

**Aus dem Physiologischen Institut der  
Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Untersuchungen zur Rolle lokaler Zytokininduktion und deren  
nachgeschalteter Signale bei der Fieberreaktion des  
Meerschweinchens (*Cavia aperea porcellus*)**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von  
Günter Roß**

**Gießen 2001**

**Aus dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Betreuer: Prof. Dr. Eugen Zeisberger**

**Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Martin Diener**

**Untersuchungen zur Rolle lokaler Zytokininduktion und deren  
nachgeschalteter Signale bei der Fieberreaktion des  
Meerschweinchens (*Cavia aperea porcellus*)**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

**zur Erlangung des Doktorgrades beim**

**Fachbereich Veterinärmedizin**

**der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von**

**Günter Roß**

**Tierarzt aus Kehl am Rhein (Baden-Württemberg)**

**Gießen 2001**

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Dekan:** Prof. Dr. M. Reinacher

**1. Berichterstatter:** Prof. Dr. Eugen Zeisberger

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. Martin Diener

**Tag der mündlichen Prüfung:** 14. August 2001

## INHALTSVERZEICHNIS

### **Kapitel 1: Einleitung**

1. Fieber .....	1
1.1 Was ist Fieber? .....	1
1.2 Die phylogenetische Entwicklung von Fieber .....	5
1.3 Mediatoren der Fieberreaktion .....	9
1.3.1 Exogene Pyrogene.....	9
1.3.2 Endogene Pyrogene .....	10
1.3.3 Kryogene .....	16
1.4 Theorien zu Signalübertragungsmechanismen bei der Fieberantwort .....	19
1.5 Regelkreis der Fieberentstehung .....	23
1.6 Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit .....	25

### **Kapitel 2: Material & Methoden**

2.1.1 Versuchstiere .....	28
2.1.2 Vermeidung von Stresseffekten auf die Körpertemperatur .....	30
2.2 Implantation von Verweilkatheter, Sender & subkutaner Kammer .....	30
2.2.1 Verweilkatheter.....	30
2.2.1.1 Herstellung des Verweilkatheters .....	31
2.2.1.2 Implantation des Verweilkatheters .....	31
2.2.2 Sender.....	33
2.2.2.1 Implantation des Senders .....	34
2.2.3 Subkutane Kammer .....	34
2.2.3.1 Implantation der subkutanen Kammer.....	35
2.3 Telemetrische Erfassung der Körperkerntemperatur .....	36
2.4 Verwendete Substanzen .....	39
2.4.1 Diclofenac.....	39
2.4.2 L-NAME .....	41
2.4.3 LPS.....	43
2.4.4 Ropivacain.....	47
2.4.5 TNF-Bindungsprotein .....	48
2.4.6 NaCl .....	50
2.5 Versuchsdurchführung .....	50
2.5.1 Gewinnung der arteriellen Blutprobe und der Lavage aus der subkutanen Kammer .....	50
2.5.1.1 Vorbereitung der Probengewinnung .....	50
2.5.1.2 Gewinnung der arteriellen Blutprobe .....	51
2.5.1.3 Gewinnung der Lavage aus der subkutanen Kammer .....	51
2.5.1.4 Applikation der Substanzen .....	52
2.5.1.5 Aufbereitung der Proben (Lavage und Blut) .....	52
2.5.2 Analyse der Plasma- und der Lavageproben .....	53
2.5.2.1 Bioassays .....	53
2.5.2.1.1 TNF-Bioassay .....	54
2.5.2.1.2 IL6-Bioassay .....	58

