

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)
Institut für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose Forschung (INIMS)
Direktor Prof. Dr. M. Friese

Klassische Konditionierung immunologischer Reaktionen bei Patienten mit Multipler Sklerose während Mitoxantrontherapie

-Dissertation-

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Ghoncheh Mina
aus Teheran, Iran

Hamburg, 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.11.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. C. Heesen

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. E. Tolosa

In Liebe für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Multiple Sklerose	6
1.1.1	Epidemiologie	6
1.1.2	Immunpathogenese	7
1.1.3	Klinik und Verlaufsformen	10
1.1.4	Immuntherapien	12
1.2	Mitoxantron	14
1.2.1	Wirkungs- und Anwendungsspektrum	14
1.2.2	Dosierung und Nebenwirkungen	15
1.3	Immunkonditionierung	17
1.3.1	Prinzip der klassischen Konditionierung	17
1.3.2	Etablierung der Psychoneuroimmunologie	18
1.3.3	Tierexperimentelle Konditionierung von Immunfunktionen	19
1.3.4	Klinisch-biologische Bedeutsamkeit der Immunkonditionierung anhand tierexperimenteller Untersuchungen	20
1.3.5	Konditionierung beim Menschen	21
1.3.6	Mechanismen der Immunkonditionierung	24
2	Fragestellung	26
3	Material und Methode	27
3.1	Material	27
3.1.1	Geräte	27
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	27
3.1.3	Verbrauchsmaterial	28
3.1.4	Stimuli	28
3.1.5	Puffer und Lösungen	29
3.1.6	Antikörper	29
3.1.7	Software	30
3.2	Studiendesign	31
3.2.1	Patienten	31
3.2.2	Der konditionierte Stimulus (CS)	32
3.2.3	Mitoxantron als unkonditionierter Stimulus vs. Placebo	32
3.2.4	Studienablauf	33
3.3	Psychologische Parameter	35

3.3.1	Subjektive Beurteilung des Getränkes	35
3.3.2	Subjektives Befinden/ Nebenwirkungen	35
3.3.3	Subjektives Einschätzen der Placeboinfusion	35
3.4	Immunologische Parameter	36
3.4.1	Differentialblutbilder	36
3.4.2	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs)	36
3.4.3	Zellzahlbestimmung	36
3.4.4	Einfrieren und Auftauen von PBMCs	37
3.4.5	Durchflusszytometrie	37
3.4.6	Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen	38
3.4.7	Detektion apoptotischer Zellen mittels Annexin V	40
3.4.8	Bestimmung der IFN- γ Produktion von T-Lymphozyten	41
3.4.9	Proliferationsraten von T-Lymphozyten	42
3.5	Statistische Auswertung	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Psychologische Parameter	45
4.1.1	Subjektive Beurteilung des konditionierten Stimulus	45
4.1.2	Subjektives Befinden/ Nebenwirkungen	45
4.1.3	Subjektive Einschätzung der Placeboinfusion	47
4.2	Immunologische Parameter	48
4.2.1	Leukozyten- und Leukozytensubpopulationen	48
4.2.2	Lymphozytensubpopulationen	49
4.2.3	Durchflusszytometrische Messung der apoptotischen T-Zellen mittels Annexin V	51
4.2.4	Bestimmung der IFN- γ Produktion von T-Lymphozyten	51
4.2.5	T-Zellproliferation	51
5	Diskussion	53
6	Zusammenfassung	63
7	Anhang	64
8	Abkürzungsverzeichnis	66
9	Literaturverzeichnis	69
10	Danksagung	79
11	Eidesstattliche Erklärung	80

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine chronisch, entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) (McFarland and Martin, 2007; Sospedra and Martin, 2005), die zu der häufigsten neurologischen Erkrankung junger Erwachsener in Europa und Nordamerika gehört. Das Erkrankungsalter liegt bei der Mehrzahl der Patienten zwischen dem 20.-40. Lebensjahr (Lassmann and Ransohoff, 2004).

Die geographische Verteilung der MS zeigt eine auffällige Prävalenz mit einem Gradienten von Süd nach Nord. Australien, Nordeuropa und Nordamerika gehören zu den Ländern mit den höchsten Prävalenzraten (über 30/100000) (Schmidt und Hoffmann 2006). Im Vergleich dazu liegen die Prävalenzraten für Länder mit niedrigem Erkrankungsrisiko wie Japan, Afrika, Südamerika bei unter 5/100000 (Kurtzke, 2000). Migrationsstudien haben ergeben, dass die Prävalenz der MS beeinflussbar ist. Demnach behält ein Mensch das Erkrankungsrisiko seines Herkunftslandes, sofern die Migration nach dem 15. Lebensjahr stattgefunden hat. Bei Migration vor dem 15. Lebensjahr, passt sich das Risiko dem Gastland an (Limmroth und Sindern 2004). Der Mangel an Sonnenlicht in Ländern mit einer hohen Erkrankungswahrscheinlichkeit wird in diesem Zusammenhang diskutiert und Vitamin D als protektiver Faktor postuliert (Hayes, 2000).

Die Ätiologie der MS ist nach wie vor unklar, aber man geht von einer multifaktoriellen Genese aus. Durch das Zusammenspiel von einer genetischen Prädisposition und zusätzlichen Umweltfaktoren steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit (Martin et al., 1992; Sospedra and Martin, 2005). Verschiedene Studien belegen, dass mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad die Erkrankungswahrscheinlichkeit abnimmt. Geschwister und dizygote Zwillinge von MS Betroffenen haben ein 2-5% höheres Risiko MS zu entwickeln. Im Gegensatz dazu variiert die Konkordanz bei monozygoten Zwillingen zwischen 25% und 35% in unterschiedlichen Studien (Dyment et al., 2004; Mumford et al., 1994; Willer et al., 2003). Zudem konnten bestimmte Gene, die im Zusammenhang mit MS stehen, nachgewiesen werden. Bereits seit den frühen 1970ern ist eine enge Assoziation

zwischen MS und dem HLA-System bekannt (Compston et al., 1976; Terasaki et al., 1976). Später konnte die HLA-DRB1 Region als stärkstes Suszeptibilitätsgen bezüglich der MS bestätigt werden (Hauser and Oksenberg, 2006). Zudem detektierten weitere Forschungen potentielle Nicht-HLA-Gene im Zusammenhang mit MS. Vor allem für IL7-RA (Interleukin7-Rezeptor- α -Gen) und IL2-RA (Interleukin2-Rezeptor- α -Gen) ergab sich eine starke Assoziation mit der MS (Hafler et al., 2007). Verschiedene Viruserkrankungen wie Masern, Mumps, Rubella, Herpes-Simplex-Virus (HSV-1), Humanes-Herpes-Virus (HHV-6), Varizella-Zoster-Virus (VZV) und Epstein-Barr-Virus (EBV) werden im Zusammenhang mit MS untersucht. HHV-6 und EBV sind die führenden Kandidaten. Die Prävalenzrate an seropositivem EBV-Antigen liegt bei MS Patienten bei 100% versus 90% in der Allgemeinbevölkerung (Sospedra and Martin, 2005). Eine frühe EBV-Infektion korreliert mit einem niedrigem Erkrankungsrisiko und umgekehrt erhöht die späte EBV-Infektion während oder nach der Pubertät das MS-Risiko (Haahr et al., 2004; Levin et al., 2003). Obwohl die derzeitigen Forschungsergebnisse einen Zusammenhang zwischen einer EBV-Infektion und MS aufzeigen, konnten bisher keine Daten die direkte ätiologische Rolle der EBV-Infektion bestätigen (Lunemann and Munz, 2009). Auch weitere Umweltfaktoren wie Zigaretten (Hernan et al., 2005; Mikaeloff et al., 2007), Sonnenlicht, Vitamin D Mangel (Hayes, 2000), hormonelle Faktoren (Runmarker and Andersen, 1995), Toxine und Luftschadstoffe werden diskutiert.

1.1.2 Immunpathogenese

Die charakteristischen Läsionen der MS sind fokal, scharf begrenzte Entmarkungsherde im ZNS, sogenannte Plaques, die bereits im 19. Jahrhundert (Charcot, 1868) beschrieben wurden und mit dem Ausmaß der Entzündung assoziiert sind. Diese Entzündungsherde lassen sich im gesamten ZNS finden, mit Prädilektion am Sehnerv, in der periventrikulären weißen Substanz, im Hirnstamm, im Cerebellum und im Rückenmark (Schmidt und Hoffmann 2006).

Als Ursache wird eine fehlgeleitete Reaktion des Immunsystems gegen Bestandteile der Myelinscheide angenommen (Martin et al., 1992). Eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsinduktion spielen autoreaktive CD4 T-Helferzellen vom proinflammatorischem Th1-Typ (Laman et al., 1998; Martin et al., 1992). Diese autoreaktiven T-Zellen werden aktiviert und passieren die Blut-Hirn-Schranke (BHS) via Adhäsionsmoleküle und Chemokinen und gelangen auf diesem Weg ins ZNS

Gewebe. Dort werden für sie spezifische Autoantigene auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ) präsentiert. Diese Autoantigene sind sogenannte Myelinbausteine, wie zum Beispiel das basische Myelinprotein (MBP) (Belogurov et al., 2008; Martin et al., 1992) das Proteolipidprotein (PLP) und das Myelin oligodendroglia Glykoprotein (MOG). Hierdurch wird eine durch proinflammatorische Zytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-23) gesteuerte Entzündungsreaktion initiiert. Durch diesen Entzündungsprozess werden weitere Immunzellen (Monozyten, CD8 T-Zellen, B-Zellen) rekrutiert, wodurch die BHS zerstört wird (Sospedra and Martin, 2005).

Zusätzlich zu myelin-reaktiven, produzierten Antikörpern führen auch weitere Faktoren zur Myelindestruktion, wie die Glutamat-assoziierte Zytotoxizität durch die exzessive Produktion des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat durch Astrozyten (Pitt et al., 2000), Komplementproteine, durch Zytokine aktivierte Makrophagen, Matrix-Metallproteinasen und Sauerstoffradikale (Kieseier et al., 1999). Neben der initialen, entzündlichen Demyelinisierung ist eine axonale Degeneration in der weißen Substanz schon in den frühesten Krankheitsstadien nachweisbar (Ferguson et al., 1997; Kuhlmann et al., 2002; Trapp et al., 1998).

Zusätzlich zur Axonschädigung wurde auch die Zerstörung von Neuronen im Kortex und in der grauen Substanz nachgewiesen (Kidd et al., 1999; Peterson et al., 2001).

Die Pathogenese der MS zeigt eine Heterogenität in den Mustern der Entmarkung (Lassmann et al., 2001; Lucchinetti et al., 2000; Lucchinetti et al., 1996). Diese Heterogenität wurde innerhalb Läsionen unterschiedlicher Patienten gefunden und erlaubt eine Klassifizierung der MS in vier Subtypen:

I: T-Zell und Makrophagen-assoziierte Demyelinisierung

II: Antikörper- und Komplement-assoziierte Demyelinisierung

III: Demyelinisierung mit distaler Oligodendropathie und Oligodendrozytenapoptose

IV: Primäre Oligodendrozytendegeneration mit sekundärer Demyelinisierung.

(Schmidt und Hoffmann 2006).

Die T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion des ZNS als Pathogenese der MS wird durch eine Vielzahl an Studien unterstützt. Die experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE) ist eine entscheidende Studie am Tiermodell der MS, die die zentrale Rolle von autoreaktiven T-Zellen in diesem Zusammenhang untermauert. Durch die Immunisierung mit spezifischen ZNS-Antigenen oder dem Transfer von aktivierten enzephalitogenen Myelin-reaktiven T-Zellen ist in suszeptiblen Tieren eine

der MS ähnelnden, chronisch-entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankung des ZNS auslösbar (Wekerle et al., 1994; Zamvil and Steinman, 1990).

Zudem scheint das Th-1/Th-2 Gleichgewicht eine Rolle zu spielen (Olsson, 1995), da man bei der MS davon ausgeht, dass ein Ungleichgewicht von Th-1 und Th-2 Zellen zu Gunsten der Th-1 Population vorliegt (Limmroth und Sinden 2004).

Zusätzlich deuten verschiedene Forschungsergebnisse auf die Beteiligung weiterer pathogenetisch wichtiger Zelltypen hin, z.B. die der IL-17 und IL-22 produzierenden Th-17 Zellen (Iwakura and Ishigame, 2006; McKenzie et al., 2006). Autoantigen-spezifische Th-17 Zellen können pathogen sein und im Mausmodell zu ausgeprägter autoimmuner Entzündung führen (Bettelli et al., 2007). Die genaue Bedeutung dieser Zellen in der MS ist noch nicht ausreichend geklärt. Allerdings konnten immunhistochemisch IL-17 Rezeptoren in MS Patienten identifiziert werden, die bei Gesunden nicht nachweisbar sind (Tzartos et al., 2008), was die Annahme untermauert, dass diese Zellen aktiv in der Verursachung der Entzündungsreaktion des ZNS verantwortlich sind (Kebir et al., 2007). Zudem exprimieren isolierte mononukleäre Zellen aus Blut und aus Liquor von MS-Patienten gehäuft IL-17 mRNA (Matusevicius et al., 1999). Weitere Studien konnten einen Anstieg von Th-17 Zellen im Liquor und im peripherem Blut bei MS Patienten im Schub im Gegensatz zu MS Patienten ohne Schub nachweisen (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Durelli et al., 2009).

Befunde der letzten Jahre deuten zusätzlich auf eine wichtige Rolle zytotoxischer, CD8 T-Zellen in der Pathogenese der MS. So sind in MS Läsionen und im Liquor von MS Patienten Expansionen von CD8 T-Zellen beobachtet worden (Babbe et al., 2000; Friese and Fugger, 2009; Jacobsen et al., 2002; Skulina et al., 2004).

Zudem untermauern weitere Studien die Beteiligung von CD19 und CD20 exprimierenden B-Zellen an der Pathogenese der MS, weshalb diese als therapeutischer Angriffspunkt (Beispiel: monoklonaler Antikörper Rituximab= anti-CD20) an Bedeutung zugenommen haben (Kasper and Shoemaker, 2010).

1.1.3 Klinik und Verlaufsformen

Durch die Verbreitung von MS Läsionen im gesamten ZNS können sich die entsprechenden Symptome auch in nahezu allen neurologischen Systemen zeigen (s. Tabelle 1). Charakteristischerweise treten bei MS Patienten schubhaft verlaufende neurologische Symptome auf, welche durch zeitlich und örtlich disseminiert auftretende Entzündungsherde bedingt sind (McDonald et al., 2001; Poser et al., 1983). Die Erfüllung der Kriterien für eine MS lässt sich mittels cranialer und spinaler Magnetresonanztomographie (MRT) Aufnahmen, Liquoruntersuchungen mit dem Nachweis von oligoklonalen Banden, Latenzen bei visuell-, motorisch- und sensorisch evozierten Potentialen und der Klinik des Patienten erhärten. Die McDonald Kriterien wurden 2005 und 2010 vor allem hinsichtlich der MRT Kriterien überarbeitet, wodurch ihre Anwendbarkeit in der Praxis erleichtert wird (Polman et al., 2011; Polman et al., 2005).

Bezüglich Einflussfaktoren der Schubraten konnte unter anderem ein Zusammenhang von MS Schüben bzw. einer Exazerbationen und stressvollen Ereignissen belegt werden (Mohr et al., 2004).

Tabelle 1: Häufigkeit neurologischer Symptome bei Erstmanifestation und im Gesamtverlauf der MS (Poser et al., 1983)

<u>Symptom</u>	<u>Häufigkeit des Auftretens bei Erstmanifestation (%)</u>	<u>Häufigkeit des Auftretens im Gesamtverlauf (%)</u>
Spastik oder Babinski Zeichen	29	85
Paresen	45	85
Hirnstamm- oder zerebelläre Symptome	24	79
Sensibilitätsstörungen	42	86
Blasen- oder Darmstörungen	9	61
Optikusneuritis	33	62
Mentale oder psychische Störungen	4	39
Funktionsstörung des N. trigeminus oder N. facialis	10	30
Störungen der Okulomotorik	14	36

Man unterscheidet insgesamt drei verschiedene Verlaufskategorien (s. Abbildung 1). 80% der MS Patienten haben einen schubförmig remittierenden Verlauf (relapsing-remitting MS= RRMS) mit unvorhersehbaren Schüben, die neurologische Defizite

hervorrufen, von denen sich die Patienten komplett oder teilweise erholen. 65% dieser Patienten zeigen im Verlauf einen Übergang in einen sekundär chronischen Verlauf (secondary-progressive MS= SPMS) (Compston and Coles, 2008), was dadurch charakterisiert ist, dass die Patienten nach ihren anfänglichen Schüben irreversible neurologische Defizite aufweisen ohne erkennbare Schübe und ohne Remission. 20% der MS Patienten erleiden eine primär chronische MS (primary-chronic MS= PPMS), in der die Erkrankung einen stetigen Krankheitsprogress ohne Schübe und Remission aufweist (Miller and Leary, 2007). Als Anfangsstadium der Erkrankung wird das klinisch isolierte Syndrom (KIS) beschrieben, das durch das erstmalige Auftreten einer klinischen Symptomatik, die von der Präsentation auf ein demyelinisierendes Ereignis deutet, definiert ist, ohne die klassischen Kriterien einer zeitlichen Dissemination zu erfüllen. Das Ausmaß der Behinderung der Patienten wird mittels standardisierter Bewertungsbögen in regelmässiger Abfolge erfasst, wobei die am meisten verbreitete Skala die Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983) ist, die einzelne funktionelle Parameter wie Gehfähigkeit oder Koordinationsfähigkeit mit einem Punktesystem erfasst.

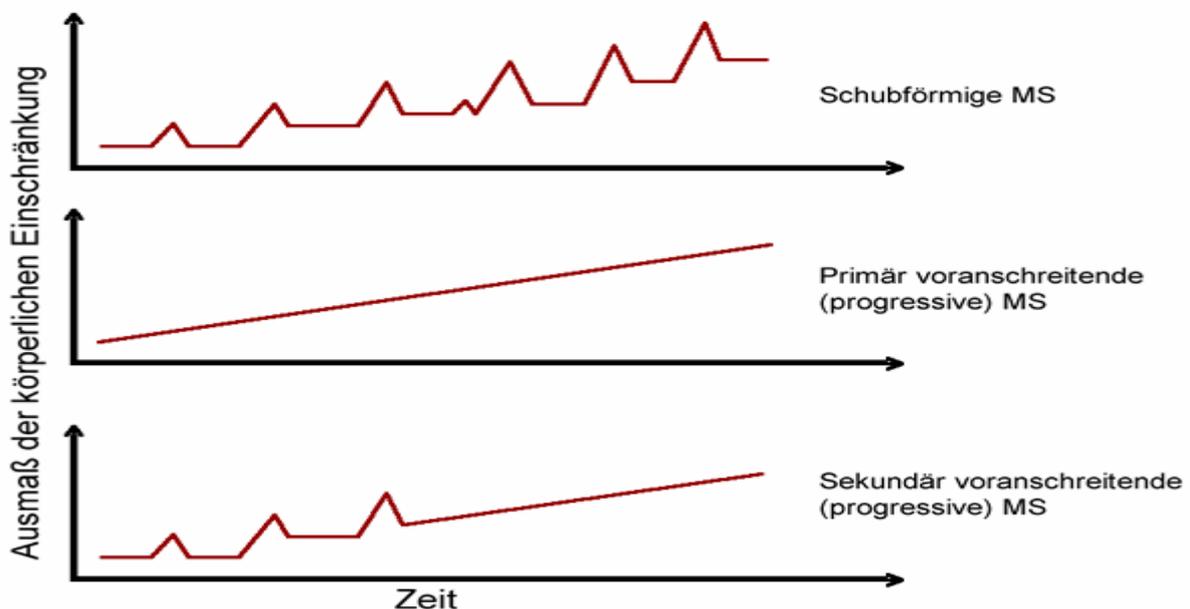


Abbildung 1: Verlaufsformen der MS (Lublin and Reingold, 1996)

1.1.4 Immuntherapien

Die aktuelle Stufentherapie der MS nach den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie ist in Abbildung 2 demonstriert.

Indikation	CIS ¹		RRMS ¹			SPMS ¹	
Verlaufsmodifizierende Therapie	(Hoch-) aktive Verlaufsform		1. Wahl - Alemtuzumab - Fingolimod - Natalizumab	2. Wahl - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) ⁴	3. Wahl - Experimentelle Verfahren	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetzte Schübe
	Milde/moderate Verlaufsform	- Glatirameracetat - Interferon-β 1a im - Interferon-β 1a sc - Interferon-β 1b sc	- Dimethylfumarat - Glatirameracetat - Interferon-β 1a im - Interferon-β 1a sc - Interferon-β 1b sc - PEG-IFN-β 1a sc - Teriflunomid (- Azathioprin) ² (- IVIg) ³	- Interferon-β 1a sc - Interferon-β 1b sc - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) ⁴	- Mitoxantron (- Cyclophosphamid) ⁴		
Schubtherapie							
	2. Wahl			- Plasmaseparation			
1. Wahl			- Methylprednisolonpuls				

Bei Versagen einer verlaufsmodifizierenden Therapie bei milder/moderater Verlaufsform einer MS werden diese Patienten wie eine aktive MS behandelt.

¹ Substanzen in alphabetischer Reihenfolge; die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens)

² zugelassen wenn Interferon-β nicht möglich oder unter Azathioprin-Therapie stabiler Verlauf erreicht

³ Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen

⁴ zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren

Abbildung 2: Stufentherapie der MS

(<http://www.dgn.org/leitlinien/2333-II-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose>, Stand: 13.08.2014)

Ergänzt wird die immunmodulatorische Behandlung durch eine

- symptomatische Therapie (Schmerztherapie, Fatiguebehandlung, Behandlung der Spastik, Verbesserung der Gehfähigkeit mittels eines Kaliumkanalblockers (Fampiridin), Behandlung des Tremors, Antidepression, Behandlung von Störungen des Urogenitaltraktes).
- nicht-medikamentöse Therapie durch Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie, psychologische Betreuung und Ernährungsberatung.
- Invasive Therapien: Intrathekales Baclofen.

