

**Untersuchungen zum Einfluss thermischer Belastungen auf den Verlauf von
Autoimmunerkrankungen am Beispiel des murinen Lupus Erythematodes**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Oliver Holger Franz
aus Limburg

Gießen 2003

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III (Direktor Prof. Dr. Bretzel) und dem
Physiologischen Institut (Direktor Prof. Dr. Dr. Piper) der Justus-Liebig-Universität
Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Drs. h.c. K. Federlin

Gutachter: PD Dr. P. Mayser

Tag der Disputation: 25.02.2004

für Judith, Evi und Falko

Inhalt

1. Einleitung	4
1.1. Kollagenosen	4
1.2. Tiermodelle für den SLE	6
1.3. Interaktion zwischen Nerven- und Immunsystem	7
1.4. Zielsetzung	10
2. Methoden	11
2.1. Versuchstiere	11
2.2. Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	12
2.3. Thermische Exposition	14
2.4. Präparation der Versuchstiere	14
2.5. Aufbereitung der lymphatischen Gewebe	15
2.5.1. Bestimmung der Zellzahl	16
2.5.2. Markierung mittels monoklonaler Antikörper	17
2.5.2.1. Antikörper	17
2.5.2.2. Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung	18
2.6. Durchflußzytometrie	18
2.6.1. Prinzip	19
2.6.2. Zellanalyse	21
2.7. Serologische Untersuchungen	25
2.7.1. Corticosteron	25
2.7.2. Andere Parameter	25
2.8. Statistische Auswertung	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Reaktion der Tiere auf die Belastung	27
3.2. Untersuchungen an Balb/c-Mäusen	27
3.2.1. Vorversuche	27
3.2.2. Corticosteron	28
3.2.3. IL-6	28
3.3. Untersuchungen an MRL-Mäusen	29
3.3.1. Milzgewicht	29
3.3.2. Lymphozytensubpopulationen	30
3.3.2.1. B220+Thy1.2+ Milzlymphozyten	30
3.3.2.2. B220+Thy1.2- Milzlymphozyten	32
3.3.2.3. CD4/8-CD44+ Milzlymphozyten	33
3.3.2.4. B220+Thy1.2+ Thymuslymphozyten	34
3.3.2.5. CD4/8-CD44+ Thymuslymphozyten	35
3.3.2.6. B220+Thy1.2+ Lymphknotenlymphozyten	35
3.3.2.7. B220+Thy1.2- Lymphknotenlymphozyten	36
3.3.2.8. CD4/8-CD44+ Lymphknotenlymphozyten	37
3.3.3. Serologische Werte	38
3.3.3.1. Corticosteron	38
3.3.3.2. IL-6	39
3.3.3.3. anti-ds-DNS-Antikörper	40
3.3.3.4. Serum-Amyloid-A	41
3.3.3.5. IL-1- α	42

4. Diskussion	43
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	43
4.2. Methodik	44
4.3. Ergebnisse	46
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis	56
7. Anhang	70

Verwendete Abkürzungen

anti-ds-DNS-Ak	Antikörper gegen doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ARA	American Rheumatism Association, heute: American College of Rheumatology (ACR)
Balb/c	Mäusestamm Balb/c
CD	“Cluster of differentiation”
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay, Enzym-Immunoansatz
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC	„Forward Scatter“ (Vorwärtsstreulicht bei Durchflußzytometrie)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
HBSS	Pufferlösung nach Hanks, balancierte Salzlösung
HPA	Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
MW	Mittelwert
MRL +/-	Mäusestamm mit Prädisposition für Autoimmunerkrankung
MRL lpr/lpr	Mäusestamm mit Mutation des lpr-Genes
NF-κB	Nukleärer-Faktor-κB
NK	Natürliche Killer(zellen)
PE	Phycoerythrin
SAA	Serum-Amyloid-A
SD	„Standard Deviation“
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSC	„Side Scatter“ (Seitliches Streulicht bei Durchflußzytometrie)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UV	Ultraviolett
VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Kollagenosen

Kollagenosen sind chronische Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, die Bindegewebe des Körpers einbeziehen und zu Organveränderungen führen können. Die bei den Kollagenosen bereits früh entdeckten Autoantikörper gegen Zellkerne (antinukleäre Antikörper) weisen darauf hin, dass Autoimmunmechanismen für die Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen (Tan 1985).

Zu den Kollagenosen zählt der Systemische Lupus Erythematoses (SLE), das Sjögren Syndrom, die progressive Systemsklerose bzw. Sklerodermie, die Polymyositis, die Dermatomyositis und Mischformen dieser klassischen Kollagenosen, z.B. das Sharp-Syndrom („Mixed Connective Tissue Disease“). Klinisch gemeinsam sind den Erkrankungen Arthritiden und Myalgien, vaskuläre Symptome und eine Beteiligung von Organsystemen mit unterschiedlichen Befallsmustern.

Der SLE hat eine Inzidenz von ca. 50 Fällen pro 100.000 Einwohner. Circa 90% der Erkrankten sind weiblich. Vor der Pubertät und nach der Menopause ist diese Prädominanz des weiblichen Geschlechts schwächer (Gerok et al 2000). Hauptmanifestationsalter ist die zweite bis dritte Lebensdekade, ein Auftreten vor dem 5. Lebensjahr ist sehr selten. Klinisch betroffen sind überwiegend Haut, Gelenke, Gefäßsystem (Vaskulitis), Nieren, Herz, Lunge und das Zentralnervensystem. Der SLE verläuft typischerweise in Schüben. Für die Diagnose des SLE werden von der ARA (American Rheumatism Association) mindestens vier von 11 Kriterien gefordert (Hochberg 1997 und Tan et al 1982).

Die Ätiopathogenese des SLE ist bisher nur partiell aufgeklärt. Es wird eine multifaktorielle Genese angenommen. Umweltfaktoren einschließlich Virusinfektionen (Rosen et al 1977) und anderer infektiöser Agentien, starke UV-Strahlung, Medikamente (Reidberg et al 1983, Hieronymus et al 2000) und

Chemikalien können bei einer entsprechenden genetischen Prädisposition (Vyse und Kotzin 1998) zu einer Störung der Immunregulation (Lorenz et al 2000 und 2001) führen. Es kommt zur Störung der T-Zell-Funktion und zur B-Zell-Aktivierung mit Bildung von Autoantikörpern mit Spezifität gegen verschiedene Zellanteile (Kalden et al 1991). Pathognomonisch sind anti-ds-DNS-Antikörper.

Auto-Antikörper bilden mit Zellantigenen Immunkomplexe. Diese lagern sich in unterschiedlichen Geweben ab, aufgrund einer gestörten Phagozytose (Herrmann et al 1998) kommt es im Weiteren zu einer Komplementaktivierung. Eine Leukozyteneinwanderung und Entzündungsreaktion führt zu einer Organschädigung. Im Krankheitsverlauf wird die Prognose häufig von den sekundären Organschäden bestimmt (Rapp et al 2002).

Die Therapie hängt von der Krankheitsaktivität, der Schwere der Symptome und der Organmanifestation ab. Glucocorticoide, Chloroquinderivate und Immunsuppressiva wie z.B. Azathioprin, Cyclophosphamid oder Methotrexat werden eingesetzt (Gescuk et al 2002).

1.2. Tiermodelle für den SLE

Es sind mehrere Mausstämme bekannt, die eine dem menschlichen Lupus ähnliche Erkrankung entwickeln. Zu diesen Stämmen gehört der NZB/NZW-Stamm und der MRL-Stamm. Der Unterschied zwischen dem MRL- und dem NZB/NZW -Stamm besteht im Wesentlichen in der Ausprägung klinischer Symptome. So entwickelt der NZB/NZW-Stamm eine klinisch der rheumatoiden Arthritis ähnlichere Erkrankung mit Destruktion von Gelenken, der MRL lpr/lpr-Stamm einen Befall des Zentralnervensystems (Mountz, Edwards 1992) und eine dem menschlichen Lupus ähnlichere Glomerulonephritis. Da insgesamt die Erkrankung des MRL lpr/lpr-Stammes mit dem menschlichen SLE vergleichbarer ist, wurden die Untersuchungen an diesem Stamm durchgeführt.

Innerhalb des MRL-Stammes gibt es zwei Substämme, den MRL lpr/lpr-Stamm und den MRL +/-Stamm, die sich durch das Vorliegen bzw. Fehlen eines Apoptose-Gendefektes unterscheiden. Durch den Apoptosegendefekt erkranken Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes bereits ab der ca. 12. Lebenswoche schwer, während Mäuse des MRL +/-Stammes erst ab der 40. Lebenswoche Symptome entwickeln. Es besteht eine Veränderung des Gens für das „Fas“-Oberflächenmolekül, das für die Regulation des programmierten Zelltodes verantwortlich ist (Watanabe-Fukunaga et al 1992, Singer et al 1994).

Im Verlauf der Erkrankung kommt es bei den Tieren zu einer massiven Lymphoproliferation. Milz und Lymphknoten erreichen ein Vielfaches des normalen Gewichtes. Es liegt eine Proteinurie vor, die histologisch ähnlich der humanen Lupusnephritis auf eine Immunkomplex-Glomerulonephritis zurückzuführen ist. Bei 30% der Tiere lässt sich ein Herzinfarkt nachweisen, bei über 50% eine akute Polyarteriitis und bei 20-25% eine Arthritis. Wie beim humanen SLE finden sich im Serum erhöhte IgG-Spiegel und Antikörper gegen ds -DNS und andere Zellkernbestandteile (Andrews et al 1978 und Mountz 1990).

Im Laufe der Erkrankung kommt es zur Zunahme einer charakteristischen Zellpopulation (Asensi et al 1989). Diese Zellen tragen auf ihrer Oberfläche das für B-Zellen und B-Zell-Vorläufer typische Antigen B220, das T-Zellen-Antigen Thy1.2, und in hoher Dichte das CD44-Antigen, das für die Migration der Lymphozyten notwendig ist (Mountz 1990, 1992 a + b). Die Oberflächenmoleküle, die von T-Helfer (CD4) und T-Suppressor- bzw. zytotoxischen T-Zellen (CD8) exprimiert werden, werden von dieser Zellpopulation nicht exprimiert.

1.3. Interaktion zwischen Nerven- und Immunsystem

Nerven- und Immunsystem sind bei der Reaktion eines Organismus auf Außenreize eng miteinander vernetzt. Neben infektiösen Einflüssen von außen, bei denen die Rolle des Immunsystems schon lange bekannt ist, spielt das Immunsystem auch bei der Reaktion auf physikalische oder psychologische Veränderungen der Lebensbedingungen eine wichtige Rolle. Diese Einflüsse werden als Stress zusammengefasst. Als Stress wird eine Umweltbedingung definiert, die entweder zu einer kurzfristigen Alarmreaktion oder bei längerer Einwirkung zu einer Adaptation führt (Selye 1936). Eine besondere Rolle in der Reaktion eines Organismus auf externe Stimuli, die zu Stress führen, kommt den Corticosteroiden zu. Das stressregulierende System, zu dem insbesondere hormon- oder neurotransmitterproduzierende Zellen des Hypothalamus, der Hypophyse und der Nebennieren gehören, ist permanent (tonisch) aktiv. Physischer oder emotionaler Stress, der einen bestimmten Schwellenwert übersteigt, führt zur weiteren Aktivierung des Systems. Diese Aktivierung kann sowohl Änderungen auf molekularer Ebene als auch Änderungen des Verhaltens bewirken (O'Connor et al 2000). Corticosteroide wirken über Beeinflussung von Zelloberflächenrezeptoren, es kommt dadurch u.a. zur Aktivierung bestimmter Gene über den Glucocorticoid-Rezeptor.

Für Corticosteroide sind zwei wichtige Zelloberflächenrezeptoren bekannt. Diese Corticoidrezeptoren werden von den meisten Zellen des Körpergewebes exprimiert. Der Typ 1-Rezeptor ist ein hochaffiner Rezeptor, der Mineralcorticoidrezeptor, der die stressunabhängigen tageszeitlichen Änderungen der Sekretion von Hormonen

der Nebennierenrinde regelt. Der Typ 2-Rezeptor ist ein niedrigaffiner Glucocorticoidrezeptor und regelt in Abhängigkeit von äußeren Störgrößen (Stress) den Serumspiegel der Glucocorticosteroide.

Glucocorticoide vermindern beim Menschen die Transkription der Gene für die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, TNF- α , und IFN- γ , während sie die Produktion der anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4 und IL-10 steigern (Webster et al 2002, Bamberger et al 1996). Die Suppression der Immunantwort wird durch Verminderung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. den „Nuclear Factor- κ B“ (NF- κ B) erreicht. NF- κ B ist von zentraler Bedeutung für die Expression von Zytokin-, Enzym-, und Adhäsions-Molekülen im Entzündungsprozess, es aktiviert die Transkription der DNS in mRNA an der Promotor-Region der entsprechenden Gene (Webster et al 2002, McKay und Cidlowski 1999).

Glucocorticoide können eine Lympholyse durch Apoptose oder Steroid-Rezeptor-regulierten Zelltod vermitteln, indem sie die Synthese von endogenen, nicht lysosomalen Endonucleasen bewirken. Ein weiterer Effekt ist die reduzierte Adhäsion von Entzündungszellen an Endothelzellen sowie die Reduktion der Bildung von Leukotrienen und Prostaglandinen aufgrund der Reduktion des Proteines Lipocortin (Peers, Flowers 1990).

Eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Nervensystem und Immunsystem kommt den Zytokinen IL-1 und IL-6 zu. Ein Feedback-Mechanismus zwischen IL-1 und Glucocorticoiden wurde erstmals von Besedovsky 1986 beschrieben. IL-1 führt in vivo zur erhöhten Corticosteronfreisetzung, während Glucocorticoide die Freisetzung und Wirkung von IL-1 hemmen. Die früheren Bezeichnungen für IL-1 lassen die vielfältigen Wirkungen dieses Proteins erkennen: Lymphozytenaktivierender Faktor, B-Zell-Differenzierungsfaktor, endogenes Pyrogen. Es gibt viele Hinweise, die als primären Wirkort des IL-1 in der Stressregulation das ZNS vermuten lassen. IL-1 und IL-1-Rezeptoren wurden in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten des Nervensystems gefunden, insbesondere in Hypothalamus, Brücke (Pons) und Medulla Oblongata (Sternberg

1997, Rothwell 1991). Korneva und Mitarbeiter konnten 2001 zeigen, dass IL-1- β bei CBA/C57BL6-Hybridmäusen nach Stress ansteigt. Als zelluläre Vermittler für die IL-1 Wirkung werden membranständige Sphingomyelinasen diskutiert (Mathias et al 1993).

IL-1 ist neben der zentralen Regulation des Immunsystems (Whitnall et al 1992, Perlstein et al 1991) auch in der peripheren Regulation der Immunreaktion beteiligt, IL-1 kann die ICAM-1 und VCAM-1 Expression in Endothelzellen induzieren (McHale et al 1999). Diese beiden Molekülgruppen sind für das „Homing“ der an der Immunreaktion bzw. Entzündungsreaktion beteiligten Zellen wichtig.

IL-6 ist an der Steuerung der Akute-Phase-Reaktion und der Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen sowie der Aktivierung von B-Zellen beteiligt. IL-6 erfüllt eine wichtige physiologische Bedeutung in der Abwehr von schädigenden exogenen Einflüssen. IL-6 gehört zur Gruppe der Zytokine, die Wachstum bzw. Differenzierung beeinflussen und wird in großer Menge von Makrophagen freigesetzt (Simpson et al 1997).