2.5.2.2 Cortisol-Radioimmunoassay .....	61
2.5.2.3 Limulus Amöbozyten Lysat Test.....	62
2.5.3 Versuchsauswertung und Statistik.....	64
<b>Kapitel 3: Ergebnisse</b> .....	66
3.1 Injektion von Ropivacain in Kombination mit LPS 100 oder mit LPS 10 in die subkutane Kammer.....	67
3.1.1 Injektion von Ropivacain im Vergleich zur Injektion von Solvent in die subkutane Kammer .....	67
3.1.2 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 100 und der Injektion von LPS 100 in Kombination mit Ropivacain.....	69
3.1.3 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 und der Injektion von LPS 10 in Kombination mit Ropivacain.....	72
3.1.4 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 in die subkutane Kammer und der Injektion von LPS 10 in Kombination mit der subkutanen Injektion von Ropivacain auf der contralateralen Seite im Bereich des Oberschenkels (Regio femoralis) .....	76
3.2 Injektion von TNF-Bindungsprotein in Kombination mit LPS 100 oder mit LPS 10 in die subkutane Kammer .....	82
3.2.1 Injektion von TNF-Bindungsprotein im Vergleich zur Injektion von Solvent in die subkutane Kammer.....	82
3.2.2 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 100 und der Injektion von LPS 100 in Kombination mit TNFbp.....	83
3.2.3 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 und der Injektion von LPS 10 in Kombination mit TNFbp.....	86
3.3 Injektion von L-NAME in Kombination mit LPS 100 oder LPS 10 in die subkutane Kammer .....	91
3.3.1 Injektion von L-NAME im Vergleich zur Injektion von Solvent in die subkutane Kammer .....	92
3.3.2 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 100 und von LPS 100 in Kombination mit L-NAME in die subkutane Kammer.....	93
3.3.3 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 und LPS 10 in Kombination mit L-NAME .....	97
3.4 Injektion von Diclofenac in Kombination mit LPS 100 oder LPS 10 in die subkutane Kammer .....	102
3.4.1 Injektion von Diclofenac im Vergleich zur Injektion von Solvent in die subkutane Kammer .....	102
3.4.2 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 100 und von LPS 100 in Kombination mit Diclofenac in die subkutane Kammer .....	104
3.4.3 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 und der Injektion von LPS 10 in Kombination mit Diclofenac .....	107
3.5 Nachweis von zirkulierendem LPS im Blutplasma .....	112

**Kapitel 4: Diskussion:**

4.1 Einfluss des Lokalanästhetikums Ropivacain auf die Fieberantwort bei einer lokalen peripheren Inflammation .....	114
4.2 Einfluss von TNF-Bindungsprotein auf die Fieberantwort bei einer lokalen peripheren Inflammation .....	124
4.3 Einfluss von dem kompetitiven Hemmstoff L-NAME auf die Fieberantwort bei einer lokalen peripheren Inflammation .....	125
4.4 Einfluss von dem COX-Inhibitor Diclofenac auf die Fieberantwort bei einer lokalen peripheren Inflammation .....	128
4.5 Schlussbetrachtung .....	130

**Kapitel 5: Zusammenfassung**

Zusammenfassung .....	132
-----------------------	-----

**Kapitel 6: Summary**

Summary .....	134
---------------	-----

**Kapitel 7: Literaturverzeichnis**

Literaturverzeichnis .....	136
----------------------------	-----

**Anhang**

Danksagung .....	149
------------------	-----

Im folgenden sind häufig verwendete Abkürzungen aufgelistet(siehe auch S. 66):

\* .....signifikant ( $p < 0,05$ )

ACTH..... Adrenocorticotropes-Hormon

Air-pouch ..... subkutane Luftkammer

ANOVA..... Varianzanalyse

APP ..... Akut-Phase-Protein

APR ..... Akute-Phase-Reaktion

AVP ..... Arginin Vasopressin

BBB ..... Blood-Brain-Barrier (Blut-Hirn-Schranke)

C..... Komplementfaktor

COX..... Cyclooxygenase

CRH..... Cortikotropes-Releasing-Hormon

DICLO ..... Diclofenac

EU..... Endotoxin Unit

F.I. .... Fieberindex [ $^{\circ}$  Gh]

HPA-Achse..... Hypophysen-Pituitary-(Hypophysale)-Adrenale Achse

IFN..... Interferon

IL..... Interleukin

IU..... international units

IUPS ..... Comission for Thermal Physiology of the international  
Union of Physiological Sciences

i.a. .... intraarteriell

i.m. .... intramuskulär

i.p. .... intraperitoneal

i.v. .... intravenös

KG ..... Körpergewicht

L10..... LPS-Dosis 10  $\mu$ g/kg

L100 ..... LPS-Dosis 100  $\mu$ g/kg

LAL ..... Limulus Amöbozyten Lysat

LD ..... Letaldosis

LN..... L-NAME

L-NAME ..... N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-methylester-hydrochlorid