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, wie Natalizumab (Antikörper gegen α4-Integrin) ermöglicht vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung für

RRMS (Polman et al., 2006). Unter der Behandlung mit Natalizumab kann es allerdings in seltenen Fällen zum Auftreten einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) kommen. Da der Nutzen des Medikamentes für Patienten mit hoher Krankheitsaktivität das bislang bekannte Risiko überwiegt, ist Natalizumab weiterhin in der MS Therapie zugelassen. Drei Faktoren sind gegenwärtig bekannt, die mit einem erhöhten Risiko einer PML assoziiert sind:

1. Eine Behandlungsdauer von mehr als 24 Monaten mit Natalizumab.
2. Eine vorherige immunsuppressive Therapie (unabhängig von Dauer, Abstand und Art der Immunsuppression).
3. Ein positiver JCV-Serologie Status.

(<http://www.tysabri.com/about/safety#>, Stand: 2015)

Fingolimod ist ein Sphingosin-1-Phosphat-(S1P)-Rezeptor-Modulator und wirkt als Immunsuppressivum, indem in den T-Lymphozyten durch Internalisierung des S1P1 Rezeptors eine Retention im lymphatischem Gewebe begünstigt wird.

Teriflunomid inhibiert reversibel das für die Pyrimidinsynthese wichtige mitochondriale Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase und hemmt dadurch die Proliferation der Lymphozyten.

Dimethylfumarat führt zu einer Verschiebung von Th1- zum Th2-Zytokinprofil und wirkt dadurch antiinflammatorisch. Zusätzlich wirkt es antioxidativ.

Alemtuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der an CD52 bindet und eine Depletion der CD52-exprimierenden T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten bewirkt.

Eine alternative Eskalationstherapie ist die autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT). Diese Methode wird bei schweren Fällen der akuten MS angewendet und befindet sich noch im Stadium der Entwicklung (Blanco et al., 2005).

Trotz neuer Medikamente und moderner Untersuchungsmethoden ist MS bislang nicht heilbar. Durch die verschiedenen Behandlungsformen lassen sich lediglich die Schübe und Symptome mildern, so dass der Krankheitsverlauf zum Teil günstig beeinflusst werden kann. Dennoch gibt es Patienten, die auf die Therapien nicht ansprechen. Zudem muss bei Einleitung einer Therapie der Nutzen und die Risiken abgewogen werden, da einige Therapien, wie auch die Mitoxantrontherapie, sehr aggressiv sind. Weitere Behandlungsoptionen, vor allem im Bereich monoklonaler Antikörper, werden derzeit untersucht.

1.2 Mitoxantron

1.2.1 Wirkungs- und Anwendungsspektrum

Mitoxantron (MX) ist ein in den 1980er Jahren entwickeltes, synthetisches Antracenidon, ein Analogon von Doxorubicin, mit einer geringeren Kardiotoxizität als Doxorubicin. Als Zytostatikum wurde es vorerst in der Onkologie eingesetzt (Leukämie, Non-Hodgkin Lymphome, Brustkrebs) (Faulds et al., 1991), bis es im Jahr 2000 auch für die SPMS und für die RRMS zugelassen wurde und sich als wirkungsvoll und gut toleriert erwiesen hat (Edan et al., 1997; Gonsette, 1996; Hartung et al., 2002; Mauch et al., 1992; Millefiorini et al., 1997; Noseworthy et al., 1993). Die Therapie mit MX führt bei RRMS und SPMS zu einer Schub- und Progressreduktion (Neuhaus et al., 2005) und über dies hinaus zu einer Reduktion der T2-gewichteten MS spezifischen Läsionen in der MRT (Millefiorini et al., 1997). MX wird in der Behandlung der MS als Eskalationstherapie empfohlen wenn andere immunmodulatorische Therapien versagt haben (Goodin et al., 2003; Rieckmann and Toyka, 1999).

Der Vergleich von Placebo (Methylenblau) versus Mitoxantron 5mg/m² bzw. 12 mg/m² alle 3 Monate für insgesamt 24 Monate bei Patienten mit SPMS erbrachte eine Überlegenheit in der Mitoxantrongruppe hinsichtlich EDSS, Anzahl therapiebedürftiger Schübe, Zeit bis zum ersten therapiebedürftigem Schub, neurologischen Status (Hartung et al., 2002). Es profitierten 14/100 Patienten von der Mitoxantrontherapie (http://www.uke.de/kliniken/neurologie/downloads/klinik-neurologie/ISDIMS_Neufassung_Maerz2013.pdf, Stand: März 2013). Insgesamt wurde MX gut vertragen. Die häufigsten Nebenwirkungen im Vergleich zu Placebo waren Übelkeit, Harnwegsinfekte, menstruelle Beschwerden, Amenorrhoe, und eine leichte Alopezie.

Durch Interkalation in DNA-Molekülen verursacht MX DNA-Brüche (De Isabella et al., 1995; Fisher and Patterson, 1991) und inhibiert die Topoisomerase II (Smith, 1983), wodurch es zu einer Behinderung der DNA-Reparatur kommt (De Isabella et al., 1995; Thielmann et al., 1993). MX wirkt antiproliferativ, vor allem auf die T- und B-Zellpopulation und auf Makrophagen (Fidler et al., 1986a; Fidler et al., 1986b; Fox, 2004; Levine and Saltzman, 1986; Wang et al., 1986). Einige Arbeiten vermuten, dass die Verminderung der Proliferationsraten durch die Induktion von Apoptose in peripheren Blutleukozyten, bevorzugt in B-Zellen vermittelt wird (Chan et al., 2005). Chans Arbeitsgruppe konnte belegen, dass diese antiproliferative Wirkung bereits

eine Stunde nach Mitoxantroninfusion im Blut von MS Patienten nachweisbar ist (Chan et al., 2005), wobei der Haupteffekt etwa 8-14 Tage nach Infusion zu finden ist (Gbadamosi et al., 2003). Die Therapie mit MX führt nicht nur zu einer Reduktion der Antikörperproduktion (Fidler et al., 1986a; Gbadamosi et al., 2003), sondern über dies hinaus zu einer persistierenden B-Zellhemmung, die bis zu einem Jahr nachweisbar ist (Gonsette and Demonty, 1990; Mauch et al., 1992). Ein weiteres Wirkungsspektrum von MX ist die verminderte Sekretionsrate proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , TNF- α , IL-2 und die Hemmung der T-Zellfunktion (Fidler et al., 1986a; Fidler et al., 1986b).

Auch in der EAE erwies sich MX über die immunsuppressive Eigenschaft als wirkungsvoll (Lublin et al., 1987; Ridge et al., 1985).

1.2.2 Dosierung und Nebenwirkungen

Die Therapie der MS mit MX besteht aus einer intravenösen Applikation von MX mit 5mg/m² bzw. mit 12 mg/m² alle 3 Monate. Aufgrund der kardiotoxischen Eigenschaft von MX, ist eine Therapie mit dieser Substanz nur für 2-3 Jahre bis zu einer kumulativen Höchstdosis von 140 mg/m² möglich (Cohen and Mikol, 2004) und erfordert ein sorgfältiges Monitoring der kardialen Funktion der Patienten. Das Risiko der Kardiotoxizität ist dosisabhängig und steigt ab einer kumulativen Dosis von > 100mg/m² (Cohen and Mikol, 2004). Bei zwei verschiedenen Studien mit RRMS Patienten konnte keine signifikante kardiale Dysfunktion bei einer kumulativen Dosis von je 96 mg/m² nachgewiesen werden (De Castro et al., 1995; Millefiorini et al., 1997). In einer weiteren Studie mit 800 MS Patienten, die eine mittlere kumulative Dosis von 70 mg/m² MX erhielten, konnte keine signifikante Kardiotoxizität von MX festgestellt werden (Edan et al., 2001). Die Inzidenz einer kongestiven Herzinsuffizienz betrug in einer Studie mit 1378 MS Patienten, die MX mit einer durchschnittlichen Dosis von 60,5 mg/m² erhielten <0.2 % (Ghalie et al., 2002).

Patienten ist das genaue Risiko von schwerwiegenden Nebenwirkungen (Kardiotoxizität, Leukämie) unter MX Therapie oft nicht gänzlich klar. Eine Aufklärung diesbezüglich ist weiterhin erforderlich und wurde im Rahmen einer Metaanalyse von 85% der Patienten geschätzt (Hofman et al., 2013).

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass die Überprüfung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) vor jeder MX Administration essentiell ist, vor allem wenn die kumulative Dosis von 100 mg/m² erreicht ist. Daraus folgt, dass MS Patienten mit

einem bestehendem Herzleiden sowie einer LVEF < 50% für eine MX Therapie nicht geeignet sind (Cohen and Mikol, 2004).

Zusätzlich ist vor jeder MX Infusion eine Blutbildkontrolle (vor allem die Zahl der weißen Blutkörperchen) erforderlich, da die MX Administration zu erheblichen Leukopenien mit daraus resultierendem erhöhtem Infektionsrisiko führen kann.

An MX-assoziierten Nebenwirkungen finden sich darüber hinaus Übelkeit, Haarausfall, Blasenentzündung und Zyklusstörungen bei der Frau (Hartung et al., 2002). Eine sehr seltene, aber ernst zu nehmende Nebenwirkung ist die Therapie-induzierte Leukämie, die bei etwa 0.2% der Patienten auftritt (Rieckmann, 2006). Daher sind vor den Behandlungen ausführliche Aufklärungen der Patienten und während der Therapien regelmäßige Blutbildkontrollen erforderlich.

1.3 Immunkonditionierung

1.3.1 Prinzip der klassischen Konditionierung

Der Begriff der klassischen Konditionierung wurde in den 1920ern von dem russischen Physiologen Ivan Petrovich Pavlov begründet. Das Prinzip dieses Lernphänomens besteht in der Darbietung von zwei Stimuli in enger zeitlicher Abfolge (kontingent). Als Grundlage dient eine spezifische physiologische Reaktion, die unconditionierte Reaktion (UCR), die durch einen bestimmten Reiz wiederholt hervorgerufen werden kann. Dieser physiologisch, „bedeutsamer“ Reiz wird unconditionierter Stimulus (UCS) genannt. Das Ziel ist, die UCR durch einen anderen, bisher physiologisch „bedeutungslosen“ Stimulus, (konditionierter Stimulus= CS) auszulösen. Die Darbietung des UCS wird mit dem CS kombiniert. Wenn nach mehrmaliger CS-UCS Paarung durch die alleinige Präsentation des CS die gleiche Reaktion auslösbar ist, spricht man von einer konditionierten Reaktion (CR). Pawlow wendete dieses Lernparadigma in seinen Experimenten zum physiologischen Speichelfluss bei Hunden (Abbildung 2) an. Die Futterdarbietung beim Hund (UCS) rief einen angeborenen Reflex (UCR) im Sinne eines Speichelflusses hervor. (Abbildung 2 **A**). Das Läuten einer Glocke (CS) erweckte bei dem Hund keine Reaktion (Abbildung 2 **A**). Durch Kombination beider Reize war ebenfalls ein Speichelfluss beim Hund nachweisbar (UCR) (Abbildung 2 **B**). Im Anschluss führte nach mehrfacher CS-UCS Paarung der alleinige Glockenton, ohne Futterdarbietung, zum Speichelfluss (CR) (Abbildung 2 **C**) (Trebst 2003).

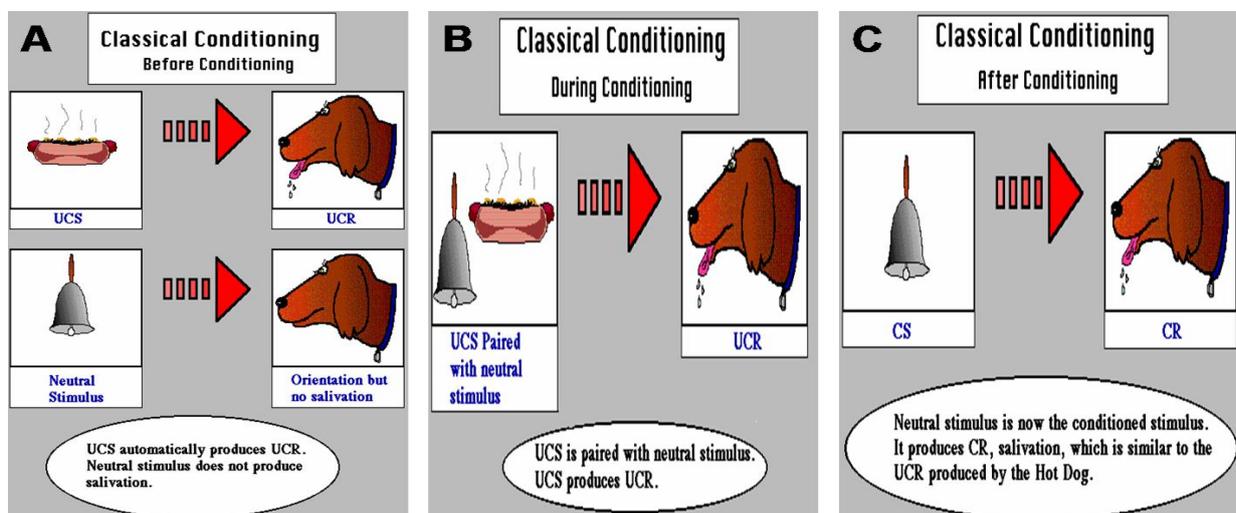


Abbildung 3: Prinzip der klassischen Konditionierung am Speichelfluss bei Hunden (Huitt, W., und Hummel, J., 1997)

1.3.2 Etablierung der Psychoneuroimmunologie

In den 1920ern wurde Pavlov's entdecktes Lernparadigma, die klassische Konditionierung, von seinen Schülern Metal'nikov und Chorine genutzt, um erste experimentelle Immunkonditionierungsarbeiten zu etablieren. Sie applizierten Meerschweinchen eine intraperitoneale Injektion des Pflanzenextraktes Tapioka (UCS), das einen Anstieg der Leukozytenzahlen in der Peritonealflüssigkeit hervorruft (UCR). Die Antigeninjektion wurde mit dem Erhitzen oder Ankratzen der Haut der Tiere (CS) gekoppelt. Mehrfache CS-UCS Paarungen hatten eine Erhöhung der Leukozytenzahl auch bei alleinigem Erhitzen oder Ankratzen der Haut (CR) zur Folge (Metal'nikov and Chorine, 1926). Ader und Cohen verfolgten den Forschungsbereich der Psychoneuroimmunologie erst ca. 50 Jahre später. Grundlage für die initialen Experimente von Ader und Cohen bildete das Geschmacksaversionsparadigma (CTA= conditioned taste aversion) von John Garcia, was eine Variante der klassischen Konditionierung darstellt. Bei der CTA wird ein harmloser Geschmack oder Geruch (CS) mit einer toxischen Substanz (UCS), die gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit oder Erbrechen verursacht, gekoppelt. Interessanterweise reicht bei der CTA meist schon eine einmalige CS-UCS Paarung zum Erlernen der CR (gelerntes Vermeidungsverhalten des CS) aus (Garcia et al., 1955). Ader und Cohen verwendeten als neuartig gustatorischen Reiz (CS) eine Saccharinlösung, die mit der Gabe von Cyclophosphamid (CY) als Noxe (UCS) gekoppelt wurde. Da CY als Nebenwirkung gastrointestinale Beschwerden (UCR) verursacht, entwickelten die Ratten auch bei später alleiniger Präsentation der Saccharinlösung eine Geschmacksaversion gegen den CS indem sie die Flüssigkeitsaufnahme vermieden (CR). Zusätzlich zu der CTA fiel der Arbeitsgruppe eine erhöhte Mortalitätsrate unter den konditionierten Ratten auf (Niemi 2004). Da CY eine toxische Substanz ist, die neben gastrointestinale Beschwerden, vor allem eine potente immunsuppressive Wirkung besitzt, führte dieser zufällig entdeckter Nebenbefund zu der Annahme, dass nicht nur die Geschmacksaversion, sondern auch die Immunsuppression konditionierbar ist (Ader and Cohen, 1975).

1.3.3 Tierexperimentelle Konditionierung von Immunfunktionen

Humorale Immunität: Nach der initialen Arbeit von Ader und Cohen 1975 konnte die konditionierte Suppression von humoralen Immunfunktionen durch diverse Arbeitsgruppen repliziert und untermauert werden (Ader and Cohen, 1982; Ader et al., 1993; Alvarez-Borda et al., 1995; Bovbjerg et al., 1987; Cohen et al., 1979; Rogers et al., 1976)

Zelluläre Immunität: Die konditionierte Immunmodulation wurde schon bald durch eine Reihe von Studien auf zellulärer Ebene ausgeweitet. In verschiedenen Versuchen ließen sich folgende zelluläre Immunfunktionen konditionieren:

- die supprimierte Zahl der Gesamtleukozyten (Klosterhalfen and Klosterhalfen, 1987),
- der Anstieg peripher mononukleärer Zellen (Buske-Kirschbaum et al., 1996),
- die Erhöhung von spezifischen Lymphozytensubpopulationen (Husband et al., 1987),
- die Erhöhung zytotoxischer T-Zellen (Ghanta et al., 1995; Gorczynski et al., 1982),
- die Erhöhung der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Ghanta et al., 1985),
- die Suppression der mitogeninduzierten Lymphozytenproliferation (Exton et al., 1998a),
- die Reduktion der Proliferationsraten isolierter Lymphozyten (Kusnecov et al., 1983),
- die Verringerung von Thymus- und Milzgewicht (Exton et al., 1998b),
- die Erniedrigung des Interleukin-2 Zytokinpiegels (Exton et al., 1998a; von Horsten et al., 1998).

1.3.4 Klinisch-biologische Bedeutsamkeit der Immunkonditionierung anhand tierexperimenteller Untersuchungen

Wie in 1.3.3 beschrieben, konnten zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen die klassische Konditionierung von Immunfunktionen belegen. Einige wenige Arbeitsgruppen befassten sich mit der therapeutischen Bedeutung der Immunkonditionierung anhand von Krankheitsmodellen, die im Folgenden beschrieben werden (Niemi 2004).

Tumorerkrankungen: Die Arbeitsgruppe von Ghanta führte Versuche zur Immunkonditionierung von Tumorwachstum durch. Die Mortalitätsrate von Mäusen nach Implantation eines Myeloms ließ sich nach Konditionierung mit Polyinosin:Polycytidyl-Säure (Poly I:C) (UCS) und Kamphergeruch (CS) erniedrigen, so dass durch Reexposition mit dem CS alleine signifikant höhere Überlebensraten erreicht werden konnten (Ghanta et al., 1987; Ghanta et al., 1988). Die selbe Arbeitsgruppe konditionierte erfolgreich die Immuntherapie (Chemotherapie) zur Bekämpfung eines T-Zell-Lymphoms, wodurch sich das Tumorwachstum verzögern ließ (Ghanta et al., 1993).

Autoimmunerkrankungen: Im Mausmodell führte bei Mäusen mit einer genetischen Prädisposition für eine systemische Lupus erythematodes (SLE) die Darbietung von CY zu einer Verlängerung der Überlebenszeit, die sich konditionieren ließ. Nach mehrmaliger Paarung des CY (UCS) mit einer Saccharinlösung (CS), überlebten die konditionierten Mäuse bei alleiniger Reexposition mit dem CS signifikant länger (Ader and Cohen, 1982).

In einem Experiment an Ratten mit einer experimentell induzierten rheumatoiden Arthritis konnte nach Konditionierung mit einer Vanille-Saccharin-Lösung (CS) und CY (UCS) (Klosterhalfen and Klosterhalfen, 1983) oder mit Cyclosporin A (CsA) (UCS) (Klosterhalfen and Klosterhalfen, 1990) eine Reduktion der Entzündung erreicht werden, was sich nach alleiniger Reexposition mit dem CS ebenfalls reproduzieren ließ.

Transplantationsmedizin: Erfolgreiche Konditionierungseffekte konnten auch auf die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHR= graft-versus-host reaction) durch eine konditioniert abgeschwächte GvHR erzielt werden (Bovbjerg et al., 1982).

Folgeversuche anderer Arbeitsgruppen im Rahmen eines Transplantationsmodells bei der Maus verdeutlichten die Bedeutsamkeit der klassischen Konditionierung des Immunsystems. Die Konditionierung mit CY (UCS) und Saccharinlösung (CS) hatte eine signifikante Verzögerung der Abstoßungsreaktion von Hauttransplantaten zur Folge (Gorczynski, 1990).

Ähnliche Studien wurden mit heterotopen Herztransplantaten bei der Ratte durchgeführt, indem nach Konditionierung mit CsA (UCS) und Saccharinlösung (CS) die alleinige Reexposition des CS zu einer Verhinderung der GvHR führte (Exton et al., 1999; Grochowicz et al., 1991).

1.3.5 Konditionierung beim Menschen

Obwohl die klassische Konditionierung von Immunfunktionen durch zahlreiche tierexperimentelle Versuche belegt wurde, gibt es im Bereich der Humankonditionierung nicht sehr viele Studien, die eine erfolgreiche klassische Konditionierung nachweisen (Trebst 2003).

Onkologie: Im Bereich der Onkologie gibt es einige Hinweise auf Konditionierungseffekte beim Menschen. So weisen Krebspatienten eine konditionierte antizipierte Übelkeit während der Chemotherapie auf. Es wurde beobachtet, dass die häufig gastrointestinalen Nebenwirkungen der Chemotherapeutika mit Stimuli der Krankenhausatmosphäre assoziiert sind, wie der Anblick oder der Geruch des Krankenhauses, wodurch bei den Patienten Übelkeit und Erbrechen hervorgerufen wird (Bovbjerg et al., 1992).

Aber auch Fatigue als Nebenwirkung der Chemotherapie ließ sich bei Brustkrebspatientinnen konditionieren (Bovbjerg et al., 2005).

In einer anderen Studie entwickelten pädiatrische Krebspatienten nicht nur eine konditionierte antizipatorische Übelkeit und Erbrechen (ANV= anticipatory nausea and/or vomiting) gegenüber der zeitlich kontingenten Stimuli mit der Chemotherapie, sondern zusätzlich eine antizipierte Immunmodulation (AIM= anticipatory immunomodulation) im Sinne der immunsuppressiven Wirkung des Chemotherapeutikums, die durch eine signifikante Reduktion immunologischer

Parameter wie der Interferon- γ Konzentration und der NK-Zell-Aktivität messbar war (Stockhorst et al., 2000).

Autoimmunerkrankungen: Ein klinischer Einzelfall am Beispiel eines SLE Patienten stellte im Rahmen seiner CY Therapie (UCS) eine erfolgreiche Konditionierung dar (Olness and Ader, 1992). CY wurde im Geschmack (Leberöl) und Geruch (Rosenaroma) verändert verabreicht (CS). Nach mehrmaligen CS-UCS Paarungen bekam der Patient zwischen seinen Behandlungen mit CY eine Placebogabe, mit den beschriebenen geschmack- und geruchlichen Veränderungen. Dadurch konnte die klinische Behandlung des SLE mit nur sechs anstatt wie klinisch standardisiert mit 12 CY Gaben vollzogen werden.