Entscheidende Regulatoren für die Stressreaktion sind das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und das Locus-Coeruleus-Norepinephrin (LC-NE, Noradrenalin). Es besteht ein Feedback-Mechanismus zwischen den Neuronen, die CRH und LC-NE produzieren. Diese Neurone befinden sich im Hypothalamus bzw. im Hirnstamm. Zytokine und Entzündungsmediatoren stimulieren die hypothalamische CRH-Freisetzung (Angeli et al 1999). CRH wiederum führt zu Freisetzung von hypophysärem ACTH, ACTH zur Freisetzung von Glucocorticoiden. Diese regulieren die Entzündungsreaktion u.a. durch Reduktion der weiteren Zytokinproduktion.

Bezüglich der zellulären Veränderungen nach Stress zeigt sich, dass akuter psychologischer Stress beim gesunden Menschen einen vorübergehenden Anstieg der Zahl der Lymphozyten im peripheren Blut bewirkt, wobei dieser Effekt am stärksten bei den natürlichen Killerzellen ist (Pawlak et al 1999). Dieser Effekt wird hauptsächlich durch das vegetative (autonome) Nervensystem über adrenerge Mechanismen reguliert. 1996 wurden von Geenen und Mitarbeitern sowie von Kuis

und Mitarbeitern Hinweise gefunden, dass sich die kardiovaskuläre, endokrine und immunologische Antwort auf Stress bei Patienten mit rheumatoider Arthritis von der gesunder Menschen unterscheidet. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden ebenso wie bei SLE-Patienten eine veränderte Rhythmik der Glucocorticoidfreisetzung gefunden (Neeck et al 1990 und Zietz et al 2000).

Für SLE-Patienten gibt es bezüglich der Einwirkung von Stress widersprüchliche Daten von Hinrichsen (1989 und 1992). Die Autoren untersuchten die Einwirkungen akuter Stressoren. Es gibt bisher keine Daten über die Auswirkung chronischen Stresses auf den Verlauf einer Autoimmunerkrankung in einer noch asymptomatischen Phase beim murinen Lupus-Modell.

1.4. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, inwieweit ein wiederholter, exogener Stimulus das bei Autoimmunkrankheiten gestörte Immunsystem beeinflussen kann. Als exogener Stimulus (=Stressor) wurde eine repetitive Wärmereizung gewählt. Die Wärmebehandlung erfolgte zu verschiedenen Krankheitsphasen, in der Phase vor Symptombeginn bei jungen Tieren und bei klinisch manifester Erkrankung bei älteren Tieren. Außerdem wurden die Untersuchungen bei Stämmen mit unterschiedlicher Ausprägung der Erkrankung durchgeführt (MRL lpr/lpr- und MRL +/-/-Stamm).

Es wurden Einwirkungen auf Lymphozyten in verschiedenen lymphatischen Organen, insbesondere auf die pathologischen B220+Thy1.2+ Zellen, und auf die Zytokine IL-1 und IL-6 untersucht. Die endokrine Stressantwort der HPA -Achse wurde durch Corticosteronmessung beurteilt. Als Maß für die Akute-Phase-Reaktion wurde SAA bestimmt. Die Krankheitsaktivität wurde durch Bestimmung der anti-DNS-Antikörpermenge im Serum untersucht.

2. Methoden

2.1. Versuchstiere

Es wurden 134 weibliche Mäuse untersucht. Davon waren 30 vom Stamm Balb/c (Zentrale Zuchtanstalt für Versuchstiere Hannover), 40 vom Stamm MRL +/- und 64 vom Stamm MRL /MpBom-lpr (beide: Bomholtgard Breeding and Research Center, Ry, Dänemark). Die Tiere wurden im Alter von 10, 20 und 40 Wochen untersucht. Die Untersuchungsgruppen sind in Tabelle 1 detailliert aufgelistet.

Die Unterbringung erfolgte im Tierstall des Physiologischen Institutes bei konstant 22 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit und einem Hell-Dunkel-Wechsel von ca. 12 zu 12 Stunden. Wasser, das täglich erneuert wurde, und handelsübliches Trockenfutter erhielten die Tiere ad libitum; sie wurden in Käfigen (40x25x20cm) zu Gruppen von je 5 Tieren gehalten.

Tabelle 1 : Stämme und Alter der untersuchten Tiere

Alter*	Balb/c	MRL lpr/lpr	MRL +/-
10 Wochen	30	41	20
20 Wochen	0	23	0
40 Wochen	0	0	20

* zum Zeitpunkt der Untersuchung

Sechs Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes verstarben im Alter von 20 Wochen und wurden nicht in die Auswertung einbezogen (jeweils 3 wärmeexponierte und 3 nicht wärmeexponierte Tiere).

2.2. Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

FACS-Zellsorter, Fa. Decton Dickinson, Kalifornien, USA

Zentrifuge J6B, Fa. Beckmann, München

Gamma-Counter MR 252, Fa. Kontron Instruments, München

Mono-Mixer REAX 2000, Fa. Heidolph, Gießen

Fotometer, Fa. Eppendorf, Hamburg

Stoppuhr, Fa. Elias, Heidelberg

Phosphate-buffered-saline (PBS-Puffer), Fa. BAG, Lich

FACScan-Polypropylenröhrchen (Falcon), Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg

Quecksilberthermometer, Fa. Kalensee, Gießen

Thermoreguliertes Wasserbad, Fa. GFL, München

Reagenzgefäße 50 ml, Fa. Greiner, Solingen

Polypropylen-Reagenzgefäße 1,5 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht

Neubauer-Zählkammer, Fa. Kalensee, Gießen

Mikroskop, Fa. Leitz, Wetzlar

Pipetten 1 µl, 5 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Fa. Eppendorf, Hamburg

Spitzen für Mikroliterpipetten in verschiedenen Größen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht

Auslaufpipette (10 und 50 ml), Fa. Sarstedt, Nümbrecht

1,8 ml-Reaktionsgefäße, Fa. Eppendorf, Hamburg

Türksche Lösung, Fa. Kalensee, Gießen

Trypanblau-Lösung, Fa. Kalensee, Gießen

Nykopräp-animal, Fa. Nykodenz, Dänemark

Hanks balanced salt solution (HBSS), Fa. Gibco, Paisley, Schottland

Petrischalen, Fa. Greiner, Solingen

Natriumazid-Lösung 0,1%, Fa. BAG, Lich

Corticosteron-RIA, Fa. IBL, Hamburg

Nembutal, Fa. Sanofi, Hannover

Corticosteron-Radioimmunoassay, Fa. IBL, Hamburg

IL-6 ELISA, Fa. Biomar Diagnostic Systems, Marburg

IL-1- α ELISA, Fa. Dianova, Hamburg

Anti-DNS-Ak ELISA, Fa. Dianova, Hamburg

SAA ELISA, Fa. Laboserv, Gießen

Erythrozyten-Lyse-Lösung, Fa. Immunotech S.A., Frankreich

Fixierlösung, Fa. Immunotech S.A., Frankreich

Spektrometer Titertek-Multiscan, Fa. Flow Laboratories, Großbritannien

Klimakammer, Eigenbau des Physiologischen Institutes mit Kühlgeräten der Firma

Karl Weiss-Klimatechnik, Gießen

PC-Steuerungseinheit, Typ 9000/300, Fa. Hewlett-Packard, Heidelberg

Consort 30-Software, Becton-Dickinson, San Jose, USA

SPSS 10.1-Software, Fa. SPSS , München

2.3. Thermische Exposition

Die Tiere wurden über Zeiträume von 3, 5, 8 und 20 Tagen wärmebelastet. Für die Dauer der Wärmeexposition wurden die Mäuse in ihren Käfigen in eine Klimakammer des Physiologischen Institutes gebracht und an jedem Expositionstag jeweils für 2 mal 3 Stunden bei einer elektronisch geregelten Temperatur von 36°C und einer 50%igen Luftfeuchtigkeit belastet. Aus diesem Belastungsschema ergab sich insgesamt eine Belastung der wärmeexponierten Tiere von 18, 30, 48 bzw. 120 Stunden. Auf diese absolute Dauer der Wärmereizung beziehen sich die Darstellungen im Ergebnisteil. Das Belastungsschema wurde in der ersten Versuchsreihe ermittelt. Kriterium für einen geeigneten Außenreiz, der eine Adaptation (Stressreaktion) der Tiere auslöst, war eine sichtbare Verhaltensänderung bzw. Stressreaktion der Tiere des in der ersten Versuchsreihe eingesetzten Balb/c-Stammes. Die Temperatur und die Belastungsdauer wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung, die die maximale Temperatur auf 36 °C begrenzte, solange gesteigert, bis die Tiere eine beobachtbare Stressreaktion im Sinn einer physischen Erschöpfung zeigten. Die Tiere legten sich, alle 4 Extremitäten ausstreckend, flach auf den Käfigboden und zeigten eine vermehrte Atmung.

Um einen Gewöhnungseffekt zu vermeiden, erfolgte die erste Exposition an jedem Tag zu variablen Zeiten zwischen 7 und 12 Uhr.

2.4. Präparation der Versuchstiere

Die Präparation erfolgte stets zwischen 15 und 17 Uhr, unmittelbar im Anschluss an eine Belastung einer thermisch exponierten Gruppe.

Nach intraperitonealer Injektion einer letalen Dosis (6-12 mg) Pentobarbital-Natrium wurde ein Wirkungseintritt abgewartet. In der Mehrzahl der Fälle traten nach 1-2 Minuten keine Abwehrreflexe auf Berührungs- bzw. Schmerzreize (mittels Kanülenspitze) auf. Falls eine Injektion nach 3 Minuten keine Wirkung zeigte, wurde eine zweite Injektion gesetzt. Danach wurden die Tiere fixiert und mittels

Herzpunktion (Einstich unterhalb des Sternum in einem Winkel von ca. 30°) eine mittlere Menge von ca. 1 ml Vollblut gewonnen, das nach 30 min abesert (Zentrifugation bei 300 g) und bei minus 18°C gelagert wurde.

Nach Abpräparation des Fells vom parietalen Peritoneum und seitlicher Fixierung, erfolgte die Eröffnung des Peritoneal- und Pleuraraumes in der Mitte des Oberbauches. Die Milz wurde entnommen, von Fett-, Binde- und Darmgewebe befreit, gewogen und in eine mit 8 ml HBSS gefüllte Petrischale (9 cm Durchmesser) überführt. Nach Durchtrennung der linken und rechten Rippen in Höhe der vorderen Axillarlinie konnte das Sternum hochgeklappt werden, so dass Lungen, Herz und Thymus frei zugänglich wurden. Die Präparation des Thymus gelang bei den älteren Tieren des MRL lpr/lpr- bzw. MRL +/- Stammes nur in seltenen Fällen, da meist eine Atrophie des Thymus vorlag.

Ebenso war die Präparation der Lymphknoten (meist axilläre, prätracheale und inguinale, seltener paraaortale Lymphknoten) beim MRL + Stamm nicht immer möglich, während beim Balb/c Stamm in keinem Fall eine ausreichende Menge an Lymphknoten gewonnen werden konnte. Thymus und Lymphknoten wurden ebenfalls in je eine mit 8 ml HBSS gefüllte Petrischale überführt.

2.5. Aufbereitung der lymphatischen Gewebe

Die lymphatischen Gewebe wurden mechanisch mittels Pinzette und Schere zerkleinert und in Suspension gebracht.

In den Vorversuchen sollte zunächst geklärt werden, ob eine Aufreinigung der Lymphozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation notwendig war. Zu diesem Zweck wurde eine Menge von 3 ml Nykopräp-animal-Flüssigkeit mit 6 ml Zellsuspension überschichtet und für 20 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der daraufhin gut sichtbare Lymphozytenring wurde mit einer Pipette abgenommen und mit HBSS in Suspension auf ein Gesamtvolumen von 8 ml gebracht. Die Zellsuspension wurde zwei mal wie folgt gewaschen: Zentrifugation bei 400 g für 5

Minuten, Dekantierung des Puffers und anschließende Wiederaufnahme der Zellen in 8 ml HBSS.

2.5.1. Bestimmung der Zellzahl

20 µl der Zellsuspension wurden in einem Eppendorf-Gefäß im Verhältnis 1:5 mit Türkscher Lösung gemischt. 10 µl dieser Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter 400-facher Vergrößerung unter einem Mikroskop ausgezählt. Alle 16 Felder jedes der vier Quadranten wurden ausgezählt und die Summe der Gesamtzellzahl durch vier dividiert, um das arithmetische Mittel eines Quadranten zu erhalten.

Die Zellzahl pro Milliliter ergab sich nach folgender Formel:

Zellzahl / ml = arithmetisches Mittel der Quadranten $\times 10^5 \times 5$ (Verdünnungsfaktor)

Um den Anteil an abgestorbenen Zellen zu ermitteln, wurde aus der selben Zellsuspension jeweils eine Zählung nach Anfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Da Trypanblau durch nicht mehr intakte Zellmembranen diffundiert, färbten sich nur avitale Zellen an. Der Anteil der abgestorbenen Zellen lag immer bei unter 2,5 Prozent.

2.5.2. Markierung mittels monoklonaler Antikörper

2.5.2.1. Antikörper

Es wurden folgende von der Ratte gewonnene und gegen Maus-Antigene gerichtete monoklonale Antikörper eingesetzt:

anti-Maus Pgp-1, FITC-markiert (CD44-FITC), Fa. Pharmingen (San Diego, USA)

anti-Maus Ly-2 (CD8a), PE-markiert (CD8-PE), Fa. Pharmingen

anti-Maus B220 (CD45R), PE-markiert (B220-PE), Fa. Pharmingen

anti-Maus L3T4, PE-markiert (CD4-PE), Fa. Becton-Dickinson (San Jose, USA)

anti-Maus Thy1.2 FITC-markiert (Thy1.2-FITC), Fa. Becton -Dickinson

Kontroll-IgG 2b,kappa, FITC-markiert (IgG 2b-FITC), Fa. Pharmingen

Kontroll-IgG 2a,kappa, PE-markiert (IgG 2a-PE), Fa. Pharmingen

Folgende Antikörperkombinationen wurden verwendet:

- 1.) IgG 2a-PE / IgG 2b-FITC (Kontroll-Ansatz)
- 2.) B220-PE / Thy 1.2-FITC
- 3.) CD44-FITC / CD4-PE / CD8-PE

2.5.2.2. Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Die Zelldichte der Suspensionen wurde mit HBSS auf 10^7 Zellen / ml eingestellt. Jeweils 100 μ l der Zellsuspension (10^6 Zellen) wurde in ein steriles 6 ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit 50 μ l PBS (pH = 7,4) gemischt.

Nach Zugabe von jeweils 5 μ l jeder Antikörperlösung zu der Zellsuspension wurde der Ansatz für 15 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Im Rahmen der Vorversuche wurde die erythrozytenreiche Suspension des Milzgewebes mit 1 ml Erythrozyten-Lyse-Lösung behandelt. In den späteren Versuchsreihen wurde die aus Milz, Thymus und Lymphknoten gewonnenen Zellsuspensionen mit 1 ml PBS gemischt und für 10 Minuten im Wasserbad bei 40°C inkubiert. Danach wurde zu allen Ansätzen 250 μ l Fixierlösung zugegeben und anschließend für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde 2 ml PBS-Natriumazid (0,1%) - Lösung zugegeben und erneut für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Zellsediment mit 0,4 ml PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis dunkel gelagert.

2.6. Durchflußzytometrie

Die Untersuchungen wurden mit dem Durchflußzytometer FACScan (Abbildung 1) der Firma Becton Dickinson (USA), das mit einer Steuerungseinheit der Fa. Hewlett-Packard (Typ 9000/300) verbunden ist, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Consort 30-Software (Becton-Dickinson).



