. Allerdings war der Ausgangswert am dritten Tag mit $1,08 \pm 0,21$ g/l signifikant höher als am ersten Tag ($t(17)=-3,146$; $p=0,006$), wohingegen der Unterschied gegenüber dem des zweiten Tages mit $t(17)=-2,037$; $p=0,058$ nur knapp über der Signifikanzgrenze lag. Am ersten Tag war der letzte Erholungswert zum Zeitpunkt P13 mit $1,02 \pm 0,16$ g/l signifikant höher als der Ausgangswert von $0,52 \pm 0,06$ g/l ($t(19)=-3,124$; $p=0,006$). An den beiden anderen Tagen lag die Speichel-sIgA-Konzentration der letzten Probennahme nur geringfügig über dem Ausgangsniveau (Tag 2: Anstieg von $0,65 \pm 0,07$ g/l (P1) auf $0,79 \pm 0,14$ g/l (P13); Tag 3: Anstieg von $1,08 \pm 0,21$ g/l (P1) auf $1,16 \pm 0,15$ g/l (P13)).

Der Kurvenverlauf der über die drei Tage zu den einzelnen Probennahmezeitpunkten gemittelten Speichel-sIgA-Konzentration (Abbildung 13) zeigte eine jeweils signifikante Reduktion der Speichel-sIgA-Konzentration nach jeder Suche auf durchschnittlich $0,31 \pm 0,01$ g/l und den ebenfalls signifikanten Anstieg der Speichel-sIgA-Konzentration bereits nach 20-minütiger Pause auf $0,84 \pm 0,06$ g/l sowie nach weiteren 20 Minuten auf gemittelt $1,00 \pm 0,05$ g/l.

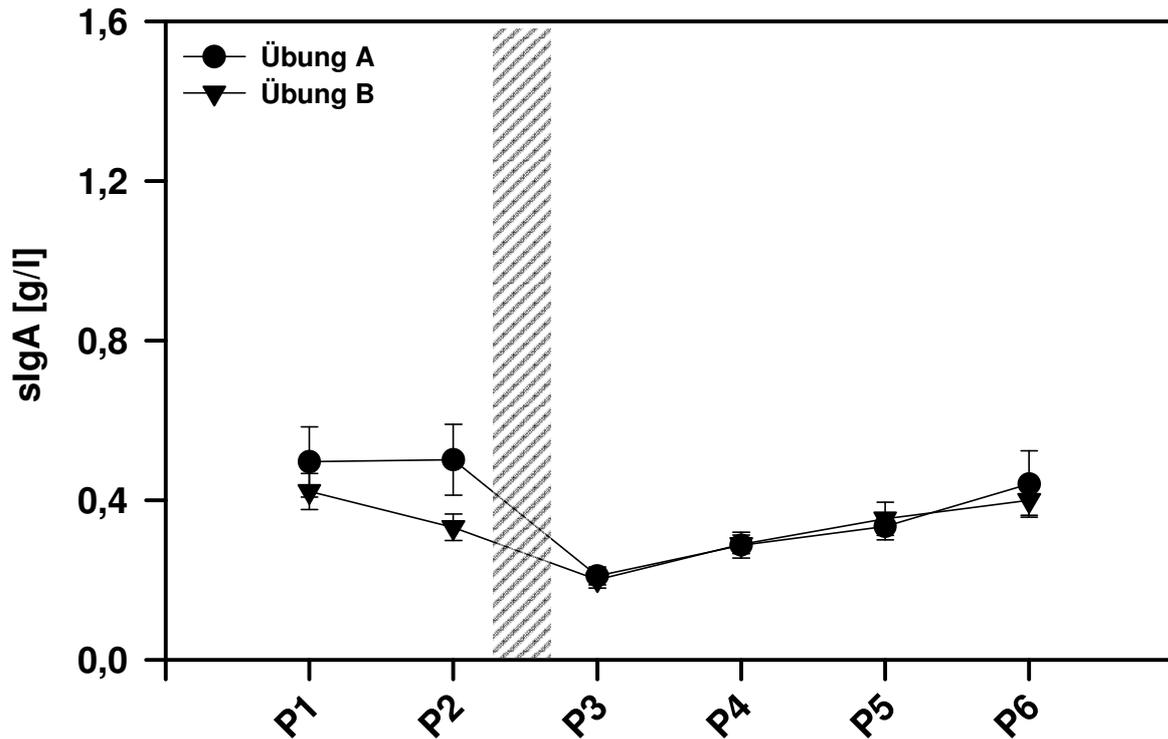


sIgA [g/l]	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
MW	0,74	0,29	1,01	1,07	0,32	0,86	0,96	0,28	0,88	0,99	0,33	0,61	0,99
± SE	±0,08	±0,02	±0,09	±0,08	±0,03	±0,08	±0,07	±0,02	±0,07	±0,08	±0,02	±0,07	±0,09

Abbildung 13. Mittlere Speichel-sIgA-Konzentration [g/l] (MW ± SE) zu den 13 Probenahmezeitpunkten gemittelt über die drei Versuchstage (Exp 2). Signifikante Unterschiede zwischen den Probenahmezeitpunkten wurden mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). P1-P13: Probenahmezeitpunkte; Tag 1/Tag 2: $n=20$, Tag 3: $n=19$. Der schraffierte Bereich kennzeichnet jeweils den Zeitraum der Suchübungen.

5.2.3 Experiment 3

Abbildung 14 dokumentiert die Verläufe der Speichel-sIgA-Konzentration [g/l] von 26 Diensthunden während zweier Schutzdienstübungen (Übung A und B), die im Abstand von vier Wochen durchgeführt wurden.

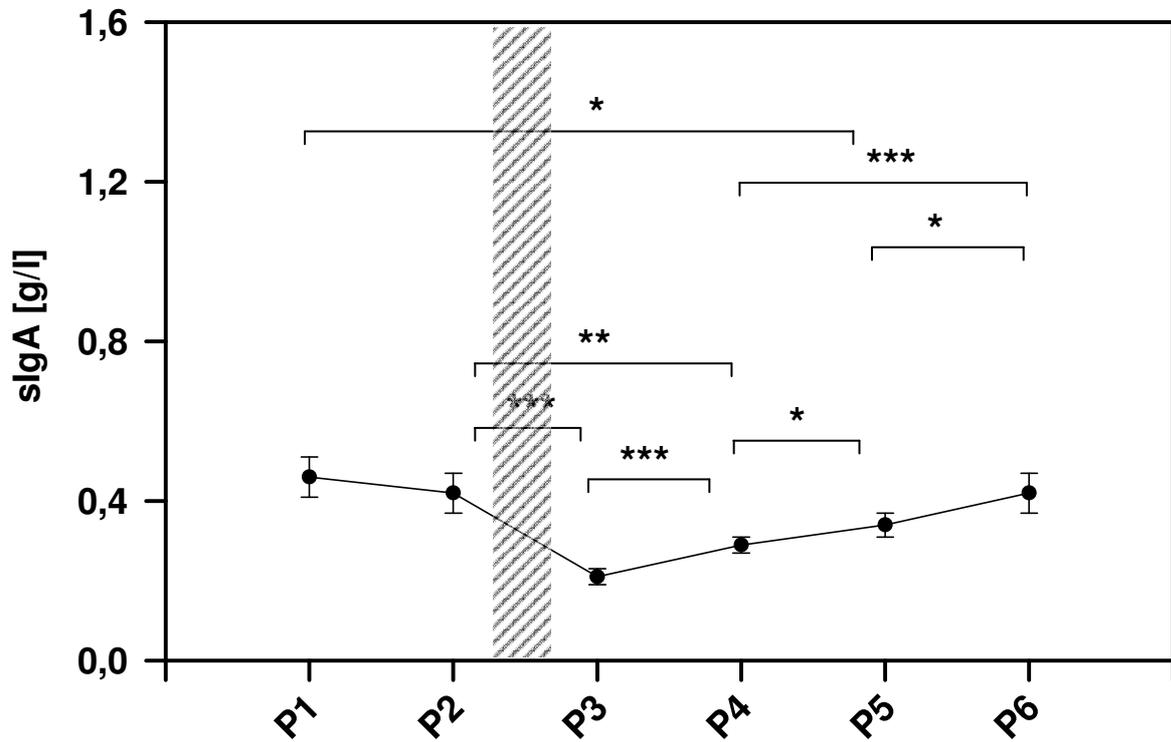


slgA [g/l]	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Übung A	0,50 ± 0,09	0,50 ± 0,09	0,21 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,44 ± 0,08
Übung B	0,42 ± 0,05	0,33 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,40 ± 0,04

Abbildung 14. Durchschnittlicher Verlauf (MW ± SE) der Speichel-sIgA-Konzentration [g/l] bei Diensthunden während zweier Schutzdienstübungen zu Beginn (Übung A) und am Ende (Übung B) einer 4-wöchigen Trainingsphase (Exp 3). P1-P6: Probenahmezeitpunkte; n=26. Der schraffierte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Übung.

Die Analyse mittels GLM ergab einen statistisch signifikanten Einfluss der Schutzdienstübung ($F(1)=5,037$; $p=0,026$) und des Probennahmezeitpunktes ($F(5)=8,881$; $p<0,001$). Dabei zeigte sich, dass die Speichel-sIgA-Konzentration während der Übung A, über den gesamten Verlauf betrachtet, um $0,06$ g/l höher lag als während Übung B ($p=0,026$). Bei direktem Vergleich der bei den verschiedenen Probennahmezeitpunkten gemessenen Werte mittels gepaartem t-Test ergab sich im mittleren Ausgangsniveau der Speichel-sIgA-Konzentration der Übung A ($0,50 \pm 0,09$ g/l) jedoch kein signifikanter Unterschied zu Übung B ($0,42 \pm 0,05$ g/l; Abbildung 14). Nur zum Zeitpunkt P2 lag der Unterschied zwischen den beiden Schutzdienstübungen mit $t(20)=1,910$; $p=0,071$ knapp über der Signifikanzgrenze.

Der Verlauf der Speichel-sIgA-Konzentration während der Schutzdienstübung und in der anschließenden Erholungsphase wird in Abbildung 15 anhand der Mittelwerte aus beiden Übungen dargestellt. Die gemittelte Speichel-sIgA-Konzentration war nach der 3-minütigen Schutzdienstübung signifikant auf $0,21 \pm 0,02$ g/l (P3) reduziert und stieg während der anschließenden Erholungsphase signifikant an. Bei der letzten Probennahme (P6) wurde mit durchschnittlich $0,42 \pm 0,05$ g/l das Ausgangsniveau annähernd wieder erreicht, aber nicht überschritten.



slgA [g/l]	P1	P2	P3	P4	P5	P6
MW	0,46	0,42	0,21	0,29	0,34	0,42
± SE	± 0,05	± 0,05	± 0,02	± 0,02	± 0,03	± 0,05

Abbildung 15. Mittlere Speichel-sIgA-Konzentration [g/l] (MW ± SE) zu den 6 Probennahmezeitpunkten bei den beiden Schutzdienstübungen (Exp 3). Signifikante Unterschiede zwischen den Probennahmezeitpunkten wurden mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). P1-P6: Probennahmezeitpunkte; n=26. Der schraffierte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Übung.

5.2.4 Vergleich der Experimente

Beim Vergleich der bei den beiden Untersuchungen an den Rettungshunden von Exp 1 und Exp 2 gewonnenen Daten zeigten sich deutliche Unterschiede in der Speichel-sIgA-Konzentration gegenüber den Diensthunden des Exp 3. Mittelwertbildung aus jeweils allen gemessenen sIgA-Konzentrationen eines Experiments ergab für die Rettungshunde aus Exp 2 eine durchschnittliche Konzentration von $0,72 \pm 0,02$ g/l Speichel-sIgA (Maximum 4,04 g/l) und bei den Rettungshunden von Exp 1 $0,60 \pm 0,02$ g/l (Maximum 3,65 g/l), wogegen bei den Diensthunden des Exp 3 nur durchschnittliche $0,36 \pm 0,02$ g/l (Maximum 2,10 g/l) gemessen wurden. Während die Rettungshunde in den Erholungspausen im Durchschnitt Konzentrationen bis zu 1,0 g/l oder mehr Speichel-sIgA erreichten, blieben die mittleren sIgA-Konzentrationen bei den Diensthunden durchgehend bei 0,5 g/l und darunter (vgl. Abbildungen 11, 13 und 15). Der Unterschied im Niveau der Speichel-sIgA-Konzentration erwies sich im statistischen Test mittels univariater Varianzanalyse mit $F(2)=53,692$; $p<0,001$ als signifikant. Post-hoc-Tests nach Scheffé (Tabelle 10) ergaben signifikante Differenzen zwischen den Werten aus allen drei Experimenten (jeweils $p<0,001$). Demnach lagen die Werte bei den Rettungshunden von Exp 2 im Mittel um $0,36 \pm 0,04$ g/l höher als bei den Diensthunden (Exp 3) und um $0,12 \pm 0,03$ g/l höher als bei den Rettungshunden des Exp 1. Letztere wiesen um durchschnittlich $0,25 \pm 0,04$ g/l höhere Speichel-sIgA-Konzentrationen auf als die Diensthunde.

Tabelle 10. Ergebnisse der Scheffé-Post-hoc-Tests nach univariater Varianzanalyse zur Feststellung von Unterschieden im Niveau der Speichel-sIgA-Konzentration bei Rettungs- und Diensthunden in den drei Experimenten.

sIgA [g/l]	mittlere Differenz (\pm SE)	p
Exp 1 – Exp 3	$0,25 \pm 0,04$	$<0,001$
Exp 2 – Exp 3	$0,36 \pm 0,04$	$<0,001$
Exp 2 – Exp 1	$0,12 \pm 0,03$	$<0,001$

Exp 1: alpine Rettungshunde bei wiederholten Suchübungen an einem Tag
 Exp 2: Rettungshunde während dreitägiger Belastung im Trümmergelände
 Exp 3: Diensthunde mit jeweils 3-minütiger Belastung im Abstand von vier Wochen
 sIgA: sekretorisches IgA; SE: Standardfehler; p: Signifikanzniveau;

5.3 Einflussfaktoren

5.3.1 Einflussfaktoren auf Plasmaparameter

Mittels der Analyse von GLM wurde der Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die verschiedenen gemessenen Parameter geprüft. Dabei zeigte sich, dass das Alter sowohl einen signifikanten Einfluss auf die Plasma-IgG-Konzentration ($F(2)=3,828$; $p=0,047$), als auch auf die Plasma-Serotoninkonzentration ($F(2)=6,080$; $p=0,012$) und die Plasma-Kortisolkonzentration ($F(2)=5,606$; $p=0,014$) hatte. Dagegen hatte das Alter keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Parameter Plasma-IgA und Plasma-Histamin. Der Einfluss des Alters auf die Plasma-Kortikosteronkonzentration lag nur knapp über der Signifikanzgrenze ($F(2)=3,657$; $p=0,053$). Das Geschlecht hatte offenbar keinen signifikanten Einfluss auf die Plasmaparameter, allerdings lagen die Irrtumswahrscheinlichkeiten bei der Plasma-Histamin- und der Plasma-IgG-Konzentration nur knapp über der Signifikanzgrenze ($F(1)=3,393$; $p=0,085$ bzw. $F(1)=4,034$; $p=0,064$). Die Ergebnisse dieser statistischen Analyse sind in Tabelle 11 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 11. Übersicht über die signifikanten Einflussfaktoren auf die einzelnen Plasmaparameter; Ergebnisse der statistischen Überprüfung mittels GLM.

Plasmaparameter	Einflussfaktor	p	Effekt
IgG	Alter Geschlecht	0,047 (0,064)	alt > jung > mittelalt (männlich > weiblich)
IgA	-	-	-
Kortisol	Alter	0,014	alt > jung > mittelalt
Kortikosteron	Alter	(0,053)	(alt > jung > mittelalt)
Histamin	Geschlecht	(0,085)	(weiblich > männlich)
Serotonin	Alter	0,012	jung > alt > mittelalt

p: Signifikanzniveau

Außerdem wurden die gegenseitigen Einflüsse der verschiedenen Plasmaparameter aufeinander geprüft. Dabei erwiesen sich die Plasma-IgG- und -IgA-Konzentrationen sowie die Plasma-Histaminkonzentration als unbeeinflusst von den übrigen untersuchten Parametern. Jedoch war ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Plasma-Kortisolkonzentration und der Plasma-Kortikosteronkonzentration zu verzeichnen ($F(1)=16,009$; $p<0,001$). Zudem zeigte Plasma-Kortisol einen signifikanten Einfluss auf Plasma-Serotonin ($F(1)=5,027$; $p=0,028$). Ebenso

waren die Einflüsse von Kortikosteron, Histamin und Serotonin auf die Plasma-Kortisolkonzentration signifikant ($F(1)=13,090$; $p=0,001$, $F(1)=4,585$; $p=0,036$ und $F(1)=4,684$; $p=0,033$). Nur knapp über der Signifikanzgrenze lagen die Irrtumswahrscheinlichkeiten bei Überprüfung des Einflusses von Kortisol auf Histamin ($F(1)=3,648$; $p=0,061$) und von Histamin auf Serotonin ($F(1)=2,994$; $p=0,087$). Diese wechselseitigen Einflüsse sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12. Übersicht über die signifikanten Einflüsse der Plasmaparameter untereinander; Ergebnisse der statistischen Überprüfung mittels GLM.

Plasmaparameter	Einflussfaktor	p	Zusammenhang
IgG	-	-	-
IgA	-	-	-
Kortisol	Kortikosteron	0,001	positiv
	Histamin	0,036	negativ
	Serotonin	0,033	positiv
Kortikosteron	Kortisol	<0,001	positiv
Histamin	Kortisol	(0,061)	(negativ)
Serotonin	Kortisol	0,028	positiv
	Histamin	(0,087)	(positiv)

p: Signifikanzniveau

Der Zusammenhang zwischen den Plasmaparametern Kortisol und Kortikosteron wurde zusätzlich mittels Korrelationsanalysen nach Pearson überprüft (Tabelle 13). Es zeigte sich, dass zu beiden Probennahmezeitpunkten des ersten Tages sowie am Morgen des zweiten Tages eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen der Plasma-Kortisol- und Kortikosteronkonzentration bestand. Zu den übrigen Zeitpunkten korrelierten die beiden Parameter nicht.

Tabelle 13. Ergebnisse der Korrelationsanalysen nach Pearson zur Frage des Zusammenhangs zwischen den Plasma-Kortisol- und Kortikosteronkonzentrationen zu den einzelnen Zeitpunkten der Probennahme. Signifikante Korrelationen wurden mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$)

	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
	pre	post	pre	post	pre	post
r	0,550*	0,764**	0,540*	0,435(*)	0,009	0,313
p	0,015	0,000	0,021	0,071	0,977	0,221
n	19	19	18	18	14	17

r: Korrelationskoeffizient; p: Signifikanzniveau; n: Anzahl

5.3.2 Einflussfaktoren auf slgA im Speichel

In keinem der durchgeführten Experimente (Exp 1, Exp 2 und Exp 3) konnte mittels der Analyse von GLM ein signifikanter Einfluss des Alters oder des Geschlechts auf die Speichel-slga-Konzentration festgestellt werden. Allerdings ergab sich jeweils ein signifikanter Zusammenhang zwischen slgA und Kortisol im Speichel sowie der Aktivität, was im Folgenden einzeln dargestellt wird.