Eine andere Studie untersuchte Konditionierungseffekte des Immunsystems an MS Patienten (n=10), die im Rahmen ihrer Therapie mit CY (UCS) ein neuartig schmeckendes Getränk (CS) dargeboten bekamen. Nach wiederholter CS-UCS Paarungen bewirkte die Reexposition mit dem CS in Kombination mit CY in einer subtherapeutischen Dosis (10mg vs 1100-1826mg) eine Reduktion der Gesamtleukozyten (Giang et al., 1996).

Veränderung von Leukozytenzahlen und –funktionen: In einem Versuch wurden die Geschmacksreize eines Brausebonbons (CS) mit einer Adrenalininjektion (UCS) gekoppelt. Die Adrenalininjektion hat eine Aktivitätssteigerung der NK-Zellen zur Folge, die nach mehrmaliger CS-UCS Paarungen bei Reexposition durch die alleinige CS Darbietung ebenfalls induzierbar war (Buske-Kirschbaum et al., 1992). Die wiederholte Paarung von CsA (UCS) mit einem neuartigem Getränk (CS) führte bei Reexposition von CS assoziiert mit Placebokapseln zu einer signifikanten Immunsuppression gemessen an der mRNA Expression von Interleukin-2 und Interferon- γ , der intrazellulären Zytokinproduktion und der Lymphozytenproliferation (Goebel et al., 2002).

Allergische Reaktionen: Die klassische Konditionierung beim Menschen lässt sich bei Allergikern darstellen. Man hat beobachtet, dass das Bild eines Heufeldes ausreicht, um bei einigen Pollenallergikern allergische Symptome wie Niesen und Augenjucken auszulösen (Ader and Cohen, 2001).

In einer experimentellen Studie an Heuschnupfen- und Hausstauballergikern wurde im Sinne der CTA ein neuartiges Getränk (CS) mit der gleichzeitigen Gabe von Allergenen (UCS) in Form eines Nasensprays verabreicht. Als Parameter der allergischen Reaktion galt die quantitative Menge der Mastzelltryptase im Nasensekret. Der positive Effekt der Konditionierung wurde durch die Erhöhung des Tryptaseniveaus nach Reexposition mit dem CS in Kombination mit einem Placebospray deutlich (Gauci et al., 1994).

Anhand der Kontaktallergie vom verzögertem Typ (DTH= delayed type of hypersensitivity) wurden an gesunden Probanden Konditionierungseffekte anhand von Tuberkulintests monatlich untersucht. Fünfmal wurden Tuberkulinantigene mit einer roten Spritze und Kontroll-Kochsalzinjektionen mit einer grünen Spritze injiziert. Am Testtag war die farbliche Markierung der Spritzen vertauscht worden. Die Injektion der Kochsalzlösung aus der roten Spritze löste keine Hautreaktion aus, doch die mit der Placeboinjektion assoziierte grüne Spritze, die nun das Tuberkulinantigen enthielt, löste eine abgeschwächte Hautschwellung aus (Smith and McDaniel, 1983).

1.3.6 Mechanismen der Immunkonditionierung

Der genaue Mechanismus der Immunkonditionierung ist noch nicht ausreichend erforscht. Es wird die Beteiligung bestimmter Hirnareale vermutet, die im Folgendem näher beschrieben werden (Goebel 2001).

Neuroanatomische Korrelate: In sogenannten Läsionsstudien wurden die Kommunikationspfade der Konditionierung von Immunfunktionen untersucht. Um zu testen, welche Rolle der Inselkortex und die Amygdala in diesem Zusammenhang spielen, wurden bilaterale Läsionen jeweils vor und nach der Konditionierungsphase im Inselkortex und in der Amygdala gesetzt (Ramirez-Amaya et al., 1998). Die Ergebnisse zeigten, dass der Inselkortex für den Erwerb und Abruf der CTA (Garcia et al., 1985) sowie für die konditionierte Immunsuppression notwendig ist, da diese Pfade durch die Läsion blockiert wurden. Hingegen hatte die Läsion der Amygdala ausschließlich ein Ausbleiben der Assoziation und nicht des Abrufes zur Folge. Bilaterale Läsionen der Amygdala und der Insel hemmen die Konditionierung von Antikörperproduktion (Ramirez-Amaya and Bermudez-Rattoni, 1999).

Adrenerge Mechanismen: Das sympathische Nervensystem ist an der Konditionierung von Immunfunktionen beteiligt, wenngleich der genaue Mechanismus nicht vollständig verstanden ist (Exton et al., 1998a). Durch Einsatz eines β -Adrenorezeptorblockers (Propranolol) ließ sich der konditionierte Effekt der Lymphozytenproliferation in der Milz aufheben. Daher liegt die Vermutung nahe, dass klassische Konditionierung von Milzfunktionen durch Noradrenalin und β -adrenergen Rezeptoren reguliert werden (Exton et al., 2002).

In Denervationsstudien war nach einer operativen Durchtrennung des Milznerven vor Konditionierung mit Saccharin (CS) und CysA (UCS) ein Abfall des Noradrenalinpiegels in der Milz nachweisbar. Zusätzlich wurde die konditionierte Immunsuppression gemessen an der Splenozytenproliferationsrate und der Zytokinproduktion blockiert (Exton et al., 1999; Exton et al., 1998a).

Stresshypothese und HPA-Achse: Einen alternativen Erklärungsansatz der Immunkonditionierung liefert die sogenannte „Stresshypothese“, die annimmt, dass es sich bei der Immunkonditionierung um keinen echten Konditionierungseffekt handelt, sondern um einen Stresseffekt. Diese induziert im Rahmen der CTA eine vermehrte

Ausschüttung des „Stresshormons“ Kortisol durch eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (hypothalamus-pituitary-adrenal= HPA) mit folgender Immunsuppression. Diese Annahme wurde durch eine folgende Arbeit von Kelley 1985 zunächst bestätigt, indem Saccharin (CS) mit Lithiumchlorid (UCS), einer Noxe mit gastrointestinalen Nebenwirkungen, aber keiner immunsuppressiven Wirkung, konditioniert wurde, was einen immunsuppressiven Effekt im Sinne einer CTA zur Folge hatte. Diese Hypothese wurde durch weiterführende Studien widerlegt. Nicht nur, dass belegt werden konnte, dass eine Immunkonditionierung auch ohne CTA (Ader et al., 1987) und gastrointestinale Beschwerden (Kusnecov et al., 1983) möglich ist, zusätzlich ließ sich in zahlreichen Studien keine vermehrte Kortisolausschüttung weder im peripheren Blut, noch in den peripheren Organen nachweisen (Exton et al., 1999; Exton et al., 1998a; Klosterhalfen and Klosterhalfen, 1990; Kusnecov et al., 1990).

Obwohl die HPA-Achse nicht direkt bei der konditionierten Immunsuppression beteiligt ist, scheint sie aber eine vermittelnde Rolle im Rahmen einer konditionierten NK-Zellaktivität durch erhöhte ACTH Ausschüttung zu spielen (Hsueh et al., 1994).

2 Fragestellung

Das Phänomen der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen konnte in zahlreichen tierexperimentellen Studien belegt werden. Diese erfolgreichen Versuchsergebnisse verdeutlichen die Wirksamkeit und deren biologische Relevanz. Im Verhältnis dazu ist die Anzahl der Untersuchungen klassisch konditionierter Immunmodulation im Humanbereich eher gering. Besonders im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit gibt es nur wenige Studien, wobei gleichzeitig der Einsatz von konditionierter Immunmodulation im klinischen Bereich mannigfaltig denkbar ist (Exton et al., 2001; Exton et al., 2000).

Ziel dieser Pilotstudie ist es, die Konditionierbarkeit der immunologischen Effekte von MX in der Therapie von MS Patienten zu prüfen und näher zu charakterisieren, um zukünftige supportive therapeutische Ansatzpunkte zu entwickeln.

Aufgrund der in Kapitel 1.2.2 beschriebenen kardiotoxischen Eigenschaft von MX und die daraus resultierende begrenzte Therapiedauer von 2-3 Jahren, erscheint die Verringerung der Medikamentendosis bei gleichzeitiger Maximierung des therapeutischen Nutzens wünschenswert. Daher soll geprüft werden, ob sich die immunsuppressive Wirkung von MX mittels der klassischen Konditionierung induzieren lässt, um die Dosis zu minimieren und damit die schädigenden Nebenwirkungen dieses Zytostatikums, vor allem die Kardiotoxizitätsgefahr, zu senken, wodurch eine längere Behandlungsdauer erzielt werden könnte.

Auf Grundlage der CTA wurde eine einfach-blind, placebokontrollierte Studie bei Patienten mit aktiver MS unter MX Therapie konzipiert, um zu prüfen, ob sich mittels einer Placeboinfusion und einem neuartigem Geschmacksreiz gemäß der CTA eine konditionierte Immunantwort hervorrufen lässt. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, inwiefern sich diese Antwort immunologisch von dem direkten Medikamenteneffekt unterscheidet.

3 Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Durchflusszytometer BD LSRII	Biosciences
Mikroskop	Olympus CX21
Inkubator	Heraeus instruments
Vortexer	Certomat MV
Vortexer	IKA
Schüttler	IKA Labortechnik
Zentrifuge Multifuge 3S-R+,	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3-L	Heraeus
Nitrogentank	tec-lab
-80 Grad Schrank	Kryotec
Kühlschrank	Liebherr
Gefrierschrank	Liebherr
LabXpert	BRADY

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH
Lymphozytentrennmedium (Ficoll)	PAA Laboratories GmbH
TURCKS Lösung	Merck KGaA
FACS-Clean	BD Biosciences
FACS-Rinse	BD Biosciences
Destilliertes Wasser	Roth
Brefeldin A	eBioscience
X-vivo15	Cambrex
Fixierungspuffer	eBioscience
Permeabilisierungspuffer	eBioscience
Erythrozyten-Lysepuffer	BD Biosciences
Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE)	Invitrogen

3.1.3 Verbrauchsmaterial

1,5ml Eppendorf tubes	Greiner bio-one
Zellkulturflasche (200ml)	Greiner bio-one
Falkonröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner bio-one
Pipetten (25ml, 5ml)	Greiner bio-one
Pipetten (1ml, 200µl, 20µl)	Gilson
Pipette (10µl)	Eppendorf
96 Lochplatte mit rundem Boden	Greiner, bio-one
Kryoröhrchen	Greiner bio-one
Einfrierbehälter	Nalgene
Pipettierhilfe	Brand
Glaspipette	Brand
Sauger	IBS (Integra Biosciences)
Neubauer Zählkammer	Loptik Labor
Deckglas	Menzel-Gläser
FACS sorting tube	BD Bioscience
FACS Röhrchen	BD Bioscience

3.1.4 Stimuli

Stimulus	Stock Konzentration	Eingesetzte Konzentration	Firma
OKT-3	1mg/ml	0,1µg/ml	Ortho Biotech Products, L.P.
OKT-3	1mg/ml	1µg/ml	Ortho Biotech Products, L.P.
Tetanus Toxoid	200µg/ml	1µg/ml	Novartis
Superantigen	200µg/ml	1µg/ml	Sigma
Interleukin-7	2ng/µl	10ng/ml	Pepto Tech

3.1.5 Puffer und Lösungen

Einfriermedium 1	90%RPMI, 10%FCS
Einfriermedium 2	40%RPMI, 40%FCS, 20%DMSO
Annexin-Bindungspuffer	10mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl in Wasser, pH auf 7.4 einstellen
FACS-Puffer	0.5 %BSA + 0.02%Natriumazid in PBS
PMA/ Ionomycin, Sigma	stock: 100µg/ml PMA; 1mg/ml Ionomycin -> Einsatzkonzentration: 50ng/ml PMA, 1µg/ml Iono in 100µl x-vivo 15

3.1.6 Antikörper

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD3	SK7	PerCP-Cy5.5	BD
CD3	UCHT1	PECy5.5	Beckman Coulter
CD4	RPA-T4	PB	BD
CD4	MT310	APC	Dako
CD4	PPA-T4	APC	eBioscience
CD8	DK25	FITC	Dako
CD8	RPA-T8	PB	BD
CD8	DK25	PB	Dako
CD14	M5E2	PB	BD
CD16	3G8	APC-Cy7	BD
CD19	HIB19	FITC	BD
CD20	2H7	PB	Natu Tech
CD25	BC96	PE	eBioscience
CD25	4E3	PE	Milteny Biotec
CD27	CLB27/1	APC-Alexa750	Caltag Lab
CD28	CD28.2	PECy7	eBioscience Natu Tec
CD45	HI30	PE-Cy7	eBioscience
CD45RO	UCHL1	FITC	BD
CD45RO	UCHL1	FITC	eBioscience
CD56	MEM188	PE	eBioscience
CD56	B159	PE	BD
CD127	R34.34	PECy5.5	Beckman Coulter

IFN- γ	4S.B3	PE	eBioscience
Isotyp		PE	eBioscience
Annexin V		FITC	BD Pharmingen

3.1.7 Software

FACS Diva, BD Biosciences

Microsoft Excel

Microsoft Word

SPSS, Version 15.0

Endnote, Windows Version X

3.2 Studiendesign

3.2.1 Patienten

Die Patienten wurden über die MS-Sprechstunde rekrutiert und gescreent. Eine Patienteninformation wurde vorgelegt und in einem Informationsgespräch wurden die Probanden über den Ablauf und über die Ziele der Studie aufgeklärt. Bei Einverständnis zur Teilnahme erfolgte nach Unterschrift der Einschluss und die Basisuntersuchung. Die Pilotstudie war der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg vorgelegt und von dieser genehmigt worden.

Als Einschlusskriterien galten eine sichere Multiple Sklerose nach Poser-Kriterien (Poser et al., 1983), keine immunsuppressive Therapie in den letzten 3 Monaten, keine Steroide innerhalb der letzten 30 Tage. Als Ausschlusskriterien galten maligne Verlaufsformen, akute Exazerbationen, Asthmatherapie, psychiatrische Erkrankungen, die medikamentös behandelt werden, ein deutliches kognitives Defizit, bestehende Herzerkrankungen und Leberfunktionsstörungen, eine bekannte Allergie gegen Methylenblau, schwere Nierenfunktionsstörungen, Impfung mit Lebendimpfstoffen in den letzten 4 Wochen, Schwangerschaft und Stillzeit, Minderjährigkeit. Die internistischen und neurologischen Untersuchungen sowie die medikamentöse Betreuung erfolgte durch die MS-Ambulanz des Institutes für Neuroimmunologie und klinische Multiple Sklerose Forschung (INIMS).

Um mögliche Erwartungseffekte auf den Konditionierungsprozess auszuschließen, wurden die Probanden zwar über die Gabe des neuartigen Getränkes und der Placeboinfusion informiert, allerdings nicht über die Hypothesen der Studie. Dieses Vorgehen hatte sich in vorherigen Studien als günstig erwiesen (Goebel et al., 2002). Alle Patienten hatten während der Studienphase durchgehend zum gleichen Experimentator Kontakt. Die Untersuchungen wurden einfach-blind, placebokontrolliert bei MS Patienten, die seit mindestens einem Zyklus mit Mitoxantron behandelt wurden, durchgeführt.

Es wurden insgesamt 20 Patienten auf die Studie angesprochen, von denen 10 eingeschlossen wurden (fünf Frauen und fünf Männer). Von diesen 10 Probanden, hatten fünf eine SPMS, zwei eine PPMS, zwei eine RRMS und eine Patientin eine NMO (Neuromyelitis Optica). Das mittlere Alter der Patienten betrug 46 Jahre (+/- 12,67; Bandbreite: 29-64 Jahre), der mittlere EDSS 5,6 (+/- 1,61; Bandbreite: 2,5-8,0), die mittlere Krankheitsdauer 8,3 Jahre (+/- 4,16; Bandbreite: 3-18 Jahre) und

die mittlere Anzahl an Mitoxantrongaben vor Beginn der Studie lag bei 4,6 (+/- 2,37; Bandbreite 2-8). Eine Patientin brach die Studie vorzeitig ab.

3.2.2 Der konditionierte Stimulus (CS)

In zahlreichen Tierexperimenten hat sich die Konditionierung mit einer für das Tier neuartigen Substanz als konditionierter Stimulus etabliert (Exton et al., 1998b). Diese erfolgreichen Versuche und das bereits erprobte Konditionierungsprotokoll beim Menschen (Goebel et al., 2002) bilden die Grundlage für das Geschmacksaversionsparadigma. Der konditionierte Stimulus (CS), das neuartige Getränk, bestand aus 150 ml aromatisierter Milch mit Lavendel, um einen möglichst neuartig und ungewöhnlich schmeckenden Reiz zu erzeugen. Zur optischen Entfremdung färbten wir das Gemisch mit blauer Lebensmittelfarbe an.



Abbildung 4: der konditionierte Stimulus, das blaugefärbte Lavendelgetränk

3.2.3 Mitoxantron als unkonditionierter Stimulus vs. Placebo

Bei dem Placebo handelt es sich um Methylenblau, ein Medikament, das bei toxischen Methämoglobinämien zugelassen ist. In therapeutischen Dosierungen von 1mg/kg KG kann es Hämolysen induzieren. Die Anwendung von Methylenblau als Placebo von MX ist im Rahmen der MIMS-Studie beschrieben worden (Hartung et al., 2002) und hat sich mit der Dosierung von 3mg/5mL pro Infusion als verträglich erwiesen. In derselben Dosierung wurde Methylenblau in dieser Studie eingesetzt.

Die Herstellung der Methylenblauinfusion erfolgt in der Apotheke des Universitätsklinikum Eppendorf Hamburg (UKE).



Abbildung 5: Mitoxantroninfusion

3.2.4 Studienablauf

Die Studie fand innerhalb von zwei Behandlungszyklen an jeweils drei Tagen statt. Am ersten Tag wurde vor dem Beginn der ersten Mitoxantroninfusion zur Erhebung der Baseline eine Blutentnahme durchgeführt. Zusätzlich wurden die Patienten zu Ihrem subjektiven Befinden befragt. Anschließend erhielten die Patienten den CS (das blaugefärbte Lavendelgetränk), gefolgt von einer Standardinfusion Mitoxantron (Novantron®). Die weiteren Blutentnahmen erfolgten eine Stunde und 14 Tage nach der Infusion.

Nach 90 Tagen erhielten die Patienten den zweiten Behandlungszyklus in Form des CS (neuartiges Getränk), diesmal zusammen mit einer identisch aussehenden Placeboinfusion (Methylenblau, 3mg/15mL). Nach 14 Tagen wurde erneut CS gefolgt von Mitoxantron appliziert. Die Blutabnahmen erfolgten entsprechend dem ersten Behandlungszyklus der Studie. Die zweite und dritte Infusion erfolgte mit einem Abstand von zwei Wochen, um sicherzugehen, dass die Patienten die notwendige und therapeutisch wirksame Medikation innerhalb dieser Zeit erhalten.

Die Studie wurde einfach-blind durchgeführt, so dass die Patienten blind gegenüber den Behandlungsbedingungen waren. Sie wurden darüber informiert, dass sie zwei

Infusionen innerhalb von 14 Tagen erhalten, wovon eine die Placeboinfusion sein wird.

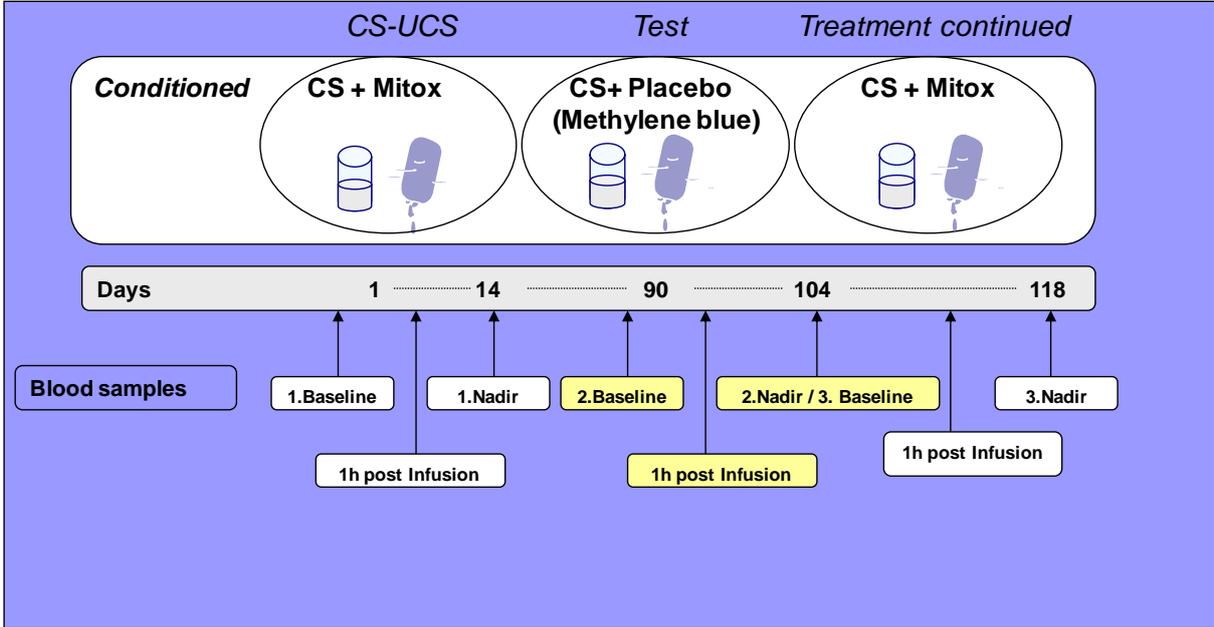


Abbildung 6: Studienablauf

3.3 Psychologische Parameter

3.3.1 Subjektive Beurteilung des Getränkes

In Anlehnung an das bereits erprobte Konditionierungsprotokoll beim Menschen (Goebel et al., 2002) wurde eine im Rahmen der Konditionierung auftretende Geschmacksaversion jeweils nach der Einnahme des Getränkes mittels eines Fragebogens nach den Kriterien Geruch, Geschmack und Neuartigkeit auf einer 9-stufigen Skala beurteilt.

3.3.2 Subjektives Befinden/ Nebenwirkungen

Die subjektiven Befindlichkeiten wurden mittels visueller Analogskalen erfasst, so dass ein Vergleich zwischen den Effekten nach Mitoxantroninfusion und denen nach Reexposition mit dem CS und Methylenblauinfusion möglich ist.