Abbildung 1 : FACScan der Firma Becton-Dickinson

2.6.1. Prinzip

Die zu messenden Zellen werden durch eine Ansaugung der Zellsuspension in einem PBS-Mantelstrom (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung) an den Messdetektoren des Gerätes vorbeigeführt. Der eigentliche Messpunkt, den ein Laserlichtstrahl kreuzt, befindet sich in einer Messküvette.

Zuerst wird auf jede Zelle ein Laserstrahl (Wellenlänge 488 nm, Leistung des Lasers ca. 15 mW) abgegeben. Das von jeder Zelle ausgehende Streulicht wird in zwei verschiedene Anteile unterteilt und durch Detektoren erfasst: anhand des Vorwärtsstreulichts (forward scatter, FSC) ist eine Bestimmung der relativen Zellgröße möglich, anhand des seitlichen Streulichts (side scatter, SSC) eine Aussage zur Dichte und Granularität der Zelle. Aufgrund dieser Daten ist eine Unterscheidung zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten möglich. Jeder Zelltyp hat charakteristische Werte von Zellgröße und -granularität. Die Lymphozyten stellen sich, wenn die Werte der jeweiligen Zellen in einem x-y-Punktediagramm aufgetragen werden („dot-plot“), als räumlich einheitliche Zellwolke

dar (Abbildung 2). Durch Setzen eines elektronischen Fensters („gate“) können die Lymphozyten von anderen Zellen abgegrenzt und separat ausgewertet werden.

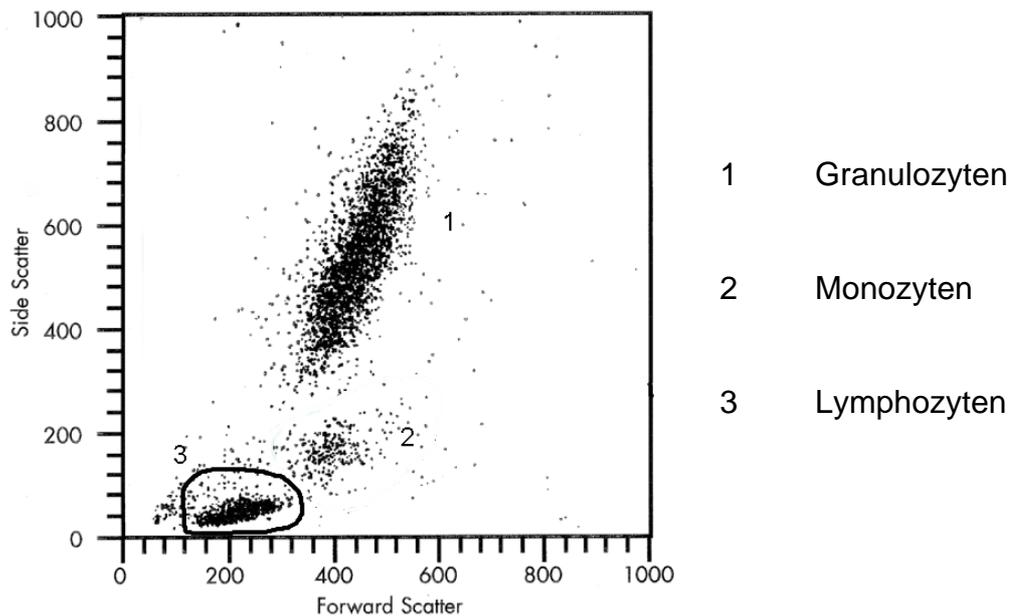


Abbildung 2 Abgrenzung der Lymphozyten anhand der typischen Vor- und Seitwärtsstreuung. Für die Auswertung der Fluoreszenz werden nur die Zellen berücksichtigt, deren Größe und Granularität innerhalb der mit dem „Analysegate“ festgelegten Grenzen liegt.

Der zweite Teil der Messapparatur besteht aus Detektoren für verschiedene Wellenlängen des Lichtes. Damit wird die Fluoreszenzlichtintensität für jeden Fluoreszenzfarbstoff getrennt ermittelt. Bei Anregung durch einen Laser mit 488 nm Wellenlänge besitzen die in dieser Untersuchung verwendeten Farbstoffe FITC (grün) und PE (rot) ein Emissionsmaximum bei 525 nm (FITC) bzw. 575 nm (PE).

Vor jeder Messreihe wurde eine Kalibrierung des Gerätes durchgeführt. Mit einer Kontrolllösung wurde die optimale Verstärkung („detector“) des Signals festgelegt. Danach wurde das Triggersignal („threshold“) ermittelt, um auf elektronischem Weg störende Signale (z.B. Zelltrümmer) herauszufiltern. Als letztes vor der eigentlichen

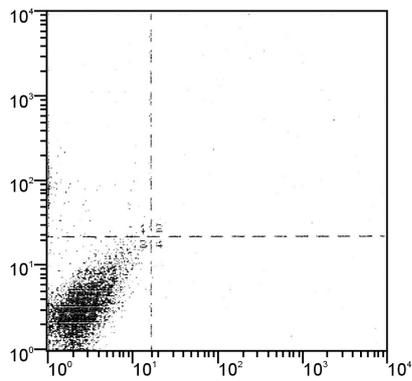
Messung wurde mittels der optimalen Kompensation („compensation“) die Überlappung der spektralen Emissionen reduziert. Es wurden jeweils 5000 Zellen pro Analyse erfasst. Die Flussrate lag zwischen 150 und 400 Zellen pro Sekunde.

2.6.2. Zellanalyse

Zu Beginn der Analysen wurden jeweils die Kontrollansätze gemessen.

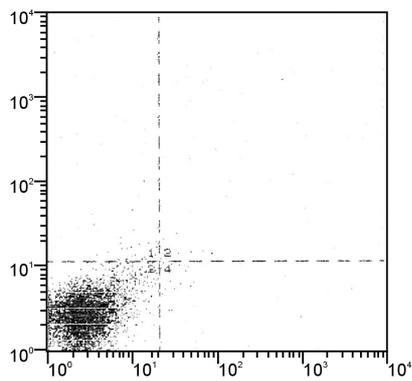
Über die Software wurden die Daten für Größe, Dichte und Fluoreszenzfarbstoffintensitäten für jede einzelne Zelle aufgenommen. Diese Werte wurden durch die verwendete Software in x-y-Diagrammen dargestellt. Die Größe/Dichte-Darstellung bietet die Möglichkeit, nur bestimmte Zellen für eine weitere Analyse auszuwählen. Alle Auswertungen wurden auf die im Lymphozytenfenster erfasste Zellpopulation bezogen.

Diese Population wurde in einem zweiten x-y-Diagramm mit ihren jeweiligen Werten für die beiden Fluoreszenzintensitäten dargestellt. Durch die Darstellung der zwei verschiedenen verwendeten Farbstoffe ließ sich unterscheiden, ob sich eine Zelle entweder mit keinem Antikörper, nur mit einem oder mit beiden Antikörpern markierte. Die prozentualen Anteile der jeweiligen markierten Zellpopulationen wurden ermittelt (Abbildung 3, 4 und 5). Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil an den Lymphozyten angegeben.



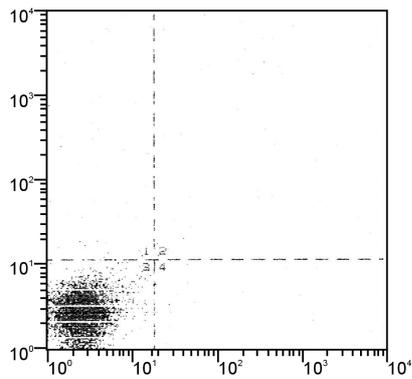
0,6	0,1
99,1	0,1

a Milzzellen



0,3	0,1
99,3	0,2

b Thymuszellen

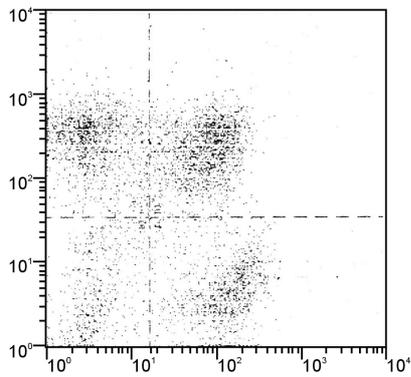


0,1	0,1
99,7	0,1

c Lymphknotenzellen

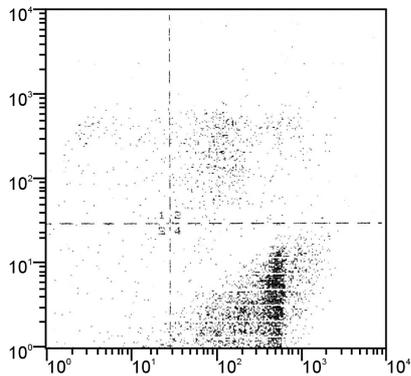
Abbildung 3

Markierung der Zellen einer MRL *Ipr/Ipr*-Maus mit Ig-Isotyp-Kontrollen. Die rechts dargestellten Zahlen geben die prozentualen Anteile an den Lymphozyten in den einzelnen Quadranten wieder.



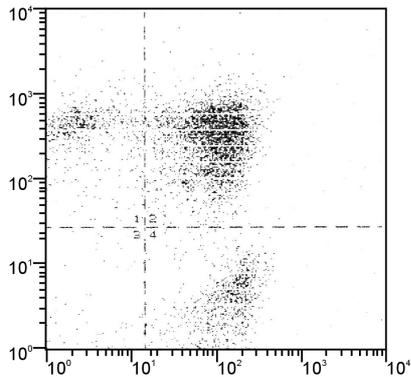
28,7	45,3
5,8	19,1

a Milzzellen



2,4	8,8
1,7	87,1

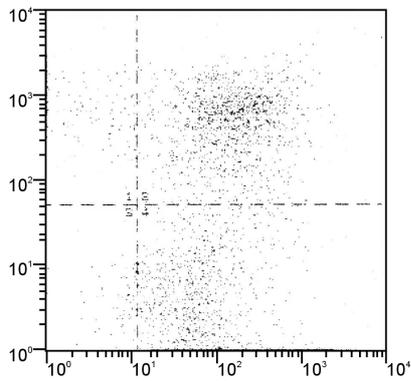
b Thymuszellen



12,3	76,8
0,7	9,8

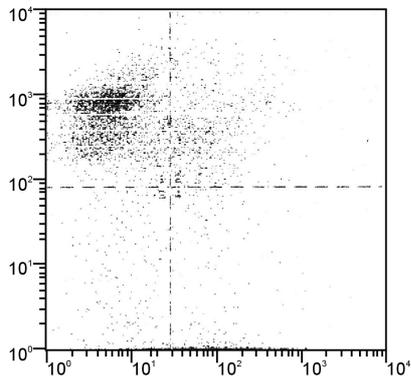
c Lymphknotenzellen

Abbildung 4
 Markierung der Zellen einer MRL lpr/lpr-Maus mit anti-B220-Antikörper (PE, Ordinate) und anti-Thy 1.2-Antikörpern (FITC, Abszisse). Die Zahlen geben die prozentualen Anteile an den Lymphozyten in den einzelnen Quadranten wieder.



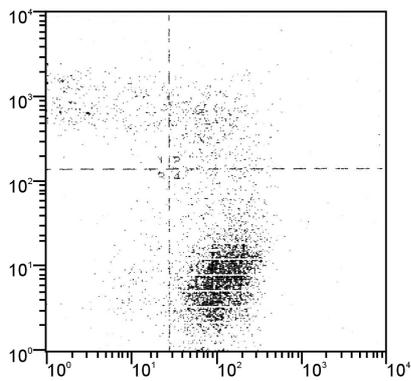
6,9	72,8
4,7	15,5

a Milzzellen



87,7	8,7
0,9	2,6

b Thymuszellen



3,1	6,1
0,7	90,0

c Lymphknotenzellen

Abbildung 5
 Markierung der Zellen einer MRL *Ipr/Ipr*-Maus mit anti-L3T4 und anti-Ly-2 (PE, Ordinate) und anti-CD44-Antikörpern (FITC, Abszisse). Die Zahlen geben die Prozentsätze der Lymphozyten in den einzelnen Quadranten wieder.

2.7. Serologische Untersuchungen

2.7.1. Corticosteron

Die Bestimmung des Corticosteron erfolgte mit einem kommerziellen Radioimmunoassay. Eine definierte Menge J^{125} - markierten Corticosterons wurde mit den Seren vermischt, anschließend eine definierte Menge anti-Corticosteron-Antikörper zugegeben. Nach Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur (22°C) wurden die entstandenen Komplexe mit Ammoniumsulfatlösung gefällt. Nach Zentrifugation wurden die Sedimente in einem gamma-counter gemessen und aus den ermittelten Werten die Corticosteron-Menge auf einer Kurve abgelesen, die über die mitgelieferten Standards ermittelt wurde. Die Sensitivität lag bei 15 ng/ml.

2.7.2. Andere Parameter

Die Bestimmung von IL-6, IL-1- α , SAA und anti-ds-DNS-Ak erfolgte jeweils mittels kommerzieller Enzyme-Linked-Immuno-Assay (ELISA). Das Serum wurde auf eine Mikrotiterplatte gegeben, die mit monoklonalen Antikörpern gegen murine Antigene beschichtet war. Nach Inkubation über 6 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen. Die freien Bindungen wurden mit 10%igem fetalem Kälberserum geblockt. Nach 2 weiteren Stunden Inkubation wurden Standards und Proben hinzugegeben und erneut für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der gegen das zu messende Antigen gerichtete Antikörper hinzugegeben, der an Peroxidase gekoppelt war. Nach der anschließenden Inkubation über 2 Stunden wurde das Substrat ortho-Phenylen-Diamin (OPD) hinzugefügt. Durch Zugabe von Schwefelsäure als Stoppreagenz veränderte sich die zuerst entstandene Blaufärbung der Lösung zu einer Gelbfärbung, deren Extinktion mit einem Spektrometer bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt wurde. Die Konzentrationen wurden jeweils mittels mitgeführter Standards bestimmt. Die Sensitivität lag bei den verwendeten Testkits wie folgt: IL-6 bei 20 pg/ml, anti-ds-DNS-Ak bei 1,0 IU/ml, SAA bei 0,233 μ g/ml und IL-1- α bei 15 pg/ml.

2.8. Statistische Auswertung

Zunächst wurden alle gemessenen Parameter mit dem Shapiro-Wilks-Test auf Normalverteilung geprüft. Da diese nicht gegeben war, wurden ausschließlich Rangtests als nicht parametrische Tests verwendet. Gruppenvergleiche für den Test auf gleiche Grundgesamtheit wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Korrelationen wurden mit dem Spearman-Rang-Korrelationstest untersucht. Alle Tests wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bei zweiseitiger Fragestellung durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Programm SPSS 10.1 (Fa. SPSS, München) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Reaktion der Tiere auf die Belastung

Die wärmeexponierten Tiere zeigten unter Belastung in der Klimakammer nach im Mittel 105 Minuten ein Sistieren der körperlichen Aktivitäten. Sie lagen auf dem Käfigboden und streckten alle vier Extremitäten von sich. Dieser Zustand war nur von gelegentlichen Aufstehen und Umherlaufen für ca. 2-5 Minuten unterbrochen. Dieses Verhalten mit reduzierter Bewegung war bei Tieren jeden Stammes und jeden Alters gleich.

3.2. Untersuchungen an Balb/c-Mäusen

3.2.1. Vorversuche

Im Rahmen der Vorversuche sollte geklärt werden, ob eine Anreicherung der Lymphozyten aus der Milzsuspension mittels Dichtegradientenzentrifugation erforderlich war. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, unterschieden sich die durch beide Verfahren gewonnenen Daten nicht wesentlich, die Unterschiede der Anteile der Lymphozytensubpopulationen lagen innerhalb der genannten Messungenauigkeit der Methode. In den nachfolgenden Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde daher auf eine Dichtegradientenzentrifugation verzichtet.