Experiment 1

Die Verläufe der Speichel-slga- und -Kortisolkonzentration sowie der Aktivität von 19 Rettungshunden während fünf verschiedener Übungen werden in Abbildung 16 dokumentiert. Statistisch erwiesen sich sowohl der Einfluss der Speichel-Kortisolkonzentration ($F(1)=3,903$; $p=0,049$) als auch der Aktivität ($F(1)=165,598$; $p<0,001$) auf die Speichel-slga-Konzentration als signifikant.

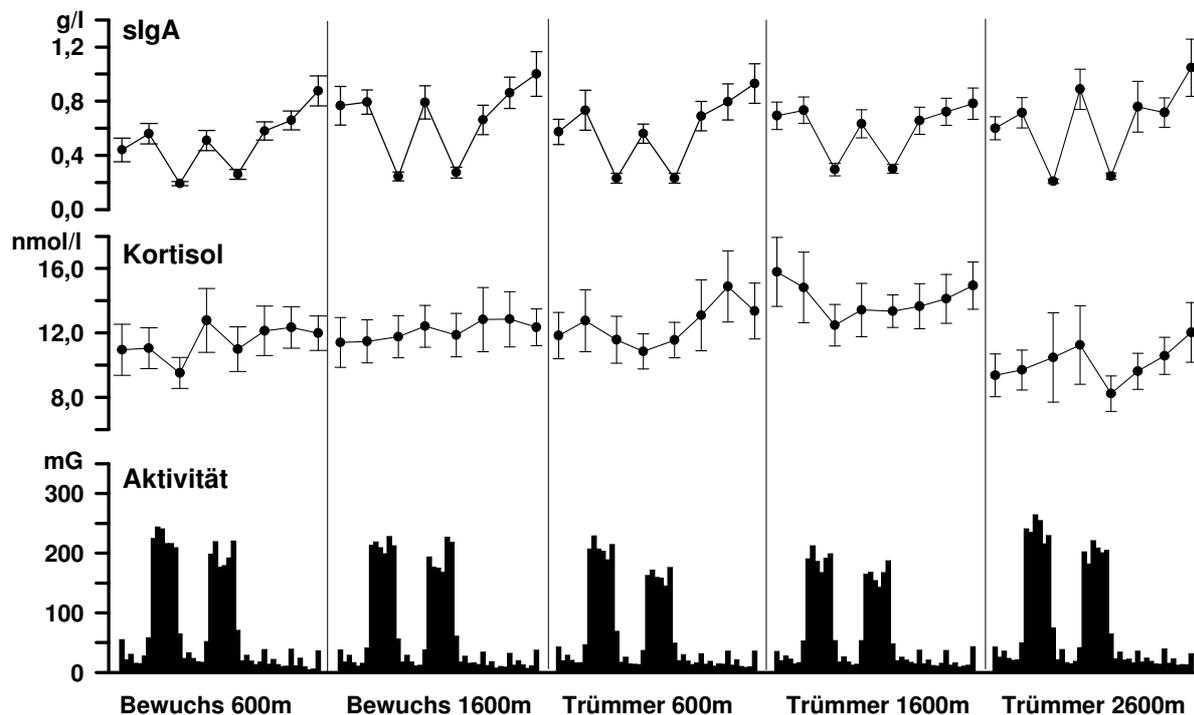


Abbildung 16. Speichel-Konzentrationen von slgA (MW \pm SE [g/l], oben) und Kortisol (MW \pm SE [nmol/l], Mitte) sowie Höhe der Bewegungsaktivität (MW [mG], unten) bei Rettungshunden ($n=19$) während wiederholter Suchübungen an fünf verschiedenen Versuchstagen in unterschiedlichem Gelände (bezüglich der Analyse von Speichel-Kortisol und Aktivität siehe WUST 2006).

Experiment 2

Abbildung 17 veranschaulicht die Verläufe der mittleren Speichel-slgA-Konzentration [g/l] und der durchschnittlichen Speichel-Kortisolkonzentration [nmol/l] von 20 Rettungshunden im Zusammenhang mit der Aktivität [mG] über drei aufeinander folgende Versuchstage im Trümmerfeld. Die Abbildung zeigt, dass zum einen die Speichel-slgA-Konzentration unmittelbar nach jeder Aktivitätsphase deutlich reduziert war, während zum anderen die Speichel-Kortisolkonzentration erhöht war. Im Verlauf der jeweils an die Suchen anschließenden Erholungspausen zeigte sich ebenfalls ein gegenläufiger Verlauf, indem die Speichel-slgA-Konzentration anstieg und die Speichel-Kortisolkonzentration abfiel. Unter Einbeziehung der Wechselwirkung von Speichel-Kortisolkonzentration mit der Aktivität erwiesen sich diese Zusammenhänge zwischen der Speichel-slgA- und der Speichel-Kortisolkonzentration in der Analyse mittels GLM mit $F(1)=5,176$; $p=0,023$ als statistisch signifikant. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Aktivität ($F(1)=12,672$; $p<0,001$) sowie der Speichel-Kortisolkonzentration in Wechselwirkung mit der Aktivität ($F(1)=12,384$; $p<0,001$) auf die Speichel-slgA-Konzentration.

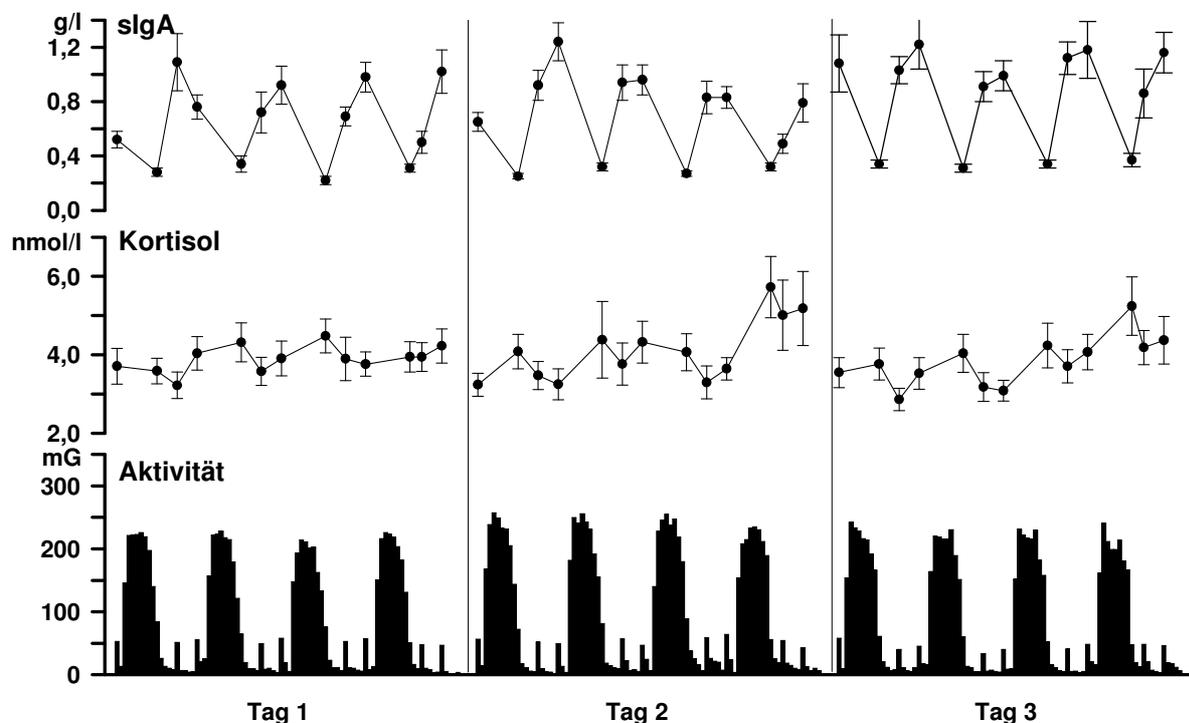


Abbildung 17. Speichel-Konzentrationen von slgA (MW \pm SE [g/l], oben) und Kortisol (MW \pm SE [nmol/l], Mitte) sowie Höhe der Bewegungsaktivität (MW [mG], unten) bei Rettungshunden ($n=20$) während drei aufeinander folgenden Versuchstagen im Trümmerfeld (bezüglich der Analyse von Speichel-Kortisol und Aktivität siehe WILHELM 2007).

Experiment 3

In Abbildung 18 sind die Verläufe der Speichel-slgA-, der Speichel-Kortisolkonzentration und der Aktivität bei 26 Diensthunden während zweier Schutzdienstübungen im Abstand von vier Wochen dargestellt. Es zeigt sich, dass es bereits unmittelbar nach der 3-minütigen Schutzdienstübung zu einer deutlichen Reduktion in der Speichel-slgA-Konzentration kam, wohingegen die Speichel-Kortisolkonzentration erhöht war. Im Verlauf der anschließenden Ruhepausen erfolgte ein stetiger Anstieg der Speichel-slgA-Konzentration bis zum Erreichen des Ausgangsniveaus. Auch die Speichel-Kortisolkonzentration stieg weiter an bis zum Erreichen eines Maximalwertes, um dann gegen Ende des Versuchsdurchganges gegenläufig zur Speichel-slgA-Konzentration abzufallen. Zwischen der Speichel-Kortisol- und der Speichel-slgA-Konzentration war nur unter Einbeziehung der Wechselwirkungen mit der Aktivität ein statistisch signifikanter Zusammenhang festzustellen ($F(1)=3,921$; $p=0,050$). Die Aktivität hatte mit $F(1)=17,553$; $p<0,001$ einen hoch signifikanten Einfluss auf die Speichel-slgA-Konzentration.

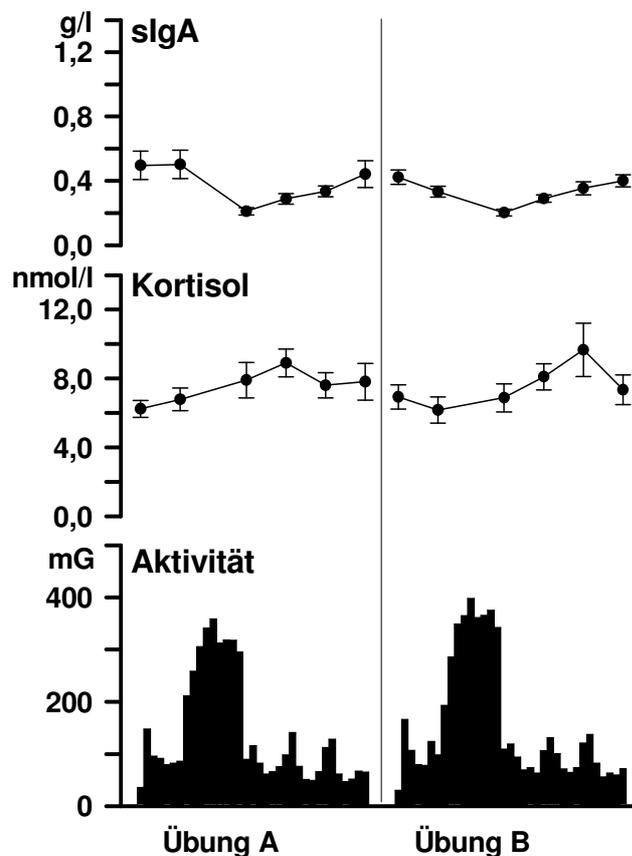


Abbildung 18. Speichel-Konzentrationen von slgA (MW \pm SE [g/l], oben) und Kortisol (MW \pm SE [nmol/l], Mitte) sowie Höhe der Bewegungsaktivität (MW [mG], unten) bei Diensthunden (n=26) bei zwei Übungen zu Beginn (Übung A) und am Ende (Übung B) einer 4-wöchigen Ausbildungsphase (bezüglich der Analyse von Speichel-Kortisol und Aktivität siehe PAULY 2007).

6. DISKUSSION

6.1 Untersuchungsmethoden

6.1.1 Versuchsdurchführung

Alle drei durchgeführten Experimente waren geeignet, die kurz-, mittel- und langfristige Belastung von Arbeitshunden zu untersuchen. In Exp 1 waren die Rettungshunde einer mittelfristigen Belastung mit zwei 20-minütigen Suchen pro Versuchstag und mehrtägigen Pausen zwischen den einzelnen Übungen ausgesetzt. Da es sich hier um gut trainierte Hunde handelte, kann diese Form der Belastung als mäßig eingestuft werden. Dagegen stellte der 3-tägige Versuchsaufbau in Exp 2 mit täglich vier 20-minütigen Suchen eine langfristige und somit intensivere Belastung dar. Zusätzlich waren bei diesem Experiment die Umgebungsbedingungen mit den Übernachtungen auf dem Versuchsgelände im Freien und die Anwesenheit von fremden Hunden und Personen als weitere Stressoren zu beachten. Demgegenüber war in Exp 3 mit den nur 3-minütigen Schutzdienstübungen eine kurzfristige, sehr intensive, physische Belastung gegeben. Da die Hunde über einen 4-wöchigen Zeitraum beobachtet wurden, konnten hier zusätzlich auch chronische Stresswirkungen erfasst werden, die durch den Umgebungswechsel für die neu angekauften Diensthunde, die Zwingereinzelhaltung und die Grundausbildung unter Zeitdruck entstanden.

Die für die vorliegende Arbeit ausgewählten Untersuchungsparameter sollten die verschiedenen Aspekte einer potentiellen Stressantwort beleuchten. Dabei sollten die Plasma-Konzentrationen von IgG und IgA als Indikatoren für ein möglicherweise beeinträchtigtes Immunsystem dienen. Die Kortikosteroide Kortisol und Kortikosteron im Plasma wurden zur Beurteilung der Stresswirkung auf die HHN-Achse untersucht. Außerdem wurden die biogenen Amine und Mediatoren Serotonin und Histamin auf ihre Tauglichkeit als Stressparameter getestet. Im Speichel wurde sIgA bestimmt, welches zum einen Rückschlüsse auf Veränderungen im Immunsystem zulässt, und zum anderen einen Hinweis auf die Auslösung von physiologischen Stressreaktionen (HHN-Achse, SAM-Aktivierung) liefern könnte. Auf die Messung der Katecholamine

als Vermittler der SAM-Aktivierung wurde verzichtet, da diese Hormone im Plasma zu sensibel auf den Stress bei der Probennahme reagieren (BEERDA ET AL. 1997) und zudem diese Stressachse durch die Aufzeichnung der Herzfrequenz (WUST 2006, PAULY 2007, WILHELM 2007) ausreichend erfasst wurde. Der Stressparameter Speichel-Kortisol wurde in den Dissertationen von WUST (2006), WILHELM (2007) und PAULY (2007) untersucht und dort ausführlich dargestellt und diskutiert.

6.1.2 Probennahmen

Die Gewinnung der Speichel- und Blutproben stellte für die Hunde einen Stressor dar, der je nach Hund unterschiedlich gut toleriert wurde. Dabei kann die Fixierung der Hunde während der Probennahme als größerer Stressor angesehen werden, als die Probennahme selbst (BEERDA ET AL. 1996). Die fixierende Person hatte einen großen Einfluss auf die Stressreaktion der Hunde, da sich Aufregung und Unruhe des Menschen auf das Tier übertragen können (TUBER ET AL. 1996). Der mit der Probennahme verbundene Stress kann bei den Rettungshunden als gering eingestuft werden, da die Hunde durch ihre vertraute Bezugsperson gehalten wurden und es sich bei den untersuchten Hunden um sehr gut ausgebildete Tiere von ausgeglichenem Wesen handelte. Für die Diensthunde war der Stress während der Probennahmen sicherlich größer. Diese Hunde waren insgesamt von leicht erregbarem Temperament und den Umgang mit fremden Personen nicht gewohnt. Zusätzlich wurden sie zur Probennahme vom verantwortlichen Ausbilder gehalten, der für den Hund eine fremde Person darstellte. Bei einigen Hunden zeigte sich eine mehr oder weniger ausgeprägte Gingivitis. Das Kauen auf den Wattetupfern während der Speichelprobennahme könnte gerade bei diesen Hunden Schmerzen und damit zusätzlichen Stress verursacht haben. Da sich Stress-induzierte Veränderungen in den Immunglobulin-, Hormon- und Neurotransmitterkonzentrationen aber erst verzögert im Blut und Speichel nachweisen lassen, sollten die nur wenige Minuten andauernden Probennahmen sowohl bei den Rettungs- als auch bei den Diensthunden keinen Einfluss auf die gemessenen Werte gehabt haben. Eine zu häufige Probennahme könnte jedoch insgesamt einen Stressreiz darstellen und zu einer Störung des möglicherweise vorhandenen, endogenen Kortisolrhythmus führen (MÖSTL & PALME 2002). Aufgrund der häufigen Speichelprobennahmen kann ein solcher Effekt nicht völlig ausgeschlossen werden.

6.1.3 Probenaufarbeitung

Die Proben wurden nach der Gewinnung in einer Kühltasche mit Kühlakkus gelagert und innerhalb von maximal 30 Minuten verarbeitet und bis zur Analyse eingefroren gelagert (vgl. Kapitel 4.2). Die Immunglobuline IgG (PAULY 2007) und IgA (KIKKAWA ET AL. 2003) sowie das Kortikosteroid Kortisol (THUN 1984) sind bei gekühlter bzw. tiefgefrorener Lagerung stabil. Das ist auch für das dem Kortisol chemisch nahe verwandte Kortikosteron zu erwarten. Die empfindlicheren Histamin- und Serotoninproben wurden vor dem Einfrieren mit Stabilisatoren versetzt, um Substanzverlust durch Abbau zu verhindern und ihre Lagerungsfähigkeit zu verbessern. Den Histaminproben wurde dazu, wie bereits von KNIES (2005) vorgeschlagen, Aminoguanidin zugesetzt, das ein potenter Inhibitor der Histamin-abbauenden Diaminoxidase (DAO) ist. Für die Serotoninproben wurde Natriumdisulfit als Stabilisator gewählt (PICARD ET AL. 1985). Aufgrund dieses Vorgehens kann ein Abbau oder Verlust der Immunglobuline, Hormone und biogenen Amine bei der Probengewinnung, -lagerung und -aufarbeitung weitgehend ausgeschlossen werden.

6.1.4 Analytik

Die am Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der LMU München etablierten ELISAs für IgG und Kortisol wurden bereits in den Untersuchungen von WUST (2006), WILHELM (2007) und PAULY (2007) angewendet. Wegen der hohen Verdünnung der Plasmaproben und der Abweichungen der Assays außerhalb des linearen Messbereichs in höheren oder niedrigeren Konzentrationsbereichen, sind die entsprechenden Inter- und Intra-Assayvarianzen bei der Beurteilung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Bei den kommerziellen ELISA-Kits für Kortikosteron und Serotonin können Matrixeffekte durch das Hundeplasma nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da diese Kits aufgrund unzureichender Probenmenge nicht für canines Plasma validiert werden konnten. Um auszuschließen, dass intra-individuelle Abweichungen durch systematische Messungenauigkeiten, Intra-Assayvarianzen oder möglicherweise geringere Richtigkeit eines Assays verstärkt oder verfälscht wurden, wurde bei den Analysen darauf geachtet, dass jeweils alle Proben eines Hundes innerhalb eines Assays gemessen wurden.

