

2 Material und Methoden

2.1 Probanden

Im Rahmen einer **Pilotstudie**, die u.a. der Festlegung des Studiendesigns diene und deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit ausgewertet werden, wurden 16 Freiwillige im Alter von 18 - 30 Jahren zufällig einer Experimental- und Kontrollgruppe zugeordnet. Der Altersdurchschnitt lag bei 22,5 Jahren. Die Experimentalgruppe setzte sich aus fünf Frauen und zwei Männern zusammen, während in der Kontrollgruppe sechs Frauen und drei Männer vertreten waren.

Die Probanden der sich an die Pilotstudie anschließenden **Verlaufsstudie** wurden aus studentischen Kreisen gewonnen. Es handelte sich dabei um 24 junge, gesunde Frauen im Alter von 18 - 30 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 21,6 Jahre. Diese Studentinnen wurden ebenfalls zufällig einer Experimental- und Kontrollgruppe zugeordnet.

Alle Probanden unterzogen sich zu Beginn der Studie einer grob orientierenden Untersuchung (Größe, Gewicht, Puls, Blutdruck), weiterhin erfolgte eine gründliche anamnestische Befragung der Studienteilnehmer. Der Anamnesebogen (siehe Anhang) war folgendermaßen gegliedert:

- Fragen zur Familien-, Sozial- und Eigenanamnese
- Fragen zu gynäkologischen Erkrankungen
- Fragen zu allergischer Disposition
- Fragen zu momentan bestehenden Beschwerden
- Medikamentenanamnese
- Fragen zum Genussmittelverhalten
- Regelmäßigkeit von sportlichen und abhärtenden Maßnahmen

Als Ausschlusskriterien wurden schwere chronische Systemerkrankungen (Stoffwechsel-, Herzkreislauf- und Krebserkrankungen) und in besonderem Maße Autoimmunerkrankungen, eine Neigung zu atopischen Erkrankungen und akute Infektionen zu Beginn der Studie festgelegt.

2.2 Die hydrotherapeutische Anwendung

Die Probanden der Experimentalgruppen führten nach Einweisung über einen Zeitraum von vier Wochen jeden Morgen Wassertreten nach Kneipp in folgender Weise durch:



Das Wassertreten wendeten die Probanden nach dem Aufstehen in einer mit kaltem Wasser (ca. 15°C) bis zu den Waden gefüllten Wanne nach dem Kneippschen Prinzip im Storchengang an. Diese Anwendung wurde mit einer anfänglichen Dauer von einer Viertelminute begonnen und konnte im Laufe der vier Wochen auf drei Minuten gesteigert werden. Besonderes Augenmerk legte man darauf, dass das Wassertreten nicht mit kalten Füßen durchgeführt wurde. Zur Erwärmung der Füße wurde den Probanden aktives Bewegen empfohlen. Des weiteren sollten die Probanden bei Eintritt eines Kälteempfindens das Wassertreten beenden.

Die Teilnehmer erhielten die Anweisung, nach Absolvieren des täglichen Wassertretens sich ohne die Beine zu trocknen bis zum Eintreten der reaktiven Hyperämie der Füße zu bewegen, da nach Brenke (1997) das wichtigste Kriterium für die Dosierung eines jeden Kaltreizes sich aus dem angestrebten Wärmegefühl ergibt, welches sich nach jeder Behandlung einstellen soll.

Die weiblichen Teilnehmerinnen der Experimentalgruppen begannen das Wassertreten in den ersten 14 Tagen des weiblichen Zyklus, d.h. mit einer maximalen zeitlichen Differenz von zwei Wochen, um den nachgewiesenen hormonellen Einfluss auf das Immunsystem (vergleiche Wilder 1998) vergleichbar zu machen und um zyklusabhängige Schwankungen auszuschließen.

Die Kontrollgruppen mieden jede hydrotherapeutische Anwendung.

2.3 Beschwerdetagebücher und Lebensqualitätsbögen

Zu Beginn der Studie wurde den Probandinnen der Verlaufsstudie ein Beschwerdetagebuch ausgehändigt, in welches täglich das allgemeine Befinden als auch Infektionen der oberen Luftwege in Infektionsstärke und Infektionsdauer einzutragen waren (siehe Anhang). Um eine Auswertung der Tagebücher möglich zu machen, sollten die subjektiven

Befindlichkeiten bei Infektionen der oberen Luftwege von den Probanden semiquantitativ eingeschätzt werden (vergleiche Ernst et al. 1990):