Tabelle 2: Einfluss der Dichtegradientenzentrifugation auf Lymphozytensubpopulationen

	ohne	mit	Differenz
	Dichtegradientenzentrifugation		
Thy1.2 +	21,31	21,61	0,30
B220 +	47,45	48,28	0,83
CD4/8 +	18,42	17,34	1,08
CD4/8 -	54,63	53,97	0,66
CD44 +	74,49	74,27	0,22

Werte in % der Lymphozyten

3.2.2. Corticosteron

Um die Wirkung verschiedener Expositionsschema auf die Corticosteron-Freisetzung zu untersuchen, wurden Tiere des Balb/c-Stammes steigenden Temperaturen und Belastungszeiten ausgesetzt. Begonnen wurde mit einer Exposition bei 28°C für die Dauer von 2 mal 1 Stunde pro Tag an sechs aufeinanderfolgenden Tagen. Eine weitere Gruppe wurde über 10 Tagen jeweils 2 x 2 Stunden bei 36°C wärmeexponiert. Eine dritte Gruppe von 10 Tieren wurde an 20 aufeinanderfolgenden Tagen über jeweils 2x3 Stunden, d.h. insgesamt über 120 Stunden, bei 36°C exponiert.

Tabelle 3: Corticosteronspiegel nach Wärmeexposition

Wärmebelastung	N	Mittelwert +/- SD	(Bereich)
Keine	10	327,5 +/- 201,4	(170 - 850)
12 Stunden	5	300,0 +/- 200,0	(100 - 620)
40 Stunden	5	276,0 +/- 116,3	(145 - 450)
120 Stunden	10	231,0 +/- 109,9	(60 - 430)

Werte in ng/ml

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Corticosteronspiegel der wärmeexponierten und der nicht exponierten Tiere ($p=0,241$ bei Vergleich der Kontrollgruppe mit der über 120 Stunden wärmeexponierten Gruppe).

3.2.3. IL-6

Nur bei einem Tier des Balb/c Stammes wurde ein IL-6-Wert (20 pg/ml) oberhalb der Nachweisgrenze (20 pg/ml) festgestellt. Dieses Tier stammte aus der über 20 Tage belasteten Gruppe.

3.3. Untersuchungen an MRL-Mäusen

3.3.1. Milzgewicht

Bei älteren Tieren nahm das Milzgewicht gegenüber jüngeren Tieren bei thermisch exponierten und nicht exponierten Tieren deutlich zu ($p < 0,001$). Dies war bei Tieren des MRL +/- Stammes und des MRL lpr/lpr-Stammes zu beobachten.

Bei Exposition der jungen Tiere des MRL +/- Stammes kam es zu keiner signifikanten Änderung des Milzgewichtes nach Wärmeexposition (Tabelle 4). Im Alter von 40 Wochen ließ sich eine Reduktion des Milzgewichtes nach thermischer Exposition finden.

Tabelle 4: Milzgewichte von Tieren des MRL +/- Stammes

Wärmebelastung	Alter 10 Wochen			Alter 40 Wochen		
	N	MW +- SD	(Bereich)	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	10	72 +- 16,2	(40 - 90)	10	220 +- 59,8	(140 - 370)
120 Stunden	10	66 +- 10,8	(50 - 90)	10	186 +- 60,2 *	(130 - 340)

Werte in mg, * $p < 0,05$ im Vergleich zur nicht exponierten Gruppe

Bei Untersuchung der 10 Wochen alten Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach thermischer Belastung:

Das Milzgewicht war bei den über 30 Stunden und 120 Stunden belasteten Gruppen reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 5). Auch im Vergleich zu der über 18 Stunden belasteten Gruppe ergab sich für die 120 Stunden belastete Gruppe ein signifikant verringertes Milzgewicht ($p=0,003$).

Tabelle 5: Reduzierte Milzgewichte junger Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes nach unterschiedlicher Expositionsdauer

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	189 +- 25	(140 - 230)
18 Stunden	8	208 +- 31	(180 - 280)
30 Stunden	4	153 +- 13 *	(140 - 170)
48 Stunden	8	176 +- 35	(130 - 220)
120 Stunden	8	155 +- 28 *	(110 - 190)

Werte in mg, * p < 0,05 im Vergleich zur nicht exponierten Gruppe

Bei Untersuchung der 20 Wochen alten Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Tabelle 6).

Tabelle 6: Milzgewichte älterer Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	8	615,0 +- 202,1	(240 - 840)
120 Stunden	9	693,3 +- 125,0	(490 - 1160)

Werte in mg

3.3.2. Lymphozytensubpopulationen

3.3.2.1. B220+Thy1.2+ Milzlymphozyten

Innerhalb der nicht belasteten Gruppe des MRL +/-Stammes stieg der Anteil der B220+Thy1.2+ Zellen mit dem Alter an (p=0,001). Dies ließ sich auch in der thermisch belasteten Gruppe beobachten (p=0,006). Diese Beobachtung ließ sich ebenfalls bei den Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes machen (p=0,001)

Es zeigte sich für die Tiere des MRL +/-Stammes im Alter von 10 Wochen eine Tendenz zur Erhöhung der B220+Thy1.2+ Zellen in der Milz in der thermisch

belasteten Gruppe ($p=0,075$). Diese Zunahme war bei Tieren im Alter von 40 Wochen signifikant (Tabelle 7).

Tabelle 7: B220+Thy1.2+ Zellen von MRL +/-Mäusen der Milz nach Wärmeexposition

Wärmebelastung	Alter 10 Wochen			Alter 40 Wochen		
	N	MW +- SD	(Bereich)	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	10	2,19 +- 0,61	(0,98 - 3,18)	10	3,89 +- 1,21	(2,64 - 6,04)
120 Stunden	10	3,05 +- 1,22	(1,08 - 5,02)	10	4,58 +- 0,80 *	(3,84 - 6,42)

Werte in % der Lymphozyten, * $p < 0,05$ im Vergleich zur nicht exponierten Gruppe

Bei Untersuchung junger und älterer MRL lpr/lpr-Mäuse ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den belasteten Gruppen (Tabelle 8 und 9).

Tabelle 8: B220+Thy1.2+ Milzzellen junger MRL lpr/lpr-Mäusen bei unterschiedlicher Belastungsdauer

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	15,63 +- 5,34	(8,42 – 29,80)
18 Stunden	8	16,51 +- 7,27	(9,08 – 32,10)
30 Stunden	4	16,09 +- 2,28	(13,06 – 18,58)
48 Stunden	8	18,49 +- 4,91	(10,98 – 25,78)
120 Stunden	8	18,14 +- 7,30	(11,82 – 34,72)

Werte in % der Lymphozyten

Tabelle 9: B220+Thy1.2+ Milzzellen älterer MRL lpr/lpr-Mäuse

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	8	38,23 +- 9,81	(19,00–48,72)
120 Stunden	9	43,18 +- 11,30	(32,02–61,12)

Werte in % der Lymphozyten

3.3.2.2. B220+Thy1.2- Milzlymphozyten

Bei Betrachtung des MRL +/--Stammes zeigte sich ein erhöhter Anteil dieser B - Zellen und B-Zellen-Vorläuferzellen mit dem Alter der Tiere: für die thermisch nicht exponierten Tiere mit $p=0,023$, für die exponierten Tiere mit $p=0,003$.

Für diese Zellgruppe zeigte sich bei den Tieren des MRL +/--Stammes nach thermischer Exposition kein signifikanter Unterschied zur nicht wärmeexponierten Gruppe.

Tabelle 10: B220+Thy1.2- Milzzellen bei Tieren des MRL +/--Stammes

Wärmebelastung	Alter 10 Wochen			Alter 40 Wochen		
	N	MW+-SD	(Bereich)	N	MW+-SD	(Bereich)
Keine	10	47,6 +- 6,5	(37,0 – 60,4)	10	55,5 +- 8,2	(47,1 – 69,1)
120 Stunden	10	45,8 +- 5,0	(38,1 – 52,3)	10	53,6 +- 5,9	(39,7 – 60,6)

Werte in % der Lymphozyten

Bei den 10 Wochen alten Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes ergab sich eine signifikante Reduktion bei der über 120 Stunden exponierten Gruppe im Vergleich zu der über 30 Stunden exponierten Gruppe (Tabelle 11). Es ließ sich eine Tendenz zur Reduktion dieser Zellpopulation nach 120 Stunden Exposition im Vergleich zur thermisch nicht exponierten Gruppe feststellen ($p=0,070$).

Tabelle 11: Reduktion der B220+Thy1.2- Milzzellen junger Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes nach thermischer Belastung

Wärmebelastung	N	MW+-SD	(Bereich)
Keine	13	38,6 +- 6,6	(27,0 – 48,6)
18 Stunden	8	35,3 +- 3,3	(32,1 – 41,3)
30 Stunden	4	39,0 +- 4,2	(35,4 – 44,7)
48 Stunden	8	38,0 +- 5,3	(31,7 – 46,8)
120 Stunden	8	33,9 +- 3,5 *	(27,6 – 38,6)

Werte in % der Lymphozyten, * $p < 0,05$ im Vergleich zur 30 Stunden belasteten Gruppe

Kein signifikanter Unterschied bestand bei Betrachtung der 20 Wochen alten Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes.

Tabelle 12: B220+Thy1.2- Milzzellen des älterer MRL lpr/lpr-Tiere

Wärmebelastung	N	MW+-SD	(Bereich)
Keine	8	16,3 +- 5,2	(11,1 – 26,2)
120 Stunden	9	14,9 +- 8,4	(5,2 – 28,1)

Werte in % der Lymphozyten

3.3.2.3. CD4/8-CD44+ Milzlymphozyten

Für die Tiere der nicht thermisch exponierten Gruppe ergab sich eine Erhöhung dieser CD4/8-CD44+ Zellen mit dem Alter ($p=0,014$), dies fand sich ebenfalls bei den thermisch exponierten Tieren ($p=0,001$).

Es ergab sich bei Betrachtung des MRL +/-Stammes für diese Zellpopulation kein signifikanter Unterschied zwischen den jüngeren, thermisch belasteten Tieren und den nicht exponierten Tieren. Eine Tendenz ($p=0,059$) zur Reduktion dieses Subsets fand sich bei den älteren exponierten Tieren im Vergleich zu den älteren, nicht exponierten Tieren.

Tabelle 13: CD4/8-CD44+ Milzlymphozyten bei Mäusen des MRL +/-Stammes

Wärmebelastung	Alter 10 Wochen			Alter 40 Wochen		
	N	MW+-SD	(Bereich)	N	MW+-SD	(Bereich)
Keine	10	57,5 +- 8,1	(45,0 – 67,7)	10	73,9 +- 6,3	(60,5 – 84,8)
120 Stunden	10	64,5 +- 8,6	(54,4 – 80,4)	10	69,4 +- 6,3	(56,9 – 80,1)

Werte in % der Lymphozyten

Bei Betrachtung der 10 Wochen alten Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes fand sich eine signifikante Reduktion der CD4/8-CD44+ Zellen bei den über 120 Stunden belasteten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 14).

Tabelle 14: CD4/8-CD44+ Milzlymphozyten junger Mäusen des MRL lpr/lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW+-SD	(Bereich)
Keine	13	72,0 +- 4,7	(64,0 – 82,7)
18 Stunden	8	71,4 +- 3,7	(68,1 – 76,7)
30 Stunden	4	72,4 +- 3,2	(69,5 – 76,2)
48 Stunden	8	70,4 +- 3,4	(65,7 – 75,6)
120 Stunden	8	68,6 +- 2,4 *	(65,9 – 73,9)

Werte in % der Lymphozyten, * p < 0,05 im Vergleich zur nicht exponierten Gruppe

Bei Untersuchung der 20 Wochen alten Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 15: CD4/8-CD44+ Milzlymphozyten ältere Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW+-SD	(Bereich)
Keine	8	78,3 +- 3,6	(74,6 – 84,4)
120 Stunden	9	78,3 +- 3,9	(72,4 – 85,3)

Werte in % der Lymphozyten

3.3.2.4. B220+Thy1.2+ Thymuslymphozyten

Bei Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes zeigte sich eine signifikante Erhöhung dieses Subsets bei den über 48 Stunden exponierten Tieren im Vergleich zu den nicht exponierten (Tabelle 16) und den 18 Stunden exponierten Tieren (p=0,009).

Tabelle 16: B220+Thy1.2+ Thymuslymphozyten junger Mäuse des MRL lpr/lpr-Stammes bei unterschiedlicher Belastungsdauer

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	2,1 +- 2,4	(0,1 – 9,6)
18 Stunden	8	1,5 +- 0,9	(0,5 – 3,3)
30 Stunden	4	2,2 +- 1,7	(1,0 – 4,6)
48 Stunden	8	5,1 +- 5,2 *	(1,1 – 17,3)
120 Stunden	8	4,4 +- 4,8	(0,7 – 15,0)

Werte in % der Lymphozyten, * p < 0,05 im Vergleich zur nicht exponierten Gruppe

3.3.2.5. CD4/8-CD44+ Thymuslymphozyten

Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes im Alter von 10 Wochen, die über unterschiedlich lange Zeiträume exponiert wurden, zeigten keine statistisch signifikant unterschiedlichen Ergebnisse.

Tabelle 17: CD4/8+CD44+ Thymuszellen junger Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes nach unterschiedlicher Belastungsdauer

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	2,7 +- 2,1	(0,8 – 8,5)
18 Stunden	8	2,4 +- 2,5	(0,4 – 7,8)
30 Stunden	4	3,0 +- 2,0	(1,4 – 5,7)
48 Stunden	8	5,5 +- 6,8	(1,0 – 21,6)
120 Stunden	8	4,6 +- 4,7	(1,3 – 15,6)

Werte in % der Lymphozyten

Bei Betrachtung der 20 Wochen alten Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes ergaben sich keine signifikante Differenz zwischen der nicht thermisch belasteten und der thermisch belasteten Gruppe.

Tabelle 18: CD4/8-CD44+ Thymuszellen älterer Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	8	17,9 +-8,7	(8,1 – 28,1)
120 Stunden	9	22,8 +- 8,3	(14,9 – 31,5)

Werte in % der Lymphozyten

3.3.2.6. B220+Thy1.2+ Lymphknotenlymphozyten

Bei den Tieren, die unterschiedlich lange exponiert wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der über 120 Stunden belasteten Gruppe und

den nicht exponierten Tieren bzw. den Tieren, die über 18 Stunden belastet wurden. Es fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der über 48 Stunden exponierten Gruppe und den nicht belasteten Tieren.

Tabelle 19: B220+Thy1.2+ Lymphknotenzellen junger Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes nach unterschiedlicher Belastungsdauer

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	53,5 +- 13,4	(32,7 – 77,1)
18 Stunden	8	57,2 +- 12,4	(44,3 – 76,1)
30 Stunden	4	46,1 +- 13,5	(32,7 – 61,2)
48 Stunden	8	61,6 +- 13,0	(42,6 – 76,8)
120 Stunden	8	55,8 +- 17,9	(28,8 – 78,6)

Werte in % der Lymphozyten

3.3.2.7. B220+Thy1.2- Lymphknotenlymphozyten

Bei Betrachtung der 10 Wochen alten Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes ließen sich bei den über 18 Stunden belasteten Tieren im Vergleich zu den thermisch unbelasteten Tieren signifikant niedrigere Anteile B220+Thy1.2- Zellen feststellen (Tabelle 20).