Die HPLC-Analytik für Histamin wurde bereits von KNIES (2005) durchgeführt und ist am Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der LMU etabliert. Die HPLC-Methode mit fluorometrischer Detektion ist spezifisch, sensitiv und präzise. Allerdings kann die Analyse durch Substanzen, die mit OPA reagieren verfälscht werden. Wie LORENZ (1974) zeigte, können schon kleine Veränderungen bei der Inkubation die Spezifität beeinflussen, so dass die Spezifität des Assays in jedem biologischen Material neu geprüft werden muss. In der vorliegenden Arbeit konnte wegen zu geringer Verfügbarkeit von Probenmaterial keine weitergehende Überprüfung der Methode durch Mehrfachmessungen durchgeführt werden. Sollte jedoch solch ein systematischer Fehler aufgetreten sein, dürfte er die Befunde nicht wesentlich beeinflusst haben.

6.2 Physiologische Parameter im Plasma

6.2.1 *Immunglobuline*

IgG

Die bei den Rettungshunden des Exp 2 gemessenen Plasma-IgG-Konzentrationen von 15,0 bis 17,1 g/l lagen in ähnlichen Bereichen wie bei PAULY (2007), die bei den Diensthunden aus Exp 3 Werte von 14,5 bis 18,0 g/l ermittelte. Bei HEDDLE & ROWLEY (1975) fanden sich durchschnittliche Werte von 8,4 g/l und GERMAN ET AL. (1998) berichteten von 17,2 g/l bei adulten Hunden. Als Referenzwerte für canines IgG werden 9,2 bis 14,5 g/l angegeben (WILLARD & TVEDTEN 2006). Damit lagen die in Exp 2 gemessenen Werte nur geringfügig höher als der angegebene Normbereich. Wie auch bereits bei PAULY (2007) dargelegt wurde, könnten die erhöhten Werte mit einer Stimulierung der Antikörperproduktion durch eine unbekannte Keimflora in der neuen Umgebung zusammenhängen. Zwar dauerte der Aufenthalt der Rettungshunde auf dem Übungsgelände nur drei Tage, aber es handelte sich dabei um Hunde, die für Auslandseinsätze ausgebildet und deshalb schon häufig an fremden Orten trainiert und eingesetzt wurden. KRAFT ET AL. (2005) betrachten die Haltungform als eine mögliche Ursache für eine Erhöhung von Leukozytenzahlen, wobei im Freien gehaltene Hunde generell höhere Werte aufweisen sollen. Vermutlich spiegelte sich in der leicht erhöhten Plasma-IgG-Konzentration eine allgemeine Stimulierung des Immunsystems der Rettungshunde wider.

Es wurde ein kontinuierlicher Abfall der Plasma-IgG-Konzentrationen vom Morgen des ersten Tages bis zum Abend des letzten Tages festgestellt. Wie bereits von WILHELM (2007) beschrieben wurde, zeigte sich bei denselben Hunden gleichzeitig ein Anstieg der Leukozytenzahl von 7189 auf 8644 x 10⁶/l wobei der Anteil der Lymphozyten über die drei Tage weitgehend konstant bei 17 bis 22 % geblieben war. Der Abfall des IgG kann demnach nicht auf eine Abnahme oder Verschiebung der Lymphozyten zurückgeführt werden. Eine relative Volumenveränderung durch Dehydratation ist aufgrund des weitgehend konstanten Hämatokrits von 0,45 bis 0,47 ebenfalls auszuschließen (WILHELM 2007).

Bei Ratten konnte durch akuten Stress eine Erhöhung der Serum-IgG-Konzentration induziert werden (KAUFMAN ET AL. 1994). Auch SILBERMAN ET AL. (2003) berichteten von einer Stimulation der humoralen, T-Zell-abhängigen, antigen-spezifischen Antwort nach akutem Stress. Bei den Hunden aus Exp 2 konnte jedoch jeweils nach Ende der vier Suchdurchgänge eines Tages keine Erhöhung der Plasma-IgG-Konzentration festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich die Belastungen der vier Suchübungen aufsummierten und sich dadurch ähnliche Effekte wie bei einer chronischen Belastung ergaben. Unter chronischem Stress wurden bei Versuchspersonen (BØYUM ET AL. 1996) und Nagern (SILBERMAN ET AL. 2003) Reduktionen in Immunglobulinkonzentrationen beobachtet, die als Folge der Suppression der Immunzellen durch Kortikosteroidwirkung erklärt wurden (SILBERMAN ET AL. 2003). Weitere Ursachen für eine Reduktion der Immunglobuline könnten neben einer Hemmung der Antikörperproduktion, d. h. der Hemmung der Lymphozytenfunktionen, auch die Diffusion von Immunglobulinen aus dem Blut in sekretorische Flüssigkeiten (z. B. in den Atem- oder Verdauungstrakt), Verbrauch durch Muskelzellschäden und lokalen Entzündungen, Katecholamindepletion oder eine Rezeptor-Down-Regulation sein (NIEMAN & NEHLSSEN-CANNARELLA 1991, MACKINNON 2000).

Die signifikante Reduktion der IgG-Konzentration vom ersten bis zum dritten Versuchstag könnte ein Hinweis darauf sein, dass es bei den Rettungshunden des Exp 2 durch die körperliche Anstrengung während des 3-tägigen Versuchszeitraums insgesamt zu ähnlichen Effekten kam wie bei einer chronischen Belastung. Im Gegensatz dazu stellte PAULY (2007) bei den Diensthunden des Exp 3 über vier Wochen ansteigende IgG-Konzentrationen bei gleichzeitiger Leukozytopenie und Granulozytose fest. Dies wurde von ihr dadurch erklärt, dass die Hunde sich während der vier Wochen mit einer neuen Keimflora auseinandersetzen mussten. Eine direkte Stimulation des Immunsystems könnte demnach bei PAULY (2007) eine aufgetretene chronische Stresswirkung überlagert haben.

IgA

Die Plasma-IgA-Konzentration lag im Durchschnitt zwischen 0,82 und 0,97 g/l. Diese Werte lagen in ähnlichen Bereichen wie auch die Literaturangaben für Serum-IgA-Konzentrationen (0,44 g/l bei HEDDLE & ROWLEY 1975; 0,23 bis 0,46 g/l bei FELSBURG ET AL. 1985; 1,0 g/l bei GERMAN ET AL. 1998; 0,7 bis 2,6 g/l bei RINKINEN ET AL. 2003; 0,79 bis 0,83 g/l bei WILLARD & TVEDTEN 2006). In den Konzentrationen des Plasma-IgA in Exp 2 wurden keine Veränderungen über die Probennahmezeitpunkte beobachtet. Da IgA als sekretorisches Immunglobulin seine Wirkungen aber vorwiegend in mukösen Oberflächen ausübt, war eine deutliche Veränderung in der Plasma-Konzentration während des 3-tägigen Versuchszeitraums letztlich nicht zu erwarten.

Eine pathologische IgA-Defizienz mancher Hunderassen, u. a. beim Beagle und DSH, muss immer als Einflussfaktor auf die Ergebnisse berücksichtigt werden (WHITBREAD ET AL. 1984, FELSBURG ET AL. 1985, GLICKMAN ET AL. 1988, BATT ET AL. 1991). FELSBURG ET AL. (1985) stellte als minimale physiologische Serum-IgA-Konzentration etwa 0,23 g/l fest und betrachtete darunter liegende Werte als pathologisch. Von den Hunden des Exp 2 lag lediglich ein DSH knapp über der Grenze zu diesen niedrigen Konzentrationsbereichen, so dass eine Verfälschung der Daten durch IgA-defiziente Hunde ausgeschlossen werden kann.

6.2.2 Steroidhormone**Kortisol**

Die im Plasma der Rettungshunde von Exp 2 gemessenen durchschnittlichen Kortisolwerte von 36,01 bis 49,17 nmol/l lagen in einem ähnlichen Bereich wie die von KNIES (2005) bei Rettungshunden gefundenen Ruhewerte von 27,7 bis 58,6 nmol/l. Dagegen wiesen die Diensthunde von PAULY (2007) mit 100,3 bis 117,3 nmol/l insgesamt höhere Serum-Kortisolkonzentrationen auf. Der Referenzbereich für Serum-Kortisol wird mit 41 bis 179 nmol/l angegeben (KRAFT & DÜRR 2005), so dass auch die Nachbelastungswerte der einzelnen Hunde einer physiologischen Stressreaktion entsprachen. Lediglich eine acht Jahre alte Hündin lag mit Werten von 204,02 bis 293,22 nmol/l deutlich über dem Normbereich.

Es wurden keine Veränderungen der durchschnittlichen Plasma-Kortisolkonzentrationen über die Zeitpunkte der Probennahme festgestellt, geringfügige Anstiege jeweils nach der Belastung waren nicht signifikant. Auch KNIES (2005) und PAULY (2007) fanden nach Belastung bei Rettungs- bzw. Diensthunden keine signifikante Veränderung der Serum-Kortisolkonzentrationen. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass der Kortisolpeak im Blut erst ca. 30 bis 60 Minuten nach dem Stressorreiz nachweisbar ist. Bei PAULY (2007) wurde die letzte Blutprobe etwa 80 Minuten nach der Belastung genommen, in Exp 2 nach Rückkehr von der vierten Suchübung. Da bei PAULY (2007) die Tendenz zwischen den Probennahmen T2 (direkt nach Belastung) und T3 (etwa 60 Minuten nach Belastung) eher fallend war, erscheint es unwahrscheinlich, dass ein Peak noch zu einem späteren Zeitpunkt hätte kommen können. Möglicherweise aber gab es ein Maximum zwischen den beiden Probennahmen. Weil davon auszugehen ist, dass die vier Suchübungen des Exp 2 kumulative Effekte auf das Stressniveau hatten (RONSEN ET AL. 2001), wäre bei der Probennahme nach der letzten Belastung ein deutlich erhöhter Kortisolspiegel zu erwarten gewesen.

Unter Umständen kann es aber dazu kommen, dass trotz Vorhandenseins eines offensichtlichen Stressreizes keine Stressreaktion in den Plasmaparametern beobachtet wird. In einer Studie an Militärhunden untersuchten HAVERBEKE ET AL. (2008) die Plasma-Kortisolkonzentration bei verschiedenen Stimuli (Spielzeugautos, Training, Luftstöße). Die Hunde wurden dabei jeweils an zwei Versuchstagen im Abstand von 20 Tagen untersucht, und nur am ersten dieser Versuchstage konnte eine signifikante Erhöhung der Kortisolwerte festgestellt werden. Dies wurde von den Autoren als Adaptationseffekt interpretiert, da das Versuchsdesign für die Tiere offensichtlich weniger Distress als vielmehr eine Abwechslung mit der damit verbundenen Aufregung (Eustress) darstellte (HAVERBEKE ET AL. 2008). Abgesehen davon entsteht Stress vor allem bei Kontrollverlust und Unvorhersehbarkeit der Situation (LADEWIG 1994), wovon aber bei den Rettungshunden des Exp 2 nicht auszugehen ist, da diese Tiere speziell auf Situationen wie den 3-tägigen Versuchsablauf mit mehreren Suchübungen pro Tag trainiert und ausgebildet waren.

Einen möglichen Einfluss des Menschen auf die Stressreaktion des Hundes studierten TUBER ET AL. (1996) und fanden dabei, dass Hunde, die zusammen mit ihrem Halter in eine neue Umgebung gebracht wurden, eine Stressreduktion zeigten. Da die Rettungshunde in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Vertrauensverhältnis zu ihrem Hundeführer hatten, könnte das beobachtete Ausbleiben einer Kortisolerhöhung auch hierauf zurückzuführen sein. Es fiel allerdings auf, dass sechs der 20 untersuchten Hunde aus Exp 2 jeweils nach den vier Suchen deutliche Anstiege der Plasma-Kortisolkonzentration aufwiesen. Darunter waren gerade die vier Hunde der Studie, die nicht von ihrem eigentlichen Besitzer, sondern jeweils von dessen Lebensgefährten geführt wurden. Möglicherweise führte dieser Wechsel in der Bezugsperson bei diesen Hunden zu Unsicherheiten und Missverständnissen in der Hund-Mensch-Kommunikation, so dass es dadurch zu verstärktem psychischen Stress und damit zu den deutlichen Kortisolreaktionen kommen konnte.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse aus den Plasma-Analysen ist zudem zu beachten, dass noch nicht eindeutig geklärt ist, ob die Kortisolausschüttung bei Hunden einer tagesrhythmischen Variation unterliegt (PALAZZOLO & QUADRI 1987B, KOYAMA ET AL. 2003, KNIES 2005). Zumindest aber ist eine episodische Ausschüttung von ACTH und Kortisol bekannt (KEMPPAINEN & SARTIN 1984, ORTH ET AL. 1988, BENTON & YATES 1990, LADEWIG 1994). Dies könnte dazu geführt haben, dass mögliche Stress-induzierte Veränderungen überlagert oder verfälscht wurden, da zwischen der Blutentnahme vor der Belastung am Morgen und nach der Belastung am späten Nachmittag mehrere Stunden lagen. Allerdings sollte eine Erhöhung durch Belastung deutlich genug sein um diese Schwankungen zu überlagern (KOLEVSKA ET AL. 2003). Abgesehen davon sind intra- und inter-individuelle Varianzen in der Kortisolkonzentration zu berücksichtigen, die mitunter sehr deutlich sein können (KUHN ET AL. 1991, CLARK ET AL. 1997, HENNESSY ET AL. 1997). Gerade bei einer kleinen Stichprobe mit heterogener Gruppenzusammensetzung ist dies besonders bedeutsam. Hinzu kommen Variationen in den Umgebungsbedingungen mit durchschnittlichen Lufttemperaturen von 8,6 bis 27,8 °C am Tag und über die verschiedenen Versuchstage wechselnden Witterungsverhältnissen (vgl. WILHELM 2007). Da nicht alle Hunde gleichzeitig in den Versuch genommen werden konnten, hatten einige Tiere kältere Umgebungstemperaturen als andere, an manchen Tagen

schien die Sonne, wohingegen es auch viele windige Regentage gab. Eine Kombination von Regen, Wind und Kälte könnte bei einzelnen Hunden einen zusätzlichen Stressor dargestellt haben. Bei der Untersuchung des Einflusses der Umgebungstemperatur auf Kortisolkonzentrationen wurde von einigen Autoren festgestellt, dass Kälte zu höheren Kortisolwerten führte (SADOWSKI ET AL. 1981, PALAZZOLO & QUADRI 1987A). Auch BEERDA ET AL. (1999) fanden eine Abhängigkeit der Stressreaktion vom Wetter.

Nicht zuletzt muss auch diskutiert werden, inwiefern in Exp 2 im Verlauf der drei Versuchstage eine langfristige Stresseinwirkung durch Kumulation von Belastungseffekten eingetreten ist. Denn bei chronischen Stresszuständen kann es zu einer Habituation der HHN-Achse an die Belastung kommen (MIZOGUCHI ET AL. 2001, HAVERBEKE ET AL. 2008). Es wurde aber auch von unveränderten Stresshormonkonzentrationen bei chronischem Stress berichtet (SILBERMAN ET AL. 2003). In einer weiteren Studie (GOMEZ-MERINO ET AL. 2005) führte länger anhaltender Multistress beim Menschen sogar zu einer Erniedrigung des Kortisolspiegels, die als Ermüdungserscheinung interpretiert werden kann (VIRU ET AL. 2001, GOMEZ-MERINO ET AL. 2005).

Insgesamt ist also fraglich, inwieweit sich Kortisol im Plasma als Stressparameter eignet, wenn, wie im vorliegenden Fall, nur wenige Probennahmen (hier jeweils vor und nach Belastung) durchgeführt werden. Zu bedenken ist dabei auch, dass die Kortisolkonzentration von sehr vielen Faktoren wie z. B. Alter, inter-individuellen Variationen oder Umgebungsbedingungen beeinflusst werden kann und zudem das Vorhandensein einer Tagesrhythmik beim Hund noch nicht geklärt ist. Aufgrund des verzögerten Kortisolpeaks im Plasma und der invasiven Probennahme könnte sich demgegenüber der Nachweis von Kortisol im Speichel als der bessere Stressparameter erweisen, da er zudem wesentlich häufiger gewonnen werden und damit einen besseren Überblick über den zeitlichen Verlauf der Kortisolkonzentration geben kann. Die vorliegenden Plasma-Kortisolkonzentrationen könnten allerdings ein Hinweis darauf sein, dass entweder die Rettungshunde aufgrund ihres guten Trainingszustands oder des Handlings durch die Hundeführer nicht gestresst waren, oder aber, dass es durch langfristige, kumulative Belastungseffekte zu einer Dämpfung der HHN-Achse kam.

Kortikosteron

Bei den Rettungshunden aus Exp 2 wurden im Durchschnitt Plasma-Kortikosteronwerte zwischen 86,08 und 115,51 nmol/l gemessen. Dabei lag die Hündin, bei der auffallend hohe Kortisolkonzentrationen nachgewiesen wurden, mit Werten zwischen 196,21 und 211,81 nmol/l auch in den Kortikosteronkonzentrationen höher als die übrigen Hunde. Allgemein wird davon ausgegangen, dass beim Hund vor allem Kortisol produziert und ausgeschüttet wird. Allerdings finden sich in der Literatur nur wenige, uneinheitliche Angaben zum Verhältnis von Kortisol zu Kortikosteron beim Hund. Demnach kann es 3:1 (HECHTER ET AL. 1955) bzw. laut BUSH (1953) bis zu 6:1 betragen. In einer Veröffentlichung von BECKER ET AL. (1976) gibt es Hinweise auf eine Streuung von 20:1 bis hin zu umgekehrten Verhältnissen mit 0,3:1. KUHN ET AL. (1991) fanden in einer Studie über Transportstress bei Hunden Plasma-Kortikosteronkonzentrationen von etwa 3 bis 30 nmol/l gegenüber Kortisolkonzentrationen von bis zu etwa 200 nmol/l. Die bei den Hunden des Exp 2 im Plasma gemessenen Kortikosteronkonzentrationen lagen damit unerwartet weit über den in der Literatur angegebenen Werten und auch deutlich höher als die zugehörigen Kortisolkonzentrationen.

Eine Erklärung für diese Verhältnisse könnte in den Synthesewegen der beiden Steroidhormone liegen (Abbildung 19). Beide Kortikosteroide werden aus dem Vorläufer Pregnenolon gebildet, wobei die 17 α -Hydroxylase aus einigen Produkten der Kortikosteronsynthese die entsprechenden Substrate in der Reihe der Kortisol-synthese bildet (THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE 1994, VOIGT 2003). Bei vermehrter Aktivität dieser 17 α -Hydroxylase wird also die Kortisol-Reihe verstärkt, wohingegen sich bei schwächerer Enzymwirkung aus Pregnenolon vor allem Kortikosteron bilden könnte. Möglicherweise ist die 17 α -Hydroxylase-Aktivität bei akutem Stress zunächst erhöht und nimmt bei längerem Bestehen des Stressreizes ab, so dass nach einiger Zeit mehr Kortikosteron gebildet wird. Bei langfristigem Stress müsste unter diesen Voraussetzungen der Kortisol-Kortikosteron-Quotient sinken, was auch bei den Rettungshunden des Exp 2 bereits während des 3-tägigen Versuchszeitraumes festzustellen war.