3.3.3 Subjektives Einschätzen der Placeboinfusion

Nach Beendigung der Studie wurden die Patienten nach ihrer subjektiven Einschätzung befragt, welches der drei Infusionen das Scheinmedikament gewesen ist.

3.4 Immunologische Parameter

3.4.1 Differentialblutbilder

3 ml venöses EDTA-Blut diente der Bestimmung der absoluten Leukozytenzahlen und des Differentialblutbildes. Die Zählung der Leukozyten erfolgte im hämatologischen Labor im Institut für klinische Chemie am UKE.

3.4.2 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen

Für die Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut ist die Fraktionierung von humanem Blut mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt worden. Die Patientenproben (18 ml pro Probe) wurden als Erstes 1:3 mit PBS verdünnt und die Blutsuspension vorsichtig auf Ficoll, eine iso-osmotische Dichtebarrriere, aufgeschichtet. Die Gradienten wurden bei 2000 rpm und bei 20°C für 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Während der Zentrifugation werden Zellen hoher Dichte wie Erythrozyten und Granulozyten entlang des Gradienten transportiert und sammeln sich auf dem Boden des Falcon-Röhrchens als Pellet an, während periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) aufgrund ihrer geringeren Dichte an der Oberfläche des Gradienten als milchige Interphase zwischen Ficoll und der obersten Schicht, dem gelblichem Serum, verbleiben. Die Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 1800 rpm und 4°C für 10 Minuten gewaschen. Das Pellet wurde in 50 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten, 4°C). Anschließend wurden die Zellen für die weitere Verarbeitung in 1 ml X-vivo15 resuspendiert und die Zellzahl ermittelt.

3.4.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 10 µl der Zellsuspension einer vorher gut durchmischten Probe entnommen und mit TURCKS-Lösung 1:10 verdünnt und mittels einer Pipette in die Zählkammer gegeben und die Zellen bei 20-facher Vergrößerung gezählt. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus vier Großquadranten (à 16 Kästchen), von denen jedes ein Volumen von 0,1 µl aufweist. Die Bestimmung erfolgte durch Auszählung und Mittelwertbildung der vier Großquadrate der Zählkammer. Die Anzahl der Zellen wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem

Kammerfaktor (10^4) multipliziert. Die Zellzahlermittlung setzte sich folgendermaßen zusammen:

$$\text{Zellzahl/ml Zellsuspension} = \text{Zellzahl} * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.4.4 Einfrieren und Auftauen von PBMCs

Zum Einfrieren der PBMCs wurden die Zellen in Einfriermedium 1 (90% RPMI + 10% FCS) und Einfriermedium 2 (40% RPMI, 40% FCS + 20% DMSO) jeweils zu gleichen Anteilen zügig resuspendiert, in Kryoröhrchen transferiert und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren. Nach 24h wurden die Kryoröhrchen gelagert und anschließend bei -180°C in Flüssigstickstoff überführt.

Zum Auftauen von Zellen wurde das Kryoröhrchen nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter in 37°C warmem Wasser geschwenkt, bis die Zellsuspension gerade aufgetaut war. Um die intrazelluläre DMSO Konzentration langsam abzusenken, wurde die Zellsuspension erst in 500 μl Schritten in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit kaltem PBS auf ein Volumen von 3-5 ml versetzt, dann in 1 ml Schritten bis auf ein Volumen von 10 ml und schließlich in 2 ml Schritten bis ein Endvolumen von 20 ml erreicht war. Die Zellen wurden bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 300 μl 90% RPMI + 10% FCS resuspendiert und nach Zählung auf Eis gelagert.

3.4.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Phänotypisierung von Zellen. Mittels monoklonaler Antikörper, an die Fluorochrome gekoppelt sind, kann die Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche und in der Zelle untersucht werden. Im Durchflußzytometer passieren die Zellen den gebündelten Strahl von monochromatischen Laserstrahlen, wobei standardmäßig im verwendeten LSRII drei Laser von unterschiedlicher Wellenlänge vorhanden sind. Sie werden als violetter (UV-Laser, 405 nm Wellenlänge), blauer (Argonlaser, 488 nm Wellenlänge) und roter (He/Ne-Laser, 633 nm Wellenlänge) Laser bezeichnet. Hierdurch ist es möglich mit acht Fluoreszenzen gleichzeitig zu messen. Es werden hierbei Fluorochrome angeregt. Die Messung der Fluoreszenzintensität unterschiedlicher Wellenlängen erfolgt durch Photodetektoren und Bandpassfilter, die in der Lage sind das spezifische Streulicht zu messen. Anhand dieser Streuimpulse lassen sich die

einzelnen Subpopulationen eingrenzen. Das Setzen von elektronischen Analysefenstern („gates“) ermöglicht eine Analyse der Fluoreszenzintensitäten verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe spezifischer Zellpopulationen. Das um 90° reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter= SSC) gemessen und ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Das in geringem Winkel (3°-10°) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (forward light scatter= FSC) definiert und korreliert mit der Zellgröße. Alle dargestellten Messungen wurden mit einem FACS LSRII durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-DIVA Software. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in 3.1.5 zusammengefasst.

3.4.6 Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen

Für eine Färbung von Zelloberflächenmolekülen aus Vollblut wurden als Erstes Antikörper-Mischungen hergestellt und als Cocktails vorab getestet. Dann wurden jeweils 50 µl Blut mit den entsprechenden Antikörper-Cocktails (siehe Tabelle 2) versetzt, gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer hinzugegeben und die Zellen für 10 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten, RT) und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch gemessen. Die untersuchten Populationen waren die T-Zellen (CD3) mit Unterteilung in T-Helfer-Zellen (CD3; CD4) und zytotoxische T-Zellen (CD3; CD8), sowie die Gruppe der NK (CD56), NKT (CD3, CD56), B-Zellen (CD19), Monozyten (CD14) und Granulozyten (CD16). Mittels CD45RO und CD27 ist eine Differenzierung von T-Zellen in Naive-, Effektor- und Gedächtniszellen möglich (Koch et al., 2008). Mit Hilfe des Differentialblutbildes lassen sich die durchflusszytometrischen Angaben zur relativen Verteilung der Zellpopulationen als absolute Zahlen darstellen.

Tabelle 2: Antikörper-Cocktails für die Oberflächen FACS Färbung

Tube	PacBlue	FITC Alexa 488	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC Alexa 647	APC-Cy7 Alexa 750
1. Unstained							
2. Subsets	CD14	CD19	CD56	CD3	CD45		CD16
3. T cells	CD8	CD45RO	CD25	CD3		CD4	CD27

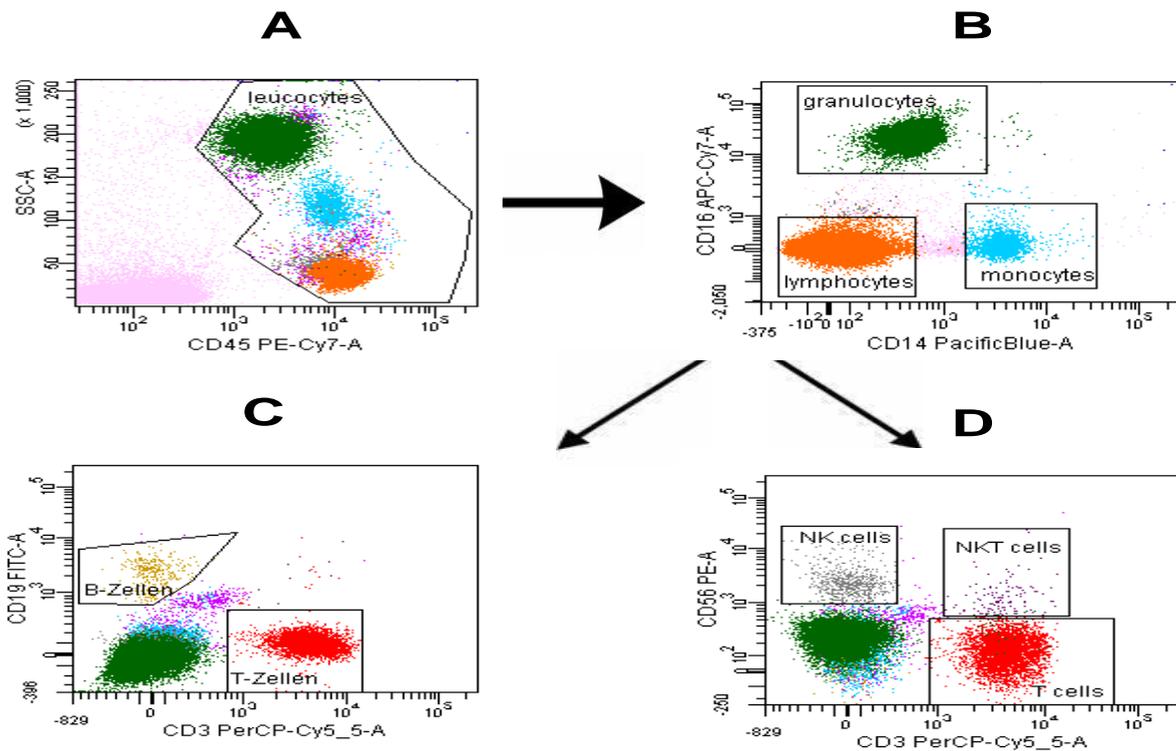


Abbildung 7: Oberflächen-FACS Färbung mit Darstellung aller Leukozyten (A), Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten (B), T- und B-Lymphozyten (C), NK- und NKT-Zellen (D).

3.4.7 Detektion apoptotischer Zellen mittels Annexin V

Für die Detektion früh apoptotischer Zellen wird die Tatsache genutzt, dass Phosphatidylserin (PS) im Frühstadium der Apoptose von der Zellinnenseite auf die Außenseite transloziert wird. Annexin-V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität an PS zu binden und ist deswegen zur Detektion apoptotischer Zellen in Zellgemischen geeignet. Durch Markierung von Zellen mit FITC-Annexin V kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen.

Aufgetaute PBMCs wurden in X-vivo15 aufgenommen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten, RT). Die Zellen wurden in 100 μl FACS-Puffer aufgenommen und mit 10 μl der entsprechenden monoklonalen Antikörper gegen die Oberflächenantigene markiert (CD20 und CD3). Nach einem zweimaligem Waschvorgang mit kaltem PBS wurde das Pellet in Annexin-Bindungspuffer aufgenommen, wovon Zellen abgenommen und in ein anderes Röhrchen überführt wurden. Diese wurden mit Annexin-FITC gefärbt und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Inkubation wurde ohne Waschen Annexin-Bindungspuffer zugegeben und schließlich mittels Durchflusszytometrie gemessen.

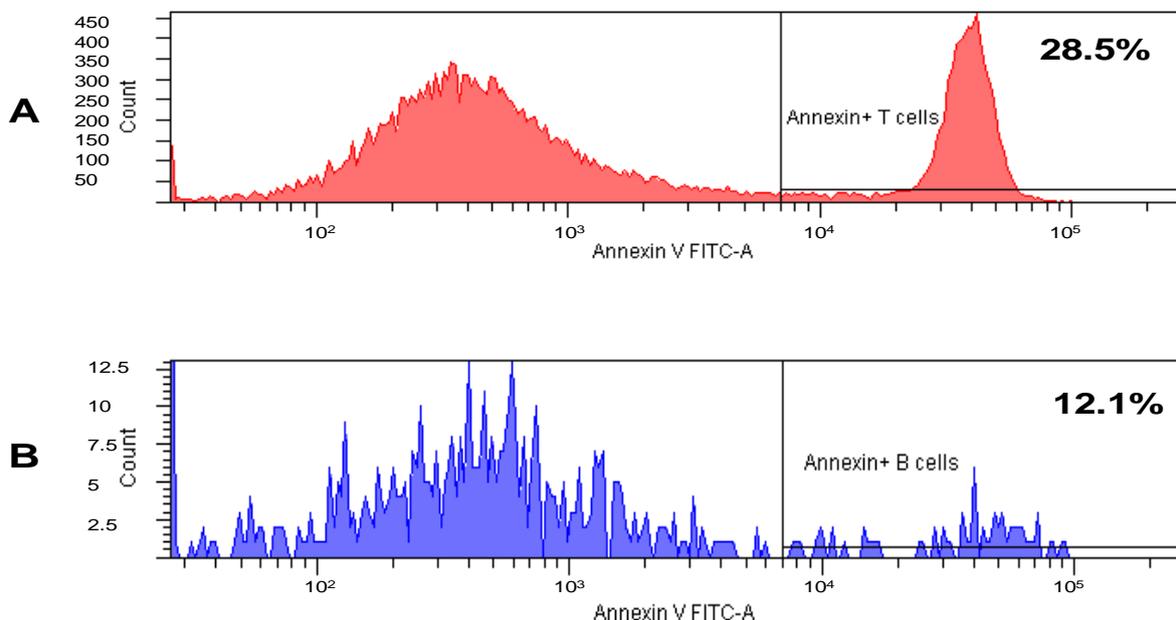


Abbildung 8: Annexin Färbung mit Darstellung der Apoptoserarten von T-Lymphozyten (A) und B- Lymphozyten (B).

3.4.8 Bestimmung der IFN- γ Produktion von T-Lymphozyten

Nach der in 3.4.2 beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation wurden 1×10^5 – 1×10^6 Zellen in 200 μ l X-vivo15 resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 50 ng/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA, Sigma) und 1 μ g/ml Ionomycin (Sigma) stimuliert und 1h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Um die Sekretion der intrazellulär gemessenen Zytokine zu verhindern, wurde der intrazelluläre Proteintransport mittels Zugabe von 10 μ g/ml Brefeldin A (BFA) nach einer Stunde blockiert. BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen in den Zellen. Der Zellansatz wurde für weitere 5h im Brutschrank aufbewahrt. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml PBS bei 1500 rpm für 5 Minuten gewaschen, mit 100 μ l Fixierungslösung bearbeitet und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Fixierung ist Voraussetzung für die nachfolgende Permeabilisierung und soll das exprimierte Antigen über einen längeren Zeitraum stabil und dadurch den Antigenverlust möglichst gering halten. Damit die Antikörper ins Zellinnere gelangen können, wurden die Zellen in 1 ml Permeabilisierungspuffer (1:10) resuspendiert und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Schließlich wurden die Zellen mit 10 μ l der entsprechenden monoklonalen Antikörper gegen Zytokine (IFN γ -PE) und Oberflächenantigene (CD4 - PB, CD8-FITC) markiert und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Als Kontrolle für IFN- γ wurde Isotyp-PE verwendet. Nach einem letzten Waschvorgang mit 1 ml Permeabilisierungspuffer bei 1500 rpm für 5 Minuten wurden die Zellen in PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch gemessen.

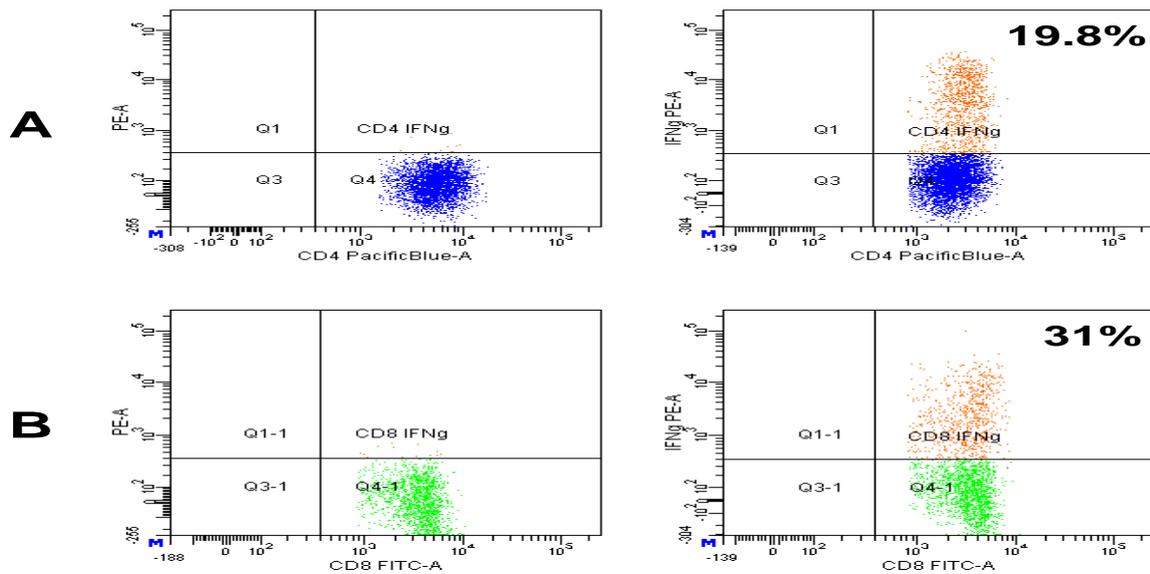


Abbildung 9: Intrazelluläre Zytokinfärbung mit Darstellung der IFN- γ Produktion rechts und der Isotyp Kontrolle links von CD4 **(A)** und CD8 **(B)** T-Zellen.

3.4.9 Proliferationsraten von T-Lymphozyten

Mit der Färbung von Zellen mit dem Molekül Carboxyfluorescein succinimidyl ester= CFSE lässt sich die Proliferation der T-Zellen in der FACS-Analyse nachweisen. CFSE bindet zytoplasmatische Strukturen und wird während der Zellkultur nicht ausgeschieden. Zusätzlich führt die Färbung mit CFSE dazu, dass jede Zelle bei der Zellteilung gleichmäßig an beide Tochterzellen weitergegeben wird. Da diese Substanz fluoreszierende Eigenschaften hat, kann mittels der Durchflusszytometrie über die Farbintensität indirekt darauf geschlossen werden, wie viele Zellteilungen eine Zelle in einer Kultur hinter sich hat.

Bei den folgenden Versuchen kam CFDA-SE (Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester) zur Anwendung, da es zelldurchlässiger ist als CFSE.

Aufgetaute PBMCs (siehe 3.4.4) wurden mit CFDA-SE 0,5 μ M markiert und für 10 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Blockung der Zellen erfolgte mit 500 μ l RPMI /15% FCS. Die Zellen wurden drei Mal mit 1 ml RPMI /10% FCS bei 1500 rpm und 4°C für 5 Minuten gewaschen und anschließend die Zellzahl ermittelt (siehe 3.4.3). Die Zellen wurden in eine 96 Lochplatte aufgenommen und mit unterschiedlichen Stimuli (siehe 3.1.6) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für vier Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und schließlich mit den entsprechenden Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch gemessen.

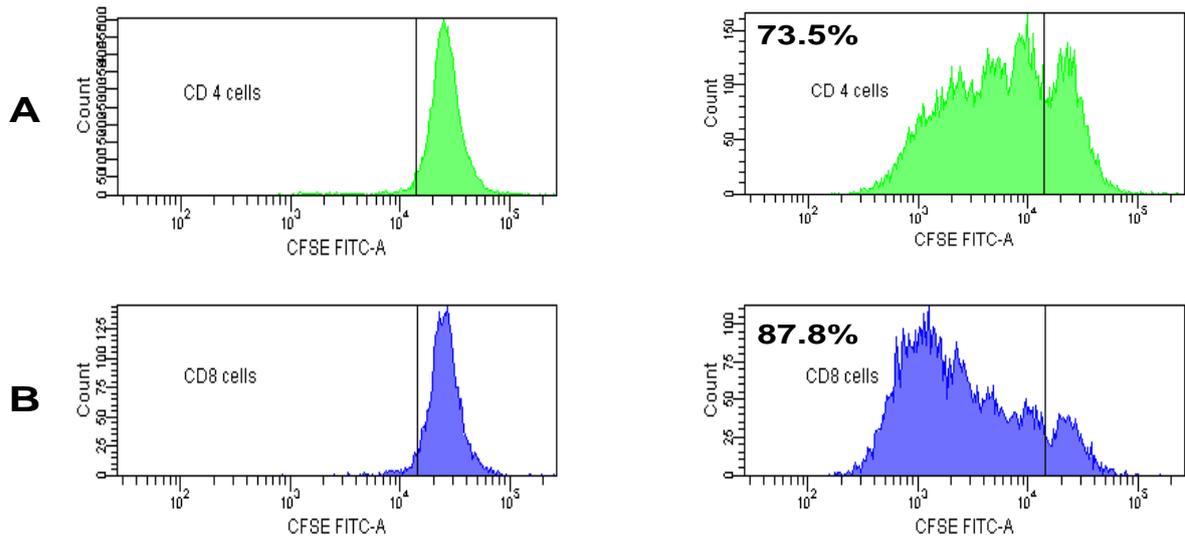


Abbildung 10: Proliferation von CD4 **(A)** und CD8 **(B)** T-Zellen mittels CFSE Färbung nach Stimulation mit OKT-3 (0,1µg/ml) rechts und unstimuliert links.

3.5 Statistische Auswertung

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Computerprogramms Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Version 15.0). Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden die einzelnen Parameter auf eine Normalverteilung geprüft. Bei Erfüllung einer Normalverteilung wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt. Als Vergleich von gepaarten Stichproben bei parametrischen Tests wurde der t-Test für verbundene Stichproben eingesetzt. Bei allen Berechnungen wurde das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,05$ festgesetzt, wobei eine α -Adjustierung nach Bonferroni aufgrund der 3 Vergleichszeitpunkte vorgenommen wurde ($p \leq 0.017$). Bei nicht-parametrischer Testung wurde der Friedman Test angewandt.

Als relevanter Beleg eines Konditionierungseffektes wurde eine Veränderung immunologischer Parameter unter Placebogabe analog zu denen des MX zumindest im Bereich von 30% angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Psychologische Parameter

4.1.1 Subjektive Beurteilung des konditionierten Stimulus

Die Probanden beurteilten das neuartige Getränk nach jeder Einnahme zu den Qualitäten Geschmack, Geruch und Neuartigkeit auf einer 9-stufigen Skala. Nach Prüfung einer Normalverteilung mittels des Kolomogorv-Smirnov-Tests wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt. Für die Qualität Geschmack und weniger deutlich für die Qualität Geruch war über die Wochen hinweg, vor allem bei CS-Reexposition eine weniger positive Beurteilung aufweisbar. Der Parameter Geschmack und die Qualität Geruch erreichten jedoch keine signifikanten Werte. Bei der subjektiven Beurteilung des CS zu der Qualität Neuartigkeit ließ sich eine gering abfallende Toleranz gegen das neuartige Getränk bei CS-Reexposition erkennen, was ebenfalls nicht signifikant war (Tabelle 3).