- Bewertung mit Infektionsstärke I: Symptome schwach ausgeprägt (nur geringfügige Beeinträchtigung)
- Bewertung mit Infektionsstärke II: Symptome stärker ausgeprägt (deutliche Beeinträchtigung, medikamentöse oder sonstige Behandlung notwendig)
- Bewertung mit Infektionsstärke III: Symptome stark ausgeprägt, Arbeitsunfähigkeit

Um einen Einblick in die Einschätzung ihrer subjektiven Lebensqualität zu erlangen, erhielten die Teilnehmer der Verlaufsstudie zu Beginn der Untersuchung einen Lebensqualitätsbogen (WHOQOL-BREF; Angermayer et al. 2000). Ob sich eventuelle Veränderungen in der Lebensqualität nach Anwendung der hydrotherapeutischen Anwendungen ergeben haben, wurde durch wiederholte Aushändigung dieser Lebensqualitätsbögen an Experimental- und Kontrollgruppe drei Monate und zwölf Monate nach Beginn der Verlaufsstudie ermittelt.

2.4 Blutentnahmen

Die **Blutentnahmen der Pilotstudie** fanden zur Bestimmung

- des zellulären Immunstatus,
- der Immunglobuline IgG, IgM, IgA als auch der IgG-Subklassen und
- der Blutsenkungsgeschwindigkeit zum Ausschluss akut-entzündlicher Vorgänge statt.

Die erste Blutentnahme (MZP 1) erfolgte bei Experimental- und Kontrollgruppe vor Beginn der hydrotherapeutischen Anwendung. Auf eine zweite Blutentnahme (MZP 2) nach Abschluss des Wassertretens verzichtete man bei der Kontrollgruppe, da keine strukturellen Veränderungen im Immunstatus der Probanden, hervorgerufen durch eine hydrotherapeutische Reiztherapie, erwartet wurden (vergleiche Bieger et al. 1998). Eine dritte und vierte Blutentnahme erfolgte bei beiden Probandengruppen jeweils nach drei (MZP 3) und sechs Monaten (MZP 4) ausgehend vom Beginn der Vorstudie.

In der Verlaufsstudie wurde von allen Probanden Blut aus einer peripheren Vene entnommen zur Bestimmung

- der Blutsenkungsgeschwindigkeit, um akut-entzündliche Vorgänge im Organismus auszuschließen (nach Standardmethode),
- der von T-Lymphozyten intrazellulär gebildeten Zytokine IFN- γ und IL-2,
- des Serum-IgE, welches als Parameter für die Th2-determinierte Immunantwort herangezogen wurde.

Die der Pilotstudie folgenden Untersuchungen der Verlaufsstudie erfolgten ebenfalls nach einer festgelegten zeitlichen Ordnung. Die erste Blutentnahme (MZP 1) fand vor Beginn der Studie statt. Weitere Blutentnahmen erfolgten bei Experimental- und Kontrollgruppe nach vier Wochen (MZP 2), drei Monaten (MZP 3), sechs Monaten (MZP 4) und zwölf Monaten (MZP 5) ausgehend vom Beginn der Studie (Abb. 1, Abb. 2).

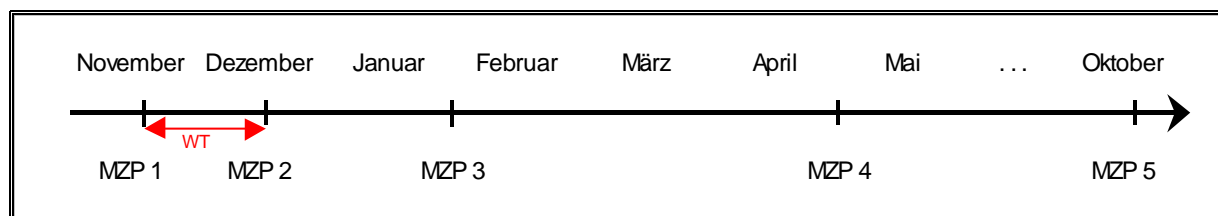


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf für die Experimentalgruppe

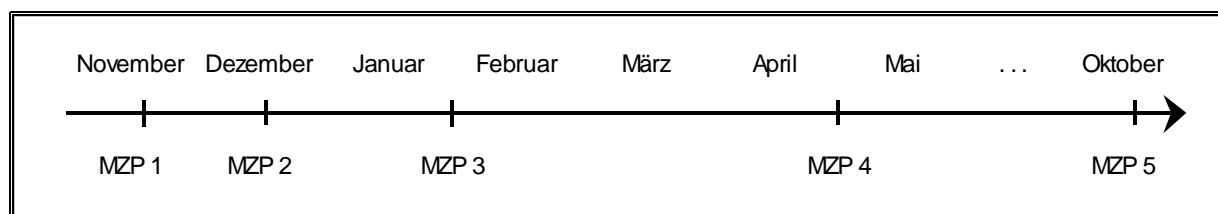


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf für die Kontrollgruppe

WT : Wassertreten
MZP: Meßzeitpunkt

Die Blutentnahmen fanden stets morgens zwischen acht und zehn Uhr statt, da eine zirkadiane Rhythmik des Cortisol-Spiegels mit Einfluss auf das Th1/Th2-System bekannt ist (Petrovsky, Harrison 1998,1995).