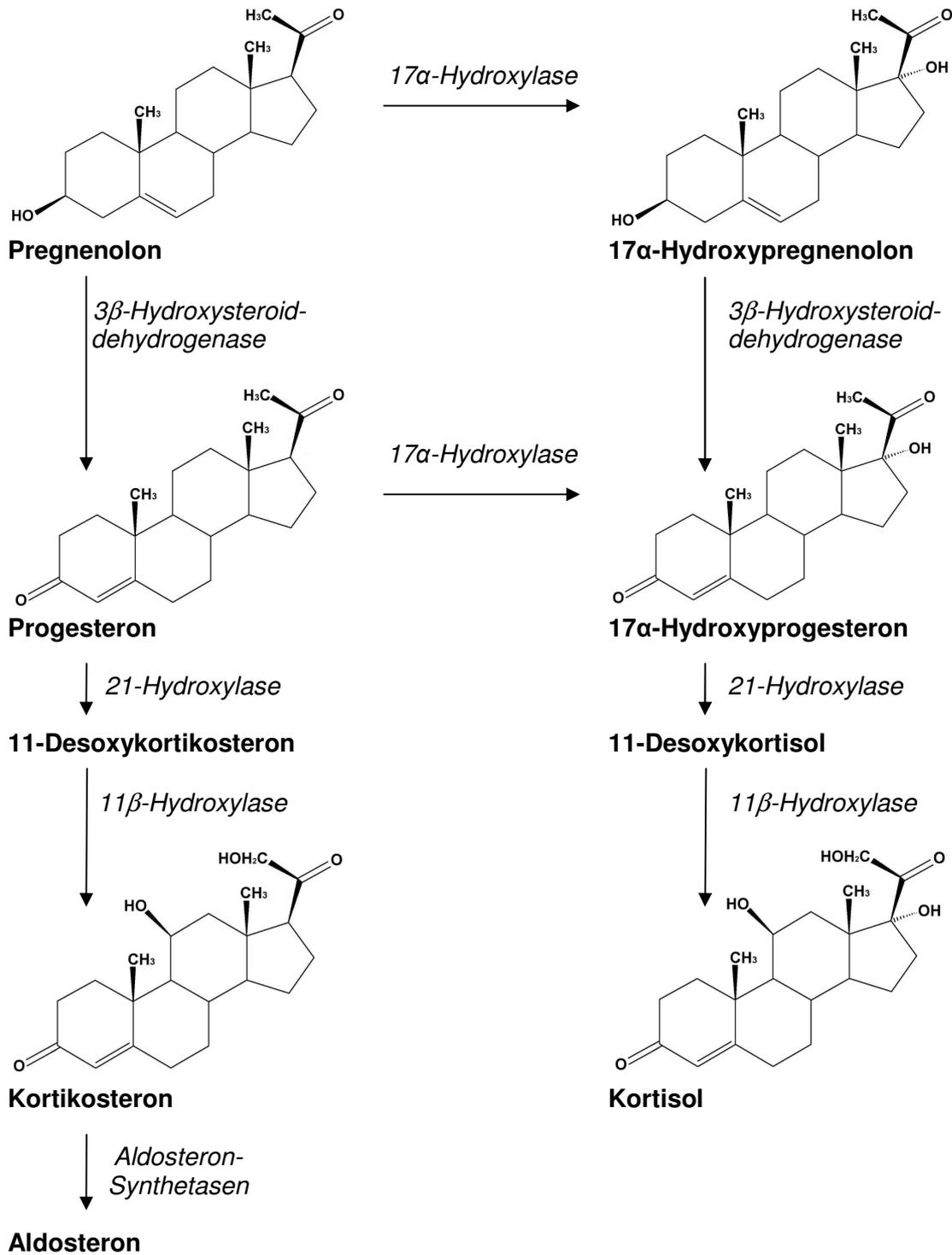


Abbildung 19. Biosynthese der Kortikosteroide (in Anlehnung an BERG ET AL. 2007, THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE 1994, VOIGT 2003).

Außerdem wurde bei den eingesetzten Hunden des Exp 2 festgestellt, dass zwischen den beiden Kortikosteroiden nur am ersten Tag und bei der Probennahme vor der Belastungsphase am zweiten Tag eine positive Korrelation bestand. Da sowohl Kortisol als auch Kortikosteron in der Nebenniere produziert und nach Stressreizen ausgeschüttet werden, waren ähnliche Reaktionen im Verlauf der Konzentrationen über den gesamten Versuchszeitraum erwartet worden. Eine fehlende Korrelation wie hier gegen Ende der 3-tägigen Trümmersuche könnte jedoch ein Hinweis auf Veränderungen im Ablauf der HHN-Achse sein, die möglicherweise Stress-induziert sind.

Eine weitere Erklärung für die gefundenen hohen Kortikosteronkonzentrationen ließe sich aus der Synthese von Aldosteron ableiten. Dieses Mineralokortikoid ist wesentlich an der Regulierung des Elektrolyt-Haushalts sowie des Plasmavolumens und des Blutdrucks durch das Renin-Angiotensin-System beteiligt (THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE 1994, GAEHTGENS 2003, SILBERNAGL 2003, OBERLEITHNER 2003). Die Aldosteronsynthese und -ausschüttung wird durch Angiotensin II stimuliert, jedoch können auch ACTH, Serotonin und Katecholamine den gleichen Effekt haben. Bei längeren höheren Dosen von ACTH kann dieses allerdings auch hemmende Wirkungen zeigen (THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE 1994). Da Kortikosteron ein direkter Vorläufer in der Biosynthese des Aldosterons ist (Abbildung 19), könnte eine Erhöhung von Kortikosteron auch auf eine Aktivierung der Aldosteronproduktion hinweisen. Inwiefern diese Sachverhalte für die vorliegenden Befunde von Bedeutung sein könnten, müsste im Zusammenhang mit der Untersuchung verschiedener Parameter der Nierenfunktion sowie der Blutdruckregulation geprüft werden.

Ferner muss berücksichtigt werden, dass nur der freie, aktive Hormonanteil im Blut tatsächlich gemessen werden kann. Da die Transportproteine CBG und Albumine für Glukokortikoide eine höhere Affinität aufweisen als für Mineralokortikoide (VOIGT 2003), könnte auch in möglicherweise Stress-induzierten Veränderungen der Bindungsfähigkeiten dieser Proteine eine Ursache für die unerwartet hohen Kortikosteronkonzentrationen liegen.

6.2.3 Histamin

Die bei den Rettungshunden (Exp 2) gemessenen durchschnittlichen Plasma-Histaminkonzentrationen von 20,8 bis 22,7 nmol/l entsprachen den von KNIES (2005) bei Laborhunden (Beaglen) ermittelten Werten. In der Literatur werden für die Plasma-Histaminkonzentration Angaben zwischen 3,6 nmol/l (LORENZ 1973) und 24,2 nmol/l (KNIES 2005) gemacht. Wie schon bei KNIES (2005) konnte in der vorliegenden Arbeit kein Anstieg der Plasma-Histaminkonzentration nach Stressbelastung beobachtet werden. Da KNIES (2005) als mögliche Ursache hierfür einen Verlust des freigesetzten Histamins aufgrund des Abbaus durch DAO diskutierte, wurde in der vorliegenden Arbeit den Proben Aminoguanidin als Stabilisator zugesetzt, so dass diese Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann.

Weil Histamin die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht durchdringen kann, ist es fraglich, inwieweit die periphere Histaminkonzentration eine Aussage über zentralnervöse Prozesse zulässt. Allerdings wurde bei Ratten gezeigt, dass unter akutem Stress auch im Gehirn eine CRH-induzierte Mastzellaktivierung stattfindet und es über diese zu Veränderungen der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke kommen kann (ESPOSITO ET AL. 2001). Außerdem wird diskutiert, dass möglicherweise auch Mastzellen bzw. deren Produkte umgekehrt Einfluss auf CRH und die HHN-Achse haben könnten (ESPOSITO ET AL. 2002), so dass ein Zusammenhang zwischen zentralen und peripheren Histaminkonzentrationen a priori nicht auszuschließen ist.

Des Weiteren wird in der Literatur darüber berichtet, dass durch körperliche Aktivität die HDC-Aktivität in der Muskulatur steigen soll (ENDO ET AL. 1998, AYADA ET AL. 2000) und so eine Erhöhung des peripheren Plasma-Histaminspiegels erklärbar wäre. Dies konnte in der vorliegenden Studie ebenso wenig bestätigt werden, wie die Befunde von HUANG ET AL. (1998), die eine Stress-induzierte Erhöhung der Plasma-Histaminkonzentration fanden. Möglicherweise stellte der 3-tägige Versuchsaufbau keinen ausreichend starken physischen Stressor für die gut trainierten Hunde dar, so dass es weder zu einer erhöhten HDC-Aktivität noch einer Mastzellaktivierung kam. Hierfür würde auch sprechen, dass sowohl die durchschnittlichen Laktatwerte (2,06 bis 2,19 mmol/l) als auch die mittlere Kreatinkinase-Aktivität (61,75 bis 201,51 IU/l)

bei den Rettungshunden im Normbereich für gut trainierte Hunde lagen (WILHELM 2007).

Nicht ganz auszuschließen ist allerdings, dass die Histaminwerte durch Zerstörung der Thrombozyten oder Hämolyse verfälscht wurden. Auch eine Gewebsverletzung bei der Venenpunktion könnte zu einer Aktivierung von Mastzellen (NOLI & MIOLO 2001, BAUER & RAZIN 2000) und zur Freisetzung von Histamin in subkutanen Gewebe (GUO ET AL. 1997) geführt haben.

6.2.4 Serotonin

In der vorliegenden Arbeit wurden bei Rettungshunden (Exp 2) während einer 3-tägigen Suchübung Plasma-Serotoninkonzentrationen zwischen 0,122 und 0,191 nmol/l gemessen. Dagegen konnte LENTZ (2000) bei den von ihr getesteten verhaltensunauffälligen Hunden im Plasma kein Serotonin nachweisen und fand im Serum Konzentrationen von etwa 0,4 bis 2,5 nmol/l. Diese große Streuung in den Werten führte LENTZ (2000) auf unterschiedlich lange Lagerungsdauern ohne Stabilisator und dadurch bedingte Substanzverluste zurück. Um eine derartige Verfälschung der Werte auszuschließen, wurde bei den Proben des Exp 2 auf eine Stabilisierung durch Natriumdisulfit Wert gelegt.

Durch die Suchübungen während der drei Versuchstage wurden keine Veränderungen in den Plasma-Serotoninkonzentrationen induziert, allerdings scheinen die Durchschnittswerte im Lauf des Versuchszeitraums abzusinken. Aufgrund der Literatur war hingegen ein Anstieg der Plasma-Serotoninkonzentrationen nach körperlicher Belastung erwartet worden (CHAOULOFF 1997, MEEUSEN ET AL. 2001). Nach LEONARD (2006) kann jedoch langfristiger Stress bei erhöhtem Kortisol zu einer Reduktion in Serotonin-Turnover und -Freisetzung führen, indem in der Leber die Tryptophan-Pyrrolase aktiviert und vermehrt Tryptophan metabolisiert wird. Da die Serotoninkonzentration von der Verfügbarkeit seiner Vorstufe, der essentiellen Aminosäure Tryptophan, abhängig ist, könnte die beobachtete Abnahme von Serotonin auch durch nutritive Defizite während des Versuchszeitraumes entstanden sein. Zwar bekamen die Hunde jeweils ihre übliche, ausgewogene Ration Futter, dennoch hätte es durch die höhere Belastung aufgrund

der Lagerung im Freien und der körperlichen Aktivität zu einem erhöhten Bedarf kommen können. Da eine Futterumstellung häufig Auslöser für Magen-Darm-Probleme wie z. B. Durchfall ist, wird dies bei Rettungshunden im Einsatz üblicherweise nicht durchgeführt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch die körperliche Aktivität vermehrt Tryptophan in das Gehirn aufgenommen wurde (CHAOULOFF 1997) und es in der Peripherie deshalb zu einer Reduktion der Serotoninkonzentration kam. Generell ist jedoch fraglich, ob über periphere Serotoninkonzentrationen überhaupt Aussagen zum zentralnervösen Stresssystem möglich sind, da Serotonin die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann.

Einen Einfluss auf die Blut-Serotoninkonzentrationen kann auch die Probengewinnung haben. Bei LENTZ (2000) wurde EDTA als Gerinnungshemmer verwendet, während in der vorliegenden Untersuchung Lithium-Heparin benutzt wurde. Allerdings sollte dies keinen entscheidenden Einfluss auf die Serotoninkonzentration gehabt haben (XIAO ET AL. 1998). Eine Verfälschung der Plasma-Serotoninkonzentration kann jedoch auftreten, wenn es bei der Probennahme und -aufarbeitung zu einer Zerstörung der Thrombozyten kommt und darin gespeichertes Serotonin freigesetzt wird (XIAO ET AL. 1998, MORGADINHO ET AL. 2004).

6.2.5 Zusammenhänge zwischen Plasmaparametern

Insgesamt konnten keine eindeutigen Stress- bzw. Belastungs-induzierten Veränderungen bei den einzelnen gemessenen Plasmaparametern der Rettungshunde des Exp 2 festgestellt werden. Allerdings zeigten sich in der statistischen Auswertung Wechselwirkungen zwischen den Kortikosteroiden und den übrigen Parametern. Kortisol hatte einen signifikanten Einfluss auf Kortikosteron und Serotonin, während sein Effekt auf Histamin nur knapp über der Signifikanzgrenze lag. Umgekehrt wurde Kortisol wiederum beeinflusst von Kortikosteron, Histamin und Serotonin.

Ein wechselseitiger Zusammenhang zwischen Kortisol und Kortikosteron war zu erwarten gewesen, da beide Steroidhormone als Folge der HHN-Achsen-Aktivierung aus der Nebenniere ausgeschüttet werden. Die Abwesenheit einer Korrelation der

beiden Parameter könnte als Hinweis auf Stress-induzierte Veränderungen des Ablaufs der HHN-Achse gewertet werden.

Verschiedene Autoren zeigten einen Zusammenhang zwischen Kortikosteroiden und dem serotonergen System auf. So haben laut GASSER ET AL. (2006) Kortikosteroide Einfluss auf Tryptophantransport, Serotoninsynthese und -metabolismus sowie Serotoninrezeptorfunktionen. Demnach modulieren Kortikosteroide die serotonerge Neurotransmission im dorsomedialen Hypothalamus über spezielle Transporter (organische Kationen-Transporter), die neben Serotonin auch die Monoamine Dopamin und Noradrenalin regulieren können. MEIJER ET AL. (1998) zeigten, dass bei Ratten über MR die Serotonin-vermittelte Stressantwort im Wasser-Labyrinth moduliert wird, und MCKITTRICK ET AL. (1995) berichteten von einer durch Kortikosteron veränderten Bindungsfähigkeit von Serotoninrezeptoren bei Ratten unter chronischem sozialen Stress. Nach LEONARD (2006) besteht eine enge Verbindung zwischen Plasma-Kortisolkonzentrationen und Serotonin, wobei akute, Stress-induzierte Anstiege in der Kortisolkonzentration mit einem Anstieg in der Turnover-Rate von Serotonin und der Stimulation der Tryptophan-Hydroxylase-Aktivität assoziiert sind. Dagegen hat chronischer Stress einen entgegengesetzten Effekt, welcher vermutlich auf einer Aktivierung der Tryptophan-Pyrrolase der Leber beruht, wobei Tryptophan auf dem Tryptophan-Kynurenine-Weg metabolisiert wird (LEONARD 2006). Veränderungen im serotonergen System könnten demnach die Art und Dauer eines Stressors und seiner Wirkung auf die HHN-Achse widerspiegeln.

Im Gegensatz zu KNIES (2005), die keine Korrelation zwischen Histamin und Kortisol fand, wurde in der vorliegenden Arbeit ein möglicherweise wechselseitiger Effekt des Histamins auf die Kortisolkonzentration festgestellt. Obwohl aufgrund der Literaturangaben eine Stress-induzierte Erhöhung der Plasma-Histaminkonzentration zu erwarten gewesen wäre, könnte eine entzündungshemmende Wirkung der Kortikosteroide auch einen gegenteiligen Effekt haben. So zeigten z. B. LIU ET AL. (2007) bei Nagern eine Hemmung der Histaminfreisetzung aus Mastzellen durch Kortikosteron. Eine Mastzellaktivierung und Histaminfreisetzung nach akutem Stress ist sowohl in zentralen als auch in peripheren Systemen vorwiegend CRH-vermittelt (THEOHARIDES & COCHRANE 2004). Möglicherweise bestehen auch hier unterschiedliche Effekte durch akuten und chronischen Stress, so dass bei länger

bestehenden erhöhten Kortikosteroidspiegeln deren entzündungshemmende Wirkung überwiegt.

Da Serotonin und Histamin als Mediatoren in peripheren Geweben im Allgemeinen synergistische Wirkungen zeigen, wäre ein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern zu erwarten gewesen. Allerdings sind beide sehr schwierig in der Probennahme, da Konzentrationen durch Hämolyse, Thrombozytenzerfall oder Gewebeschädigung verfälscht werden können. Eine große Streuung der Werte könnte hier mögliche Stresseffekte überlagern.

Der kontinuierliche Abfall der IgG-Konzentration über den 3-tägigen Versuchszeitraum spricht für eine längerfristige Belastung der Hunde mit möglicherweise chronischen Stresseffekten. Das könnte sich auch in den gefundenen Veränderungen im Kortisol-Kortikosteron-Quotient bzw. der Kortisol-Kortikosteron-Korrelation sowie der geringfügigen Reduktion der Plasma-Serotoninkonzentration zeigen. Möglicherweise sind die vorliegenden Ergebnisse nicht signifikant, da zusätzliche, akute Effekte der einzelnen Suchübungen diese langfristigen Effekte überlagern und zudem eine zu kleine Stichprobe und eine heterogene Gruppenzusammensetzung mit großen inter-individuellen Variationen die Streuung der Ergebnisse vergrößern. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass hauptsächlich unkontrollierbare und unvorhersehbare Situationen Stressreaktionen auslösen. Je nach Stressor kann es also durch Habituation oder auch durch Lernprozesse zu einer Dämpfung der Reaktion der Stressachsen kommen. Bei den Hunden aus Exp 2 konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Versuchsdauer ein Lernprozess einsetzte und die Tiere mit der Umgebung und den Aufgaben immer besser zu Recht kamen. Solche positiven, emotionalen Faktoren könnten sich gegenteilig auf die zunehmende körperliche Belastung auswirken und die zusätzliche Motivation durch den Hundeführer ebenfalls eine chronische Belastung ausgleichen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keiner der untersuchten Parameter eindeutige Aussagen über die Belastung der Tiere zulässt, dass aber insgesamt Stress-korrelierte Veränderungen zu beobachten waren.