Tabelle 3: Mittelwerte und (\pm SD) vor Konditionierung (MX1), nach der CS-UCS Paarung (Placebo) und nach CS-Reexposition (MX2) für die subjektive Beurteilung der Geschmacks- und Geruchsqualität sowie der subjektiven Neuartigkeit. (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen, $p \leq 0.017$ nach α - Adjustierung)

Qualität	MX1	Placebo	MX2	p-Wert
Geschmack	3.8 \pm 2.2	3.0 \pm 2.9	2.9 \pm 2.5	0.11
Geruch	4.1 \pm 2.5	4.8 \pm 2.6	3.8 \pm 2.2	0.52
Neuartigkeit	2.6 \pm 2.5	2.8 \pm 2.9	3.8 \pm 3.5	0.88

4.1.2 Subjektives Befinden/ Nebenwirkungen

Die subjektive Befindlichkeit der Patienten wurde 14 Tage nach jeder Infusion mittels visueller Analogskalen von 1 (= gar nicht zutreffend) bis 7 (= sehr stark zutreffend) erfasst. Die nicht-parametrische Testung erfolgte mittels des Friedmann-Testes.

Die Nebenwirkungen Übelkeit, Appetitlosigkeit, Müdigkeit, Kopfschmerzen und Missempfindungen wurden nach CS-Placebogabe tendenziell weniger häufig von den Patienten beklagt als nach CS-MX Gabe. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Die Schwäche als Nebenwirkung nach Mitoxantroninfusion trat

am häufigsten auf und wurde von den Patienten am meisten als belastend empfunden. Dieser Parameter wurde von den Probanden nach CS-Placebogabe deutlich seltener ($p = 0.02$) angegeben, als nach CS-MX Gabe. Nach der α -Adjustierung nach Bonferroni erreichte dies jedoch knapp das Signifikanzniveau nicht ($p \leq 0.017$ nach α -Adjustierung). Die weiteren Parameter (Erbrechen, Schwindel, Haarausfall, Harnwegsinfekt, Atemwegsinfektion, Schmerzen in der Brust, Beklemmung in der Brust, Atemnot, Durchfall, Verstopfung, Magenschmerzen, Blau-grüner Urin) wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten auf, da diese Parameter, unabhängig von der jeweiligen Infusion, insgesamt selten auftraten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Mittelwerte und (\pm SD) vor Konditionierung (MX1), nach der CS-UCS Paarung (Placebo) und nach CS-Reexposition (MX2) für die Beurteilung des subjektiven Befindens. (Nicht-parametrische Testung mittels des Friedman Testes, $p \leq 0.017$ nach α -Adjustierung, n.b.= nicht berechenbar)

Nebenwirkung	MX1	Placebo	MX2	p-Wert
Erbrechen	1.2 \pm 0,4	1.0 \pm 0	1.0 \pm 0	0.37
Kopfschmerzen	2.3 \pm 2.3	1.0 \pm 0	2.2 \pm 1.6	0.09
Schwindel	1.3 \pm 0.5	1.0 \pm 0	1.3 \pm 0.5	0.27
Haarausfall	1.2 \pm 0.4	1.0 \pm 0	1.0 \pm 0	0.37
Harnwegsinfekt	1.0 \pm 0	1.0 \pm 0	1.0 \pm 0	n.b.
Atemwegsinfekt	1.0 \pm 0	1.0 \pm 0	1.0 \pm 0	n.b.
Schmerzen in der Brust	1.2 \pm 0.4	1.0 \pm 0	1.0 \pm 1.6	0.61
Beklemmung in der Brust	1.2 \pm 0.4	1.0 \pm 0	1.8 \pm 2.0	0.61
Atemnot	1.5 \pm 1.2	1.0 \pm 0	1.0 \pm 0	0.37
Durchfall	1.0 \pm 0	1.0 \pm 0	1.7 \pm 1.6	0.37
Verstopfung	1.2 \pm 0.4	1.0 \pm 0	1.5 \pm 1.2	0.37
Magenschmerzen	2.0 \pm 1.5	1.0 \pm 0	2.0 \pm 1.7	0.23
Misempfindungen	3.0 \pm 2.8	1.0 \pm 0	1.8 \pm 2.0	0.1
Übelkeit	2.3 \pm 1.5	1.2 \pm 0.4	2.7 \pm 1.6	0.06
Appetitlosigkeit	2.5 \pm 2.3	1.2 \pm 0.4	2.7 \pm 1.9	0.18
Müdigkeit	2.8 \pm 2.6	1.3 \pm 0.5	2.3 \pm 1.0	0.14
Schwäche	4.2 \pm 2.6	1.3 \pm 0.5	2.3 \pm 1.2	0.02
Blau-grüner Urin	6.8 \pm 0.4	5.2 \pm 2.9	6.8 \pm 0.4	0.5

4.1.3 Subjektive Einschätzung der Placeboinfusion

Von den 9 Patienten, die diese Studie beendeten, schätzten 8 von ihnen die zweite Infusion als Scheinmedikament richtig ein. Grund hierfür war, dass sie kaum Nebenwirkungen (v.a. Übelkeit) nach der Placeboinfusion verspürten. Eine Patientin schwankte zwischen der zweiten und dritten Infusion, da sie nach beiden keine üblichen Nebenwirkungen (Haarausfall) hatte.

4.2 Immunologische Parameter

4.2.1 Leukozyten- und Leukozytensubpopulationen

Die aus dem Differentialblutbild gewonnenen Daten der absoluten Leukozytenzahlen und Leukozytensubpopulationen zeigten eine signifikante Reduktion der Gesamtleukozyten je 14 Tage nach der 1.MX- ($p < 0.001$) und nach der 2. Mitoxantrongabe ($p = 0.001$) gemessen anhand des t-Tests. Diese Reduktion betraf vorwiegend die neutrophilen Granulozyten (1. MX Gabe: $p < 0.001$, 2. MX Gabe: $p = 0.001$). Bei den Monozyten- und Lymphozytenzahlen war eine signifikante Reduktion 2 Wochen nach MX Gabe lediglich bei der 1.CS-MX Paarung (Monozyten: $p < 0.001$, Lymphozyten: $p = 0.008$), jedoch nicht nach der 2. CS-MX Paarung eingetreten (Monozyten: $p = 0.4$, Lymphozyten: $p = 0.92$). Zwei Wochen nach CS-Placebo Paarung war weder bei den absoluten Leukozytenzahlen noch bei den Leukozytensubpopulationen ein signifikanter Effekt nachweisbar (Leukozyten: $p = 0.25$, Granulozyten: $p = 0.22$, Monozyten: $p = 0.18$, Lymphozyten: $p = 0.65$). (Abbildung 11).

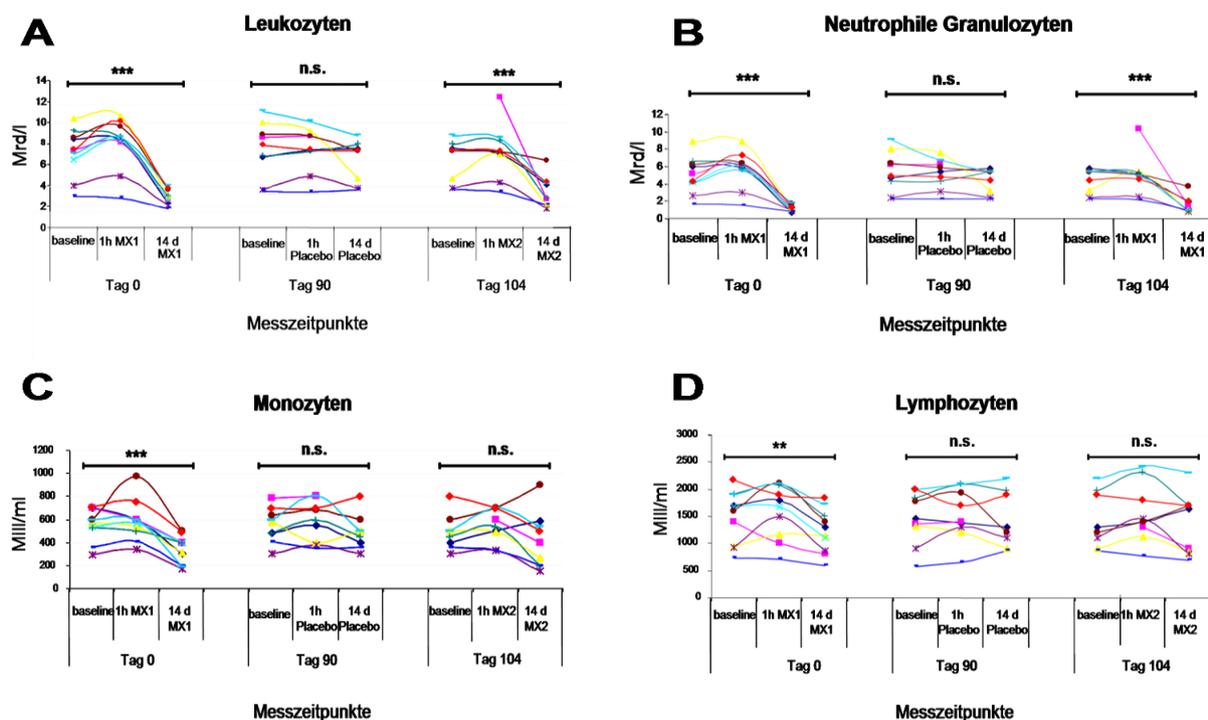


Abbildung 11: Darstellung der Gesamtleukozyten- **A**, Granulozyten- **B**, Monozyten- **C** und Lymphozytenzahlen **D** an Tag 0 (CS-MX1 Paarung), an Tag 90 (CS-Placebo Paarung) und an Tag 104 (CS-MX2 Paarung) der einzelnen Patienten (***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$, t-Test baseline und Tag 14, n.s. = nicht signifikant).

4.2.2 Lymphozytensubpopulationen

Die durchflusszytometrische Phänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen zeigte nach dem t-Test für die Subpopulationen von T-Zellen (CD3), T-Helferzellen (CD3, CD4), zytotoxischen T-Zellen (CD3, CD8), NK-Zellen (CD56), regulatorische T-Zellen (CD4, CD25) und im CD4/CD8 Ratio zu keinem Messzeitpunkt signifikante Veränderungen (Tabelle 5). Die einzige Subpopulation mit einem deutlichen Effekt waren die B-Zellen, die sowohl 14 Tage nach der 1. CS-MX Paarung ($p = 0.007$) als auch nach der 2. CS-MX Paarung ($p = 0.001$) signifikant reduziert waren. Nach CS-Placebo Paarung zeigte sich hingegen keine signifikante Veränderung ($p = 0.37$) (Abbildung 12).

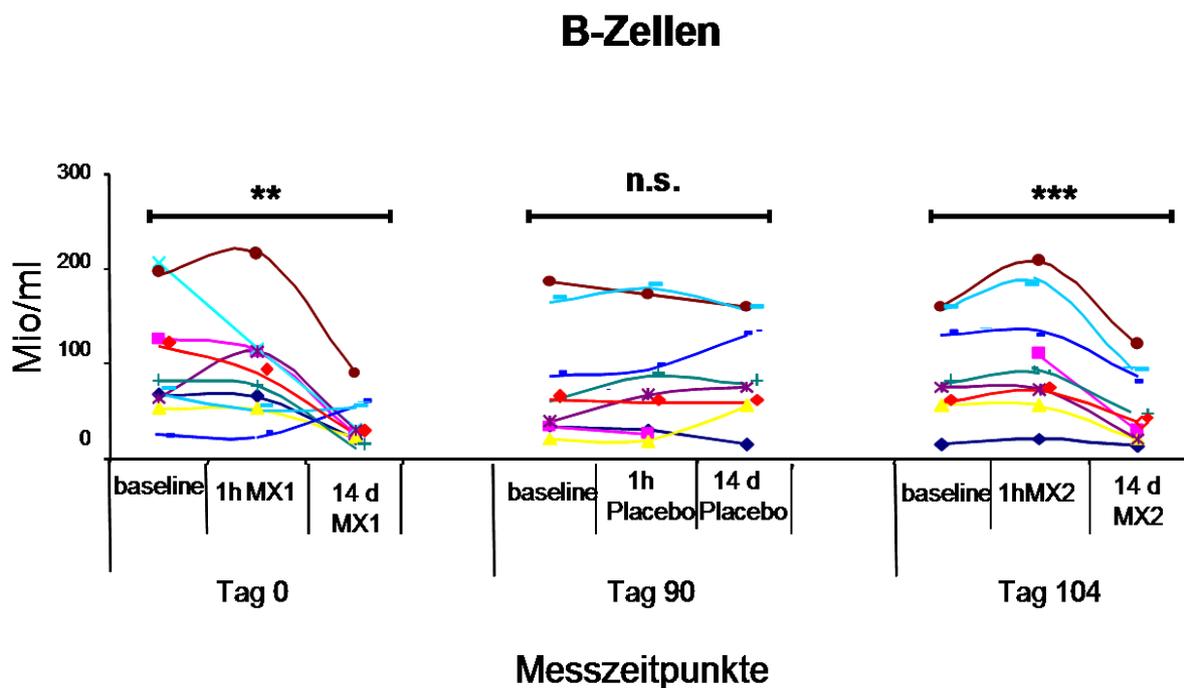


Abbildung 12: Darstellung der B-Lymphozyten an Tag 0 (CS-MX1 Paarung), an Tag 90 (CS-Placebo Paarung) und an Tag 104 (CS-MX2 Paarung) der einzelnen Patienten (***, $p \leq 0.001$, **, $p \leq 0.01$, t-Test baseline und Tag 14, n.s. = nicht signifikant).

Tabelle 5: Mittelwerte und (\pm SD) vor Konditionierung (MX1), nach der CS-UCS Paarung (Placebo) und nach CS-Reexposition (MX2) jeweils als Baseline, 1h, und 14 Tage nach der Infusion für B-Zellen, T-Zellen, NK Zellen, NK T-Zellen, T-Helferzellen, Zytotoxische T-Zellen, regulatorische T-Zellen und CD4/CD8 Ratio (***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$, t-Test baseline und Tag 14).

	MX1			Placebo			MX2	
	Baseline	1h MX1	14 d MX1	Baseline	1h Placebo	14 d Placebo/ Baseline MX2	1h MX2	14 d MX2
B- Zellen (Mio/ml)	84.8 \pm 52.6	86.9 \pm 60.6	** 38.9 \pm 26	82.2 \pm 62.1	89.2 \pm 60.6	91.5 \pm 52.2	105.5 \pm 65.7	*** 54.3 \pm 39.9
T- Zellen (Mio/ml)	1068.2 \pm 500.9	1025 \pm 464.8	1004.4 \pm 391.7	1227.2 \pm 658.8	1269.5 \pm 635.1	1102.1 \pm 546	1304.7 \pm 655.5	1123.7 \pm 619.8
NK Zellen (Mio/ml)	145.8 \pm 94.5	154.8 \pm 88.9	129.7 \pm 46.2	125.2 \pm 75	147.4 \pm 78.3	136.7 \pm 54.6	138.1 \pm 91	130.3 \pm 60.7
NK T-Zellen (Mio/ml)	59.4 \pm 39.1	56.8 \pm 38.4	60.1 \pm 40.1	69.5 \pm 76	81 \pm 78	76.7 \pm 60.3	87.7 \pm 68.8	63.3 \pm 50.1
T- Helferzellen (%)	57.4 \pm 5.8	56.4 \pm 4.2	55.3 \pm 8.4	54.3 \pm 6.3	54 \pm 5.7	55.3 \pm 6.4	54.6 \pm 5.8	57.2 \pm 5.8
Zytotoxische T-Zellen (%)	32.2 \pm 4	31 \pm 7.4	35.5 \pm 7.4	32.5 \pm 6.1	33.4 \pm 6.3	32.1 \pm 5.2	32.2 \pm 4.7	33.7 \pm 5.5
Regulatorische T-Zellen (%)	3.8 \pm 1.5	4.8 \pm 2.4	4 \pm 2.1	6.4 \pm 3.3	5.4 \pm 3.8	4.4 \pm 1.6	4.8 \pm 2.2	3.3 \pm 1.5
CD4/CD8 ratio	1.8 \pm 0.4	2 \pm 0.7	1.7 \pm 0.6	1.7 \pm 0.4	1.7 \pm 0.4	1.8 \pm 0.5	1.8 \pm 0.4	1.8 \pm 0.4

4.2.3 Durchflusszytometrische Messung der apoptotischen T-Zellen mittels Annexin V

Die Ergebnisse für die Apoptoseraten von B- und T-Zellen mittels Annexin V Färbung erbrachten nach dem t-Test zu keinem Messzeitpunkt, weder nach der 1. und 2. CS-MX Paarung noch nach CS-Placebo Paarung, signifikante Veränderungen (Tabelle 6, Anhang, Seite 64).

4.2.4 Bestimmung der IFN- γ Produktion von T-Lymphozyten

Nach dem T-Test war die IFN- γ Produktion von T-Zellen, insbesondere der CD8 T-Zellen zwei Wochen nach der 1.MX Gabe signifikant reduziert ($p < 0.001$). Die CD4 T-Zellen zeigten zwar ebenfalls zwei Wochen nach der 1.MX Infusion einen Abfall der IFN- γ Produktion, diese erreichte jedoch mit $p = 0.019$ nach der α -Adjustierung nach Bonferroni knapp das Signifikanzniveau ($p \leq 0.017$) nicht.

Zwei Wochen nach der 2. MX- sowie nach der CS-Placebo Gabe blieben die Werte der IFN- γ Produktion von CD8- und CD4 T-Zellen konstant (Abbildung 14, Anhang, Seite 64).

4.2.5 T-Zellproliferation

Die Ergebnisse für die Proliferationsraten von CD4 und CD8 T-Lymphozyten nach dem t-Test zeigten zu keinem Messzeitpunkt nach Stimulation mit Superantigen signifikante Veränderungen.

Für OKT-3 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) waren eine Stunde nach der 1.MX Gabe deutlich reduzierte Proliferationsraten für CD4 ($p = 0.003$) und CD8 Zellen ($p = 0.008$) nachweisbar. Eine Stunde nach CS-Placebo Paarung und nach der 2.MX Infusion blieben die Proliferationsraten der T-Zellen hingegen nahezu konstant, bis auf eine Reduktion der CD4 Lymphozyten eine Stunde nach der 2.MX Gabe ($p = 0.022$), die jedoch nach der α -Adjustierung nach Bonferroni knapp die Signifikanz ($p \leq 0.017$) nicht erreichte.

Nach Stimulation mit OKT-3 in höherer Dosis (1 $\mu\text{g/ml}$), kam es lediglich zu einer signifikanten Proliferationsreduktion in CD4 T-Zellen eine Stunde nach der 1.MX Infusion ($p = 0.015$). Dieser Effekt war in den CD8 T-Zellen nicht nachweisbar. Auch erbrachte weder die CS-Placebo Paarung noch die 2.MX Gabe signifikante Veränderungen.

Zwei Wochen nach den jeweiligen Messungen wiesen die Proliferationsraten tendenziell eher einen Anstieg auf (siehe Abbildung 15, Anhang, Seite 65).

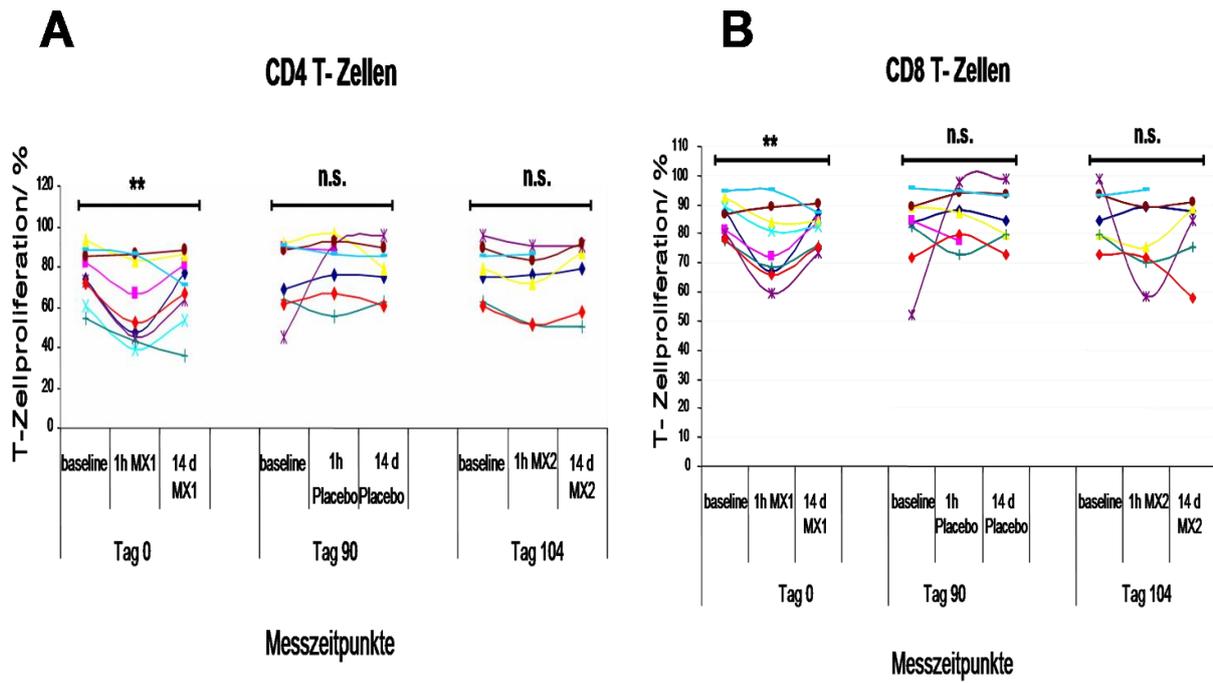


Abbildung 13: Darstellung der Proliferationsraten von CD4 T-Zellen (**A**) und CD8 T-Zellen (**B**) nach Stimulation mit OKT-3 (0.1µg/ml) (**, $p \leq 0.01$, t-Test baseline und nach 1h, n.s. = nicht signifikant).

5 Diskussion

Die klassische Konditionierung von Immunfunktionen konnte in zahlreichen tierexperimentellen Studien und bisher in einigen Humanversuchen belegt werden. Ziel dieser Pilotstudie war es, die Konditionierbarkeit der immunologischen Effekte von MX in der Therapie von MS Patienten zu prüfen, um eine Dosisreduktion zu erreichen und damit die schädigenden Nebenwirkungen dieses Zytostatikums (vor allem die Kardiotoxizität) zu senken. Mittels einer Placeboinfusion und einem neuartigem Geschmacksreiz gemäss der CTA wurde ein Konditionierungsparadigma aufgestellt.