2.5 Antikörper und Chemikalien

Bestimmung des zellulären Immunstatus

In der Pilotstudie wurden zur Bestimmung des zellulären Immunstatus (B-,T-,NK-,T-Helfer-, T-Suppressorzellen sowie HLA-DR auf T-Zellen) die Antikörper des standardisierten Simulset IMK Plus der Firma Becton Dickinson Heidelberg verwendet. Der handelsüblichen Variante wurde zur Bestimmung von CD25 auf T-Zellen ein zusätzlicher Antikörper (PE-Färbung) der Firma Immunotech in Kombination mit einem Anti-CD3-Antikörper (FITC-Färbung) der Firma Becton Dickinson Heidelberg hinzugefügt.

intrazelluläre Zytokinbestimmung

Um die T-Lymphozyten sowie die intrazellulär gebildeten Zytokine anzufärben, kamen nachfolgende aufgelistete monoklonale Antikörper zum Einsatz (Tab. 1).

Tab. 1: Verwendete Antikörper zur intrazellulären Zytokinbestimmung

Antikörper	Konjugation	Firma
CD3	PerCP	Becton Dickinson Heidelberg
IFN- γ	FITC	Becton Dickinson Heidelberg
IL-2	FITC	Becton Dickinson Heidelberg

Als polyklonale T-Zellaktivatoren wurden PMA der Firma Calbiochem Bad Soden (Konzentration: 1 μ mol) und Ionomycin der Firma Sigma Steinheim (Konzentration: 10 μ g/ml) verwendet. Der Transport intrazellulär gebildeter Zytokine aus dem Golgiapparat der T-Lymphozyten wurde durch Monensin der Firma Sigma Steinheim (Konzentration: 1 μ mol) blockiert. AIM-V der Firma Gibco-BRL Karlsruhe kam als serumfreies Lymphozytenmedium zum Einsatz. Facs Lysing Solution der Firma Becton Dickinson Heidelberg wurde in 0,1%-iger Lösung eingesetzt. PBS diente als Wasch- und Aufnahmemedium. Der zur Permeabilisation der T-Lymphozyten benötigte Saponinpuffer wurde von dem immunologischen Labor der Martin-Luther-Universität Halle nach folgender Rezeptur hergestellt:

- 500 mg Saponin (Firma Sigma Steinheim)
- 1190 μ g Hepes-Puffer (Firma Serva Heidelberg)
- 1 g Sodium-Acid (Firma Sigma Steinheim)
- sind in 500 ml PBS aufzunehmen.

2.6 Bestimmung des zellulären Immunstatus

Die Bestimmung des zellulären Immunstatus erfolgte mittels der Vollblutmethode. Jeweils 100 μ l heparinisieretes Vollblut wurden mit den Antikörpern des Simulsets direkt markiert. Dieses Gemisch musste bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert werden. Im Anschluss wurde jedes Röhrchen mit Facs Lysing Solution (2 ml) bestückt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte, welche mit PBS durchzuführen waren. Auf die abgesetzten Zellen wurden anschließend 400 μ l PBS gegeben und die

Messung am Durchflusszytometer (FACScan der Firma Becton Dickinson Heidelberg) konnte erfolgen.

Die verwendete Software des Durchflusszytometers benötigte zur Berechnung der Absolutzahlen der T-, B-, NK-, T-Helfer- und T-Suppressorzellen sowie der T-Zellen, welche die IL-2-R α -Kette CD25 exprimieren als auch der HLA-DR-markierten T-Zellen, die Leukozytenzahl eines jeden Probanden, welche nach manueller Auszählung in den Computer eingegeben worden ist. Aus den erhaltenen Ergebnissen konnte die CD4/CD8-Ratio errechnet werden.

2.7 Intrazelluläre Zytokinbestimmung

Die Behandlung des Blutes erfolgte in den Schritten

- Stimulation,
- Fixation,
- Permeabilisation,
- Färbung.