Dass diese Veränderungen nicht statistisch signifikant waren, lässt sich durch Überlagerung von akuten und langfristigen Stresseffekten, durch Streuung der Werte aufgrund der Größe und Zusammensetzung der Versuchstiergruppe sowie durch wechselnde Umgebungs- bzw. Wetterverhältnissen und Probennahmen unter nicht vollkommen standardisierbaren Feldversuchsbedingungen erklären.

6.2.6 *Alterseffekt auf Plasmaparameter*

In Exp 2 konnten signifikante Einflüsse des Alters auf die Plasma-Konzentrationen von IgG, Kortisol und Serotonin nachgewiesen werden. Die Zusammensetzung der Gruppe war mit sechs jungen, zwölf mittelalten und zwei alten Hunden nicht homogen. Vor allem für die Gruppe der alten Tiere lassen sich deshalb keine statistisch abgesicherten Aussagen machen. Diese beiden Hündinnen waren jeweils acht Jahre und lagen damit nur knapp über der Altersgrenze der mittelalten Hunde. Im Folgenden werden deshalb nur die Abweichungen der jungen Hunde von der mittelalten Gruppe diskutiert. Die jungen Hunde wiesen höhere IgG-, Kortisol- und Serotoninkonzentrationen auf als die älteren Hunde.

Der Einfluss des Alters auf das Immunsystem zeigte sich bereits bei WILHELM (2007), die signifikant höhere Leukozyten- und Granulozytenzahlen bei den jungen Hunden aus Exp 2 fand. Auch STRASSER ET AL. (1993, 1997, 2000), KRAFT ET AL. (2005) und GREELEY ET AL. (2001) berichten von einer Abnahme der Leukozytenzahlen mit steigendem Alter. Allerdings konnten HOGEN-ESCH ET AL. (2004) solche Effekte nicht bestätigen. Bezüglich der Plasma-IgG-Konzentrationen konnten STRASSER ET AL. (1997, 2000) sowie BLOUNT ET AL. (2005) ebenfalls keine Unterschiede zwischen jungen und älteren Tieren feststellen. Im vorliegenden Fall stellen die höheren IgG-Konzentrationen bei den jungen Hunden vermutlich weniger einen direkten Alterseffekt auf das Immunsystem dar. Eher waren sie dadurch bedingt, dass die jungen Hunde noch unerfahrener und weniger häufig im Einsatz waren und ihr Immunsystem stärker durch die unbekannte Umgebung und die neue Keimflora stimuliert wurde.

In den vorangegangenen Studien waren die Alterseffekte auf die Speichel- und Plasma-Kortisolkonzentrationen nicht einheitlich. KÖHLER (2004) fand einen

Zusammenhang zwischen Speichel-Kortisol und Alter der Hunde, wobei die jungen und alten Hunde höhere Werte aufwiesen als mittelalte Hunde. Bei WUST (2006) zeigten vor allem die alten Hunde höhere Speichel-Kortisolwerte als die übrigen Tiere, während WILHELM (2007) keinen Alterseffekt auf Speichel-Kortisol nachweisen konnte. Bei KNIES (2005) und PAULY (2007) finden sich keine Aussagen über den Einfluss des Alters auf die Kortisolausschüttung. Auch in der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben. Nach MURASE ET AL. (1988), HENNESSY ET AL. (1997, 2001), KOYAMA ET AL. (2003) und HAUBENHOFER ET AL. (2005) hat das Alter keinen Einfluss auf die Kortisolwerte. Dagegen zeigten sich in einigen Studien bei älteren Hunden höhere Kortisolkonzentrationen als bei jüngeren (PALAZZOLO & QUADRI 1987A, 1987B, STRASSER ET AL. 1993, ROTHUIZEN ET AL. 1991, 1994). In der vorliegenden Untersuchung konnte ein Einfluss des Alters festgestellt werden, wobei die jungen und alten Hunde höhere Kortisolkonzentrationen als die mittelalten Hunde aufwiesen. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Junghunde weniger erfahren als die routinierten älteren Hunde waren und somit einer stärkeren psychischen Belastung durch die neue Situation und Umgebung, die Anwesenheit fremder Hunde und vieler Personen, die intensive Arbeit sowie die mehr oder weniger invasiven und häufigen Manipulationen bei den Probennahmen ausgesetzt waren. Bei den älteren Hunden hatte wahrscheinlich die zunehmende physische Belastung aufgrund der nachlassenden körperlichen Leistungsfähigkeit einen Effekt auf die Stresshormone. Dies war vermutlich auch eine Ursache für die auffallend hohen Kortikosteroidkonzentrationen der acht Jahre alten Hündin.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch ein Einfluss des Alters auf die Plasma-Serotoninkonzentration festgestellt, die bei den jungen Hunden höher lag als bei den älteren Tieren. Allerdings gibt es darüber keine weiteren Daten in der Literatur und auch in der Arbeit von LENTZ (2000) konnten dazu keine weiteren Angaben gefunden werden.

6.3 slgA im Speichel

In allen drei Experimenten kam es nach der Belastung in Form einer 20-minütigen Suchübung (Exp 1 und Exp 2) bzw. einer 3-minütigen Schutzdienstübung (Exp 3) zu einem Abfall der slgA-Konzentration im Speichel der Rettungs- bzw. Diensthunde. Die Ausgangswerte vor Beginn der Übungen lagen mit durchschnittlichen 0,62 g/l (Exp 1), 0,74 g/l (Exp 2) und 0,46 g/l (Exp 3) in ähnlichen Bereichen wie in der Literatur angegeben (0,17 bis 1,25 g/l bei HEDDLE & ROWLEY 1975; 0,5 bis 1,0 g/l bei KIKKAWA ET AL. 2003). Nach jeder Belastung waren die slgA-Konzentrationen auf durchschnittliche 0,25 g/l (Exp 1), 0,31 g/l (Exp 2) und 0,21 g/l (Exp 3) reduziert, während sie in den anschließenden Erholungsphasen wieder anstiegen. Außerdem war die Speichel-slgA-Konzentration bei Exp 2 am dritten Tag am höchsten, während sie bei Exp 3 über den 4-wöchigen Versuchszeitraum abnahm und bei Übung B niedriger lag als bei Übung A. Hier zeigten sich die Unterschiede vor allem in den Ruhewerten vor der 3-minütigen Schutzdienstübung (Probennahmezeitpunkte P1 und P2). Zudem lagen die slgA-Werte insgesamt bei den in Exp 3 eingesetzten Diensthunden signifikant niedriger als bei den Rettungshunden von Exp 1 und Exp 2.

Zwischen den Rettungshunden von Exp 1 und Exp 2 und den Diensthunden ergaben sich Unterschiede in den Speichel-Kortisolkonzentrationen und dem Aktivitätsniveau. Da die beiden letzten Parameter in den Arbeiten von WUST (2006), WILHELM (2007) und PAULY (2007) bereits im Einzelnen ausführlich erörtert wurden, wird hier nur eine kurze Zusammenfassung in Tabelle 14 gegeben.

Tabelle 14. Überblick über die Daten für Speichel-Kortisol und Bewegungsaktivität aus den drei Experimenten zur Belastung von Rettungs- und Diensthunden. Angegeben sind die durchschnittlichen Maximalwerte (jeweils MW \pm SD).

	Exp 1	Exp 2	Exp 3
Speichel-Kortisol [nmol/l]	15,8 \pm 9,1	5,7 \pm 3,5	9,3 \pm 7,6
Aktivität Ruhe [mG]	25,2 \pm 12,3	13,2 \pm 34,2	118,4 \pm 63,1
Aktivität Belastung [mG]	240,6 \pm 88,6	238,0 \pm 96,2	348,2 \pm 137,4

Exp 1: alpine Rettungshunde bei wiederholten Suchübungen an einem Tag; vgl. WUST 2006

Exp 2: Rettungshunde während dreitägiger Belastung im Trümmergelände; vgl. WILHELM 2007

Exp 3: Diensthunde mit jeweils 3-minütiger Belastung im Abstand von vier Wochen; vgl. PAULY 2007

In der vorliegenden Arbeit konnten in allen drei Experimenten signifikante Einflüsse von Speichel-Kortisol und Bewegungsaktivität auf die sIgA-Konzentration nachgewiesen werden. Dabei scheinen körperliche Aktivität und hohe Speichel-Kortisolkonzentrationen zu einer sofortigen Reduktion der sIgA-Konzentration zu führen. Dies wird durch die Befunde von KIKKAWA ET AL. (2003) bestätigt, die aus Untersuchungen über Speichel-sIgA-Konzentrationen bei Laborhunden (Beaglen) schlussfolgerten, dass bei Hunden die sIgA-Konzentration bei körperlicher Aktivität sinken und in Ruhe steigen müsse.

Selbst in Exp 3 konnte bereits nach der 3-minütigen Schutzdienstübung eine signifikante Reduktion der sIgA-Konzentrationen beobachtet werden, obwohl die Ausgangskonzentrationen schon deutlich niedriger lagen als bei den Rettungshunden (Exp 1, Exp 2). Dieses allgemein niedrigere sIgA-Niveau der Diensthunde lässt sich durch die hohe körperliche Aktivität während des gesamten Versuchsdurchgangs erklären (Tabelle 13). Im Gegensatz zu den Rettungshunden, die in den Erholungsphasen ruhig beim Hundeführer lagen, waren die Diensthunde zwischen den einzelnen Probennahmen in ihren Zwingern untergebracht und dort sehr aktiv (PAULY 2007). Zudem konnten KIKKAWA ET AL. (2003) an Laborhunden zeigen, dass psychischer Stress in Form von Lärm, dem auch die Diensthunde in der Zwingeranlage permanent ausgesetzt waren, zu deutlichen Reduktionen in Speichel-sIgA-Konzentrationen führen kann. Dass die Diensthunde trotz des insgesamt niedrigen sIgA-Spiegels nach der kurzen Schutzdienstübung dennoch eine deutliche Reduktion der sIgA-Konzentration zeigten, dürfte darauf zurückzuführen sein, dass hier neben der körperlichen Belastung eine hohe Erregungslage, die durch die Übung beim Hund erzeugt und vom Ausbilder auch erwünscht wird, einen zusätzlichen Effekt ausübte.

Abgesehen davon gibt es Hinweise darauf, dass die Speichel-sIgA-Konzentration Aussagen über die psychische Belastbarkeit von Hunden zulassen könnte. Schon SKANDAKUMAR ET AL. (1995) fanden einen Zusammenhang zwischen der Anpassungsfähigkeit der von ihnen untersuchten Polizeihunde an veränderte Umgebungsbedingungen und der gemessenen sIgA-Konzentration. In einer neueren Studie interpretierten KIKKAWA ET AL. (2005) steigende sIgA-Werte bei Hunden, die als Blindenführhund geeignet waren, ebenfalls mit erhöhter Sensibilität und

Anpassungsfähigkeit an Stress. Auch in der vorliegenden Arbeit scheint sich Vergleichbares zu bestätigen.

Bei den Rettungshunden von Exp 2 war ein deutlicher Anstieg im Niveau der Speichel-sIgA-Konzentration über den 3-tägigen Versuchszeitraum zu verzeichnen, obwohl sich das Aktivitätsniveau insgesamt nicht veränderte. Zudem waren ab dem Ende des zweiten Tages Ermüdungs- und Stresserscheinungen bei den Hunden erkennbar (WILHELM 2007). Vermutlich fand, wie bei den Blindenführhunden von KIKKAWA ET AL. (2005), eine Anpassung der Rettungshunde aus Exp 2 an die Versuchsbedingungen statt, und die erfolgreiche Verarbeitung des Stresses könnte sich in der ansteigenden sIgA-Konzentration widerspiegeln. Dagegen zeigte sich bei den Diensthunden aus Exp 3 eine Erniedrigung der sIgA-Konzentrationen bei Übung B gegenüber Übung A. Diese Hunde unterlagen während der 4-wöchigen Ausbildung steigendem psychischem Druck durch die Zwingereinzelhaltung, den Sicht- und Hörkontakt mit vielen fremden Hunden und einem harten Training. Nach diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, ob anhand der sIgA-Konzentrationen gestresste, überforderte Rettungs- oder Diensthunde von geeigneten Hunden unterschieden werden können. Da die Einteilung der Hunde in „gestresst“ bzw. „ungestresst“ aber nicht in allen Experimenten eindeutig möglich war, lässt sich diese Frage hier nicht umfassend beantworten. Lediglich für die Rettungshunde aus Exp 2 wurde eine solche Einteilung anhand der Videoaufzeichnungen durchgeführt (SCHNEIDER & WILHELM 2008), aber es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Stressbelastung und der sIgA-Konzentration nachgewiesen werden. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass alle an Exp 2 beteiligten Rettungshunde bereits erfahrene Arbeitshunde mit stabiler psychischer Konstitution waren, und dass selbst die als „gestresst“ eingestuften Rettungshunde im Vergleich zu den jungen, unerfahrenen und untrainierten Diensthunden aus Exp 3 als „ungestresst“ anzusehen sind. Bei Letzteren waren mangels Probenmaterialies keine Analysen der aus dem Versuch vorzeitig ausgeschiedenen, für den Schutzdienst ungeeigneten Hunde möglich. Dennoch könnte eine weitere Erklärung für die insgesamt niedrigeren sIgA-Konzentrationen der Hunde in Exp 3 sein, dass für den Schutzdienst geeignete Hunde grundsätzlich von leicht erregbarem, hoch reaktivem Temperament sein müssen, während als Rettungshunde vor allem ausgeglichene und arbeitswillige Tiere zum Einsatz kommen, die ein gut

eingespieltes Hund-Mensch-Team mit ihrem Hundeführer bilden müssen. Danach könnte die sIgA-Konzentration bzw. ihre Veränderung unter Stressbedingungen möglicherweise doch einen Hinweis darauf geben, ob sich bestimmte Hunde als Rettungs- bzw. Diensthund eignen.

Im Verlauf der sIgA-Konzentration traten große inter-individuelle Unterschiede auf. Solche Abweichungen könnten bei Hunden auch auf einer möglicherweise vorliegenden IgA-Defizienz beruhen. Allerdings untersuchten GINEL ET AL. (1993) bei Hunden mit IgA-Defizienz deren IgA-Konzentrationen in Plasma und Tränen und fanden in der Tränenflüssigkeit keine signifikant erniedrigten Werte. Demnach müssen niedrige systemische IgA-Werte nicht zwangsläufig zu einer Reduktion der Werte in sekretorischen Flüssigkeiten führen. Auch bei dem einzigen Hund aus Exp 2, der niedrigere Plasma-IgA-Konzentrationen hatte, waren keine entsprechend niedrigeren Speichel-sIgA-Konzentrationen zu beobachten. Insgesamt konnte in Exp 2 keine Korrelation zwischen den Speichel- und Plasma-Konzentrationen von sIgA bzw. IgA nachgewiesen werden, was mit Berichten von GERMAN ET AL. (1998) und RINKINEN ET AL. (2003) im Einklang steht.

Über die Mechanismen, die der Reaktion der sIgA-Konzentration im Speichel auf akuten Stress zugrunde liegen, wird in der Literatur noch diskutiert. Nach einer Studie von HUCKLEBRIDGE ET AL. (1998) scheint die sIgA-Sekretion unter anderem auch von Glukokortikoiden beeinflusst zu werden und möglicherweise ein Zusammenhang zwischen Langzeiteffekten von Stress auf HHN-Funktion und sIgA-Veränderungen zu bestehen. Dagegen konnten TIOLLIER ET AL. (2005) keine Korrelationen zwischen Kortisol und sIgA feststellen. Wahrscheinlicher ist ein Regulationsmechanismus über SAM-Aktivierung, da die Speicheldrüsen sympathisch und parasympathisch innerviert werden. Diese Zusammenhänge wurden in Studien an Ratten untersucht, die zeigten, dass die sIgA-Sekretion von Nervenimpulsen up-reguliert wird, wobei sympathische Innervation einen größeren Effekt hat als parasympathische (CARPENTER ET AL. 1998). Der Regulationsmechanismus scheint dabei über eine Veränderung der Expression des polymerischen Ig-Rezeptors auf der Membranoberfläche zu wirken (CARPENTER ET AL. 2004, 2005). Bei Abwesenheit von neuraler Stimulation werden sIgA und andere Proteine fortlaufend in die Drüsenlumina sezerniert (PROCTOR ET AL. 2003). Möglicherweise sind die

vorliegenden Stress-induzierten Reduktionen der sIgA-Konzentration dadurch erklärbar, dass die Speicheldrüsenzellen nach SAM-Aktivierung aufgrund erhöhter Sekretion entleert wurden und zum Zeitpunkt der Probennahme nach Belastung kein sezerniertes sIgA im Speichel mehr nachweisbar war. Im Laufe der Erholungsphasen wurden die Drüsenlumina wieder gefüllt und eine Erhöhung der sIgA-Konzentration im Speichel feststellbar. Bei Effekten von chronischem Stress auf die sIgA-Konzentration muss auch eine Auswirkung auf den gesamten Immunstatus bedacht werden, allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit keine solchen Zusammenhänge gefunden werden.

6.4 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit diskutierten Zusammenhänge zwischen verschiedenen Stressparametern beim Hund müssten durch weitere Studien überprüft werden. Wichtig wären dabei Untersuchungen an homogenen Versuchstiergruppen unter noch besser standardisierten Versuchsbedingungen und optimaler Probennahme. Zudem sollten die Nachweismethoden für Serotonin und Kortikosteron nochmals überprüft und für Hundeplasma besser validiert werden. Ein gleichzeitiger Nachweis mehrerer Parameter aus einer Probe könnte mittels HPLC-Analytik ermöglicht und Zusammenhänge so deutlicher sichtbar werden.

Im Zusammenhang mit dem Kortisol-Kortikosteron-Verhältnis wären auch Untersuchungen zu spezifischen Bindungsfähigkeiten an Transportproteine bzw. die Analyse der Enzymaktivität der 17 α -Hydroxylase unter Stressbedingungen von Interesse. Zudem müssten neben den Kortikosteroiden auch Parameter des Renin-Angiotensin-Systems, der Nierenfunktion und der Blutdruckregulation geprüft werden.

Im Speichel erscheint sIgA ein sehr viel versprechender Stressparameter zu sein. Daher wäre auch zu prüfen, welchen Einfluss z. B. der Speichelfluss oder die Sekretionsrate auf die sIgA-Konzentration haben. Da in der vorliegenden Arbeit überwiegend physischer Stress auf die Hunde gewirkt hat, könnte in definierten Versuchsdesigns z. B. mittels Lärm oder sozialer Isolierung die Wirkung von psychischen Stressoren näher untersucht werden. Von allgemeinem Interesse wäre auch eine Klärung der Frage, ob sIgA ein Indikator für den „Charakter“ eines Hundes bzw. seine Anpassungsfähigkeit an bestimmte Situationen ist, denn das könnte die Auswahl und die Ausbildung von Rettungs- oder Diensthunden erleichtern.

Da gerade bei den Rettungshunden die Motivation durch den Hundeführer einen großen Anteil an der Suchleistung und Arbeitsbereitschaft des Hundes hat, wäre die Bestimmung von β -Endorphinen sinnvoll. Zudem wäre es wichtig, parallel dazu das Stressniveau des Hundeführers zu erfassen, da dieser bedeutsamen Einfluss auf die Befindlichkeit des Hundes haben kann.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss von kurz-, mittel- und langfristiger Belastung auf physiologische Parameter bei Arbeitshunden

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Auswirkungen von kurz-, mittel- und langfristigen Belastungen bei Arbeitshunden anhand verschiedener physiologischer Parameter zu erfassen.