Tabelle 20: B220+Thy1.2- Lymphknotenzellen junger Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes nach unterschiedlicher Belastungsdauer

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	16,4 +- 5,3	(6,8 - 26,5)
18 Stunden	8	10,4 +- 2,9 *	(6,5 – 15,2)
30 Stunden	4	16,7 +- 4,0	(12,8 – 21,2)
48 Stunden	8	12,1 +- 5,5	(7,6 – 24,2)
120 Stunden	8	13,6 +- 4,0	(7,8 – 20,0)

Werte in % der Lymphozyten, * p < 0,05 im Vergleich zur nicht exponierten Gruppe

Bei Betrachtung der 20 Wochen alten Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der B220+Thy1.2- Zellen der Lymphknoten nach thermischer Exposition feststellen (Tabelle 21).

Tabelle 21: B220+Thy1.2- Lymphknotenzellen älterer Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	8	5,1 +- 2,3	(2,4 – 9,6)
120 Stunden	9	6,6 +- 8,0	(2,2 – 27,5)

Werte in % der Lymphozyten

3.3.2.8. CD4/8-CD44+ Lymphknotenlymphozyten

Bei Betrachtung der Tiere, die über unterschiedlich lange Zeiträume exponiert wurden, ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Tabelle 22: CD4/8-CD44+ Lymphknotenzellen junger Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes nach unterschiedlicher Belastungsdauer

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	50,7 +- 13,3	(26,7 – 69,0)
18 Stunden	8	46,9 +- 16,0	(23,5 – 74,5)
30 Stunden	4	43,7 +- 12,7	(30,9 – 57,0)
48 Stunden	8	59,2 +- 13,8	(40,1 – 76,1)
120 Stunden	8	54,2 +- 20,0	(23,7 – 78,9)

Werte in % der Lymphozyten

Bei den 20 Wochen alten Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 23: CD4/8-CD44+ Lymphknotenzellen älterer Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	8	83,9 +- 7,0	(67,4 – 88,9)
120 Stunden	9	83,5 +- 5,5	(71,1 – 88,3)

Werte in % der Lymphozyten

3.3.3. Serologische Werte

3.3.3.1. Corticosteron

Bei den Tieren der thermisch nicht exponierten Gruppe des MRL +/--Stammes ergab sich eine signifikante Erhöhung ($p=0,041$) des Corticosterons bei den 40 Wochen alten Tieren, verglichen mit den jungen Tieren. Ähnliche Veränderungen zeigten sich bei den thermisch exponierten Tieren (Erhöhung der Corticosteron-Spiegel mit $p=0,006$).

Bei den 10 Wochen alten Tieren des MRL +/--Stammes ergab sich eine Reduktion bei der thermisch exponierten Gruppe gegenüber den Tieren, die nicht exponiert wurden. Bei den 40 Wochen alten Tieren wurde kein so hohes Signifikanzniveau erreicht (Tabelle 24).

Tabelle 24: Abhängigkeit der Serum-Corticosteronspiegel von Alter und Wärmeexposition bei Tieren des MRL +/--Stammes

Wärmebelastung	Alter 10 Wochen			Alter 40 Wochen		
	N	MW +- SD	(Bereich)	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	10	311 +- 289	(60 – 1100)	10	403 +- 154	(150 – 680)
120 Stunden	10	120 +- 58 **	(70 – 220)	10	245 +- 102 *	(80 – 390)

Werte in ng/ml, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ im Vergleich zur nicht exponierten Gruppe

Der Corticosteron-Spiegel zeigte sich bei der Betrachtung der 10 Wochen alten MRL lpr/lpr-Mäusen bei den für 120 Stunden belasteten Tieren reduziert im Vergleich zu der nicht exponierten Gruppe. Eine Reduktion ergab sich ebenso bei der für 48 Stunden belasteten Gruppe im Vergleich zu den thermisch nicht exponierten Tieren (Tabelle 25). Ebenfalls signifikant war die Abnahme bei der 48 Stunden belasteten Gruppe im Vergleich zu der über 18 Stunden belasteten Gruppe ($p=0,001$).

Tabelle 25: Reduktion des Corticosteron junger Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes nach unterschiedlicher Belastungsdauer

Wärmebelastung	N	MW +- SD		(Bereich)
Keine	13	238 +- 137		(25 – 527)
18 Stunden	8	252 +- 125		(154 – 539)
30 Stunden	4	197 +- 214		(66 – 517)
48 Stunden	8	92 +- 53	**	(36 – 168)
120 Stunden	8	166 +- 86	*	(60 – 284)

Werte in ng/ml, * p < 0,05 ** p < 0,01 im Vergleich zur nicht exponierten Gruppe

Bei den 20 Wochen alten Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes zeigte sich keine signifikante Reduktion des Serum-Corticosteron nach thermischer Belastung.

Tabelle 26: Corticosteron älterer Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	8	264 +- 155	(70 – 580)
120 Stunden	9	181 +- 104	(50 – 400)

Werte in ng/ml

3.3.3.2. IL-6

Bei Vergleich innerhalb der thermisch unbelasteten Tiere fand sich ein höherer IL-6-Serumspiegel bei den älteren Tieren (p=0,049), bei den thermisch belasteten Tieren bestätigte sich diese Zunahme des Serum-IL-6-Spiegels mit dem Alter (p=0,034).

In der Gruppe der 10 Wochen alten Tieren fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei unterschiedlichem Expositionsschema (Tabelle 27).

Tabelle 27: IL-6-Serumspiegel junger Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	102,9 +- 271,4	(0 – 1000)
18 Stunden	8	63,8 +- 79,9	(0 – 188)
30 Stunden	4	40,5 +- 59,1	(0 – 128)
48 Stunden	8	174,6 +- 435,2	(0 – 1250)
120 Stunden	8	40,6 +- 85,2	(0 – 250)

Werte in pg/ml

Die IL-6-Spiegel unterschieden sich bei den 20 Wochen alten Tieren nicht bei Vergleich der thermisch exponierten Tiergruppe mit der unbelasteten Gruppe.

Tabelle 28: IL-6-Serumspiegel älterer Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	8	384,1 +- 582,3	(24,0- 1750)
120 Stunden	9	52,8 +- 41,1	(12,0- 125,0)

Werte in pg/ml

3.3.3.3. anti-ds-DNS-Antikörper

Bei älteren Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes fand sich innerhalb der nicht wärmeexponierten Tiere im Vergleich zu den jungen Tieren ein signifikant höherer Spiegel an anti-ds-DNS-Ak im Serum ($p=0,012$). Diese Erhöhung mit dem Alter fand sich ebenfalls innerhalb der thermisch belasteten Gruppen ($p=0,001$).

Die Menge an anti-ds-DNS-Antikörpern veränderten sich nicht infolge der Wärmebelastung.

Tabelle 29: Anti-ds-DNS-Antikörper-Spiegel junger Tieren des MRL lpr-lpr-Stammes nach unterschiedlicher Wärmebelastung

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	9,5 +- 25,4	(0 – 92,0)
18 Stunden	8	1,4 +- 2,5	(0 – 7,0)
30 Stunden	4	1,0 +- 2,0	(0 – 4,0)
48 Stunden	8	1,0 +- 1,3	(0 – 4,0)
120 Stunden	8	0,1 +- 0,4	(0 – 1,0)

Werte in IU/ml

Bei Betrachtung der älteren Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 30: Anti-ds-DNS-Antikörper-Spiegel älterer Tiere des MRL lpr-lpr-Stammes

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	8	42,9 +- 66,3	(2,5 – 185,0)
120 Stunden	9	58,4 +- 71,5	(3,5 – 189,0)

Werte in IU/ml

3.3.3.4. Serum-Amyloid-A

Der SAA-Spiegel war bei den 48 Stunden belasteten Tieren höher als bei den thermisch nicht exponierten Tieren (Tabelle 31).

Tabelle 31: SAA-Spiegel junger MRL lpr/lpr-Mäuse nach unterschiedlicher Belastungsdauer

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	13	36,6 +- 16,6	(13 – 72)
18 Stunden	8	37,5 +- 17,0	(16 – 58)
30 Stunden	4	37,5 +- 11,6	(28 – 54)
48 Stunden	8	67,9 +- 32,8 *	(31 – 132)
120 Stunden	8	45,1 +- 11,6	(28 – 67)

Werte in µg/ml

Eine Korrelation zwischen SAA und IL-6 bestand nicht (Spearman-rho: -0,166).

Bei den älteren Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 32: Unveränderter SAA-Spiegel älterer Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes nach Exposition

Wärmebelastung	N	MW +- SD	(Bereich)
Keine	9	61,8 +- 59,8	(30,0 – 206,0)
120 Stunden	8	40,7 +- 14,6	(27,0 – 65,0)

Werte in µg/ml

3.3.3.5. IL-1-α

IL-1-α ließ sich nur bei wenigen Tieren nachweisen (>15 pg/ml). Es wurde daher keine statistische Auswertung vorgenommen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung sollte der Frage nachgegangen werden, ob chronische Wärmebelastung ein gestörtes Immunsystem in verschiedenen Phasen einer Autoimmunkrankheit modulieren kann.

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Altersbedingt war bei den Tieren beider Stämme eine Zunahme des Milzgewichtes und eine Erhöhung des Anteils an B220+Thy1.2+ Zellen zu beobachten. Bei den Tieren des MRL +/- Stammes fand sich eine Erhöhung des Serum-Corticosterons mit dem Alter. Der Serum -IL-6-Spiegel zeigte beim MRL lpr/lpr-Stamm eine altersabhängige Zunahme.

Nach thermischer Exposition fand sich eine Reduktion des Milzgewichtes bei den Tieren des MRL +/- Stammes im Alter von 40 Wochen und den Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes im Alter von 10 Wochen sowie eine Erhöhung des Anteils des B220+Thy1.2+ Zellsubsets in der Milz bei den älteren Tieren des MRL +/- Stammes und im Thymus der jungen Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes. Eine Reduktion der B-Zellen und der B-Zell-Vorläuferzellen fand sich nach thermischer Belastung bei den über 120 Stunden belasteten jungen Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes in den Lymphknoten und eine Tendenz dazu in der Milz. In der Milz von jungen MRL lpr/lpr-Mäusen konnte nach thermischer Exposition ebenfalls eine Reduktion von CD4/8-CD44+ Zellen gefunden werden. Bezüglich des Serum-Corticosterons zeigte sich, außer bei MRL lpr/lpr-Tieren in der Spätphase der Erkrankung, eine Reduktion nach thermischer Belastung. Eine Erhöhung des SAA wurde bei den über 30 Stunden belasteten Tieren beobachtet, während dieser Effekt bei den über 120 Stunden belasteten Tieren nicht mehr nachweisbar war.

4.2. Methodik

Der SLE ist der Prototyp einer Autoimmunkrankheit, so dass er für die vorliegende Studie ausgewählt wurde. Da auch Aussagen über die Wirkung von repetitiver Wärmereizung in der Phase vor Ausbruch der Erkrankung getroffen werden sollten, kam eine Untersuchung an Menschen nicht in Betracht. Es ist kein Test verfügbar, der eine Früherkennung von Individuen erlaubt, die später zu einem bestimmten Zeitpunkt einen SLE entwickeln. Ein gut charakterisiertes Tiermodell für den humanen SLE ist der murine Lupus. Von den verschiedenen Stämmen entwickeln MRL lpr/lpr- und MRL +/-Stämme eine mit dem humanen SLE gut vergleichbare Erkrankung (Andrews et al 1978, Theofilopoulos et al 1985, Mountz 1990, 1992 und Watanabe-Fukunaga et al 1992) mit ähnlicher klinischer Symptomatik. Wegen der bevorzugten Erkrankung weiblicher Tiere und den vorliegenden Hinweisen für eine wichtige Rolle weiblicher Hormone in der Pathogenese (Carlsten et al 1992 und 1993) wurden in dieser Arbeit ausschließlich weibliche Tiere untersucht. Zur Untersuchung verschiedener Krankheitsphasen wurden Tiere in einer noch asymptomatischen Phase, einem frühen Erkrankungsalter und einem späteren Erkrankungsalter untersucht. Der natürlichen Lebensspanne der MRL lpr/lpr-Tiere von 5 Monaten entsprechend, verstarben einige Tiere dieses Stammes bereits in einem Alter von 18-20 Wochen.

Die Mäuse wurden in Gruppen zu 5 Tieren in einem Käfig gehalten, da diese Gruppengröße zuließ, die Untersuchungen an einem Tag ohne zu große tageszeitliche Schwankungen durchzuführen. Dies war wichtig, da bekannt ist, dass der MRL lpr/lpr-Stamm einen gestörten zirkadianen Corticosteronrhythmus aufweist (Lechner et al 2000). Die tageszeitliche Verschiebung der Corticosteronproduktion wurde durch die Begrenzung des Untersuchungszeitraums so weit wie möglich minimiert. Vor Beginn der Versuchsreihen wurden die Tiere zur Gewöhnung an den Untersucher und die Umgebung über einen Zeitraum von 2 Wochen im Versuchsstall gehalten.

Es wurde ein Belastungsschema mit unterschiedlicher Dauer des exogenen Stimulus angewendet, um die Auswirkungen von kurz- und längerfristigen Belastungen zu

beurteilen. Yin und Mitarbeiter (2000) beschrieben, dass es schon nach zwei Tagen physischen Stresses zu einer Veränderung der Milzzellzahl kommen kann. Die Tiere wurden in den vorliegenden Untersuchungen über Gesamtzeiträume von 18, 30, 48 und 120 Stunden belastet.

Die Zellanalysen erfolgten mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Diese Methode ist im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie weniger zeitaufwendig und von der subjektiven Beurteilung des Untersuchers unabhängig. Durch Immunfluoreszenzfarbstoffe doppelmarkierte Zellen sind mit dem Auge schwer zu erkennen und zu differenzieren. Aufgrund des größeren Zeitaufwandes ist in der Fluoreszenzmikroskopie oft nur eine Untersuchung von 100 Zellen pro Probe möglich, während durchflusszytometrisch wesentlich höhere Zellzahlen, z.B. 5000 Zellen, untersucht werden können. Parks und Mitarbeiter (1984) haben errechnet, dass eine Zahl von 5000 Zellen pro Messung ausreicht, um sicher über Unterschiede in zwei Populationen von je 50% bis zu einer Größe von 1,97% der Gesamtstichprobe eine Aussage machen zu können. Bei einer Größe von 5% der Gesamtstichprobe sind Unterschiede von 0,39% statistisch signifikant darstellbar. Bei der Aufbereitung der Zellsuspensionen wurde auf einen Einsatz von Lyse-Reagenz zur Beseitigung der Erythrozyten verzichtet, da der Anteil in den Lymphknoten und dem Thymus relativ klein war. Bezüglich der Milzzellen wurde in Vorversuchen ein Vergleich zwischen mit Lyse-Reagenz behandelten Suspensionen und unlysierten Suspensionen durchgeführt. Hier ergab sich jedoch kein außerhalb der methodischen Messungengenauigkeit liegender Unterschied, so dass auf eine Lyse der Erythrozyten anschließend verzichtet wurde. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper und Enzym- bzw. Radioimmunoassays wurden kommerziell erworben. Um fertigungsbedingte Schwankungen gering zu halten, wurde darauf geachtet, dass diese Immunoassays möglichst aus der gleichen Produktionscharge stammten.

Zur statistischen Analyse ist die Anwendung von parametrischen und nichtparametrischen Tests möglich. Parametrische Tests haben eine bessere Trennschärfe als nichtparametrische Tests. Voraussetzung für die Anwendung von parametrischen Tests ist allerdings eine Normalverteilung des Parameters. Die

statistische Auswertung wurde mittels eines Rangtests durchgeführt, da eine Normalverteilung nicht in allen Stichproben gegeben war.