Insgesamt war in unserer Studie –bis auf den deutlichen Abfall der Gesamtleukozyten, v.a. der neutrophilen Granulozyten,- nur ein geringer Effekt von MX auf das Immunsystem nachweisbar. Diese Tatsache bietet zusätzlich eine Einschränkung für die Konditionierungseffekte.

Im Folgendem werden die Mitoxantron- sowie die Konditionierungseffekte getrennt diskutiert.

Immunologische Effekte von Mitoxantron:

Der immunologische Effekt von MX wurde am nachdrücklichsten im Abfall der Gesamtleukozyten, vor allem der neutrophilen Granulozyten, 14 Tage nach MX Gabe deutlich. Auch die Mono- und Lymphozyten waren zwei Wochen nach MX Administration signifikant reduziert. Eine signifikante Reduktion der Gesamtleukozyten 14 Tage nach MX Gabe, vor allem betreffend die neutrophilen Granulozyten, wurde bei MS Patienten (n=20) bereits beschrieben (Gbadamosi et al., 2003).

Hingegen fanden sich in einer doppel-blinden Langzeitstudie mit PPMS Patienten (n=20, 12 Placebo, 8 MX) hinsichtlich des Differentialblutbildes keine wesentlichen Unterschiede in Lymphozyten-, Monozyten-, Neutrophilen-, und Granulozytenzahlen 12, 24 und 36 Wochen nach MX Infusion (Pelfrey et al., 2006).

Auch fand sich in einer anderen Langzeitstudie mit MS Patienten (n=20), die MX de novo erhielten nach drei und nach sechs Monaten keine Veränderungen bezüglich des Differentialblutbildes (Putzki et al., 2009). Eine Erklärung für diesen Effekt ist, dass der Abfall der Leukozytenzahlen nach MX Gabe eine akute Reaktion des Immunsystems ist, die innerhalb von zwei Wochen ihr Maximum erreicht, aber nach

12 und mehr Wochen nicht mehr nachzuweisen ist. Zudem waren die Fallzahlen der genannten Langzeitstudien von Pelfrey und Putzki klein.

In der Zulassungsstudie wurden 194 RRMS und SPMS Patienten über 24 Monate beobachtet und erhielten je nach Gruppenzugehörigkeit in drei Monatsabständen entweder eine Placeboinfusion oder eine MX Infusion (5 mg/m² vs. 12 mg/m²). Während in der Placebogruppe keine Leukopenien nachweisbar waren, fanden sich unter MX 5 mg/m² in 9% der Fälle Leukopenien und unter MX 12 mg/m² 19% Leukopenien bei MS Patienten (Hartung et al., 2002). In einer Laborkontrolle nach 36 Monaten war keine signifikante Leukopenie mehr nachweisbar.

Hinsichtlich der Lymphozytensubpopulationen waren die B-Zellen die einzige Population mit einem signifikanten Abfall nach MX Gabe.

In einer Vorarbeit fanden wir sowohl eine Woche, aber vor allem zwei Wochen nach MX Gabe, einen signifikanten Abfall der meisten Lymphozytensubpopulationen (B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, T-Helfer Zellen, zytotoxische T-Zellen, NK Zellen), ausgenommen naive und aktivierte T-Lymphozyten und dem CD4/CD8 Quotienten bei einer Versuchsgruppe von 20 MS Patienten. Die Langzeitstudie bei acht Patienten über 3-4 MX Zyklen (jeweils drei Monatsabstände) konnte einen persistierenden, signifikanten Abfall der B-Zellen sowie eine Reduktion der T-Zellen (ohne Signifikanz) nachweisen (Gbadamosi et al., 2003).

Bereits in den 1980ern wurde der suppressive Effekt von MX auf B-Lymphozyten beschrieben (Fidler et al., 1986a).

Auch Untersuchungen bei 20 Neuromyelitis Optica Patienten ergaben, dass MX vorzugsweise CD27 und CD19 Zellen angreift (Kim et al., 2011).

Langzeiteffekte hinsichtlich MX und einer signifikanten, persistierenden und selektiven Reduktion der B-Lymphozyten, teilweise über ein Jahr, sind mehrfach reproduziert worden (Gonsette and Demonty, 1990; Mauch et al., 1992; Putzki et al., 2009).

Eine Studie befasste sich mit den autoptischen Konzentrationen von MX in menschlichem Gewebe (Leber, Gehirn, Herz, Schilddrüse) bei 11 Krebspatienten die 10-272 Tage vor dem Tod MX (Dosis: 6-100 mg/m²) erhalten hatten. Interessanterweise war MX bei allen Patienten, sogar 272 Tage nach MX Administration noch nachweisbar (Stewart et al., 1986). Im Tumorgewebe fanden sich geringere Mitoxantronkonzentrationen, als in gesundem Gewebe.

Desweiteren wurde bei 16 Patienten mit Brustkrebs eine signifikante Reduktion von T-Suppressor Zellen, B-Lymphozyten und CD25 Zellen nach Administration von 14 mg/m² MX alle 3 Wochen detektiert. Die Raten für CD3, CD4, CD8, NK Zellen und dem CD4/CD8 Quotient waren jedoch nicht wesentlich beeinflusst (Barni et al., 1991). Hingegen ergaben durchflusszytometrische Oberflächenfärbungen von CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD45RO und weiteren Lymphozytensubpopulationen nach in vitro MX Gabe bei gesunden Probanden, unbehandelten MS Patienten und mit Interferon-β behandelten MS Patienten keine wesentlichen Unterschiede (Neuhaus et al., 2005).

Auch die Arbeitsgruppe von Pelfrey konnte bei PPMS Patienten keine signifikanten Kurzzeit- (Woche 12) und Langzeiteffekte (bis zu Woche 36) hinsichtlich CD4, CD8 und CD14 positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie erfassen (Pelfrey et al., 2006).

Die Apoptoseraten von B- und T-Zellen erbrachten zu keinem Zeitpunkt, weder nach Verumgabe noch nach Konditionierung signifikante Veränderungen.

Der Nachweis von Annexin V als Indikator der Apoptose ist vielfach beschrieben (van Engeland et al., 1998).

In einer in vitro Studie wurden MX dosisabhängige Apoptoseraten vor allem der Monozyten, aber auch der Lymphozyten mittels Annexin V gemessen (Neuhaus et al., 2005).

In einer ex vivo Untersuchung mit Annexin V bei 46 MS Patienten waren bereits eine Stunde nach MX Administration bei 37/52 Proben spät apoptotische sowie nekrotische Zellen bevorzugt in CD19-Zellen und etwas weniger in CD8 Zellen detektierbar. Der deutlichste Effekt war bei Patienten mit RRMS nachweisbar. Nachdem vier dieser Patienten weiter beobachtet wurden, wurde eine noch höhere Apoptoserate der Zellen zwei Wochen nach MX Gabe festgestellt (Chan et al., 2005). Hingegen fanden sich in einer anderen Studie (n= 23) eine Stunde nach MX Gabe Apoptose in Annexin V markierten Zellen in 19/23 MS Patienten, jedoch ohne Präferenz bezüglich der Subpopulationen (Weilbach et al., 2002).

Der zytotoxische Effekt von MX, der unter anderem Apoptose induziert, konnte in vitro auch bei Leukämie Patienten mittels DNA Fragmentation gezeigt werden (Bellosillo et al., 1998; Bhalla et al., 1993).

Insgesamt ist zu erwähnen, dass die Annexin V Färbung zur Detektion apoptotischer Zellen ein sehr sensitives Verfahren ist, dessen Ergebnisse leicht durch die Umgebungsbedingungen beeinflusst werden können. Annexin V detektiert im Vergleich zu anderen Methoden (beispielsweise DNA-Fragmentation, oder Caspase Aktivierung), um einiges früher apoptotische oder frühapoptotische Zellen.

Neben unterschiedlich großen Kollektiven könnte dies auch ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse in unserer Arbeit im Gegensatz zu den genannten Vorarbeiten von Chan und auch von Weilbach sein. Zusammenfassend kann die Frage der Apoptoseinduktion durch Mitoxantron gegenwärtig nicht abschließend beantwortet werden.

Die IFN- γ Produktion der CD8 Lymphozyten war zwei Wochen nach MX Gabe signifikant reduziert. Die CD4 Zellen produzierten ebenfalls tendenziell (nicht signifikant) weniger IFN- γ .

Ex vivo Effekte von MX auf TNF- α produzierende TH1-Zellen und IL-10 produzierende TH2-Zellen in mit PHA stimulierter und unstimulierter Form zeigten lediglich eine signifikante Reduktion der stimulierten IL-10 Produktion, zwei Wochen nach MX Administration. Basales IL-10, sowie basales und stimuliertes TNF- α wiesen keine wesentlichen Veränderungen auf (Gbadamosi et al., 2003).

In einer anderen ex vivo Studie wurden die TH1-, TH2-, und TH17- Zytokine von CD4 und CD8 Zellen nach PHA Stimulation vor MX Gabe sowie 6,12 und 18 Tage nach MX Administration bestimmt. Es zeigte sich eine Erhöhung der TH2 produzierenden Zytokine (IL-4 und IL-5) in CD4 Zellen 18 Tage nach MX Therapie. Hingegen waren die IFN- γ -, TNF- α -, IL17-, und IL10 Produktion nach MX Gabe unbeeinflusst. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass MX eher die von Th2-Zellen produzierende Zytokine beeinflusst (Vogelgesang et al., 2010).

Einige Studien beschreiben eine Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α) vs. einer Erhöhung von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10) unter MX Therapie (Duddy et al., 2007).

Weitere in vitro Untersuchungen hinsichtlich IL-2 (Fidler et al., 1986b) und in vitro Studien bezüglich der IFN- γ und der IL-4 Produktion (Neuhaus et al., 2005) ergaben keinen wesentlichen Einfluß von MX auf die Zytokinproduktion.

Zusammenfassend ist der Einfluß von Mitoxantron auf die Produktion intrazellulärer Zytokine gering.

Die T-Zellproliferation in B- und T-Zellen nach Stimulation mit OKT-3 (0.1 µg/ml) war eine Stunde nach der 1.MX Gabe signifikant reduziert. Die Stimulation in höherer Dosis mit OKT-3 (1 µg/ml) erbrachte lediglich einen signifikanten Proliferationsabfall in CD4 T-Zellen. Aus dem derzeitigen Forschungsstand geht nicht hervor, warum die Wirkung von OKT-3 in niedrigerer Dosis (0.1 µg/ml) effektiver war, als in höherer Dosis (1 µg/ml). Weiterhin fällt auf, dass der nach der ersten MX Administration nachweisbare immunsuppressive Effekt nicht in dem Ausmaß nach der zweiten MX Gabe zu verzeichnen war. Da zwischen den beiden Gaben die Placeboinfusion mit Methylenblau erfolgte, stellt sich die Frage ob Methylenblau einen immunologischen Effekt besitzt. In der derzeitigen Studienlage sind jedoch Effekte auf das Immunsystem durch Methylenblau nicht beschrieben.

Nach Stimulation mit Superantigen waren zu keinem Messzeitpunkt signifikante Veränderungen nachweisbar.

In vitro Untersuchungen ergaben nach MX Gabe in verschiedenen Konzentrationen eine konzentrationsabhängige Proliferationsreduktion von stimulierten B- und T-Zellen nach Markierung mit (³H)-Thymidine (Neuhaus et al., 2005)(Chan et al., 2005; Fidler et al., 1986a).

Insgesamt konnte der immunsuppressive Effekt von MX mittels Reduktion von B- und T- Lymphozyten durch (³H)-Thymidine markierte Zellen bei MS Patienten bisher belegt werden. Ähnliche Ergebnisse bei mit CFSE markierten Zellen sind noch rar.

Immunkonditionierungseffekte:

In unserer Studie gelang die Immunkonditionierung nicht. Bei einer sehr geringen Fallzahl und einer Heterogenität des Patientenkollektives besteht insgesamt eine eingeschränkte Aussagekraft. Zudem erfolgten möglicherweise nur unzureichende Konditionierungsversuche, da bereits nach der ersten Konditionierung, die CS-UCS Paarung folgte, so dass ein Lernprozess nicht ausreichend gegeben war. Vorarbeiten verdeutlichen die Wirksamkeit eher eines längeren Lernprozesses mit mindestens 4 Kopplungen (Goebel et al., 2005; Goebel et al., 2002). Zusätzlich waren die Abstände zwischen den einzelnen Infusionen sehr groß, da die Mitoxantrontherapie im Drei-Monatsabstand erfolgt. Diese Intervalle waren aber notwendig, um eine Durchführung im Rahmen einer laufenden Mitoxantrontherapie zu ermöglichen.

Die CTA wurde über eine 9-stufige Skala zur subjektiven Beurteilung des CS hinsichtlich Geschmack, Geruch und Neuartigkeit geprüft. Bezüglich des Geschmacks war im Verlauf eine schlechtere Beurteilung (ohne Erreichen einer Signifikanz) nachweisbar, was auf eine Geschmacksaversion hindeutet. Der Parameter Geruch zeigte nur eine leicht schlechtere Bewertung im Verlauf. Die subjektive Neuartigkeit des Getränkes nahm während der Versuchsreihe ab, was darauf hinweist, dass sich die Patienten an das CS adaptieren.

Die CTA erwies sich bisher sowohl in tierexperimentellen Studien (Exton et al., 1998b) als auch in Humanversuchen (Goebel et al., 2002) als ein Prädiktor für eine erfolgreiche Konditionierung.

Bezüglich des subjektiven Befindens wurde Schwäche nach CS-UCS Paarung deutlich seltener von den Patienten beklagt als nach Verumgabe. Nach der α -Adjustierung nach Bonferroni erreichte dies jedoch knapp das Signifikanzniveau nicht. Die Nebenwirkungen Übelkeit, Appetitlosigkeit, Müdigkeit, Kopfschmerzen und Missempfindungen wurden nach CS-Placebogabe tendenziell weniger häufig von den Patienten beklagt als nach CS-MX Gabe. Die weiteren erfragten Nebenwirkungen wiesen während der Studie keine wesentlichen Veränderungen auf. Das Vorkommen von geringeren Nebenwirkungen nach Placebogabe im Vergleich zu MX wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Hartung et al., 2002). Hier war ein signifikant häufigeres Auftreten von Übelkeit, Haarausfall, Harnwegsinfektion, Menstruationsstörungen, Leukopenie sowie eine Erhöhung der γ -GT nach MX Gabe im Vergleich zur Placeboinfusion nachweisbar. Insgesamt war es bisher weder in Vorarbeiten noch in dieser Studie möglich, dass die Placeboinfusion die Medikamentennebenwirkungen in annäherndem Maße auslöste.

In einem doppel-blindem Konditionierungsversuch an MS Patienten mit CY (n=10) berichteten die Patienten über weniger Nebenwirkungen nach der CS Gabe vs. nach Verumgabe. Sechs Patienten hatten keine Übelkeit nach CS Gabe im Vergleich zur CY Administration. Vier Patienten bemerkten sowohl unter CS (in geringerem Ausmaß) als auch unter CY Übelkeit. Interessanterweise trat bei einem der Patienten, wo eine Immunkonditionierung nicht gelang unter CS Übelkeit auf. Das bedeutet, dass die Nebenwirkung konditioniert wurde und die Wirkung nicht. Gleichzeitig kam es bei drei Patienten zu einem Immunkonditionierungseffekt unter CS, aber ohne Übelkeit, so dass vermutet wurde dass die gastrointestinalen und immunologischen

Effekte möglicherweise sich unabhängig voneinander konditionieren lassen, auch wenn die Erklärung dieses Phänomens noch unklar ist.

CY wurde im Vergleich zu unserer Arbeit einerseits in kürzeren Abständen verabreicht, nämlich monatlich und andererseits fanden mehrere (mindestens vier) CS-UCS Kopplungen statt. Die Patienten wurden darüber informiert, dass eines der insgesamt sieben geplanten Zyklen eine sehr geringe Dosis CY sein würde. Der Begriff Placebo wurde bewusst nicht benutzt, weil man annahm, dass dies nachteilig und abwertend sein könnte. Der CS war ein Anis Getränk, was mit 10 mg CY gekoppelt wurde. Dies entspricht weniger als 1% der eigentlichen CY Dosis, so dass hierdurch alleine kein signifikanter Immuneffekt zu erwarten ist. In dieser Arbeit kam es bei acht von 10 Patinten zu einem erfolgreichen Immunkonditionierungseffekt. Von diesen Patienten waren nur zwei vorbehandelt mit CY, die restlichen erhielten CY de novo. Da von den zweien, die bereits mit CY vorbehandelt waren, einer keinen Immunkonditionierungseffekt aufwies und der andere nur einen geringen, wurde darüber diskutiert, ob eine Vorbehandlung mit CY ohne Paarung mit CS möglicherweise einen störenden Einfluß auf einen Konditionierungseffekt haben könnte. (Giang et al., 1996). Da die Fallzahl in dieser Arbeit zu klein ist, kann hierzu eine abschließende Antwort nicht gegeben werden. Ergänzend ist jedoch zu erwähnen, dass in unserer Studie alle Patienten mit MX vorbehandelt waren.

Aufgrund der geringeren Nebenwirkungen (vor allem bei nahezu fehlender Übelkeit) nach der Placebo- vs. nach Veruminfusion, schätzten fast alle Patienten in unserer Studie den Zeitpunkt der Placeboinfusion während der Studie, als richtig ein. So gesehen, erwarteten die Patienten durch die zweite Infusion (Placebo) keinen Effekt. Vorarbeiten verdeutlichen, dass die Erwartungshaltung der Patienten den Konditionierungseffekt maßgeblich beeinflussen (Pacheco-Lopez et al., 2006). Krebspatienten, die eine größere Erwartungshaltung und Sorge hatten unter Chemotherapie Übelkeit zu entwickeln, entwickelten tatsächlich bis zu fünf Mal häufiger Übelkeit (Roscoe et al., 2004).

Die Placebowirkung in Zusammenhang mit der Erwartungshaltung der Probanden wurde u.a. bei Schmerz (Amanzio and Benedetti, 1999; Linde et al., 2007), Morbus Parkinson (Benedetti et al., 2004; McRae et al., 2004), Sucht (Kokain) (Volkow et al., 2003) Raucherentwöhnungsprogramme (Dar et al., 2005) erfolgreich dargestellt.

Zusammenfassend ist also während eines Konditionierungsaparadigmas die Induktion von Nebenwirkungen durch die Placeboinfusion sowie die

Erwartungshaltung der Patienten ein Einflußfaktor für einen erfolgreichen Konditionierungseffekt. Dies erklärt ggfs. teilweise die nicht gelungene Konditionierung in dieser Studie.

Nach der Placeboinfusion war keine Reduktion der Lymphozytensubpopulationen, der Leukozyten- und der Leukozytensubpopulationen nachweisbar.

Im Bereich der Humankonditionierung wurde jedoch mit CY bei MS Patienten eine erfolgreiche Immunkonditionierung mit einem deutlichem Abfall der Gesamtleukozyten nach zuvoriger mindestens fünf maliger CS-UCS Paarung erzielt (Giang et al., 1996).

Auch die gesteigerte NK-Zellaktivität ließ sich in einer Humankonditionierungsstudie mittels des Geschmacksreizes eines Brausebonbons (CS) in Kombination mit einer Adrenalininjektion (UCS) erfolgreich konditionieren (Buske-Kirschbaum et al., 1992). Hingegen waren in einer anderen Humankonditionierungsstudie mit gesunden Probanden weder nach Konditionierung noch unter Verumgabe mit CysA signifikante Veränderungen hinsichtlich der Lymphozytensubpopulationen, der Leukozyten- und der Leukozytensubpopulationen nachweisbar (Goebel et al., 2002).

In tierexperimentellen Studien sind erfolgreiche Immunkonditionierungen hinsichtlich der Zahl der Gesamtleukozyten (Klosterhalfen and Klosterhalfen, 1987) der Lymphozytensubpopulationen (Husband et al., 1987) sowie der Aktivität der NK-Zellen (Ghanta et al., 1985) beschrieben.

Daher gibt es bisher wenige Belege für eine erfolgreiche Humanimmunkonditionierung hinsichtlich Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen nach ausreichender CS-UCS Paarung, noch weniger bei immunologischen Erkrankungen.

Die Apoptoseraten von B- und T-Zellen erbrachten zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen. Immunkonditionierungseffekte hinsichtlich apoptotischer Zellen sind unseres Erachtens derzeit noch nicht vorbeschrieben.

Die CS-Placebo Paarung erbrachte keinen wesentlichen Effekt auf die Zytokinproduktion.

In einer doppel-blinden Humankonditionierungsstudie mit gesunden Probanden (n = 34) war nach Konditionierung mit CysA und einem neuartig schmeckendem Getränk

eine erfolgreiche Immunkonditionierung im Sinne einer deutlichen, signifikanten intrazellulären Reduktion von IL-2 und IFN- γ in CD3⁺; CD3, CD4, und CD3, CD8 Zellen durchflusszytometrisch messbar (Goebel et al., 2002).

Tierexperimentelle Studien stellten erniedrigte Zytokinspiegel des Interleukin-2 sowohl intrazellulär als auch im Serum (Exton et al., 1998a; von Horsten et al., 1998) nach einer Immunkonditionierung dar.

Die Konditionierung hinsichtlich der gemessenen T-Zellproliferation mit CFSE markierten Zellen erreichte keine signifikanten Veränderungen, unabhängig von den eingesetzten Stimuli.

Hinsichtlich tierexperimenteller Studien sind erfolgreiche Konditionierungen der mitogeninduzierten Lymphozytenproliferation (Exton et al., 1998a) und der Reduktion der Proliferationsraten isolierter Lymphozyten (Kusnecov et al., 1983) beschrieben.

In Humanversuchen gibt es bisher eine humane Konditionierungsstudie, in der sich ein Konditionierungseffekt bei gesunden Probanden durch reduzierte Proliferationsraten sowohl nach CsA als auch nach Placebogabe nach Stimulation mit Con A belegen ließ. Die Stimulierung mit PHA erbrachte keine relevanten Veränderungen. Die Zellen wurden vorab mit (³H)-Thymidine versetzt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen (Goebel et al., 2002).