Hierfür wurden Rettungs- bzw. Diensthunde unter drei verschiedenen Versuchsbedingungen getestet. In einem ersten Experiment (Exp 1) wurden Rettungshunde einer mittelfristigen Belastung ausgesetzt. Dabei absolvierten 19 Hunde an fünf verschiedenen Versuchstagen auf unterschiedlichen Geländeformen jeweils zwei 20-minütige Suchübungen. Im zweiten Experiment (Exp 2) wurden 20 Rettungshunde einer langfristigen Belastung ausgesetzt, indem sie an einer 3-tägigen Trümmersuche mit täglich vier 20-minütigen Suchübungen teilnahmen. In Experiment 3 (Exp 3) wurden Diensthunde im Rahmen einer 4-wöchigen Ausbildungsphase zum Wach- und Begleithund jeweils in der ersten und der vierten Woche während einer Schutzdienstübung beprobt. Diese 3-minütigen Schutzdienstübungen wurden als kurzfristige Belastungsform gewertet.

In allen drei Experimenten wurden Speichelproben analysiert, die in regelmäßigen Abständen vor und nach der Belastung sowie in den Erholungspausen genommen wurden. Bei den Hunden des Exp 2 wurden täglich jeweils vor der ersten und nach der letzten Suche Blutproben gewonnen. Zudem wurde für die vorliegende Arbeit jeweils die kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum mittels ActiTrac®-Bewegungsmonitoren aufgezeichnete Aktivität ausgewertet. Bei allen untersuchten Arbeitshunden wurde sekretorisches IgA (sIgA) im Speichel bestimmt und bei den Rettungshunden des Exp 2 zusätzlich im Plasma verschiedene Parameter untersucht, die geeignet erschienen, verschiedene Aspekte der Stressantwort zu beleuchten. Dabei stellten die Plasma-Konzentrationen der Immunglobuline IgG und IgA Indikatoren für ein möglicherweise beeinträchtigt Immunsystem dar. Die Kortikosteroide Kortisol und Kortikosteron im Plasma wurden zur Beurteilung der Reaktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse)

untersucht. Außerdem wurden die biogenen Amine und Mediatoren Serotonin und Histamin auf ihre Tauglichkeit als Stressparameter überprüft.

In einigen der in Exp 2 untersuchten Plasmaparameter kam es während des 3-tägigen Versuchszeitraums zu signifikanten Veränderungen. Die durchschnittliche Plasma-IgG-Konzentration lag zwischen 15,03 und 17,13 g/l. Sie nahm kontinuierlich vom Morgen des ersten Tages bis zum Abend des dritten Tages ab, wobei der Unterschied vom ersten bis zum letzten gemessenen Wert signifikant war ($p < 0,001$). Über den gesamten Versuchszeitraum waren keine Veränderungen in der Plasma-IgA-Konzentration nachzuweisen, die durchschnittlich 0,82 bis 0,97 g/l betrug. Die mittleren Plasma-Kortisolkonzentrationen bewegten sich zwischen 36,01 und 49,17 nmol/l. Es waren keine Veränderungen über die Probennahmezeitpunkte und die drei Versuchstage festzustellen, geringfügige Erhöhungen jeweils nach den Belastungen waren nicht signifikant. Die im Plasma gemessenen Kortikosteronkonzentrationen betrugen durchschnittlich zwischen 86,08 und 115,51 nmol/l. Insgesamt stieg die Kortikosteronkonzentration von Tag zu Tag signifikant an ($p < 0,01$), jedoch zeigten sich bei den jeweiligen Nachbelastungswerten keine signifikanten Veränderungen. Die durchschnittliche Plasma-Histaminkonzentration lag im Bereich zwischen 20,80 und 22,70 nmol/l und veränderte sich über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant. Veränderungen in der Plasma-Serotoninkonzentration, die sich durchschnittlich zwischen 0,12 und 0,19 nmol/l bewegte, waren ebenfalls nicht nachzuweisen.

Es konnten keine eindeutigen Stress- bzw. Belastungs-induzierten Veränderungen bei den einzelnen gemessenen Plasmaparametern der Rettungshunde des Exp 2 festgestellt werden. Jedoch waren insgesamt Veränderungen zu beobachten, die als Stressreaktion gewertet werden können. Der kontinuierliche Abfall der IgG-Konzentration über den 3-tägigen Versuchszeitraum spricht für eine längerfristige Belastung der Hunde mit möglicherweise chronischen Stresseffekten. Eine Aktivierung der HHN-Achse war bei einzelnen Hunden in einer erhöhten Kortisolkonzentrationen und in Wechselwirkungen zwischen den Kortikosteroiden und den übrigen Parametern zu erkennen.

Im Speichel konnte in allen drei Experimenten nach der Belastung in Form einer 20-minütigen Suchübung (Exp 1 und Exp 2) bzw. einer 3-minütigen Schutzdienstübung (Exp 3) ein Abfall der sIgA-Konzentration festgestellt werden ($p < 0,001$). Die gemessenen Ausgangswerte vor Beginn der Übungen lagen durchschnittlich bei 0,62 g/l (Exp 1), 0,74 g/l (Exp 2) und 0,46 g/l (Exp 3). Nach jeder Belastung waren die durchschnittlichen sIgA-Konzentrationen auf 0,21 bis 0,31 g/l reduziert, während sie in den anschließenden Erholungspausen anstiegen. Bei Exp 2 stieg die Speichel-sIgA-Konzentration über den 3-tägigen Versuchszeitraum an und lag am dritten Tag insgesamt am höchsten ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu nahm sie bei Exp 3 über den 4-wöchigen Versuchszeitraum ab ($p < 0,05$). Das Niveau der Speichel-sIgA-Konzentration lag bei den Diensthunden signifikant niedriger als bei den Rettungshunden ($p < 0,001$).

In allen drei Experimenten konnten signifikante Einflüsse der Bewegungsaktivität auf die Speichel-sIgA-Konzentration nachgewiesen werden. Körperliche Aktivität führte sowohl bei den Rettungs- als auch bei den Diensthunden zu einer sofortigen Reduktion der sIgA-Konzentration. Die Diensthunde zeigten im Zusammenhang mit einem insgesamt höheren Aktivitätsniveau deutlich niedrigere sIgA-Konzentrationen als die Rettungshunde. Da auch psychische Belastung eine Reduktion des sIgA bewirkt, lässt sich das niedrigere sIgA-Niveau der Diensthunde zumindest teilweise auf die sowohl bei den Schutzdienstübungen als auch während den Ruhepausen hohe Erregungslage zurückführen.

8. SUMMARY

Effects of short-, middle- and long-term stress on physiological parameters in working dogs

The aim of this study was the assessment of the effects of short-, middle- and long-term stress on working dogs via the analysis of various physiological parameters.

Search-and-rescue dogs or service dogs were tested in three experimental settings. In one first experiment (exp 1), search-and-rescue dogs were exposed to stress of intermediate duration. In this experiment, 19 dogs performed two search operations of 20 minutes duration each on five different days in two differently structured territories. In the second experiment (exp 2), 20 search-and-rescue dogs were subjected to long-term trials, i. e. three-day rubble search involving four 20 minutes search operations per day. In the third experiment (exp 3), service dogs were in the course of a four-week training course subjected to a protection exercise in the first and fourth week. These protection exercises of three minutes duration were considered a short-term strain.

In all three experiments saliva samples were taken for analysis at regular intervals before and after the exercises as well as during the periods of recovery. Blood was taken from the dogs of exp 2 daily before and after the last search. In addition, physical activity was monitored continuously over the entire period of the experiment using locomotion monitors (ActiTrac[®]). Secretory IgA (sIgA) in the saliva of all dogs was measured. In the blood samples from exp 2, a number of parameters were analysed that were selected on the basis of their apparent suitability as indicators of different aspects of the stress response. Here, plasma levels of the immunoglobulins IgG and IgA give an indication of the possibility of immunodeficiency. Plasma levels of the corticosteroids cortisol and corticosterone were determined as a measure of the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. In addition, biogenic amines and the mediators serotonin and histamine were investigated as to their suitability as indicators of stress.

In some of the plasma parameters in exp 2, significant changes were observed during the three-day experimental period. The average concentration of IgG in plasma was between 15.03 and 17.13 g/l. This concentration showed a continuous decline between the morning of the first day and the evening of the third day. The difference in concentration between the first and the last data points was significant ($p < 0.001$). No changes in plasma IgA were observed over this period of time (average 0.92 – 0.97 g/l). The mean plasma cortisol levels were between 36.01 and 49.17 nmol/l. No changes were observed over the three days; small elevations following the exercises were not statistically significant. Plasma corticosterone levels were between 86.08 and 115.51 nmol/l on average. Concentrations of corticosterone rose significantly between each day ($p < 0.01$) but no significant changes were observed in the levels of the corresponding samples taken after exercise. The average plasma levels of histamine were between 20.80 and 22.70 nmol/l and failed to change significantly over the period of the experiment. Changes in serotonin plasma levels, which ranged on average between 0.12 and 0.19 nmol/l, were also not detectable.

No changes were observed in the plasma parameters of the search-and-rescue dogs in exp 2 that would have been unequivocally induced by the exposure to stress during the exercise. However, alterations were noted that can be interpreted in terms of a stress reaction. The continuous decline in IgG concentrations over the three-day experimental period indicates a long-term strain on the dogs with possibly chronic stress-related effects. The activation of the HPA-system was detectable in individual dogs as an elevation in cortisol levels and in the interaction of corticosteroids and the other parameters.

In the saliva samples from all three experiments, a significant reduction of sIgA levels over the course of the exercises (20-minutes search operation, exp 1 and exp 2 or 3-minutes protection exercise, exp 3) was noted ($p < 0.001$). The starting levels were on average 0.62 g/l (exp 1), 0.74 g/l (exp 2) and 0.46 g/l (exp 3). Following each exercise, average IgA levels were reduced to concentrations between 0.21 and 0.31 g/l. These levels increased again during the recovery periods following the exercises. In exp 2, the saliva levels of IgA increased over the three-day experimental period and reached the highest level on day 3 ($p < 0.001$). To the contrary, in exp 3 the levels decreased over the experimental period of four weeks

($p < 0.05$). The absolute levels of saliva IgA were significantly lower in the service dogs compared to the search-and-rescue dogs ($p < 0.001$).

In all three experiments significant effects of physical activity on the saliva levels of IgA could be detected. In both search-and-rescue and service dogs, physical activity led to an immediate reduction of IgA. In the context of an overall higher level of activity, service dogs displayed a substantially lower sIgA concentration as compared to search-and-rescue dogs. Since psychic stress can also reduce sIgA, the lower level of sIgA in service dogs is at least in part the result of the high level of agitation during both protection exercises and rescue periods.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S (2007). Cellular and Molecular Immunology. Saunders Elsevier, 6. Aufl.
- ADER R (2003). Conditioned immunomodulation: Research needs and directions. Brain Behav Immun 17, S51-S57.
- ADER R, COHEN N (1993). Psychoneuroimmunology: Conditioning and stress. Annu Rev Psychol 44, 23-51.
- AHRENS F, KNIES K, SCHNEIDER M, KÖHLER F, ERHARD MH (2005). Influence of different training and outdoor conditions on plasma histamine and cortisol concentrations in search-and-rescue dogs. Inflamm Res 54 Suppl 1, S34-S35.
- 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 250, E523-529.
- AKIMOTO T, KUMAI Y, AKAMA T, HAYASHI E, MURAKAMI H, SOMA R, KUNO S AND KONO I (2003). Effects of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects. Brit J Sport Med 37, 76-79.
- ASCHENBACH JR (1997). Resorption und Wirkung von Histamin im Pansen von Schafen unter besonderer Berücksichtigung der Pansenazidose. Diss. med. vet., Universität Leipzig.
- ASSIA E, EPSTEIN Y, MAGAZANIK A, SHAPIRO Y, SOHAR E (1989). Plasma-cortisol levels in experimental heatstroke in dogs. Int J Biometeorol 33, 85-88.
- 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 Reg Int Comp Physiol 279, R2042–R2047.
- AYELLI-EDGAR V, SILBERMAN DM, CREMASCHI G, ZIEHER LM, GENARO AM (2003). Altered lymphocyte catecholamine reactivity in mice subjected to chronic mild stress. Biochem Pharmacol 65, 15-23.
- BACHERT C (2002). The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of its inflammatory potential. Allergy 57, 287-296.
- BARNES PJ (2001). Histamine and Serotonin. Pulm Pharmacol Ther 14: 329-339.
- BATT RM, BARNES A, RUTGERS HC, CARTER SD (1991). Relative IgA deficiency and small intestinal bacterial overgrowth in German shepherd dogs. Res Vet Sci 50, 106-111.

- BAUER O, RAZIN E (2000). Mast cell-nerve interactions. *News Physiol Sci* 15, 213-218.
- BAUER ME, PERKS P, LIGHTMAN SL, SHANKS N (2001). Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiol Behav* 73, 525-532.
- BAUM M, LIESEN H (1997). Sport und Immunsystem. *Der Orthopäde* 20, 976-980.
- BECKER MJ, HELLAND D, BECKER DN (1976). Serum cortisol (hydrocortisone) values in normal dogs as determined by radioimmunoassay. *Am J Vet Res* 37, 1101-1102.
- BEERDA B, SCHILDER MBH, JANSSEN NSCRM, MOL JA (1996). The use of saliva cortisol, urinary cortisol and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Horm Behav* 30, 272-279.
- BEERDA B, SCHILDER MBH, VAN HOOFF JARAM, DE VRIES HW (1997). Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Appl Anim Behav Sci* 52, 307-319.
- BEERDA B, SCHILDER MBH, VAN HOOFF JARAM, DE VRIES HW, MOL JA (1998). Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Appl Anim Behav Sci* 58, 365-381.
- BEERDA B, SCHILDER MBH, BERNADINA W, VAN HOOFF JARAM, DE VRIES HW, MOL JA (1999). Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction: II. Hormonal and immunological responses. *Physiol Behav* 66, 243-254.
- BENTON LA, YATES FE (1990). Ultradian adrenocortical and circulatory oscillations in conscious dogs. *Am J Physiol* 258, R578-R590.
- BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L (2007). *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München, 6. Aufl., 840-841.
- 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* 66, 211-216.
- BLALOCK JE (1994). The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 15, 504-511.
- BLOUNT DG, PRITCHARD DI, HEATON PR (2005). Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 399-407.
- BØYUM A, WIİK P, GUSTAVSSON E, VEIBY OP, RESELAND J, HAUGEN A-H, OPSTAD PK (1996). The effect of strenuous exercise, calorie deficiency and sleep deprivation on white blood cells, plasma immunoglobulins and cytokines. *Scand J Immunol* 43, 228-235.

- BRANDTZAEG P (2007). Does salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann NY Acad Sci* 1098, 288-311.
- BRENNER I, SHEK PN, ZAMECNIK J, SHEPHARD RJ (1998). Stress hormones and the immunological response to heat and exercise. *Int J Sports Med* 19, 130-143.
- BULAT M, SUPEK Z (1967). The penetration of 5-hydroxytryptamine through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 14, 265-271.
- BUSH IE (1953). Species differences in adrenocortical secretion. *J Endocrinol* 9, 95-100.
- CALOGERO AE, BAGDY G, MONCADA ML, D'AGATA R (1993). Effect of selective serotonin agonists on basal, corticotropin-releasing hormone- and vasopressin-induced ACTH release in vitro from rat pituitary cells. *J Endocrinol* 136, 381-387.
- CALOGERO AE, BAGDY G, BURRELLO N, POLOSA P, D'AGATA R (1995). Role for serotonin₃ receptors in the control of adrenocorticotrophic hormone release from rat pituitary cell cultures. *Eur J Endocrinol* 133, 251-254.
- CAMPOS HA, MONTENEGRO M (1998). Footshock-induced rise of rat blood histamine depends upon the activation of postganglionic sympathetic neurons. *Eur J Pharmacol* 347, 159-164.
- 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* 383, 69-73.
- CANNON WB (1929). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: an account of recent researches into the function of emotional excitement*. Appleton, New York.
- CARPENTER GH, GARRETT JR, HARTLEY RH, PROCTOR GB (1998). The influence of nerves on the secretion of immunoglobulin A into submandibular saliva in rats. *J Physiol* 512, 567-573.
- CARPENTER GH, PROCTOR GB, EBERSOLE LE, GARRETT JR (2004). Secretion of IgA by rat parotid and submandibular cells in response to autonomic stimulation in vitro. *Int Immunopharmacol* 4, 1005-1014.
- CARPENTER GH, PROCTOR GB, GARRETT JR (2005). Preganglionic parasympathectomy decreases salivary sIgA secretion rates from the rat submandibular gland. *J Neuroimmunol* 160, 4-11.

- CARRASCO GA, VAN DE KAR LD (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463, 235-272.
- CHAOULOFF F (1997). Effects of acute physical exercise on central serotonergic systems. *Med Sci Sport Exerc* 29, 58-62.
- 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* 47, 500-510.
- DE KLOET ER (2004). Hormones and the stressed brain. *Ann NY Acad Sci* 1018: 1-15
- DEINZER R, SCHULLER N (1998). Dynamics of stress-related decrease of salivary immunoglobulin A (sIgA): relationship to symptoms of the common cold and studying behavior. *Behav Med* 23, 161-169.
- DEINZER R, KLEINEIDAM C, STILLER-WINKLER R, IDEL H, BACHG D (2000). Prolonged reduction of salivary immunoglobulin A (sIgA) after a major academic exam. *Int J Psychophysiol* 37, 219-232.
- DHABHAR FS (2000). Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity: the role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann NY Acad Sci* 917, 876-893.
- DHABHAR FS, McEWEN BS (1996). Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J Immunol* 156: 2608-2615.
- DHABHAR FS, McEWEN BS (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 11, 286-306.
- DHABHAR FS, McEWEN BS (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1059-1064.
- DÖCKE F (1994). Hypothalamus-Hypophysen-System. In: Döcke F (Hrsg.). *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 3. Aufl., 131-175.
- ECKERT R (2002). *Tierphysiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 4. durchges Aufl.
- ELENKOV IJ, CHROUSOS GP (2006). Stress system - organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulat* 13, 257-267.
- ELENKOV IJ, WILDER RL, CHROUSOS GP, VIZI ES (2000). The sympathetic nerve - an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52, 595-638.