4.3. Ergebnisse

In Übereinstimmung mit der von Schmidt (1987) an Ratten beobachteten Reduktion von Milz-, Thymus-, und Lymphknotengewicht nach Exposition bei 40°C wurde in den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls eine Reduktion des Milzgewichtes nach Exposition bei einer niedrigeren Temperatur beobachtet. Schmidt zeigte 1987, dass die Reduktion des Feuchtgewichtes der Milz einer verminderten Zahl an Zellen in der Milz entspricht. Jandali (1984) stellte bei Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 40°C bei Ratten eine Reduktion des Milzgewichtes fest. Die histologischen Auswirkungen einer lang dauernden oder wiederholten Hyperthermie auf immunologische Organe sind schon lange bekannt (Hale et al 1959), es kommt zu einer Verkleinerung und Verringerung von Keimzentren und Follikeln und Entwicklung einer Fibrose. Diese Beobachtungen weisen auf eine Reduktion des lymphatischen Gewebes unter Wärmestress hin. Diese Reduktion des lymphatischen Gewebes ist nicht nur auf eine reine Wärmewirkung zurückzuführen, da auch bei anderen Formen von Stress eine Reduktion des Milzgewichtes beobachtet wurde. Yin und Mitarbeiter (2000) beschrieben eine Reduktion der Zahl der Milzzellen bei Mäusen nach Immobilisationsstress. Chao und Mitarbeiter (1992) zeigten, dass Bewegungsstress wie Schwimmen zu einer Reduktion des Milzgewichtes bei Balb/c-Mäusen führt. Korneva und Mitarbeiter (2001) berichteten, dass nach Kältestress und nachfolgendem Immobilisationsstress das Milzgewicht bei Mäusen reduziert ist. Es ist zu diskutieren, dass die Reduktion des Milzgewebes durch eine Umverteilung der lymphatischen Zellen in andere Gewebe, vermindertes „Homing“ der Lymphozyten in die Milz oder durch Reduktion des gesamten lymphatischen Gewebes verursacht wurde. Die beobachtete Reduktion des Milzgewichtes und die Beobachtungen anderer Autoren sprechen insgesamt für eine generelle Reduktion des lymphatischen Gewebes nach thermischer Exposition.

Neben den quantitativen Veränderungen am Immunsystem nach Wärmebelastung wurden auch Veränderungen an der Funktion der immunkompetenten Zellen

beobachtet: Neben Schmidt (1987) beschreiben Huang, Haegerstrand und Frostegard (1995), dass eine kurzfristige in vitro-Hyperthermie bei peripheren mononukleären Blutzellen eine gesteigerte Immunantwort auf IL-1, IL-2 und auf Antigene hervorruft. In vivo-Untersuchungen von Downing und Mitarbeitern (1987) zeigten eine gesteigerte IFN- γ Produktion peripherer Lymphozyten nach Hyperthermie. Weitere in vitro-Untersuchungen an Lymphozyten von Mäusen belegen, dass eine milde Hyperthermie zu einer gesteigerten Immunantwort führen kann (Bühning et al 1985).

Bei Betrachtung der einzelnen Zellsubpopulationen war der Anteil an B220+Thy1.2+ Zellen in der Milz von MRL +/-Mäusen bei den 40 Wochen alten Tieren nach thermischer Belastung erhöht, und in der noch asymptomatischen Phase der Erkrankung im Alter von 10 Wochen tendenziell erhöht. Bei den Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes zeigte sich in der Milz weder in der frühen noch in der späten Krankheitsphase eine signifikante Änderung dieser Lymphozytensubpopulation, allerdings war der Anteil der B220+Thy1.2+ Zellen im Thymus bei den 10 Wochen alten Tieren nach Wärmeexposition erhöht. Dieser Effekt war jedoch nur bei den über 48 Stunden belasteten Tieren nachweisbar, während bei den über 120 Stunden belastenden Tieren keine signifikante Veränderung zu beobachten war. Zu diskutieren sind kurzfristige Adaptationsvorgänge, die eine Erhöhung dieses Zellanteils bewirken. Bei Umverteilungsvorgängen würde man z.B. eine Reduktion dieses Zellanteils in der Milz oder in den Lymphknoten erwarten. Dies wurde nicht beobachtet. Bei den Tieren des MRL +/-Stammes stieg der Anteil dieser Zellen in der Milz an, was ebenfalls als ein Zeichen einer gesteigerten Neubildung interpretiert werden kann.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine nach Wärmebelastung verminderte B-Zell-Reifung bzw. B-Zell-Proliferation hin. Es wurde eine tendenzielle Reduktion des Anteils der B220+ Zellen in der Milz gefunden, im Lymphknoten war eine signifikante Reduktion dieser Subpopulation nach Wärmeexposition zu beobachten. Diese Reduktion des Anteils an B-Zellen kann aus einer relativen Reduktion dieser Population durch Anstieg des Anteils an pathologischen Zellen entstehen, da die absoluten Zellzahlen hier nicht bestimmt wurden. Allerdings konnte kein dazu

passender signifikanter Anstieg der pathologischen Zellen in den entsprechenden Gruppen gefunden werden, so dass diese Erklärung unwahrscheinlich ist.

In der Literatur gibt es mehrere Hinweise dafür, dass bei Wärmestress die B-Zell-Funktion gestört ist: Greeley und Mitarbeiter (1992) haben gezeigt, dass eine Hyperthermie von über 40°C über 4 Stunden bei Mäusen eine Suppression der B-Zell-Funktion zur Folge hat. Franci und Mitarbeiter (1996) haben bei Kaninchen beobachtet, dass nach Wärmestress die B-Zell-Differenzierung und die Fähigkeit zur Proliferation mononukleärer Zellen gestört ist. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen berichten Hinrichsen und Mitarbeiter (1989) über einen Anstieg von B-Lymphozyten des peripheren Blutes nach kurzdauernder akustischer Belastung gesunder Probanden und SLE-Patienten. Diese Diskrepanz könnte durch unterschiedliche Methoden erklärt werden. Zum einen wurde von Hinrichsen akuter, kurzdauernder Stress untersucht, andererseits wurde peripheres Blut untersucht.

Im Gegensatz zu der beobachteten Erhöhung des Anteils an B220+Thy1.2+ Zellen fand sich bei Betrachtung der zweiten Antikörperkombination nach Wärmebelastung eine Reduktion der CD4/8-CD44+ -Zellen in der Milz der jungen MRL lpr/lpr -Tiere. Diese Zellpopulation ist in der B220+Thy1.2+ Subpopulation enthalten. Allerdings lag die Reduktion des Anteils dieser Zellen an der Grenze der Messgenauigkeit der Methode (3,4% Unterschied bei einem Anteil von 72,0 bzw. 68,6%), so dass diese gegensätzliche Beobachtung hier weniger valide ist, als die Betrachtung des B220+Thy1.2+ Zellsubsets. In der Literatur gibt es keine vergleichbare Untersuchung zu diesem CD4/8-CD44+ Zellsubset nach thermischer Belastung.

Bei älteren MRL lpr/lpr-Mäusen fanden sich nach thermischer Belastung keine signifikanten Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung der untersuchten lymphatischen Organe.

Die eigenen Ergebnisse zeigen am murinen Modell des SLE, dass ein Immunsystem durch chronische Wärmereizung in der Phase vor der Manifestation einer Autoimmunerkrankung in seiner zellulären Zusammensetzung verändert werden kann. Ein pathologisches Zellsubset, B220+Thy1.2+, wie das in den vorliegenden

Versuchen beschriebene, gibt es beim humanen SLE nicht. Die bisher vorliegenden Untersuchungen beim Menschen beschränken sich auf die auch bei Gesunden vorhandenen Zellpopulationen. Es zeigt sich beim Menschen eine verminderte Modulierbarkeit einzelner Zellkompartimente eines bereits erkrankten Immunsystems. Jacobs und Mitarbeiter (2001) beobachteten, dass SLE-Patienten und Gesunde unterschiedlich auf Stress reagieren. Die Aktivität der Natürlichen Killer(NK)-Zellen stieg nur bei Gesunden signifikant an. Außerdem fand diese Gruppe Hinweise für eine gesteigerte IL-6-Produktion bei SLE-Patienten nach psychologischem Stress. Bei den am besten belegten zellulären Veränderungen beim Menschen nach akutem Stress, dem Anstieg des Anteils an NK-Zellen im peripheren Blut, gibt es Hinweise auf eine Vermittlung durch Katecholamine über β_2 -adrenerge Mechanismen (Schedlowski et al 1996). Schmid-Ott (1998) berichtete über einen Anstieg der CD8+ T-Lymphozyten, des Noradrenalins und Cortisols nach akutem psychologischem Stress bei Gesunden und Psoriasis-Patienten. Diese beispielhaft genannten Untersuchungen am Menschen beziehen sich jeweils nur auf akuten, kurzfristigen Stress. Eine vergleichende Untersuchung von Lymphozytenpopulationen zu chronischem oder wiederholtem Stress unter Einbeziehung nicht nur des peripheren Blutes liegt bisher nicht vor.

In Übereinstimmung mit den eigenen an Mäusestämmen gefundenen reduzierten Corticosteron-Spiegeln nach Wärmebelastung beobachtete Cozzi und Mitarbeiter (1995) beim Menschen eine Dysregulation der HPA-Achse beim Gesunden mit reduzierten Corticosteron-Serumspiegel nach Wärmebädern. Die bisherigen Konzepte der Stressreaktion lassen ein Ansteigen des Corticosterons nach Wärmestress erwarten. Ein grundsätzliches methodisches Problem der meisten Untersuchungen zu chronischem Stress liegt darin begründet, dass oft ein akuter Stressor eingesetzt wird, der wiederholt angewendet wird. Dabei kann es zu einer Adaptation an den Stressor kommen. Für verschiedene über einen längeren Zeitraum applizierte Stressformen wurde eine Adaptation der HPA-Regulation beschrieben (Spencer und McEwen 1990, Hashimoto et al 1988). Nach einer Woche erreichten die anfangs gestiegenen Corticosteronspiegel die Ausgangswerte. Für Kältestress wurde eine Reduktion des Corticosterons unter den Ausgangswert nach acht Wochen beschrieben (Daniels-Severs et al 1973). In der vorliegenden

Untersuchung zeigt sich nach thermischer Exposition über 18 Stunden (entsprechend 3 Tagen à 6 Stunden) ein Anstieg, der allerdings statistisch nicht signifikant ist. Obwohl die Tiere, die thermisch nicht belastet wurden, auch jeden Tag durch den Untersucher durch Anwesenheit und Manipulation „gestresst“ wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die höhere Umgebungstemperatur günstiger für die untersuchten Stämme war, und die Umgebungstemperatur von 22°C chronischen Stress für die Tiere bedeutete. Das wiederum würde bedeuten, dass es aber nicht zu einer Adaptation der HPA-Achse gekommen sein kann, da die Tiere am Ende der 20 Tage dauernden Versuchsreihe weiterhin erhöhte Corticosteronwerte im Vergleich zu den ebenfalls gestressten Tieren der thermisch exponierten Gruppen aufwiesen. Eine andere in der Methode begründete Ursache kann diskutiert werden: Die Tiere der Kontrollgruppe könnten bei der Tötung am Ende der Versuchsreihe einen anderen Stress erfahren haben, als in den Wochen zuvor, da bei der Tötung die einzelnen Tiere nicht, wie bei dem Umsetzen der Tiere in ein anderen frischen Käfig im Rahmen der Pflege, wieder zu ihren Artgenossen zurückgesetzt wurden. Diese Veränderung könnte mit einem stärkeren Anstieg des Corticosterons im Vergleich zu den durch die thermische Exposition stärker gestressten und daher besser adaptierten Tiere einhergehen. Als weitere mögliche Erklärung wäre eine veränderte Reaktion dieses Stammes auf Stress denkbar. Es gibt Hinweise für eine Störung der HPA-Achse bei Autoimmunerkrankungen (Webster et al 2002, Wilder RL 1995). Eine Dysregulation der HPA-Achse mit verminderter Corticosteron-Freisetzung nach Stimulation der HPA-Achse zeigten Lechner und Mitarbeiter (1996). Beim MRL lpr/lpr-Stamm kam es zu einem verminderten Anstieg des Corticosterons nach Verabreichung von rekombinantem IL-1. Im Gegensatz hierzu fanden Hinrichsen und Mitarbeiter (1992) bei Patienten mit SLE einen unveränderten Cortisolspiegel nach kurzdauerndem psychischen Stress. Allerdings blieb bei dieser Untersuchung offen, inwieweit methodische Einflüsse eine Rolle spielten, da zirkadiane Schwankungen des Cortisols nicht berücksichtigt wurden.

Der Corticosteronspiegel stieg nach thermischer Belastung der Tiere des MRL lpr/lpr-Stammes in der späten Krankheitsphase nicht an. Dies weist auf eine schwere Beeinflussbarkeit des HPA-Regelkreises in der späten Phase der Erkrankung hin.

Im Vergleich zu den Literaturangaben wurden in den vorliegenden Untersuchungen höhere Corticosteronwerte für die Tiere unter Kontrollbedingungen gemessen. Andere Autoren verwendeten jedoch z.T. andere Methoden. So wurde bei Shanks und Mitarbeitern (1999) der Plasma-Corticosteronspiegel bestimmt, und dem Plasma wurde ein Zitratpuffer zugegeben. Abweichungen könnten auch darin begründet sein, dass die Tiere aus einer anderen Zuchtanstalt stammten. Es könnte eine Schwankungsbreite innerhalb der Zuchtstämme bestehen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich entsprechend den Literaturangaben kein signifikanter Unterschied zwischen den Corticosteronwerten der Kontrollgruppen der beiden MRL-Stämme. Es fand sich ebenfalls in Übereinstimmung mit anderen Autoren eine Zunahme des Serum-Corticosteron mit dem Alter der Tiere (Wilder 1995).

Zusätzlich zur Beeinflussung der HPA-Achse wurden Einflüsse auf Entzündungsparameter festgestellt. Die SAA-Konzentration veränderte sich nach Wärmeexposition. Dies konnte nur für die über 48 Stunden belastete Gruppe gezeigt werden, und nicht für die länger belasteten Tiere. Eine mögliche Ursache für einen nur mittelfristigen Effekt auf die SAA-Konzentration könnte hier ein Adaptationsvorgang mit z.B. kurzfristiger Steigerung der entzündlichen Krankheitsaktivität sein. Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF sind als wichtige Induktoren der SAA-Synthese bekannt (Marhaug und Dowton 1994). Es fanden sich jedoch keine entsprechenden Änderungen des IL-6-Serumspiegel. Die IL-6-Spiegel zwischen den Gruppen unterschieden sich nicht signifikant, die Streubreite der Messwerte war außerordentlich groß. Es gibt Hinweise dafür, dass eine Ganzkörperhyperthermie von 41,8°C über eine Stunde bei Patienten mit einer malignen Erkrankung den IL-6-Spiegel passager für 5 Stunden erhöht (Atanackovic et al 2002). Sobieska und Mitarbeiter (1993) untersuchten die Wärmewirkung bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen. Ihre Daten weisen auf ansteigende IL-6-Spiegel unter lokaler Wärmeanwendung hin. Die Unterschiede zu den eigenen Daten könnten dadurch erklärt werden, dass in den eigenen Untersuchungen nur eine milde Wärmebelastung erfolgte, die keine Hyperthermie induzierte. Da IL-6 auch im ZNS von Neuronen und Gliazellen produziert wird (Schobitz et al 1992), und nur in geringem Maße die Blut-Liquor-Schranke durchdringen kann, kann nicht

ausgeschlossen werden, dass die IL-6-Produktion im ZNS beeinflusst wurde. Dies wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Eine Einflussnahme auf zerebrales IL-6 könnte zu einer Beeinflussung von zentralen Anteilen des autonomen Nervensystems im Hirnstamm (Locus coeruleus), die wiederum das Immunsystem beeinflussen können (Wilder 1995 und Elenkov et al 2000), führen.