Fazit:

Insgesamt wird deutlich, dass der Hauptangriffspunkt von MX als Zytostatikum auf das Immunsystem vor allem die Leukozyten (v.a. Granulozyten) und die B-Lymphozyten betrifft. Die Effekte auf die Apoptose, Proliferation und Zytokinproduktion sind eher gering ausgeprägt und variieren in den verschiedenen bisher existierenden Forschungsarbeiten.

So gesehen sind die Effekte von MX auf das Immunsystem gering. Die Applikationsform von MX bei MS Patienten mit Therapie alle 3 Monate scheint eher nicht geeignete Effekte zu zeigen. Unter Umständen ist ein solches Konditionierungsparadigma bei MS Patienten unter einer anderen Therapie, wie beispielsweise Interferontherapie sinnvoll.

Dass sich auch Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden konditionieren lassen, wurde in einigen Arbeiten belegt (Giang et al., 1996, Stockhorst et al., 2007). Allerdings sind bisher durch Konditionierungsversuche schwere Nebenwirkungen des eigentlichen Medikamentes wie Leukämie oder Kardiotoxizität nicht konditionierbar gewesen.

6 Zusammenfassung

Das in der MS Behandlung zugelassene Medikament MX, ist ein Zytostatikum, das antiproliferativ wirkt und neben Übelkeit und Erbrechen eine signifikant kardiotoxische Wirkung hat, so dass eine Therapie in höheren Dosen nur bis zu 2-3 Jahre durchgeführt werden kann.

Vor diesem Hintergrund erscheint eine Reduktion der Medikamentendosis bei gleichzeitiger Maximierung des therapeutischen Benefits wünschenswert. Daher sollte in dieser Studie geprüft werden, ob sich die immunsuppressive Wirkung von Mitoxantron mittels der klassischen Konditionierung induzieren lässt, um eine Basis für einen möglichen Einsatz des Konditionierungsparadigmas als supportive Therapie bei der MS zu schaffen. Tierexperimentelle Studien belegen eine Vielzahl an erfolgreicher Immunkonditionierungen. Hingegen ist die humane Konditionierung von Immunfunktionen vor allem im klinischen Kontext noch wenig erforscht. Mittels der CTA wurde ein Konditionierungsparadigma aufgestellt.

Die Pilotstudie wurde einfach-blind, placebokontrolliert bei MS Patienten (n=9), die seit mindestens einem Zyklus mit MX behandelt waren, durchgeführt. Am ersten Tag erhielten die Patienten den CS (conditioned stimulus), ein neuartiges Getränk zusammen mit einer Standardinfusion Mitoxantron. 90 Tage später bekamen die Patienten den CS, diesmal zusammen mit einem identisch aussehendem Placebo (Methylenblau) dargeboten. Nach 14 Tagen wurde wieder CS zusammen mit der Standardinfusion Mitoxantron appliziert. Die Blutentnahmen erfolgten jeweils vor sowie eine Stunde und 14 Tage nach den Infusionen zur Bestimmung des Differentialblutbildes, der Lymphozytensubpopulationen, der Proliferations- und Apoptoseraten sowie der intrazellulären INF- γ Produktion mittels Durchflusszytometrie.

Insgesamt konnte in dieser Studie –bis auf den deutlichen Abfall der Gesamtleukozyten, v.a. der neutrophilen Granulozyten, 2 Wochen nach MX Gabe - nur ein geringer Effekt von MX auf das Immunsystem nachgewiesen werden. Eine Immunkonditionierung gelang nicht, vermutlich vor allem aufgrund zu weniger Kopplungen. Die Erwartungshaltung der Probanden ist eines der wichtigen Einflussfaktoren für eine erfolgreiche Konditionierung wie unter anderem auch in der Schmerztherapie und in der Placeboforschung belegt. Zudem konnten in der Vergangenheit auch Nebenwirkungen konditioniert werden. Insgesamt besteht weiterhin Forschungsbedarf, vor allem im Bereich der Humankonditionierung.

7 Anhang

4.2.3 Durchflusszytometrische Messung der apoptotischen T Zellen mittels Annexin V

Tabelle 6: Mittelwerte und (\pm SD) vor Konditionierung (MX1), nach der CS-UCS Paarung (Placebo) und nach CS-Reexposition (MX2) für die Detektion apoptotischer B- und T-Lymphozyten

	Baseline MX1	1h MX1	14 d MX1	Baseline Placebo	1h Placebo	14d Placebo/ Baseline MX2	1h MX2	14 d MX2
B-Zellen	8,2 \pm 3,0	8,4 \pm 3,4	10,2 \pm 4,5	9,1 \pm 3,1	10,7 \pm 3,3	12,6 \pm 2,8	10,5 \pm 3,9	11,3 \pm 6,3
T-Zellen	13,5 \pm 6,1	13,7 \pm 8,3	14,7 \pm 8,3	13,8 \pm 4,8	13,6 \pm 4,6	18,3 \pm 9,3	13,7 \pm 7,8	16,7 \pm 10,2

4.2.4 Bestimmung der IFN- γ Produktion von T-Lymphozyten

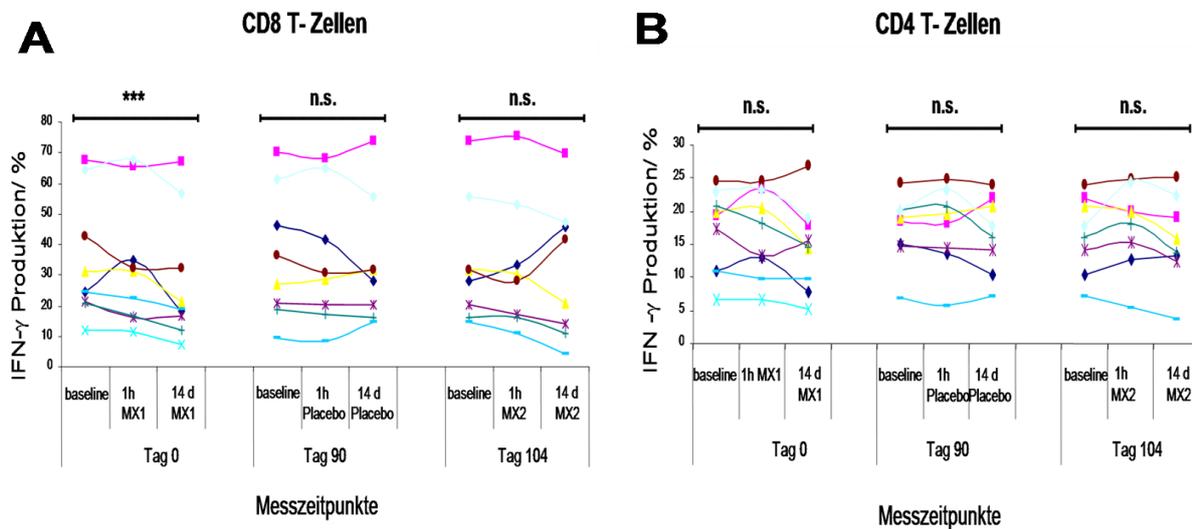


Abbildung 14: Darstellung der IFN- γ Produktion von CD8 **A** und CD4 T-Zellen **B** an Tag 0 (CS-MX1 Paarung), an Tag 90 (CS-Placebo Paarung) und an Tag 104 (CS-MX2 Paarung) der einzelnen Patienten (***, $p \leq 0.001$, t-Test baseline und Tag 14, n.s. = nicht signifikant).

4.2.5 T- Zellproliferation

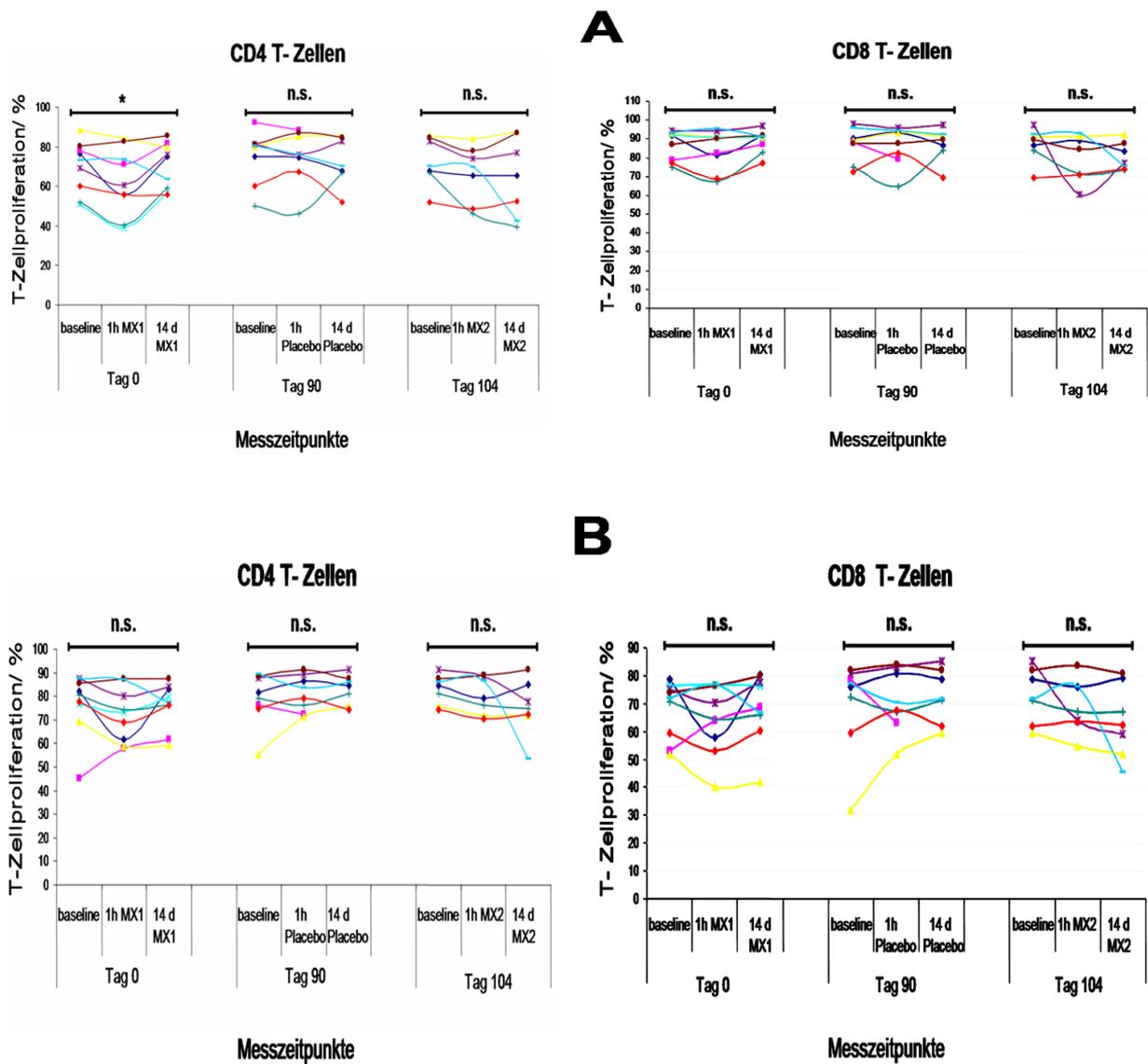


Abbildung 15: Darstellung der Proliferationsraten von CD8 Zellen (rechts) und CD4 Zellen (links) nach Stimulation mit OKT3 (1 μ g/ml) **A** und Superantigen (1 μ g/ml) **B** (*, $p \leq 0.017$ nach α - Adjustierung, t-Test baseline und nach 1h, n.s. = nicht signifikant).

8 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AIM	Antizipierte Immunmodulation (anticipatory immunmodulation)
ANV	Antizipatorische Übelkeit/Erbrechen (anticipatory nausea/vomitting)
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BFA	Brefeldin A
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	Cluster of differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CO ₂	Kohlendioxid
CR	Konditionierte Reaktion (conditioned response)
CS	Konditionierter Stimulus (conditioned stimulus)
CsA	Cyclosporin A
CTA	Geschmacksaversionsparadigma (conditioned taste aversion)
CY	Cyclophosphamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	Kontaktallergie vom verzögertem Typ (delayed type of hypersensitivity)
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (fluorescence activated cell sorter)
FCS	Fetal calf serum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward light scatter)
GvHR	Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (graft-versus-host reaction)
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (hypothalamus-pituitary-adrenal)
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus
HHV-6	Humanes-Herpes-Virus
HSCT	Autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation
IFN	Interferon

IL	Interleukin
INIMS	Institut für Neuroimmunologie und klinische Multiple Sklerose Forschung
IVIGs	Intravenöse Immunglobuline
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
LVEF	Linksventrikulären Ejektionsfraktion
MBP	Basisches Myelinprotein
MOG	Myelin oligodendroglia Glykoprotein
mRNA	Messenger ribonuclein acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MX	Mitoxantron
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMO	Neuromyelitis Optica
n.s.	nicht signifikant
PBMCs	Periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PHA	Phytohaemagglutinine
PLP	Proteolipidprotein
PMA	Phorbol 12-Myristat 13 Acetat
PML	Progressiv multifokale Leukenzephalopathie
Poly I:C	Polyinosinic: polycytidylic acid
PPMS	Primär chronische Multiple Sklerose (primary progressive multiple sclerosis)
PS	Phosphatidylserin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	Umdrehungen (rounds per minute)
RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (relapsing remitting multiple sclerosis)
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SPMS	Sekundär chronische Multiple Sklerose (secondary relapsing multiple sclerosis)

SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter)
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
UCR	Unkonditionierte Reaktion (unconditioned reaction)
UCS	Unkonditionierter Stimulus (unconditioned stimulus)
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf Hamburg
VZV	Varizella-Zoster-Virus
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

- Ader, R., Cohen, N., 1975. Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom Med* 37, 333-340.
- Ader, R., Cohen, N., 1982. Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science* 215, 1534-1536.
- Ader, R., Cohen, N., 2001. Conditioning and immunity. In: R. Ader, D.L. Felten, N. Cohen (Eds.): *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press, S. 3-34.
- Ader, R., Grotta, L.J., Cohen, N., 1987. Conditioning phenomena and immune function. *Ann N Y Acad Sci* 496, 532-544.
- Ader, R., Kelly, K., Moynihan, J.A., Grotta, L.J., Cohen, N., 1993. Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus. *Brain Behav Immun* 7, 334-343.
- Alvarez-Borda, B., Ramirez-Amaya, V., Perez-Montfort, R., Bermudez-Rattoni, F., 1995. Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiol Learn Mem* 64, 103-105.
- Amanzio, M., Benedetti, F., 1999. Neuropharmacological dissection of placebo analgesia: expectation-activated opioid systems versus conditioning-activated specific subsystems. *J Neurosci* 19, 484-494.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R., Rajewsky, K., 2000. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192, 393-404.
- Barni, S., Lissoni, P., Paolorossi, F., Rescaldani, R., Crispino, S., Archili, C., Cattaneo, G., Tancini, G., 1991. Mitoxantrone as a single agent in pretreated metastatic breast cancer: effects on T lymphocyte subsets and their relation to clinical response. *Tumori* 77, 227-231.
- Bellosillo, B., Colomer, D., Pons, G., Gil, J., 1998. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 100, 142-146.
- Belogurov, A.A., Jr., Kurkova, I.N., Friboulet, A., Thomas, D., Misikov, V.K., Zakharova, M.Y., Suchkov, S.V., Kotov, S.V., Alehin, A.I., Avalle, B., Souslova, E.A., Morse, H.C., 3rd, Gabibov, A.G., Ponomarenko, N.A., 2008. Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis. *J Immunol* 180, 1258-1267.
- Benedetti, F., Colloca, L., Torre, E., Lanotte, M., Melcarne, A., Pesare, M., Bergamasco, B., Lopiano, L., 2004. Placebo-responsive Parkinson patients show decreased activity in single neurons of subthalamic nucleus. *Nat Neurosci* 7, 587-588.
- Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8, 345-350.
- Bhalla, K., Ibrado, A.M., Tourkina, E., Tang, C., Grant, S., Bullock, G., Huang, Y., Ponnathpur, V., Mahoney, M.E., 1993. High-dose mitoxantrone induces programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Blood* 82, 3133-3140.
- Blanco, Y., Saiz, A., Carreras, E., Graus, F., 2005. Autologous haematopoietic-stem-cell transplantation for multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4, 54-63.
- Bovbjerg, D., Ader, R., Cohen, N., 1982. Behaviorally conditioned suppression of a graft-versus-host response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 583-585.
- Bovbjerg, D., Kim, Y.T., Siskind, G.W., Weksler, M.E., 1987. Conditioned suppression of plaque-forming cell responses with cyclophosphamide. The role of taste aversion. *Ann N Y Acad Sci* 496, 588-594.

- Bovbjerg, D.H., Montgomery, G.H., Raptis, G., 2005. Evidence for classically conditioned fatigue responses in patients receiving chemotherapy treatment for breast cancer. *J Behav Med* 28, 231-237.
- Bovbjerg, D.H., Redd, W.H., Jacobsen, P.B., Manne, S.L., Taylor, K.L., Surbone, A., Crown, J.P., Norton, L., Gilewski, T.A., Hudis, C.A., et al., 1992. An experimental analysis of classically conditioned nausea during cancer chemotherapy. *Psychosom Med* 54, 623-637.
- Brucklacher-Waldert, V., Stuerner, K., Kolster, M., Wolthausen, J., Tolosa, E., 2009. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 132, 3329-3341.
- Buljevac, D., Hop, W.C., Reedeker, W., Janssens, A.C., van der Meche, F.G., van Doorn, P.A., Hintzen, R.Q., 2003. Self reported stressful life events and exacerbations in multiple sclerosis: prospective study. *Bmj* 327, 646.
- Buske-Kirschbaum, A., Grotta, L., Kirschbaum, C., Bienen, T., Moynihan, J., Ader, R., Blair, M.L., Hellhammer, D.H., Felten, D.L., 1996. Conditioned increase in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) number and corticosterone secretion in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 55, 27-32.
- Buske-Kirschbaum, A., Kirschbaum, C., Stierle, H., Lehnert, H., Hellhammer, D., 1992. Conditioned increase of natural killer cell activity (NKCA) in humans. *Psychosom Med* 54, 123-132.
- Chan, A., Weilbach, F.X., Toyka, K.V., Gold, R., 2005. Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 139, 152-158.
- Charcot, M., 1868. Histologie de la sclerose en plaques. *Gaz Hop* 141, 554-555.
- Cohen, B.A., Mikol, D.D., 2004. Mitoxantrone treatment of multiple sclerosis: safety considerations. *Neurology* 63, S28-32.
- Cohen, N., Ader, R., Green, N., Bovbjerg, D., 1979. Conditioned suppression of a thymus-independent antibody response. *Psychosom Med* 41, 487-491.
- Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-1517.
- Compston, D.A., Batchelor, J.R., McDonald, W.I., 1976. B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. *Lancet* 2, 1261-1265.
- Dar, R., Stronguin, F., Etter, J.F., 2005. Assigned versus perceived placebo effects in nicotine replacement therapy for smoking reduction in Swiss smokers. *J Consult Clin Psychol* 73, 350-353.
- De Castro, S., Cartoni, D., Millefiorini, E., Funaro, S., Gasperini, C., Morino, S., Tallarico, D., Beni, S., 1995. Noninvasive assessment of mitoxantrone cardiotoxicity in relapsing remitting multiple sclerosis. *J Clin Pharmacol* 35, 627-632.
- De Isabella, P., Palumbo, M., Sissi, C., Capranico, G., Carenini, N., Menta, E., Oliva, A., Spinelli, S., Krapcho, A.P., Giuliani, F.C., et al., 1995. Topoisomerase II DNA cleavage stimulation, DNA binding activity, cytotoxicity, and physico-chemical properties of 2-aza- and 2-aza-oxide-anthracenedione derivatives. *Mol Pharmacol* 48, 30-38.
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., Bar-Or, A., 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 178, 6092-6099.
- Durelli, L., Conti, L., Clerico, M., Boselli, D., Contessa, G., Ripellino, P., Ferrero, B., Eid, P., Novelli, F., 2009. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol* 65, 499-509.
- Dyment, D.A., Ebers, G.C., Sadovnick, A.D., 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3, 104-110.

- Edan, G., Brochet, B., Clanet, M., 2001. Safety profile of mitoxantrone in a cohort of 800 multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis* 7, S14 (abstr).
- Edan, G., Miller, D., Clanet, M., Confavreux, C., Lyon-Caen, O., Lubetzki, C., Brochet, B., Berry, I., Rolland, Y., Froment, J.C., Cabanis, E., Iba-Zizen, M.T., Gandon, J.M., Lai, H.M., Moseley, I., Sabouraud, O., 1997. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62, 112-118.
- Exton, M.S., Gierse, C., Meier, B., Mosen, M., Xie, Y., Frede, S., Goebel, M.U., Limmroth, V., Schedlowski, M., 2002. Behaviorally conditioned immunosuppression in the rat is regulated via noradrenaline and beta-adrenoceptors. *J Neuroimmunol* 131, 21-30.
- Exton, M.S., Herklotz, J., Westermann, J., Schedlowski, M., 2001. Conditioning in the rat: an in vivo model to investigate the molecular mechanisms and clinical implications of brain-immune communication. *Immunol Rev* 184, 226-235.
- Exton, M.S., Schult, M., Donath, S., Strubel, T., Bode, U., del Rey, A., Westermann, J., Schedlowski, M., 1999. Conditioned immunosuppression makes subtherapeutic cyclosporin effective via splenic innervation. *Am J Physiol* 276, R1710-1717.
- Exton, M.S., von Auer, A.K., Buske-Kirschbaum, A., Stockhorst, U., Gobel, U., Schedlowski, M., 2000. Pavlovian conditioning of immune function: animal investigation and the challenge of human application. *Behav Brain Res* 110, 129-141.
- Exton, M.S., von Horsten, S., Schult, M., Voge, J., Strubel, T., Donath, S., Steinmuller, C., Seeliger, H., Nagel, E., Westermann, J., Schedlowski, M., 1998a. Behaviorally conditioned immunosuppression using cyclosporine A: central nervous system reduces IL-2 production via splenic innervation. *J Neuroimmunol* 88, 182-191.
- Exton, M.S., Von Horsten, S., Voge, J., Westermann, J., Schult, M., Nagel, E., Schedlowski, M., 1998b. Conditioned taste aversion produced by cyclosporine A: concomitant reduction in lymphoid organ weight and splenocyte proliferation. *Physiol Behav* 63, 241-247.
- Faulds, D., Balfour, J.A., Chrisp, P., Langtry, H.D., 1991. Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs* 41, 400-449.
- Ferguson, B., Matyszak, M.K., Esiri, M.M., Perry, V.H., 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3), 393-399.
- Fidler, J.M., DeJoy, S.Q., Gibbons, J.J., Jr., 1986a. Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *J Immunol* 137, 727-732.
- Fidler, J.M., DeJoy, S.Q., Smith, F.R., 3rd, Gibbons, J.J., Jr., 1986b. Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone-treated mice. *J Immunol* 136, 2747-2754.
- Fisher, G.R., Patterson, L.H., 1991. DNA strand breakage by peroxidase-activated mitoxantrone. *J Pharm Pharmacol* 43, 65-68.
- Fox, E.J., 2004. Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology* 63, S15-18.
- Friese, M.A., Fugger, L., 2009. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 66, 132-141.
- Garcia, J., Kimeldorf, D.J., Koelling, R.A., 1955. Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 122, 157-158.
- Garcia, J., Lasiter, P.S., Bermudez-Rattoni, F., Deems, D.A., 1985. A general theory of aversion learning. *Ann N Y Acad Sci* 443, 8-21.
- Gauci, M., Husband, A.J., Saxarra, H., King, M.G., 1994. Pavlovian conditioning of nasal tryptase release in human subjects with allergic rhinitis. *Physiol Behav* 55, 823-825.