Die Stimulation erfolgte mit den polyklonalen T-Zellaktivatoren PMA (12 μ l) und Ionomycin (6 μ l). In Anwesenheit des Golgi-Blockers Monensin (24 μ l) wurde dazu 1080 μ l AIM-V und 120 μ l Vollblut gegeben. Die so erhaltene Mischung aus Zellen des peripheren Blutes und den Stimulatoren/Transportblockern wurde 16 Stunden bei 37°C in 5 %-iger CO₂-Umgebung inkubiert.

Die für diese Versuchsanordnung optimale Inkubationszeit von 16 Stunden wurde nach Durchführung eigener Zeitreihen festgelegt, wobei nach 5 und 16 Stunden Inkubation die jeweilige intrazelluläre Zytokinproduktion der CD3-markierten T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt worden ist. Anhalte für die Inkubationszeiten gaben Arbeitsanleitungen von Ferry et al. (1997), Prussin (1997), Krouwels et al. (1996) und Empfehlungen der Firma Becton Dickinson Heidelberg.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde dieser Ansatz zweimalig mit PBS (2 ml) gewaschen. Anschließend fixierte man die Zellen mit 2 %-iger Paraformaldehydlösung (500 μ l) 15 Minuten. Die Permeabilisation der stimulierten und fixierten T-Lymphozyten erfolgte durch die Zugabe von 200 μ l Saponinpuffer. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS schloss sich die direkte Antikörpermarkierung mit Anti-Zytokin-Antikörpern (Anti-

IFN- γ -AK, Anti-IL-2-AK) und mit Anti-CD3-Antikörper an. Die Antikörper setzte man in einer im Vorversuch ermittelten Menge von je 5 μ l ein. Es folgten zwei weitere Waschstritte; die mit Saponinpuffer (2 ml) im ersten und mit PBS (2 ml) im zweiten Waschdurchgang auszuführen waren.

Die Zellen wurden in 200 μ l PBS aufgenommen und es konnte die Messung am Durchflusszytometer durchgeführt werden. Das dazu verwendete Gerät war das FACScan der Firma Becton Dickinson Heidelberg. Die prozentuale Angabe der von den T-Lymphozyten gebildeten Zytokine erfolgte durch die verwendete Software des Durchflusszytometers in histogrammischer Anordnung (siehe Kap. 3.4).

2.8 Immunglobulinbestimmung

Die Immunglobulinbestimmung von IgG (einschließlich der IgG-Subklassen), IgM und IgA führten die Mitarbeiter des Zentrallabors der Universitätsklinik Kröllwitz der Martin-Luther-Universität Halle nach Standardmethode durch.

Die IgE-Bestimmung erfolgte im Labor der Hautklinik der Martin-Luther-Universität Halle. Die angewandte Methode war der Fluoroenzymeimmunoassay UniCAP Total IgE der Firma Pharmacia & Upjohn.

2.9 Hautstempeltest auf Recall-Antigene

Zur Bestimmung des Status der zellvermittelten Immunität durch Messung der Hautreaktion vom verzögerten Typ (Typ 4) wurde der standardisierte Hautstempeltest Multitest Immignost der Firma biosyn Arzneimittel GmbH gegenüber folgenden Antigenen angewendet. Tetanus-Toxoid, Diphtherie-Toxoid, Streptokokken-Antigen, Alttuberkulin, Candida albicans-Antigen, Trichophyton-Antigen und Proteus-Antigen. Glycerin diente als Negativ-Kontrolle.

Es werden für diesen Test diese weit verbreiteten mikrobiellen Antigene eingesetzt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die Probanden gegen eines der genannten Antigene eine T-Zell-Immunität besitzen, die nachweisbar ist (Rieber 1995).

Die Durchführung des Hautstempeltests fand ausschließlich bei den Probanden der Verlaufsstudie statt. Wie vom Hersteller angegeben, erfolgte die Anwendung des Tests intrakutan auf gesunder Haut (Innenseite des linken Unterarms), welche vorher gründlich mit

Alkohol gereinigt worden ist. Die Ergebnisse des Hautstempeltests wurden 48 Stunden nach Applikation der Antigene abgelesen. Der Hautstempeltest wurde bei allen Probanden der Verlaufsstudie vor Beginn der Studie durchgeführt. Weitere Anwendungen erfolgten nach vier Wochen, drei, sechs und zwölf Monaten ausgehend vom Zeitpunkt Null.

2.10 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden in dem Computerprogramm SPSS 9.0 ausgewertet. Als statistischer Test kam der T-Test für gepaarte Stichproben (T-Test) zum Einsatz, der überprüft, ob zwei zusammenhängende Stichproben aus Populationen mit demselben Mittelwert stammen. Des Weiteren wurde der T-Test für unabhängige Stichproben zur Prüfung, ob zwei nicht verbundene Stichproben aus Populationen mit demselben Mittelwert stammen, verwendet.