IL-6 stimuliert ebenso wie IL-1 und TNF- α die Produktion von SAA. Eine Korrelation des SAA mit dem IL-6-Serumspiegel ließ sich nicht nachweisen. Daher ist eine Stimulation der SAA-Produktion allein durch IL-6 wenig wahrscheinlich. Inwieweit IL-1 an den erhöhten SAA-Spiegeln beteiligt ist, lässt sich nicht feststellen, da die gemessenen IL-1-Spiegel überwiegend unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

IL-1 ist neben anderen Zytokinen (TNF- α und IL-6) als Mediator der Akute-Phase-Reaktion bei der Maus bekannt (Perlstein et al 1993). Es wurde beschrieben, dass IL-1 den Serum Corticosteron-Spiegel erhöht (Lechner et al 1996, Besedovsky et al 1986). Die eigenen Untersuchungen konnten im Gegensatz zu Suda (1990) keinen Zusammenhang zwischen IL-1 und Corticosteron zeigen.

Als Parameter des Autoimmunprozesses wurden anti-ds-DNS-Ak bei den untersuchten Tieren gemessen. Anti-ds-DNS-Ak nehmen im Lauf des Lebens bei MRL lpr/lpr-Mäusen zu (Shanks et al 1999), dies wurde in der vorliegenden Untersuchung bestätigt. Eine signifikante Änderung der anti-ds-DNS-Antikörpermenge durch thermische Belastung konnte nicht aufgezeigt werden, bisher gibt es darüber keine Daten in der Literatur.

Unter thermischer Belastung wurde eine Veränderung der zellulären Zusammensetzung des Immunsystems der untersuchten Mäuse beobachtet. Dabei konnte jedoch nicht geklärt werden, ob eine reguläre Stressreaktion durch die Wärmebelastung induziert wurde. Ein möglicher alternativer Regulationsmechanismus könnte eine Aktivierung des Antidiuretischen Hormones (ADH) sein. Es gibt Hinweise für eine Aktivierung des ADH-Systems bei chronischem Stress (Harbuz 1992).

Insgesamt sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine Verstärkung des Erkrankungsprozesses durch Wärmebelastung. Hierfür spricht die Zunahme der Anteile pathologischer B220+Thy1.2+-Zellen in Milz und Thymus, die Reduktion der „gesunden“ B-Zellen und der Anstieg des SAA. Eine Förderung der Krankheit scheint aber nur in einer frühen Lebensphase der Tiere möglich. Eine Einflussnahme auf die bereits länger etablierte Erkrankung ist nicht mehr möglich. Es ist daher anzunehmen, dass nur vor Ausbruch der Erkrankung und in der frühen Krankheitsphase eine Beeinflussung des Immunsystems durch thermische Belastung möglich ist. Es gibt in der Literatur bisher keine vergleichbare Arbeit zum systemischen Lupus Erythematodes, in der die Modulierbarkeit des zellulären Immunsystems durch chronische Wärmebelastung zu unterschiedlichen Krankheitsphasen bzw. auch in der noch asymptomatischen Phase der Erkrankung untersucht wurde.

Es gibt zwar Studien (Otto und Mackay 1967, Blumenfield 1978), die der Frage nachgingen, ob ein SLE durch Stress (psychologische Stressoren) ausgelöst werden kann, es handelt sich jedoch nur um retrospektive Studien. Hermann und Mitarbeiter (2000) haben dargelegt, dass für den SLE bisher keine Daten über eine Förderung der Krankheitsentwicklung durch Stress in der Phase vor Beginn der Symptomatik vorliegen. Im Tiermodell gibt es bisher auch keine Untersuchungen über die mögliche Auswirkung von Wärmestress auf die Modulation oder Auslösung von SLE in der asymptomatischen Phase. Unklar ist, in wieweit die im Tiermodell in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können.

Im Einklang mit den in dieser Arbeit festgestellten Hinweisen auf eine Förderung des SLE-Krankheitsprozesses durch Wärmebehandlung stehen Ergebnisse von Schmidt (1987), die eine Exacerbation und Verschlechterung der rheumatoiden Arthritis nach Wärmebelastung zeigten. Wärmebehandlungen könnten daher den Entzündungsprozess bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen verstärken und beim SLE eine schubfördernde oder –auslösende Wirkung haben.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, wie Autoimmunkrankheiten durch chronischen Stress beeinflusst werden. Es sollte insbesondere untersucht werden, ob eine Autoimmunkrankheit durch Stress bei Individuen mit einer entsprechenden Prädisposition gefördert werden kann.

Der SLE ist der Prototyp einer Autoimmunkrankheit. Die Untersuchungen erfolgten an einem Tiermodell für den humanen SLE, an Mäusen der MRL lpr/lpr- und MRL +/- -Stämme. Charakteristisch ist für diese Stämme eine ausgeprägte Lymphoproliferation mit Zunahme einer pathologischen Zellpopulation, B220+Thy1.2+ Lymphozyten, im Verlauf der Erkrankung. Es wurden Untersuchungen bei jungen Tieren vor Manifestwerden der Erkrankung und bei älteren Tieren in verschiedenen Krankheitsphasen durchgeführt. Als Stressor wurde eine repetitive thermische Belastung über bis zu 120 Stunden bei 36°C und 50% Luftfeuchte für jeweils 2 x 3 Stunden pro Tag gewählt. Am Ende der unterschiedlichen Expositionszeiträume wurden die Tiere getötet und Blut sowie lymphatische Organe entnommen. Es erfolgten durchflußzytometrische Analysen der Lymphozytensubpopulationen von Milz, Lymphknoten und Thymus. Parallel hierzu wurden Bestimmungen des Corticosteron, IL-1- α , IL-6, SAA und von ds -DNS- Antikörpern durchgeführt.

Es wurde ein Anstieg der B220+Thy1.2+ Zellen in der Milz in der noch asymptomatischen Phase der Erkrankung beim MRL +/- -Stamm und im Thymus der Tiere des MRL lpr/lpr - Stammes in der Frühphase der manifesten Erkrankung gezeigt. Dies wies auf eine beschleunigte Progression der Erkrankung nach chronischer Wärmeexposition hin. Des Weiteren fanden sich reduzierte reife B-Zellen und B-Vorläuferzellen in der Milz sowie im Lymphknotengewebe bei wärmebelasteten Mäusen.

Bei Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes mit klinischem Vollbild der Erkrankung konnten keine Veränderungen der untersuchten Lymphozytensubsets nach Wärmebelastung gefunden werden.

Unter der Wärmeexposition gingen die Serum-Corticosteronspiegel zurück. Dieser Effekt war sowohl bei den Tieren des MRL +/+ -Stammes als auch bei den Tieren des MRL lpr/lpr-Stammes zu beobachten. Bei letzteren allerdings nicht in der Spätphase der Erkrankung. Beeinflussungen der Zytokine IL-1- α und IL-6 konnten nicht nachgewiesen werden. Der beobachtete Anstieg des SAA-Spiegel wies auf eine Zunahme der Entzündungsaktivität hin. Eine Änderung der anti-dsDNA-Ak-Spiegel nach thermischer Belastung ließ sich nicht beobachten.

Zusammenfassend wurde eine Modulierbarkeit des Immunsystems vor klinischer Manifestation des SLE nachgewiesen. Die erhobenen Daten sprechen dafür, dass chronischer Wärmestress den Autoimmunprozess fördern kann. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die länger etablierte Erkrankung weniger durch Stress beeinflussbar ist.

6. Literaturverzeichnis

Andrews BS, Eisenberg RA, Argyrios N, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, Murphy ED, Roths JB, Dixon FJ (1978) Spontaneous murine lupus-like syndromes. *J Exp Med* 148: 1198-1215

Angeli A, Masera RG, Sartori ML, Fortunati N, Racca S, Dovio A, Staurenghi A, Frairia R (1999) Modulation by Cytokines of Glucocorticoid Action. *Ann N Y Acad Sci* 876: 211-220

Asano T, Yoshikai Y, Matsumoto K, Matuzaki G, Nomoto K (1990) Subpopulations of CD 4+ cells in the lpr/lpr mice: differences in the expression of T cell receptor/CD3 complex and proliferative responses. *Clin Exp Immunol* 81: 90-96

Asensi V, Kimeno K, Kawamura I, Sakumoto M, Nomoto K (1989) Treatment of autoimmune MRL/lpr mice with anti-B220 monoclonal antibody reduces the level of DNA antibodies and lymphadenopathie. *Immunology* 68: 204-208

Atanackovic D, Nierhaus A, Neumeier M, Hossfeld DK, Hegewisch-Becker S (2002) 41.8 degree C whole body hyperthermia as an adjunct to chemotherapy induces prolonged T cell activation in patients with various malignant diseases. *Cancer Immunol Immunother* 51: 603-613

Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP (1996) Molecular determinantes of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17: 245-261

Berliner MN (1999) Thermotherapie bei rheumatischen Erkrankungen. *Zeitschrift für ärztliche Fortbildung und Qualitätssicherung* 93: 331-334

Besedowsky HO, del Rey A (1996) Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. *Endocr Rev* 17: 64-102

Besedowsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA (1986) Immunoregulatory feedback between Interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233: 652-654

Beyer TD, Kuenkele S, Gaipf US, Kolowos W, Voll RE, Baumann I, Kalden JR, Herrmann M: Systemic Lupus Erythematosus. In: Kalden JR, Herrmann M (Herausgeber) Apoptosis and Autoimmunity. From Mechanisms to Treatment. Wiley-VCH, Weinheim, 1. Auflage 2003, 187-204

Bijl M, Limburg PC, Kalenberg CG (2001) New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis. *Neth J Med* 59: 66-75

Boswell JM, Yui MA, Burt DW, Kelley VE (1988) Increased tumor necrosis factor and IL-1 beta gene expression in the kidneys of mice with lupus nephritis. *J Immunol* 141: 3050-3054

Brey RL, Sakic B, Szechtman H, Denburg JA (1997) Animal models for nervous System disease in systemic lupus erythematosus . *Ann N Y Acad Sci* 823: 97-106

Budd RC, MacDonald HR, Lowenthal JW, Davignon JL, Izui S, Cerottini JC (1985) Growth and differentiation in vitro of the accumulating LYT-2⁺/L3T4⁻ subset in the lpr mice. *J Immunol* 135: 3704-3711

Bühning M (1985) Die Beeinflussung des Immunsystems durch Thermotherapie. *Z Phys Med Baln Med Klin* 14: 32-45

Bullard DC, King PD, Hicks MJ, Dupont B, Beaudet AL, Elkon KB (1997) Intercellular adhesion molecule-1 deficiency protects MRL/MpJ-Fas(lpr) mice from early lethality. *J Immunol* 159: 2058-2067

Carlsten H, Nilsson H, Jonsson R, Backman K, Holmdahl R, Tarkowski A (1992) Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T cell-

mediated vasculitis and sialoadenitis in autoimmune MRL lpr/lpr mice. *Cell Immunol* 144: 190-202

Carlsten H, Tarkowski A (1993) Histocompatibility complex gene products and exposure to oestrogen: Two independent factors in murine lupus. *Scand J Immunol* 38: 341-347

Coffman RL, Weissman IL (1981) B220: a B cell-specific member of the T200 Glycoprotein family. *Nature* 289: 681-683

Cohen MG, Polard KM, Schrieber L (1988) Relationship of age and sex to autoantibody expression in MRL+/+ and MRL-lpr/lpr mice: demonstration of an association between the expression of antibodies to histones, denatured DNA and Sm in MRL-+/+ mice. *Clin Exp Immunol* 72: 50-54

Cohen S, Tyrrell DAJ, Smith AP (1991) Psychological stress and susceptibility to the common cold. *New Eng J Med.* 325: 606-612

Cozzi F, Lazzarin P, Todesco S, Cima L (1995) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in healthy subjects undergoing mud-bath applications (letter). *Arthritis & Rheumatism* 38: 724-725

Daniels-Severs A, Goodwin A, Keil LC, Vernikos-Danellis J (1973) Effect of chronic crowding and cold on the pituitary-adrenal system: responsiveness to an acute stimulus during chronic stress. *Pharmacol* 9: 348-356

Downing JF, Taylor MW, Wei KM, Elizondo RS (1987) In vivo hyperthermia enhances plasma antiviral activity and stimulates peripheral lymphocytes for increased synthesis of interferon-gamma. *J Interferon Res* 7: 185-193

Evans-Storms RB, Cidlowski JA (1995) Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J Steroid Biochem Molec Biol* 53: 1-8

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

Fleck M, Kern ER, Zhou T, Lang B, Mountz JD (1998) Murine cytomegalievirus induces a Sjögren`s syndrome-like disease in C57Bl/6-lpr/lpr mice. *Arth Rheum* 41: 2175-2184

Franci O, Amici A, Margarit R, Merendino N, Piccolella E (1996) Influence of thermal and dietary stress on immune response of rabbits. *J Anim Sci* 74: 1523-1529

Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H (Hrsg., 2000) *Die Innere Medizin*. 10. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart, 84-87

Gescuk BD, Davis JC Jr (2002) Novel therapeutic agents for systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 14: 515-521

Gordon C, Ranges GE, Greenspan JS, Wolfsy D (1989) Chronic therapy with recombinant tumor necrosis factor-alpha in autoimmune NZB/NZW /F1 mice. *Clin Immunol Immunopathol* 52: 421-434

Greeley EH, Helfrich BA, Feuermann LL, Cain CA, Segre M (1992) Radiant heat-induced hyperthermia in mice: in vivo effects on the immune system. *Int J Hyperthermia* 8: 209-220

Gutierrez-Ramos JC, Andreu JL, de Alboran IM, Rodriguez J, Leonardo E, Krolmer G, Marcos MA, Martinez CA (1990) Insights into autoimmunity: from classical models to current perspectives. *Immunol Rev* 118: 73-101

Hale HB, Mefferd RB, Vawter G, Förster G, Criscuolo D (1959) Influence of long term exposure to adverse environments on organ weights and histology. *Am J Physiol* 196: 520-524

Handwerger BS (1990) Lymphocyte biology in lupus. *Curr Opin Rheumatol* 2: 749 - 761

Harbuz MS, Lightman SL (1992) Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol* 134: 327-339

Hashimoto K, Suemaru S, Takao T, Sugarawa M, Makino S, Ota S (1988) Corticotropin-releasing hormone and pituitary-adrenocortical responses in chronically stressed rats. *Regulatory Peptides* 23: 117-126

Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR (1998) Impaired phagocytosis of apoptotic material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 7: 113-118

Hieronimus T, Grotsch P, Blank N et al (2000) Chlorpromazine induces apoptosis in activated human lymphoblasts: a mechanism supporting the induction of drug-induced lupus erythematosus? *Arthritis Rheum* 43: 1994-2004

Hinrichsen H, Barth J, Ferstl R, Kirch W (1989) Changes of immunoregulatory cells induced by acoustic stress in patients with systemic lupus erythematosus, sarcoidosis, and in healthy controls. *Eur J Clin Invest* 19: 372-377

Hinrichsen H, Barth J, Rückemann M, Ferstl R, Kirch W (1992) Influence of prolonged neuropsychological testing on immunoregulatory cells and hormonal parameters in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 12: 47-51

Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1725-1725

Hoffmann-Goetz L, Thorne R, Randall Simpson JA, Arumugam Y (1989) Exercise stress alters murine lymphocyte subset distribution in spleen, lymph nodes and thymus. *Clin Exp Immunol* 76: 307-310

Huang YH, Haegerstrand A, Frostegard J (1996) Effects of in vitro hyperthermia on proliferative responses and lymphocyte activity. *Clin Exp Immunol* 103: 61-66