- 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* 509, 587-598.
- ENDOU M, YANAI K, SAKURAI E, FUKUDO S, HONGO M, WATANABE T (2001). Food-deprived activity stress decreased the activity of the histaminergic neuron system in rats. *Brain Res* 891, 32-41.
- ENGELMANN M, LANDGRAF R, WOTJAK CT (2004). The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Front Neuroendocrin* 25, 132-149.
- ESKOLA J, RUUSKANEN O, SOPPI E, VILJANEN MK, JARVINEN M, TOIVONEN H, KOUVALAINEN K (1978). Effect of sport stress on lymphocyte transformation and antibody formation. *Clin Exp Immunol* 32, 339-345.
- ESPOSITO P, GHEORGHE D, KANDERE K, PANG X, CONNOLLY R, JACOBSON S, THEOHARIDES TC (2001). Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res* 888, 117-127.
- ESPOSITO P, CHANDLER N, KANDERE K, BASU S, JACOBSON S, CONNOLLY R, TUTOR D, THEOHARIDES TC (2002). Corticotropin-releasing hormone and brain mast cells regulate blood-brain-barrier permeability induced by acute stress. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 1061-1066.
- FELDMAN S, WEIDENFELD J (1998). The excitatory effects of the amygdala on hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses are mediated by hypothalamic norepinephrine, serotonin, and CRF-41 *Brain Res Bull* 45, 389-393.
- FELSBURG PJ, GLICKMAN LT, JEZYK PF (1985). Selective IgA deficiency in the dog. *Clin Immun Immunopathol* 36, 297-305.
- FLESHNER M, LAUDENSLAGER ML, SIMONS L, MAIER SF (1988). Reduced serum antibodies associated with social defeat in rats. *Physiol Behav* 45, 1183-1187.
- FUKUI Y, SUDO N, YU X-N, NUKINA H, SOGAWA H, KUBO C (1997). The restraint stress-induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of in vivo antibody production. *J Neuroimmunol* 79, 211-217.
- GAEHTGENS P (2003). Das Kreislaufsystem. In: Klinker R, Silbernagl S (Hrsg.). *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 4. Aufl., 145-188.

- GAILLET S, LACHUER J, MALAVAL F, ASSENMACHER I, SZAFARCZYK A (1991). The involvement of noradrenergic ascending pathways in the stress-induced activation of ACTH and corticosterone secretions is dependent on the nature of stressors. *Exp Brain Res* 87, 173-180.
- GARNIER F, BENOIT E, VIRAT M, OCHOA R, DELATOUR P (1990). Adrenal cortical response in clinical normal dogs before and after adaptation to a housing environment. *Lab Anim* 24, 40-43.
- GASSER PJ, LOWRY CA, ORCHINIK M (2006). Corticosterone-sensitive monoamine transport in the rat dorsomedial hypothalamus: potential role for organic cation transporter 3 in stress-induced modulation of monoaminergic neurotransmission. *J Neurosci* 26, 8758-8766.
- GAYRARD V, ALVINERIE M, TOUTAIN PL (1996). Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domest Anim Endocrin* 13, 35-45.
- GERMAN AJ, HALL EJ, DAY MJ (1998). Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. *Vet Immunol Immunopathol* 64, 107-121.
- GINEL PJ, NOVALES M, LOZANO MD, MOLLEDA JM, LOPEZ R (1993). Local secretory IgA in dogs with low systemic IgA levels. *Vet Rec* 132, 321-323.
- GLICKMAN LT, SHOFRER FS, PAYTON AJ, LASTER L, FELSBURG PJ (1988). Survey of serum IgA, IgG and IgM concentration in a large beagle population in which IgA deficiency had been identified. *Am J Vet Res* 49, 1240-1245.
- GÖBEL T, KASPERS B (2005). Immunabwehr und Blutgruppen. In: von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.). *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart, 2. Aufl., 213-229.
- GOMEZ-MERINO D, DROGOU C, CHENNAOUI M, TIOLLIER E, MATHIEU J, GUEZENEC CY (2005). Effects of combined stress during intense training on cellular immunity, hormones and respiratory infections. *Neuroimmunomodulat* 12, 164-172.
- GRAHAM NM, BARTHOLOMEUSZ RC, TABOONPONG N, LA BROOY JT (1988). Does anxiety reduce the secretion rate of secretory IgA in saliva? *Med J Australia* 148, 131-133.
- 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* 331, 237-243.

- HAMMACK SE, RICHEY KJ, SCHMID MJ, LOPRESTI ML, WATKINS LR, MAIER SF (2002). The role of corticotropin-releasing hormone in the dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of uncontrollable stress. *J Neurosci* 22, 1020-1026.
- HANLEY NR, VAN DE KAR LD (2003). Serotonin and the neuroendocrine regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and disease. *Vitam Horm* 66, 189-255.
- HAUBENHOFER D, MÖSTL E, KIRCHENGAST S (2005). Cortisol concentrations in saliva of humans and their dogs during intensive training courses in animal-assisted therapy. *Wien Tierärztl Mschr* 92, 66-73.
- HAYERBEKE A, DIEDERICH C, DEPIEREUX E, GIFFROY JM (2008). Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. *Physiol Behav* 93, 59-67.
- HECHTER O, MACCHI IA, KORMAN H, FRANK ED, FRANK HA (1955). Quantitative variations in the adrenocortical secretion of dogs. *Am J Physiol* 182, 29-34.
- HEDDLE RJ, ROWLEY D (1975). Dog immunoglobulins. I. Immunochemical characterization of dog serum, parotid saliva, colostrum, milk and small bowel fluid. *Immunology* 29, 185-195.
- HENNESSY MB, DAVIS HN, WILLIAMS MT, MELLOTT C, DOUGLAS CW (1997). Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. *Physiol Behav* 62, 485-490.
- HENNESSY MB, VOITH VL, MAZZEI SJ, BUTTRAM J, MILLER DD, LINDEN F (2001). Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. *Appl Anim Behav Sci* 73, 217-233.
- HINCHCLIFF KW, OLSON J, CRUSBERG C, KENYON J, LONG R, ROYLE W, WEBER W, BURR J (1993). Serum biochemical changes in dogs competing in a long-distance sled race. *JAVMA* 202, 401-405.
- HOGEN-ESCH H, THOMPSON S, DUNHAM A, CEDDIA M, HAYEK M (2004). Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. *Vet Immunol Immunopathol* 97, 77-85.
- HUANG Z-L, 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* 360, 139-146.

- HUCKLEBRIDGE F, CLOW A, EVANS P (1998). The relationship between salivary secretory immunoglobulin A and cortisol: neuroendocrine response to awakening and the diurnal cycle. *Int J Psychophysiol* 31, 69-76.
- IRWIN MR (2008). Human psychoneuroimmunology: 20 years of discovery. *Brain Behav Immun* 22, 129-139.
- ITO C, SHEN H, TOYOTA H, KUBOTA Y, SAKURAI E, WATANABE T, SATO M (1999). Effects of the acute and chronic restraint stresses on the central histaminergic neuron system of Fischer rat. *Neurosci Let* 262, 143-145.
- JACOBS C, VAN DEN BROECK W, SIMOENS P (2007). Neurons expressing serotonin-1B receptor in the basolateral nuclear group of the amygdala in normally behaving and aggressive dogs. *Brain Res* 1136, 102-109.
- JIANG CG, MORROW-TESSCH JL, BELLER DS, LEVY EM, BLACK PH (1990). Immunosuppression in mice induced by cold water stress. *Brain Behav Immun* 4, 278-291.
- JØRGENSEN HS (2007). Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan Med Bull* 54, 266-288.
- KAUFMAN JC, HARRIS TJ, HIGGINS J, MAISEL AS (1994). Exercise-induced enhancement of immune function in the rat. *Circulation* 90, 525-532.
- KELLER-WOOD ME (1990). Fast feedback control of canine corticotropin by cortisol. *Endocrinology* 126, 1959-1966.
- KELLER-WOOD ME, SHINSAKO J, KEIL LC, DALLMAN MF (1981). Insulin-induced hypoglycemia in conscious dogs. I. Dose-related pituitary and adrenal responses. *Endocrinology* 109, 818-824.
- KELLER-WOOD ME, SHINSAKO J, DALLMAN MF (1983). Inhibition of the adrenocorticotropin and corticosteroid responses to hypoglycemia after prior stress. *Endocrinology* 113, 491-496.
- KEMPPAINEN RJ, SARTIN JL (1984). Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotropin, cortisol and thyroxine in dogs. *J Endocrinol* 103, 219-226.
- KHANSARI DN, MURGO AJ, FAITH RE (1990). Effects of stress on the immune system. *Immunol Today* 11, 170-175.
- KIKKAWA A, UCHIDA Y, NAKADE T, TAGUCHI K (2003). Salivary secretory IgA concentrations in beagle dogs. *J Vet Med Sci* 65, 689-693.

- KIKKAWA A, UCHIDA Y, SUWA Y, TAGUCHI K (2005). A novel method for estimating the adaptive ability of guide dogs using salivary sIgA. *J Vet Med Sci* 67, 707-712.
- KIRBY LG, RICE KC, VALENTINO RJ (1999). Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacol* 22, 148-162.
- KNIES K (2005). Untersuchungen zur Histaminkonzentration im Plasma als Stressindikator bei Hunden. Diss. med. vet., LMU München.
- KNIES K, ERHARD MH, AHRENS F (2005). Effect of moderate stress on plasma histamine concentration in laboratory dogs. *Inflamm Res* 54 Suppl 1, S32-S33.
- KNIGGE U, WOLLESEN F, DEJGAARD A, LARSEN K, CHRISTIANSEN PM (1983). The effect of histamine stimulation and H₂-receptor inhibition on the pituitary prolactin and ACTH release and on cortisol secretion in human males. *Horm Metab Res* 15, 89-91.
- KÖHLER F (2004). Vergleichende Untersuchungen zur Belastung von Lawinen- und Rettungshunden bei der Lauf- und der Sucharbeit. Diss. med. vet., LMU München.
- KOLB E (1993). Anpassungsvorgänge in der Sekretion von Hormonen (Corticoliberin, ACTH, Cortisol) und im Stoffwechsel von Hunden bei Belastungen. *Mh Vet Med* 48, 595-601.
- KOLEVSKA J, BRUNCLIK V, SVOBODA M (2003). Circadian rhythm of cortisol secretion in dogs of different daily activities. *Acta Vet BRNO* 72, 599-605.
- KOOLMANN J, RÖHM KH (2003). Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 3. Aufl.
- KOYAMA T, OMATA Y, SAITO A (2003). Changes in salivary cortisol concentrations during a 24-hour period in dogs. *Horm Metab Res* 35, 355-357.
- KRAFT W, DÜRR UM (2005). Referenzbereiche. In: Kraft W, Dürr UM (Hrsg.). *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 6. Aufl., 507-523.
- KRAFT W, DÜRR UM, FÜRL M, BOSTEDT H, HEINRITZI K (2005). Hämatologie. In: Kraft W, Dürr UM (Hrsg.). *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 6. Aufl., 49-92.
- KUHN G, LICHTWALD K, HARDEGG W, ABEL HH (1991). Reaktionen von Corticoiden, Enzymaktivitäten und hämatologischen Parametern auf Transportstress bei Hunden. *J Exp Anim Sci* 34, 99-104.

- KUSNECOV AW, RABIN BS (1993). Inescapable footshock exposure differentially alters anti- and mitogen-stimulated spleen cell proliferation in rats. *J Neuroimmunol* 44, 33-42.
- LADWIG J (1994). Stress. In: Döcke F (Hrsg.). *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 3. Aufl., 379-398.
- LAING SJ, GWYNNE D, BLACKWELL J, WILLIAMS M, WALTERS R, WALSH NP (2005). Salivary IgA response to prolonged exercise in a hot environment in trained cyclists. *Eur J Appl Physiol* 93, 665-671.
- LAUDENSLAGER ML, FLESHNER M, HOFSTADTER P, HELD PE, SIMONS L, MAIER SF (1988). Suppression of specific antibody production by inescapable shock: stability under varying conditions. *Brain Behav Immun* 2, 92-101.
- LEFEBVRE H, CONTESSE V, DELARUE C, VAUDRY H, KUHN M (1998). Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res* 30: 398-403.
- LENTZ S (2000). Vergleichende Untersuchungen zu den Serotonin- und 5-HIAA-Konzentrationen in Liquor, Serum und Plasma bei dominanzaggressiven und verhaltensunauffälligen Hunden. Diss. vet. med., LMU München.
- LEONARD BE (2006). HPA and immune axes in stress: Involvement of the serotonergic system. *Neuroimmunomodulat* 13, 268-276.
- LEONHARDT H (1990). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 8. Aufl.
- LILLIEHOOK I (1997). Diurnal variation of canine blood leukocyte counts. *Vet Clin Path* 26, 113-117.
- LIU C, ZHOU J, ZHANG LD, WANG YX, KANG ZM, CHEN YZ, JIANG CL (2007). Rapid inhibitory effect of corticosterone on histamine release from rat peritoneal mast cells. *Horm Metab Res* 39, 273-277.
- LORENZ W, DOENICKE A, REIMANN H-J, 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* 3, 183-184.
- LORENZ W, BARTH H, SCHMAL A, NIEMEYER I, DORMANN P (1974). o-Phthaldialdehyde reactive substances in dog's plasma and gelatin (Haemacoel[®]) complicating the determination of histamine. *Agents Actions* 4, 206-208.

- LUKKES JD, FORSTER GL, RENNER KJ, SUMMERS CH (2008). Corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in the dorsal raphe differentially affect serotonin release in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 578, 185-193.
- MACKINNON LT (2000). Chronic exercise training effects on immune function. *Med Sci Sport Exerc* 32 Suppl 7, S369-S376.
- MACKINNON LT, HOOPER S (1994). Mucosal (secretory). immune system responses to exercise of varying intensity and during overtraining. *Int J Sports Med* 15 Suppl 3, S179-S183.
- MACKINNON LT, JENKINS DG (1993). Decreased salivary immunoglobulins after intense interval exercise before and after training. *Med Sci Sport Exerc* 25, 678-683.
- MACKINNON LT, GINN E, SEYMOUR GJ. (1993). Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite kayakers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 67, 180-184.
- MADDEN KS, SANDERS VM, FELTEN DL (1995). Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 417-448.
- MANSER CE (1992). The assessment of stress in laboratory animals. Causeway RSPCA, Horsham, West Sussex.
- MAŚLIŃSKI C (1975A). Histamine and its metabolism in mammals. Part I: Chemistry and formation of histamine. *Agents Actions* 5, 89-107.
- MAŚLIŃSKI C (1975B). Histamine and its metabolism in mammals. Part II: Catabolism of histamine and histamine liberation. *Agents Actions* 5, 183-225.
- MCCARTHY DA, DALE MM (1988). The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med* 6, 333-63.
- MCKITTRICK CR, BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, MCEWEN BS, SAKAI RR (1995). Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol Psychiat* 37, 383-393.
- MEEUSEN R, PIACENTINI MF, KEMPENAERS F, BUSSCHAERT B, DE SCHUTTER G, BUYSE L, DE MEIRLEIR K (2001). Neurotransmitter im Gehirn während körperlicher Belastung. *Deut Z Sportmed* 52, 361-368.
- MEIJER OC, KORTEKAAS RUUD, OITZL MS, DE KLOET RE (1998). Acute rise in corticosterone facilitates 5-HT receptor-mediated 1A behavioural responses. *Eur J Pharmacol* 351, 7-14.

- MESTECKY J (1993). Saliva as a manifestation of the common mucosal immune system. *Ann NY Acad Sci* 694, 184-194.
- MESTECKY J, RUSSELL MW, JACKSON S, BROWN TA (1986). The human IgA system: A reassessment. *Clin Immun Immunopathol* 40, 105-114.
- MILETIC ID, SCHIFFMAN SS, MILETIC VD, SATTELY-MILLER EA (1996). Salivary IgA secretion rate in young and elderly persons. *Physiol Behav* 60, 243-248.
- MILLAN S, GONZALES-QUIJANO MI, GIORDANO M, SOTO L, MARTÍN AI, LOPEZ-CALDERON A (1996). Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. *Life Sci* 59, 1431-1442.
- MIZOGUCHI K, YUZURIHARA M, ISHIGE A, SASAKI H, CHUI H, TABIRA T (2001). Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback in rats. *Psychoneuroendocrinology* 26, 443-459.
- MOBERG GP (2001). Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA (Hrsg.). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing Oxon, Cambridge, 1-22.
- MORGADINHO MT, RIBEIRO CAF, MACEDO TRA (2004). Influence of the sample preparation method on the serotonin determination in plasma and platelets. *Biomed Chromatogr* 18, 739-744.
- MORGANE PJ, GALLER JR, MOKLER DJ (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol* 75, 143-160.
- MÖSSNER R, LESCH K-P (1998). Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun* 12, 249-271.
- MÖSTL E, PALME R (2002). Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrin* 23: 67-74.
- MUNCK A, GUYRE PM (1991). Glucocorticoids and immune function. In: Ader R, Felten DL, Cohen N (eds.). *Psychoneuroimmunology*. Academic Press, Rochester, 447-475.
- MURASE T, INABA M, MAEDE Y (1988). Measurement of serum glucocorticoids by high-performance liquid chromatography and circadian rhythm patterns of the cortisol value in normal dogs. *Jpn J Vet Sci* 50, 1133-1135.
- NEHLSSEN-CANNARELLA SL, NIEMAN DC, JESSEN J, CHANG L, GUSEWITCH G, BLIX GG, ASHLEY E (1991). The effects of acute moderate exercise on lymphocyte function and serum immunoglobulin levels. *Int J Sports Med* 12, 391-398.

- NEHLSSEN-CANNARELLA SL, NIEMAN DC, FAGOAGA OR, KELLN WJ, HENSON DA, SHANNON M, DAVIS JM (2000). Saliva immunoglobulins in elite women rowers. *Eur J Appl Physiol* 81, 222-228.
- NIEMAN DC, NEHLSSEN-CANNARELLA SL (1991). The effects of acute and chronic exercise on immunoglobulins. *Sports Med* 11, 183-201.
- NIEMAN DC, HENSON DA, FAGOAGA OR, UTTER AC, VINCI DM, DAVIS JM, NEHLSSEN-CANNARELLA SL (2002). Change in salivary IgA following a competitive marathon race. *Int J Sports Med* 23, 69-75.
- NOLI C, MIOLO A (2001). The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol* 12, 303-313.
- OBERLEITHNER H (2003). Salz- und Wasserhaushalt. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.). *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 4. Aufl., 337-364.
- ORTH DN, PETERSON ME, DRUCKER WD (1988). Plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptides and cortisol in normal dogs and dogs with cushing's syndrome: diurnal rhythm and responses to various stimuli. *Endocrinology* 122, 1250-1262.
- OTTAWAY CA, HUSBAND AJ (1994). The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol Today* 15, 511-517.
- OWENS MJ, EDWARDS E, NEMEROFF CB (1990). Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and corticotropin-releasing factor containing neurons in rat brain. *Eur J Pharmacol* 190, 113-122.
- PADGETT DA, GLASER R (2003). How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 24, 444-448.
- PALAZZOLO DL, QUADRI SK (1987A). Plasma thyroxine and cortisol under basal conditions and during cold stress in the aging dog. *Proc Exp Biol Med* 185, 305-311.
- PALAZZOLO DL, QUADRI SK (1987B). The effects of aging on the circadian rhythm of serum cortisol in the dog. *Exp Gerontol* 22, 379-387.
- PALME R, RETTENBACHER S, TOUMA C, EL-BAHR SM, MÖSTL E (2005). Stress hormones in mammals and birds. Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann NY Acad Sci* 1040, 162-171.
- PANULA P, YANG HYT, COSTA E (1984). Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 2572-2576.