- Gbadamosi, J., Buhmann, C., Tessmer, W., Moench, A., Haag, F., Heesen, C., 2003. Effects of mitoxantrone on multiple sclerosis patients' lymphocyte subpopulations and production of immunoglobulin, TNF-alpha and IL-10. *Eur Neurol* 49, 137-141.
- Ghalie, R.G.; Edan, G.; Laurent, M.; Mauch, E.; Eisenman, S.; Hartung, H.P.; Gonsette, R.E.; Butine, M.D.; Goodkin, D.E., 2002. Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (Novantrone) therapy in patients with MS. *Neurology* 59, 909-13.
- Ghanta, V., Hiramoto, R.N., Solvason, B., Spector, N.H., 1987. Influence of conditioned natural immunity on tumor growth. *Ann N Y Acad Sci* 496, 637-646.
- Ghanta, V.K., Hiramoto, N.S., Soong, S.J., Hiramoto, R.N., 1995. Conditioning of the secondary cytotoxic T-lymphocyte response to YC8 tumor. *Pharmacol Biochem Behav* 50, 399-403.
- Ghanta, V.K., Hiramoto, N.S., Soong, S.J., Miller, D.M., Hiramoto, R.N., 1993. A multiple modality approach combining the effect of conditioning with adoptive chemoimmunotherapy. *Int J Neurosci* 71, 251-265.
- Ghanta, V.K., Hiramoto, R.N., Solvason, H.B., Spector, N.H., 1985. Neural and environmental influences on neoplasia and conditioning of NK activity. *J Immunol* 135, 848s-852s.
- Ghanta, V.K., Miura, T., Hiramoto, N.S., Hiramoto, R.N., 1988. Augmentation of natural immunity and regulation of tumor growth by conditioning. *Ann N Y Acad Sci* 521, 29-42.
- Giang, D.W., Goodman, A.D., Schiffer, R.B., Mattson, D.H., Petrie, M., Cohen, N., Ader, R., 1996. Conditioning of cyclophosphamide-induced leukopenia in humans. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 8, 194-201.
- Goebel, M.U., Hubell, D., Kou, W., Janssen, O.E., Katsarava, Z., Limmroth, V., Schedlowski, M., 2005. Behavioral conditioning with interferon beta-1a in humans. *Physiol Behav* 84, 807-814.
- Goebel, M.U., Trebst, A.E., Steiner, J., Xie, Y.F., Exton, M.S., Frede, S., Canbay, A.E., Michel, M.C., Heemann, U., Schedlowski, M., 2002. Behavioral conditioning of immunosuppression is possible in humans. *Faseb J* 16, 1869-1873.
- Goebel M.U., (2001), *Klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte beim Menschen*, Dissertation der Medizinwissenschaften, Universität Essen.
- Gonsette, R.E., 1996. Mitoxantrone immunotherapy in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1, 329-332.
- Gonsette, R.E., Demonty, L., 1990. Immunosuppression with mitoxantrone in multiple sclerosis: A pilot study for 2 years in 22 patients. *Neurology* 40(suppl 1), 261-266.
- Goodin, D.S., Arnason, B.G., Coyle, P.K., Frohman, E.M., Paty, D.W., 2003. The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 61, 1332-1338.
- Gorczynski, R.M., 1990. Conditioned enhancement of skin allografts in mice. *Brain Behav Immun* 4, 85-92.
- Gorczynski, R.M., Macrae, S., Kennedy, M., 1982. Conditioned immune response associated with allogeneic skin grafts in mice. *J Immunol* 129, 704-709.
- Grochowicz, P.M., Schedlowski, M., Husband, A.J., King, M.G., Hibberd, A.D., Bowen, K.M., 1991. Behavioral conditioning prolongs heart allograft survival in rats. *Brain Behav Immun* 5, 349-356.
- Haahr, S., Plesner, A.M., Vestergaard, B.F., Hollsberg, P., 2004. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 109, 270-275.
- Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., Ivinson, A.J., Pericak-Vance, M.A., Gregory, S.G., Rioux, J.D., McCauley, J.L., Haines, J.L., Barcellos, L.F., Cree, B., Oksenberg, J.R.,

- Hauser, S.L., 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 357, 851-862.
- Hartung, H.P., Gonsette, R., Konig, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S.P., Krapf, H., Zwingers, T., 2002. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360, 2018-2025.
- Hauser, S.L., Oksenberg, J.R., 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 52, 61-76.
- Hayes, C.E., 2000. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc* 59, 531-535.
- Hernan, M.A., Jick, S.S., Logroscino, G., Olek, M.J., Ascherio, A., Jick, H., 2005. Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain* 128, 1461-1465.
- Hofmann, A.; Stellmann, J.P.; Kasper, J.; Ufer, F.; Elias, W.G.; Pauly, I.; Repenthin, J.; Rosenkranz, T.; Weber, T.; Kopke, S.; Heesen, C., 2013. *Mult Scler* 19, 920-5.
- Hsueh, C.M., Rogers, C., Hiramoto, R.N., Ghanta, V.K., 1994. Effect of dexamethasone on conditioned enhancement of natural killer cell activity. *Neuroimmunomodulation* 1, 370-376.
- <http://www.dgn.org/leitlinien/2333-ll-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose>
<http://www.tysabri.com/about/safety#>
http://www.uke.de/kliniken/neurologie/downloads/klinik-neurologie/ISDIMS_Neufassung_Maerz2013.pdf
- Huitt, W., & Hummel, J. (1997). An introduction to classical (respondent) conditioning. *Educational Psychology Interactive*.
- Husband, A.J., King, M.G., Brown, R., 1987. Behaviourally conditioned modification of T cell subset ratios in rats. *Immunol Lett* 14, 91-94.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116, 1218-1222.
- Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N., Hemmer, B., 2002. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 125, 538-550.
- Kasper, L.H., Shoemaker, J., 2010. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology* 74 Suppl 1, S2-8.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., Prat, A., 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13, 1173-1175.
- Kelley, K.W., Dantzer, R., Mormede, P., Salmon, H., Aynaud, J.M., 1985. Conditioned taste aversion suppresses induction of delayed-type hypersensitivity immune reactions. *Physiol Behav* 34, 189-193.
- Kidd, D., Barkhof, F., McConnell, R., Algra, P.R., Allen, I.V., Revesz, T., 1999. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain* 122 (Pt 1), 17-26.
- Kieseier, B.C., Storch, M.K., Archelos, J.J., Martino, G., Hartung, H.P., 1999. Effector pathways in immune mediated central nervous system demyelination. *Curr Opin Neurol* 12, 323-336.
- Kim, S.H., Kim, W., Park, M.S., Sohn, E.H., Li, X.F., Kim, H.J., 2011. Efficacy and safety of mitoxantrone in patients with highly relapsing neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 68, 473-479.
- Klosterhalfen, S., Klosterhalfen, W., 1987. Classically conditioned effects of cyclophosphamide on white blood cell counts in rats. *Ann N Y Acad Sci* 496, 569-577.
- Klosterhalfen, S., Klosterhalfen, W., 1990. Conditioned cyclosporine effects but not conditioned taste aversion in immunized rats. *Behav Neurosci* 104, 716-724.

- Klosterhalfen, W., Klosterhalfen, S., 1983. Pavlovian conditioning of immunosuppression modifies adjuvant arthritis in rats. *Behav Neurosci* 97, 663-666.
- Koch, S., Larbi, A., Derhovanessian, E., Ozelik, D., Naumova, E., Pawelec, G., 2008. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing* 5, 6.
- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., Bruck, W., 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1452.
- Kurtzke, J.F., 2000. Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *J Neurovirol* 6 Suppl 2, S134-140.
- Kusnecov, A.W., Husband, A.J., King, M.G., 1990. The influence of dexamethasone on behaviorally conditioned immunomodulation and plasma corticosterone. *Brain Behav Immun* 4, 50-66.
- Kusnecov, A.W., Sivyer, M., King, M.G., Husband, A.J., Cripps, A.W., Clancy, R.L., 1983. Behaviorally conditioned suppression of the immune response by antilymphocyte serum. *J Immunol* 130, 2117-2120.
- Laman, J.D., Thompson, E.J., Kappos, L., 1998. Balancing the Th1/Th2 concept in multiple sclerosis. *Immunol Today* 19, 489-490.
- Lassmann, H., Bruck, W., Lucchinetti, C., 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7, 115-121.
- Lassmann, H., Ransohoff, R.M., 2004. The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends Immunol* 25, 132-137.
- Levin, L.I., Munger, K.L., Rubertone, M.V., Peck, C.A., Lennette, E.T., Spiegelman, D., Ascherio, A., 2003. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Jama* 289, 1533-1536.
- Levine, S., Saltzman, A., 1986. Regional suppression, therapy after onset and prevention of relapses in experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone. *J Neuroimmunol* 13, 175-181.
- Limmroth V., Sindern E. (2004), *Multiple Sklerose*, Thieme, Essen und Bochum.
- Linde, K., Witt, C.M., Streng, A., Weidenhammer, W., Wagenpfeil, S., Brinkhaus, B., Willich, S.N., Melchart, D., 2007. The impact of patient expectations on outcomes in four randomized controlled trials of acupuncture in patients with chronic pain. *Pain* 128, 264-271.
- Lublin, F.D., Lavasa, M., Viti, C., Knobler, R.L., 1987. Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone. *Clin Immunol Immunopathol* 45, 122-128.
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907-911.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717.
- Lucchinetti, C.F., Bruck, W., Rodriguez, M., Lassmann, H., 1996. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6, 259-274.
- Lunemann, J.D., Munz, C., 2009. EBV in MS: guilty by association? *Trends Immunol* 30, 243-248.
- Martin, R., McFarland, H.F., McFarlin, D.E., 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 10, 153-187.

- Matusevicius, D., Kivisakk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., Link, H., 1999. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5, 101-104.
- Mauch, E., Kornhuber, H.H., Krapf, H., Fetzer, U., Laufen, H., 1992. Treatment of multiple sclerosis with mitoxantrone. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 242, 96-102.
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127.
- McFarland, H.F., Martin, R., 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 8, 913-919.
- McKenzie, B.S., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27, 17-23.
- McRae, C., Cherin, E., Yamazaki, T.G., Diem, G., Vo, A.H., Russell, D., Ellgring, J.H., Fahn, S., Greene, P., Dillon, S., Winfield, H., Bjugstad, K.B., Freed, C.R., 2004. Effects of perceived treatment on quality of life and medical outcomes in a double-blind placebo surgery trial. *Arch Gen Psychiatry* 61, 412-420.
- Metal'nikov, S., Chorine, V., 1926. The role of conditioned reflexes in immunity. In: S. Locke, R. Ader, H.O. Besedovsky, N. Hall, G. Solomon, G. Strom (Eds.): *Foundations of psychoneuroimmunology*. New York: Aldine, S. 263-267.
- Mikaeloff, Y., Caridade, G., Tardieu, M., Suissa, S., 2007. Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children. *Brain* 130, 2589-2595.
- Millefiorini, E., Gasperini, C., Pozzilli, C., D'Andrea, F., Bastianello, S., Trojano, M., Morino, S., Morra, V.B., Bozzao, A., Calo, A., Bernini, M.L., Gambi, D., Prencipe, M., 1997. Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome. *J Neurol* 244, 153-159.
- Miller, D.H., Leary, S.M., 2007. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 6, 903-912.
- Mohr, D.C.; Hart, S.L.; Julian, L.; Cox, D.; Pelletier, D., 2004. Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *Bmj* 328, 731.
- Mumford, C.J., Wood, N.W., Kellar-Wood, H., Thorpe, J.W., Miller, D.H., Compston, D.A., 1994. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 44, 11-15.
- Neuhaus, O., Wiendl, H., Kieseier, B.C., Archelos, J.J., Hemmer, B., Stuve, O., Hartung, H.P., 2005. Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro. *J Neuroimmunol* 168, 128-137.
- Niemi M.-B., (2004), *Zentrale Mechanismen bei der klassisch konditionierten Immunsuppression*, Dissertation der Medizinwissenschaften, Universität Duisburg-Essen.
- Noseworthy, J.H., Hopkins, M.B., Vandervoort, M.K., Karlik, S.J., Lee, D.H., Penman, M., Rice, G.P., Grinwich, K.D., Cauvier, H., Harris, B.J., et al., 1993. An open-trial evaluation of mitoxantrone in the treatment of progressive MS. *Neurology* 43, 1401-1406.
- Olness, K., Ader, R., 1992. Conditioning as an adjunct in the pharmacotherapy of lupus erythematosus. *J Dev Behav Pediatr* 13, 124-125.
- Olsson, T., 1995. Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology* 45, S11-15.
- Pacheco-Lopez, G., Engler, H., Niemi, M.B., Schedlowski, M., 2006. Expectations and associations that heal: Immunomodulatory placebo effects and its neurobiology. *Brain Behav Immun* 20, 430-446.

- Pelfrey, C.M., Cotleur, A.C., Zamor, N., Lee, J.C., Fox, R.J., 2006. Immunological studies of mitoxantrone in primary progressive MS. *J Neuroimmunol* 175, 192-199.
- Peterson, J.W., Bo, L., Mork, S., Chang, A., Trapp, B.D., 2001. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50, 389-400.
- Pitt, D., Werner, P., Raine, C.S., 2000. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 6, 67-70.
- Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899-910.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J.S., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292-302.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58, 840-846.
- Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Sibley, W.A., Silberberg, D.H., Tourtellotte, W.W., 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13, 227-231.
- Putzki, N., Kumar, M., Kreuzfelder, E., Grosse-Wilde, H., Diener, H.C., Limmroth, V., 2009. Mitoxantrone does not restore the impaired suppressive function of natural regulatory T cells in patients suffering from multiple sclerosis. A longitudinal ex vivo and in vitro study. *Eur Neurol* 61, 27-32.
- Ramirez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B., Bermudez-Rattoni, F., 1998. Differential effects of NMDA-induced lesions into the insular cortex and amygdala on the acquisition and evocation of conditioned immunosuppression. *Brain Behav Immun* 12, 149-160.
- Ramirez-Amaya, V., Bermudez-Rattoni, F., 1999. Conditioned enhancement of antibody production is disrupted by insular cortex and amygdala but not hippocampal lesions. *Brain Behav Immun* 13, 46-60.
- Ridge, S.C., Sloboda, A.E., McReynolds, R.A., Levine, S., Oronsky, A.L., Kerwar, S.S., 1985. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone. *Clin Immunol Immunopathol* 35, 35-42.
- Rieckmann, P., 2006. [Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis. Update (September 2006)]. *Nervenarzt* 77, 1506-1518.
- Rieckmann, P., Toyka, K.V., 1999. Escalating immunotherapy of multiple sclerosis. Austrian-German-Swiss Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group [MSTCG]. *Eur Neurol* 42, 121-127.
- Rogers, M.P., Reich, P., Strom, T.B., Carpenter, C.B., 1976. Behaviorally conditioned immunosuppression: replication of a recent study. *Psychosom Med* 38, 447-451.
- Roscoe, J.A., Bushunow, P., Morrow, G.R., Hickok, J.T., Kuebler, P.J., Jacobs, A., Banerjee, T.K., 2004. Patient expectation is a strong predictor of severe nausea after chemotherapy: a University of Rochester Community Clinical Oncology Program study of patients with breast carcinoma. *Cancer* 101, 2701-2708.
- Runmarker, B., Andersen, O., 1995. Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis. *Brain* 118 (Pt 1), 253-261.

- Schmidt R.M., Hoffmann F.A. (2006), Multiple Sklerose, 4. Aufl., URBAN&FISCHER, Halle (Saale).
- Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., Goebels, N., 2004. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2428-2433.
- Smith, G.R., Jr., McDaniel, S.M., 1983. Psychologically mediated effect on the delayed hypersensitivity reaction to tuberculin in humans. *Psychosom Med* 45, 65-70.
- Smith, I.E., 1983. Mitoxantrone (novantrone): a review of experimental and early clinical studies. *Cancer Treat Rev* 10, 103-115.
- Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23, 683-747.
- Stewart, D.J., Green, R.M., Mikhael, N.Z., Montpetit, V., Thibault, M., Maroun, J.A., 1986. Human autopsy tissue concentrations of mitoxantrone. *Cancer Treat Rep* 70, 1255-1261.
- Stockhorst, U., Enck, P.; Klosterhalfen, S., 2007. Role of classical conditioning in learning gastrointestinal symptoms. *World J Gastroenterol* 13, 3430-7.
- Stockhorst, U., Spennes-Saleh, S., Korholz, D., Gobel, U., Schneider, M.E., Steingruber, H.J., Klosterhalfen, S., 2000. Anticipatory symptoms and anticipatory immune responses in pediatric cancer patients receiving chemotherapy: features of a classically conditioned response? *Brain Behav Immun* 14, 198-218.
- Terasaki, P.I., Park, M.S., Opelz, G., Ting, A., 1976. Multiple sclerosis and high incidence of a B lymphocyte antigen. *Science* 193, 1245-1247.
- Thielmann, H.W., Popanda, O., Gersbach, H., Gilberg, F., 1993. Various inhibitors of DNA topoisomerases diminish repair-specific DNA incision in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 14, 2341-2351.
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338, 278-285.
- Trebst A.E., (2003), Klassisch konditionierte Effekte auf Lymphozytenzirkulation und Zytokinsynthese beim Menschen, Medizinische Dissertation, Universität Duisburg-Essen.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., Fugger, L., 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172, 146-155.
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P., 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9.
- Vogelgesang, A., Rosenberg, S., Skrzipek, S., Broker, B.M., Dressel, A., 2010. Mitoxantrone treatment in multiple sclerosis induces TH2-type cytokines. *Acta Neurol Scand* 122, 237-243.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Ma, Y., Fowler, J.S., Zhu, W., Maynard, L., Telang, F., Vaska, P., Ding, Y.S., Wong, C., Swanson, J.M., 2003. Expectation enhances the regional brain metabolic and the reinforcing effects of stimulants in cocaine abusers. *J Neurosci* 23, 11461-11468.
- von Horsten, S., Exton, M.S., Schult, M., Nagel, E., Stalp, M., Schweitzer, G., Voge, J., del Rey, A., Schedlowski, M., Westermann, J., 1998. Behaviorally conditioned effects of Cyclosporine A on the immune system of rats: specific alterations of blood leukocyte numbers and decrease of granulocyte function. *J Neuroimmunol* 85, 193-201.
- Wang, B.S., Lumanglas, A.L., Silva, J., Ruzsala-Mallon, V.M., Durr, F.E., 1986. Inhibition of the induction of alloreactivity with mitoxantrone. *Int J Immunopharmacol* 8, 967-973.

- Weilbach, F.X., Chan, A., Toyka, K.V., Gold, R., 2002. Mitoxantrone induced immunological changes in MS patients-ex vivo studies on proliferation and cell death of peripheral blood leukocytes. *J. Neurol.* 249 (Suppl. 1), I/113.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., Linington, C., 1994. Animal models. *Ann Neurol* 36 Suppl, S47-53.
- Willer, C.J., Dyment, D.A., Risch, N.J., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., 2003. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12877-12882.
- Zamvil, S.S., Steinman, L., 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8, 579-621.

10 Danksagung

Ich möchte hiermit allen, die meinem Werdegang beeinflusst haben vom Herzen danken.

Mein spezieller Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. R. Martin danke ich für die Möglichkeit, die er mir geboten hat in seinem Institut arbeiten zu dürfen und Herrn Prof. Dr. M. Friese danke ich dafür, dass ich meine Arbeit im INIMS fortsetzen durfte.

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Heesen danke ich für Lob und Kritik und die Chance diese interessante Arbeit umzusetzen und mich mit dem Thema Psychoneuroimmunologie beschäftigen zu dürfen. Weiterhin ermöglichte er mir, im Rahmen dieser Dissertation und darüber hinaus klinische Erfahrungen in der MS-Ambulanz zu sammeln.

Frau Prof. Dr. Eva Tolosa, danke ich für die exzellente Betreuung im Labor und darüber hinaus. Sie lehrte mich in wissenschaftlichem Denken und deren Umsetzung. Sie war in jeder Lage mit Rat und Tat zur Stelle und hatte immer ein offenes Ohr für mich. Ich konnte mich stets auf sie verlassen.

Frau Dr. Marion Hagemann-Goebel, danke ich herzlich für die Vertiefung der Psychoneuroimmunologie und vor allem für die Hilfe bei der statistischen Auswertung! Frau Verena Brucklacher-Waldert und Frau Karin Steinbach danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft. Die beiden waren zu jeder Zeit im Labor ansprechbar ihr fundiertes wissenschaftliches Wissen zu teilen.

Dem Rest der AG Martin am INIMS sowie der MS-Ambulanz danke ich für die nette gemeinsame Atmosphäre.

Ich bedanke mich bei den Patienten für ihr Einverständnis zu dieser Studie.

Meiner Mutter danke ich für ihre Liebe, Fürsorge und Geborgenheit. Ihre positive Einstellung gibt mir Kraft und motiviert mich.

Meiner Schwester Sormeh danke ich für ihr Verständnis und ihren Glauben an mich in jeder Situation. Sie stärkt mich und gibt mir das Gefühl alles erreichen zu können.

Meinem Freund Sia danke ich für seine Geduld sowie für seine Hartnäckigkeit mich immer weiter voranzubringen und das Beste aus mir rauszuholen.

In Dankbarkeit,

Ghoncheh Mina

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: Ghoncheh Mina