Ikeda M, Hamada K, Sumitomo H, Sakakibara B (1999) Serum amyloid A, cytokines, and corticosterone responses in germfree and conventional mice after lipopolysaccharide injection. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 1006-1010

Isenberg D, Leckie MJ (2002) Biological treatments for systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 31: 187-191

Ishigatsubo Y, Steinberg AD, Klinman DM (1988) Autoantibody production is associated with polyclonal B cell activation in autoimmune mice which express the *Ipr* or *gld* genes. *Eur J Immunol* 18: 1089-1093

Jacobs R, Pawlak CR, Mikeska E, Meyer-Olson D, Martin M, Heijnen CJ, Schedlowski M, Schmidt RE (2001) Systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients differ from healthy controls in their cytokine pattern after stress exposure. *Rheumatology (Oxford)* 40 : 868-875

Jandali R (1984) Einfluß der Hyperthermie und der Schilddrüsenhormone auf die Lymphozytenproliferation der Ratte. Inauguraldissertation, Gießen

Kalden JR, Winkler T, Hermann M, Krapf F (1991) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 11: 95-100

Klinman DM (1990) IgG1 and IgG2a production by autoimmune B cells treated in vitro with IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol* 144: 2529-2534

Klinman DM (1989) Regulation of B cell activation in autoimmune mice. *Clin Immunol and Immunopathol* 53: S25-34

Korneva EA, Shanin SN, Rybakina EG (2001) The Role of Interleukin-1 in Stress-Induced Changes in Immune System Function. *Neurosci Behav Physiol* 31: 431-437

Lechner O, Dietrich H, Oliveira-dos-Santos A, Wieggers GJ, Schwarz S, Harbutz M, Herold M, Wick G (2000) Altered circadian rhythm of the stress hormone and melatonin response in lupus-prone MRL/Mp-fas(lpr) mice. *J Autoimmun* 14: 325 - 333

Lechner O, Hu Y, Jafarian-Therani M, Dietrich H, Schwarz S, Herold M, Haour F, Wick G (1996) Disturbed immunoendocrine communication via the Hypothalamo-pituitary-adrenal axis in murine lupus. *Brain Behav Immun* 10: 337-350

Lee WT, Vitetta E (1991) The differential expression of homing and adhesion molecules on virgin and memory T cells in the mouse. *Cellular Immunology* 132: 215-222

Lloyd CM, Gonzalo JA, Salant DJ, Just J, Gutierrez-Ramos JC (1997) Intracellular adhesion molecule-1 deficiency prolongs survival and protects against the development of pulmonary inflammation during murine lupus. *J Clin Invest* 100: 963-971

Lorenz HM, Herrmann M, Kalden JR (2001) The pathogenesis of autoimmune diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 235: S16-26

Lorenz HM, Herrmann M, Winkler T, Gaipf U, Kalden JR (2000) Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis* 5: 443-449

Manolios N, Schrieber L, Nelson M, Geczy L (1989) Enhance interferon-gamma (IFN) production by lymph node cells from autoimmune (MRL/1, MRL/n) mice. *Clin Exp Immunol* 76: 301-306

Marhaug G, Dowton SB (1994) Serum amyloid A: an acute phase apolipoprotein and precursor of AA amyloid. *Baillieres Clin Rheumatol* 8: 553-573

Mason D (1991) Genetic variation in the stress response: susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease. *Immunology today* 12: 57-60

Mathias S, Jounes A, Kann CC, Orlow I, Joseph C, Kolesnik RN (1993) Activation of the sphingomyelin signalling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. *Science* 259: 519-522

McKay LI, Cidlowski JA (1999) Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20: 435-59

Miescher GC, Buddy RC, Lees RK, MacDonald HR (1987) Abnormal expression of T cell receptor genes in Lyt-2⁻ L3T4⁻ lymphocytes of lpr mice: comparison with normal immature thymocytes. *J Immunol* 138: 1959-1967

Morse HC III, Davidson WF, Yetter RA, Murphy ED, Roths JB, Coffman RL (1982) Abnormalities induced by mutant gene lpr: expansion of a unique lymphocyte subset. *J Immunol* 129: 2612-2615

Mountz JD (1990) Animal models of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2: 740-748

Mountz JD, Edwards CK III (1992) Murine models of autoimmunity: T-cell and B-cell defects. *Curr Opin Rheumatol* 4: 612-620

Mountz JD, Edwards CK III (1992) Murine models of autoimmune disease. *Curr Opin Rheumatol* 4: 621-629

Mountz JD, Gause WC, Finkelmann FD, Steinberg AD (1988) Prevention of lymphadenopathy in MRL-lpr mice by blocking peripheral lymph node homing with Mel-14 in vivo. *J Immunol* 140: 2943-2949

Mountz JD, Zhou T, Su X, Wu J, Cheng J (1996) The role of programmed cell death as an emerging new concept for the pathogenesis of autoimmune diseases. Clin Immunol Immunopathol 80: S2-S14

Neeck G, Federlin K, Graef V, Rusch D, Schmidt KL (1990) Adrenal secretion of cortisol in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 17: 24-29

O'Connor TM, O'Halloran DJ, Shanahan F (2000) The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. QJM 93: 323-333

Ohteki T, Seki S, Abo T, Kumagai K (1990) Liver is a possible site for the proliferation of abnormal CD3⁺4⁻8⁻ double-negative lymphocytes in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. J Exp Med 172: 7-12

Packer SH, Logue GL (1980) Quantitation of warm reactive IgG antilymphocyte autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol 17: 515-529

Parks DR, Lanier LL, Herzberg LA (1984) Fluorescence activated cell sorting: Theory, experimental optimisation and applications in lymphoid biology. Colowick SP, Kaplan NO (Herausgeber): Methods in Enzymology, Academic Press, Orlando (USA) 108: 197-241

Peers SH, Flowers RJ (1990) The role of lipocortin in corticosteroid actions. Am Rev Resp Dis 141: S18-21

Perlstein RS, Mougey EH, Jackson WE, Neta R (1991) Interleukin-1 and interleukin-6 act synergistically to stimulate the release of adrenocorticotrophic hormone in vivo. Lymphokine Cytokine Res 10: 141-146

Perlstein RS, Whitnall MH, Abrams JS, Mougey EH, Neta R (1993) Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. *Endocrinology* 132: 946-952

Rapp CA, Berner B, Müller GA, Reuss-Borst MA (2002) Krankheitsaktivität und chronische Organschäden bei Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) im Langzeitverlauf. *Z Rheumatol* 61: 521-531

Ravirajan CT, Sarraf CE, Anilkumar TV, Golding MC, Alison MR, Isenberg DA (1996) An analysis of apoptosis in lymphoid organs and lupus disease in murine systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 105: 306-312

Reap EA, Roof K, Maynor K, Borrero M, Booker J, Cohen PL (1995) Radiation and stress-induced apoptosis: A role for Fas/Fasligand interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5750-5755

Reeves WH (1990) Immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus and Sjögren`s syndrome. *Curr opin Rheumatol* 2: 717-723

Reidenberg MM, Durant PJ, Harris RA, De Boccardo G, Lahita R, Stenzel KH (1983) Lupus erythematosus-like disease due to hydrazine. *Am J Med* 75: 365-370

Reilly CM, Gilkeson GS (2002) Use of genetic knockouts to modulate disease expression in a murine model of lupus, MRL/lpr mice. *Immunol Res* 25: 143-153

Rosen A, Gergely P, Jondal M, Klein G, Britton S (1977) Polyclonal immunoglobulin production after Epstein-Barr virus infection in human lymphocytes in vitro. *Nature* 267: 52-54

Rothwell NJ (1991) Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci* 12:430-436

Santoro TJ, Lehmann KR, Batt RA, Kotzin BL (1987) The role of L3T4+ cells in the pathogenesis of lupus in lpr-bearing mice. I. Defects in the production of interleukins 2 and 3. *Eur J Immunol* 17: 1131-1136

Schattner A (1988) Lymphokines in autoimmunity - roles of interferons in systemic lupus erythematosus and other autoimmune disorders. *Isr J Med Sci* 24: 728-731

Schedlowski M, Hosch W, Oberbeck R, Benschop RJ, Jacobs R, Raab HR, Schmidt RE (1996) Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent β_2 -adrenergic mechanisms. *J Immunol* 156: 93-99

Schmid-Ott G (1998) Stress-Induced Endocrine and Immunological Changes in Psoriasis Patients and Healthy Controls. *Psychother Psychosom* 67: 37-42

Schmidt KL (1987) Hyperthermie und Fieber, Wirkungen bei Mensch und Tier. Pathologie, Immunologie, Wirkungen auf Entzündungen. 2. Auflage, Stuttgart, Hippokrates, 63-65, 86-90, 104-105, 128-136

Schmidt KL, Ott VR, Roecher G, Schaller H (1979) Heat, cold and inflammation. *Z Rheumatol* 38: 391-404

Schobitz B, Voorhuis DA, De Kloet ER (1992) Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 136: 189-192

Selye H (1936) A syndrom produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32

Sekigawa I, Noguchi K, Hasegawa K, Hirose S, Sato H, Shirai T (1989) B cell hyperresponsiveness to interleukin 2 and age-associated decline in murine lupus. *Clin Immunol Immunopathol* 51: 172-184

Shanks N, Moore PM, Perks P, Lightman SL (1999) Alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal function correlated with the onset of murine SLE in MRL +/+ and lpr/lpr mice. *Brain Behav Immun* 13: 348-360

Shanks N, Moore PM, Perks P, Lightman SL (1997) Endocrine correlates of murine systemic lupus erythematosus in the MRL lpr/lpr model. *Ann N Y Acad Sci* 823: 252-255

Singer GG, Carrera AC, Marshak-Rothenstein A, Martinez C, Abbas AK (1994) Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr Opin Immunol* 6: 913-920

Sipe JD, Gonnerman WA, Loose LD, Knapschaefer G, Xie WJ, Franzblau C (1989) Direct binding enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serum amyloid A (SAA). *J Immunol Methods* 125: 125-135

Sobieska M, Stratz T, Samborski W, Hrycay P, Mennet P, Müller W (1993) Interleukin-6 (IL-6) after whole body cryotherapy and local hot mud pack treatment. *Eur J Phys Med Rehabil* 3: 205-205

Spencer RL, McEwen BS (1990) Adaptation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to chronic ethanol stress. *Neuroendocrinol* 52: 481-489

Steckler T (2001) The molecular neurobiology of stress – evidence from genetic and epigenetic models. *Behav Pharmacol* 12: 381-427

Sternberg EM (1997) Perspective series: Cytokines and the Brain. *Neural-immune Interactions in Health and Disease. J Clin Invest* 100: 2641-2647

Sternberg EM, Chrousos GP, Wilder RL, Gold PW (1992) The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med* 117: 854-866

Suda HF, Tozawa F, Ushiyama T, Sumitomo T, Yamada M, Demura H (1990) Interleukin-1 stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in rat hypothalamus. *Endocrinology* 126: 1223-1228

Sukenik S, Abu-Shakara M, Flusser D (1997) Balneotherapy in autoimmune disease. *Isr J Med Sci* 33; 258-261

Talal N, Dang H, Ahmed SA, Kraig E, Fischbach M (1987) Interleukin 2, T cell receptor and sex hormone studies in autoimmune mice. *J Rheumatol* 13: S21-25

Talal N (1981) Sex steroid hormones and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 24: 1054-1056

Tan EM (1985) Systemic Lupus Erythematosus: Immunologic Aspects. Aus: McCarthy DJ *Arthritis and allied conditions*. Lea & Febinger, Philadelphia, 1985, 936-941

Tan EM, Cohen AS, Fries JF (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277

Theofilopoulos AN, Dixon FJ (1985) Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 37: 269-290

Vyse TJ, Kotzin BL (1998) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 16; 261-292

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317

Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM (2002) Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 20: 125-63

Whitnall MH, Perlstein RS, Mougey EH, Neta R (1992) Effects of interleukin-1 on the stress-responsiveness and –nonresponsiveness subtypes of corticotropin -releasing hormone neurosecretory axons. *Endocrinology* 131: 37-44

Wilder RL (1995) Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 13: 307-338

Zietz B, Reber T, Oertel M, Glück T, Schölmerich J, Straub RH (2000) Altered Function of the Hypothalamic Stress Axes in Patients with Moderately Active Systemic Lupus Erythematosus. II. Dissociation Between Androstendione, Cortisol, or Dehydroepiandrosterone and Interleukin 6 or Tumor Necrosis Factor. *J Rheumatol* 27: 911-918

7. Anhang

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Landesforschungsschwerpunktprogrammes „Neuroimmunobiochemie von Rezeptor-Transmitter-Systemen“ durch das Land Hessen gefördert.

Vor Beginn der Versuche wurde eine Tierversuchsgenehmigung eingeholt (Zeichen: 17b 19c 20-15 (1); Gi 20/11 – 2/91).

Folgende Publikationen gingen aus der vorliegenden Arbeit hervor:

H. Becker, O. Franz, P. Hinckel, H. Holzträger, K. Federlin (1992) Chronischer thermischer Streß moduliert das Immunsystem in der präklinischen Phase des murinen Lupus erythematodes.

20. Tagung des Arbeitskreises für klinische Immunologie, Frankfurt/Höchst, 6.-7.11.1992, Vortrag

O. Franz, H. Becker, P. Hinckel, H. Holzträger, K. Federlin (1993) Repetitiv thermal stimulation modulates the immune system in asymptomatic murine lupus erythematosus.

13. Winter Conference on Brain Research, LaPlagne, Frankreich, 13.-20.3.1993, Vortrag

H. Becker, O. Franz, P. Hinckel, H. Holzträger, K. Federlin (1993): Chronischer thermischer Stress moduliert das Immunsystem in der präklinischen Phase des murinen Lupus erythematodes. Immunität und Infektion, April 1993; 21 Suppl 1:23-4

Lebenslauf

Name: Oliver Holger Franz

Geburtsdatum: 31. März 1969

Geburtsort: Limburg / Lahn

Anschrift: Eichenweg 4
35799 Merenberg

Schule und Ausbildung: 1975 – 1979 Grundschule Merenberg
1979 – 1988 Gymnasium Philippinum Weilburg
1988 – 1989 Wehrdienst in Ulm und Wetzlar
1989 – 1995 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig Universität Gießen
1995 – 1996 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Köln, Praktisches Jahr

Beruflicher Werdegang: 1996 – 1998 Arzt im Praktikum, Neurologische Abteilung, St. Augustinus Krankenhaus, Düren
1998 – 2001 Assistenzarzt, Neurologische Abteilung, Evangelisches Krankenhaus, Wesel
2001 - 2002 Assistenzarzt, Rheinische Kliniken und Hochschulkliniken, Abteilung Psychiatrie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
2003 bis heute Assistenzarzt, Kliniken Maria Hilf Mönchengladbach, Klinik für Neurologie

Merenberg, September 2003

Danksagung:

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. emer. Dr. Drs. h.c. K. Federlin, ehemaliger Leiter der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der JLU-Giessen und Herrn Prof. Dr. Dr. Piper, Leiter des Physiologischen Institutes der JLU-Giessen, für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Frau PD Dr. H. Becker, früher Medizinische Klinik III der Justus-Liebig-Universität Gießen, jetzt Medizinische Klinik B des Universitätsklinikums Münster, für die Einführung in die wissenschaftlichen Arbeitsmethoden, die stete Diskussionsbereitschaft und für die geduldige Betreuung der Arbeit.

Herrn PD Dr. P. Hinckel gebührt ebenfalls mein Dank für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die Betreuung der Arbeit. Herrn H. Holzträger (Physiologisches Institut) und den Mitarbeitern des Immunologischen Labors der Medizinischen Klinik III, insbesondere Frau S. Schaum und Herrn M. Stein, gilt mein Dank für die technische Hilfestellung.