- PANULA P, KAARTINEN M, MACKLIN M, COSTA E (1985). Histamine-containing peripheral neuronal and endocrine systems. *J Histochem Cytochem* 33, 933-941.
- PAULY SK (2007). Belastung von angekauften Diensthunden durch Haltung und die Grundausbildung im Schutzdienst. Diss. med. vet., LMU München.
- PEDERSEN KB (1991). Influence of physical-activity on the cellular immune-system - mechanisms of action. *Int J Sports Med* 12 Suppl 1, S23-S29.
- PEDERSEN KB, HOFFMAN-GOETZ L (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 80, 1055-1081.
- PEÑALVA RG, FLACHSKAMM C, ZIMMERMANN S, WURST W, HOLSBOER F, REUL JM, LINTHORST ACE (2002). Corticotropin-releasing hormone receptor type1-deficiency enhances hippocampal serotonergic neurotransmission: an in vivo microdialysis study in mutant mice. *Neuroscience* 109, 253-266.
- PERNA FM, SCHNEIDERMAN N, LAPERRIERE A (1997). Psychological stress, exercise and immunity. *Int J Sports Med* 18 Suppl 1, S78-S83.
- PICARD M, OLICHON D, GOMBERT J (1985). Determination of serotonin in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 341, 445-451.
- PROCTOR GB, CARPENTER GH, SEGAWA A, GARRETT JR, EBERSOLE L (2003). Constitutive secretion of immunoglobulin A and other proteins into lumina of unstimulated submandibular glands in anaesthetised rats. *Exp Physiol* 88, 7-12.
- 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* 40, 63-69.
- REYNOLDS HY, JOHNSON JS (1970). Quantitation of canine immunoglobulins. *J Immunol* 105, 698-703.
- RICKS J, ROBERTS M, PATTERSON R (1970). Canine secretory immunoglobulins: Identification of secretory component. *J Immunol* 105, 1327-1333.
- RIEDERER P, YODIM M (1990). Amine oxidases and their impact on neurobiology. *J Neural Transm Suppl* 32, 152-153.
- RING C, CARROL D, WILLEMSEN G, COOKE J, FERRARO A, DRAYSON M (1999). Secretory immunoglobulin A and cardiovascular activity during mental arithmetic and paced breathing. *Psychophysiology* 36, 602-609.

- RINKINEN M, TEPPONEN A-M, HARMONINEN J, WESTERMARCK E (2003). Relationship between canine mucosal and serum Immunoglobulin A (IgA) concentrations: Serum IgA does not assess duodenal secretory IgA. *Microbiol Immunol* 47, 155-159.
- RONSEN O, HAUG E, PEDERSEN KB, BAHN R (2001). Increased neuroendocrine response to a repeated bout of endurance exercise. *Med Sci Sport Exerc* 33, 568-575.
- ROONEY NJ, GAINES SA, BRADSHAW JWS (2007). Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiol Behav* 92, 847-854.
- ROTHUIZEN J, REUL JM, RJINBERK A, MOL JA, DE KLOET E (1991). Aging and the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis, with special reference in the dog. *Acta Endocrinol* 125, 73-76.
- ROTHUIZEN J, REUL JM, VAN SLUIJS FJ, MOL JA, RJINBERK A, DE KLOET ER (1993). Increased neuroendocrine reactivity and decreased brain mineralocorticoid receptor-binding capacity in aged dogs. *Endocrinology* 132, 161-168.
- RUSHEN J (1991). Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. *Appl Anim Behav Sci* 28, 381-386.
- SADOWSKI J, GELLERT R, KURKUS J, PORTALSKA E (1981). Denervated and intact kidney responses to exercise in the dog. *J Appl Physiol* 51, 1618-1624.
- SAPOLSKY RM (2000). Stress hormones: Good and bad. *Neurobiol Dis* 7, 540-542.
- SAPOLSKY RM, ROMERO LM, MUNCK AU (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21, 55-89.
- SCHEDLOWSKI M, SCHMIDT R (1996). Stress und Immunsystem. *Naturwissenschaften* 83, 214-220.
- SCHNEIDER M, WILHELM S (2008). pers. Mitteilung (Februar 2008).
- SCHWARTZ JC, POLLARD H, QUACH TT (1980). Histamine as a neurotransmitter in mammalian brain: neurochemical evidence. *J Neurochem* 35, 26-33.
- SELYE H (1981). Geschichte und Grundzüge des Stresskonzepts. In: Nitsch JR (Hrsg.). *Stress. Theorien, Untersuchungen, Maßnahmen*. Verlag Hans Huber, Bern, 163-187.
- SHA L, MILLER SM, SZURSZEWski JH (2004). Morphology and electrophysiology of neurons in dog paraventricular nucleus: in vitro study. *Brain Res* 1010, 95-107.

- SILBERMAN DM, WALD MR, GENARO AM (2002). Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response. Participation of serum thyroid hormones and corticosterone. *Int Immunopharmacol* 2, 487-497.
- SILBERMAN DM, WALD MR, GENARO AM (2003). Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *J Neuroimmunol* 144, 53-60.
- SILBERNAGL S (2003). Die Funktion der Nieren. In: Klinker R, Silbernagl S (Hrsg.). *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 4. Aufl., 287-336.
- SKANDAKUMAR S, STODULSKI G, HAU J (1995). Salivary IgA: A possible stress marker in dogs. *Anim Welfare* 4, 339-350.
- SNOECK V, PETERS IR, COX E (2006). The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res* 37, 455-467.
- STEPHEN JM, LEDGER RA (2006). A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kennelled dogs, *Canis familiaris*. *Physiol Behav* 87, 911-916.
- STICHNOTH J (2002). Stresserscheinungen beim praxisähnlichen Einsatz von elektrischen Erziehungshalsbändern beim Hund. *Diss. med. vet., TiHo Hannover*.
- STOKES C, WALY N (2006). Mucosal defence along the gastrointestinal tract of cats and dogs. *Vet Res* 37, 281-293.
- STRASSER A, NIEDERMÜLLER H, HOFHECKER G, LABER G (1993). The effect of aging on laboratory values in dogs. *J Vet Med A* 40, 720-730.
- STRASSER A, SEISER M, SIMUNEK M, HEIZMANN V, NIEDERMÜLLER H (1997). Physiologische Altersveränderungen beim Hund (Longitudinalstudie in einer Beagle-Kolonie). *Wien Tierärztl Mschr* 84, 189-196.
- STRASSER A, TELTSCHER A, MAY B, SANDERS C, NIEDERMÜLLER H (2000). Age-associated changes in the immune system of German shepherd dogs. *J Vet Med A* 47, 181-192.
- THEOHARIDES TC, COCHRANE DE (2004). Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J Neuroimmunol* 146, 1-12.
- 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* 136, 5745-5750.

- THEWS G, VAUPEL P (1997). *Vegetative Physiologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Aufl.
- THOMÉ H (2004). Mundhöhle und Schlundkopf. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Bd. 2 Eingeweide. Parey Verlag, Stuttgart, 9. Aufl., 19-102.
- THOMPSON RF (2001). *Das Gehirn: Von der Nervenzelle zur Verhaltenssteuerung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 3. Aufl.
- THUN RHL (1984). Einfluss von Lagerzeit und Temperartur auf den Cortisolgehalt in Blutproben beim Hund. *Schweiz Arch Tierh* 126, 261-264.
- THUN R, EGGENBERGER E, ZEROBIN K (1990). 24-hour profil of plasma cortisol and testosterone in the male dog: absence of circadian rhythmicity, seasonal influence and hormonal interrelationships. *Reprod Domest Anim* 25, 68-77.
- THUN R, SCHWARTZ-PORSCHKE D (1994). Nebennierenrinde. In: Döcke F (Hrsg.). *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 3. Aufl., 309-356.
- TIOLLIER E, SCHMITT L, BURNAT P, FOUILLOT J-P, ROBACH P, FILAIRE E, GUEZENNEC CY, RICHALET J-P (2005). Living high–training low altitude training: effects on mucosal immunity. *Eur J Appl Physiol* 94, 298-304.
- TOMASI TB, TRUDEAU FB, CZERWINSKI D, ERREDGE S (1982). Immune parameters in athletes before and after strenuous exercise. *J Clin Immunol* 2, 173-178.
- TUBER DS, HENNESSY MB, SANDERS S, MILLER JA (1996). Behavioral and glucocorticoid responses of adult domestic dogs (*Canis familiaris*) to companionship and social separation. *J Comp Psychol* 110, 103-108.
- VAERMAN JP, HEREMANS JF (1968). The immunoglobulins of the dog. 1. Identification of canine immunoglobulins homologues to human IgA and IgM. *Immunochemistry* 5, 425-432.
- VAERMAN JP, HEREMANS JF (1969). The immunoglobulins of the dog. 2. Immunoglobulins of canine secretions. *Immunochemistry* 6, 779-786.
- VAN DE KAR LD, BLAIR ML (1999). Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrin* 20, 1-48.
- VAN DEN BERG L, VERSTEEG SA, VAN OOST BA (2003). Isolation and characterization of the canine serotonin receptor 1A gene (*htr1A*). *J Hered* 94, 49-56.
- VOIGT K (2003). Endokrines System. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.). *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 4. Aufl., 443-492.

- VINCENT IC, MICHELL RA (1992). Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res Vet Sci* 53, 342-345.
- VIRU AM, HACKNEY AC, VÄLJA E, KARELSON K, JANSON T, VIRU M (2001). Influence of prolonged continuous exercise on hormone responses to subsequent exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 85, 578-585.
- WALSH NP, BISHOP NC, BLACKWELL J, WIERZBICKI SG, MONTAGUE JC (2002). Salivary IgA response to prolonged exercise in a cold environment in trained cyclists. *Med Sci Sport Exerc* 34, 1632-1637.
- 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* 295, 13-25.
- WEICKER H, WERLE E (1991). Interaction between hormones and the immune-system *Int J Sports Med* 12 Suppl 1, S30-S37.
- WEIDENFELD J, NEWMAN ME, ITZIK A, GUR E, FELDMAN S (2002). The amygdala regulates the pituitary-adrenocortical response and release of hypothalamic serotonin following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Neuroendocrinology* 76, 63-69.
- WEIDENFELD J, NEWMAN ME, ITZIK A, FELDMAN S (2005). Adrenocortical axis responses to adrenergic and glutamate stimulation are regulated by the amygdala. *Neuroreport* 16, 1245-1249.
- WHITBREAD TJ, BATT RM, GARTHWAITE G (1984). Relative deficiency of serum IgA in the german shepherd dog: a breed abnormality. *Res Vet Sci* 37, 350-352.
- WILHELM S (2007). Belastung von Rettungshunden während einer dreitägigen Trümmersuche auf einem Katastrophenübungsgelände. Diss. med. vet., LMU München.
- WILLARD M, TVEDTEN H (2006). Labordiagnostik in der Kleintierpraxis. Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München, 1. Aufl.
- WILLEMSSEN G, RING C, CARROLL D, EVANS P, CLOW A, HUCKLEBRIDGE F (1998). Secretory immunoglobulin A and cardiovascular reactions to mental arithmetic and cold pressor. *Psychophysiology* 35, 252-259.

- WINZER A, RING C, CARROL D, WILLEMSSEN G, DRAYSON M, KENDALL M (1999). Secretory immunoglobulin A and cardiovascular reactions to mental arithmetic, cold pressor, and exercise: Effects of beta-adrenergic blockade. *Psychophysiology* 36, 591-601.
- WUST C (2006). Einfluss der Höhenlage und Geländebeschaffenheit auf die leistungsphysiologischen Parameter von alpinen Rettungshunden. Diss. med. vet., LMU München.
- XIAO R, BECK O, HJEMDAHL P (1998). On the accurate measurement of serotonin in whole blood. *Scand J Clin Lab Inv* 58, 505-510.
- YOUNG JA, COOK DI, LINGARD JM, VAN LENNEP EW, WEGMAN EA (2003). Funktionen des Magen-Darm-Trakts. In: Klinker R, Silbernagl S (Hrsg.). *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 4. Aufl., 393-442.
- ZALCMAN S, ANISMAN H (1993). Acute and chronic stressor effects on the antibody response to sheep red blood cells. *Pharmacol Biochem Behav* 46, 445-452.
- ZALCMAN S, KERR L, ANISMAN H (1991). Immunosuppression elicited by stressors and stress-related odors. *Brain Behav Immun* 5, 262-273.

10. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Übersicht über den Ablauf einer Übung bei Rettungshunden (Exp 1), Aufzeichnung der Bewegungsaktivität und die Probennahmezeitpunkte.....	25
Tabelle 2. Übersicht über den Ablauf eines Versuchstags bei Rettungshunden (Exp 2), Aufzeichnung der Bewegungsaktivität und die Probennahmezeitpunkte.....	27
Tabelle 3. Übersicht über den Ablauf einer Schutzdienstübung bei Diensthunden (Exp 3), Aufzeichnung der Bewegungsaktivität und die Probennahmezeitpunkte.	29
Tabelle 4. Inter-Assayvarianz des IgG-ELISAs.	37
Tabelle 5. Inter-Assayvarianz des IgA-ELISAs.	39
Tabelle 6. Inter-Assayvarianz des Kortisol-ELISAs.	42
Tabelle 7. Inter-Assayvarianz des Kortikosteron-ELISAs.	44
Tabelle 8. Inter-Assayvarianz des Serotonin-ELISAs.	46
Tabelle 9. Übersicht über die chromatographischen Bedingungen der Histamin-Analytik	50
Tabelle 10. Ergebnisse der Scheffé-Post-hoc-Tests nach univariater Varianzanalyse zur Feststellung von Unterschieden im Niveau der Speichel-sIgA-Konzentration bei Rettungs- und Diensthunden in den drei Experimenten.	71
Tabelle 11. Übersicht über die signifikanten Einflussfaktoren auf die einzelnen Plasmaparameter; Ergebnisse der statistischen Überprüfung mittels GLM.	72
Tabelle 12. Übersicht über die signifikanten Einflüsse der Plasmaparameter untereinander; Ergebnisse der statistischen Überprüfung mittels GLM.	73
Tabelle 13. Ergebnisse der Korrelationsanalysen nach Pearson zur Frage des Zusammen- hangs zwischen den Plasma-Kortisol- und Kortikosteronkonzentrationen.....	73
Tabelle 14. Überblick über die Daten für Speichel-Kortisol und Bewegungsaktivität aus den drei Experimenten zur Belastung von Rettungs- und Diensthunden.	97

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Schematische Darstellung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Angaben zum Probenauftrag für den Nachweis von Immunglobulinen mittels ELISA.....	35
Abbildung 2. Schematische Darstellung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Angaben zum Probenauftrag für den Nachweis von Kortisol mittels ELISA.	40
Abbildung 3. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor und nach einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-IgG-Konzentration.	54

Abbildung 4. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor und nach einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-IgA-Konzentration.	55
Abbildung 5. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor und nach einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-Kortisolkonzentration.	56
Abbildung 6. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor und nach einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-Kortikosteronkonzentration.....	58
Abbildung 7. Verteilung des bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor und nach einem Versuchsdurchgang ermittelten Kortisol/Kortikosteron-Quotienten.....	59
Abbildung 8. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor und nach einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-Histaminkonzentration.....	60
Abbildung 9. Verteilung der bei den Rettungshunden (Exp 2) jeweils unmittelbar vor und nach einem Versuchsdurchgang ermittelten Plasma-Serotoninkonzentration.	61
Abbildung 10. Durchschnittlicher Verlauf der Speichel-sIgA-Konzentration bei Rettungshunden während fünf Übungen auf verschiedenen Geländeformen und in verschiedenen Höhenlagen (Exp 1).....	62
Abbildung 11. Mittlere Speichel-sIgA-Konzentration zu den 8 Probennahmezeitpunkten gemittelt über die fünf Suchübungen (Exp 1).	64
Abbildung 12. Durchschnittlicher Verlauf der Speichel-sIgA-Konzentration bei Rettungshunden während der 3-tägigen Trümmersuche (Exp 2)	65
Abbildung 13. Mittlere Speichel-sIgA-Konzentration zu den 13 Probennahmezeitpunkten gemittelt über die drei Versuchstage (Exp 2).	67
Abbildung 14. Durchschnittlicher Verlauf der Speichel-sIgA-Konzentration bei Diensthunden während zweier Schutzdienstübungen zu Beginn und am Ende einer 4-wöchigen Trainingsphase (Exp 3).	68
Abbildung 15. Mittlere Speichel-sIgA-Konzentration zu den 6 Probennahmezeitpunkten bei den beiden Schutzdienstübungen (Exp 3).	70
Abbildung 16. Speichel-Konzentrationen von sIgA und Kortisol sowie Höhe der Bewegungsaktivität bei Rettungshunden während wiederholter Suchübungen an fünf verschiedenen Versuchstagen in unterschiedlichem Gelände (Exp 1)	74
Abbildung 17. Speichel-Konzentrationen von sIgA und Kortisol sowie Höhe der Bewegungsaktivität bei Rettungshunden während drei aufeinander folgenden Versuchstagen im Trümmerfeld (Exp 2).....	75
Abbildung 18. Speichel-Konzentrationen von sIgA und Kortisol sowie Höhe der Bewegungsaktivität bei Diensthunden bei zwei Übungen zu Beginn und am Ende einer 4-wöchigen Ausbildungsphase (Exp 3)	76
Abbildung 19. Biosynthese der Kortikosteroide.	88

DANKSAGUNG

An erster Stelle bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Erhard für die Überlassung des Themas und seine jederzeit freundliche Unterstützung.

Frau Dr. Michaela Schneider danke ich besonders dafür, dass ich an den von ihr betreuten Projekten mitarbeiten durfte, aber auch für die vielen wertvollen Gespräche, Diskussionen und Anregungen, das intensive Korrekturlesen und die zu jeder Zeit und an jedem Ort immer angenehme und produktive Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Frank Ahrens gilt mein Dank für seine tatkräftige Unterstützung im Labor, besonders bei der HPLC-Analytik, und für die immer hilfreichen Gespräche und Diskussionen.

Bei Frau Dr. Silke Pauly, Frau Dr. Christine Waldhauser und ganz besonders bei Frau Dr. Stephanie Wilhelm möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit vor, während und nach der Studie im Tritolwerk bedanken.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Hermann Kuchler, Frau Katrin Schuster, Herrn Christian Strobl und Frau Nicole Zobel, die mir im und außerhalb des Labors immer eine große Hilfe waren.

Ferner gilt mein herzlichster Dank allen, die zum Gelingen der Studien beigetragen haben, in ganz besonderem Maß Herrn Rolf Frasch, aber auch allen Hundeführern mit ihren Hunden sowie den Organisatoren und Mithelfern vor Ort.

Den Mitarbeitern des statistischen Beratungslabors der LMU unter der Leitung von Prof. Dr. Helmut Küchenhoff danke ich für die fachkundige Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Hans Erkert (Universität Tübingen) und Herrn Prof. Dr. Georg Häcker (TU München) für freundschaftlichen Rat und hochgeschätzte Unterstützung.

Frau Dr. Cornelia Meyer gilt mein herzlichster Dank für die aufmerksame und sorgfältige Korrektur der Arbeit.

Meiner Familie danke ich für die immerwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht und meinen Freunden für grenzenlose Geduld und Verständnis.