LPS..... Lipopolysaccharid

MDP..... Muramyl-dipeptid

MG..... Molekulargewicht

MIP ..... Makrophagen-Inflammatorisches-Protein

MSH..... Melanozyten-stimulierendes Hormon

MTT .....	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 Diphenyl-Tetrazoliumbromid
n.d. ....	nicht detektierbar bzw. unterhalb der Nachweisgrenze
n.s. ....	nicht signifikant ( $p > 0,05$ )
nmol.....	nanomol
NO .....	Stickstoffmonoxid
NOS.....	Stickstoffmonoxid-Synthase
OVLT .....	Organum vasculosum laminae terminalis
PBS .....	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PG .....	Prostaglandin
p.i. ....	post injectionem
PNS .....	peripheres Nervensystem
POA.....	Präoptische Region
RO .....	Ropivacain
ROc.l. ....	Ropivacain contralateral
S.E.M. ....	Standardfehler
SIRS .....	Systemisches-Inflammatorisches-Reaktions-Syndrom
SFO .....	Subfornicales Organ
SOL .....	Solvent/Kochsalzlösung
t.....	Zeit nach der Injektion von LPS, Solvent oder der Testsubstanz [min.]
TBP .....	Tumor-Nekrose-Faktor-Bindungsprotein
TNF.....	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFbp .....	Tumor-Nekrose-Faktor-Bindungsprotein
T <sub>abd.</sub> .....	abdominale Körpertemperatur
ZNS .....	Zentralnervensystem





## KAPITEL 1: EINLEITUNG

### 1. Fieber (Pyrexie)

#### 1.1 Was ist Fieber?

Nicht bei jeder Erhöhung der Körpertemperatur handelt es sich um Fieber. Schon im vorigen Jahrhundert postulierte Liebermeister (1875), dass Fieber nicht mit einer Hyperthermie gleichzusetzen ist. Die Hyperthermie beruhe auf einer passiven Erhöhung der Körpertemperatur. Im Gegensatz hierzu entstehe Fieber durch eine Verstellung des thermoregulatorischen Sollwerts und sei nicht auf das Unvermögen zurückzuführen, die Körpertemperatur nicht mehr regulieren zu können. Im Jahr 1987 wurden von der „Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission)“ Begriffe, die thermophysologisch von Bedeutung sind, definiert: so auch Fieber und Hyperthermie. Diese Definitionen sind im folgenden sinngemäß wiedergegeben.

Definition Fieber: Fieber ist das Stadium erhöhter *Körperkerntemperatur*. Diese Erhöhung ist oft, aber nicht zwingend, Teil der Immunabwehr eines Wirtsorganismus gegenüber eingedrungenen Mikroorganismen oder gegenüber unbelebten Substanzen, die als pathogen oder fremd vom Wirtsorganismus erkannt werden. Durch den Einsatz von *Thermoeffektoren* kommt es zu einer Erhöhung des *Sollwertes* für die Körpertemperatur und infolge dessen zu einem aktiven Anstieg derselben. Die Zeitdauer und das Ausmaß des Fiebers können von Wirt zu Wirt variieren, jedoch wird ein bestimmter, festgesetzter oberer Temperaturgrenzwert (41 °C beim Menschen) selten überschritten. Nach diesem Zeitintervall kommt es wieder zu einer Herabsetzung des Sollwertes auf den normalen Wert. Bei jedem Anstieg der Körpertemperatur kann es sich potenziell um Fieber handeln. Anstiege der Körpertemperatur, die nicht auf einer Aktivierung der Thermoeffektoren beruhen, werden dagegen als Hyperthermie bezeichnet. Die Fieberentstehung beruht auf verschiedenen humoralen Mechanismen, die zu einer Veränderung der neuronalen Kontrolle der Körpertemperatur führen. Die Substanzen, die zu dieser Veränderung führen, werden als Pyrogene bezeichnet.

Man unterscheidet zwei Arten von *Pyrogenen* – endogene Pyrogene und exogene Pyrogene. Endogene Pyrogene sind meist die obligatorischen Fiebermediatoren, aber direkte Auswirkungen von exogenen Pyrogenen können nicht ausgeschlossen werden. Das typische, natürlicherweise auftretende Fieber bei einer bakteriellen Infektion wird durch Interleukin 1 (IL1) induziert.

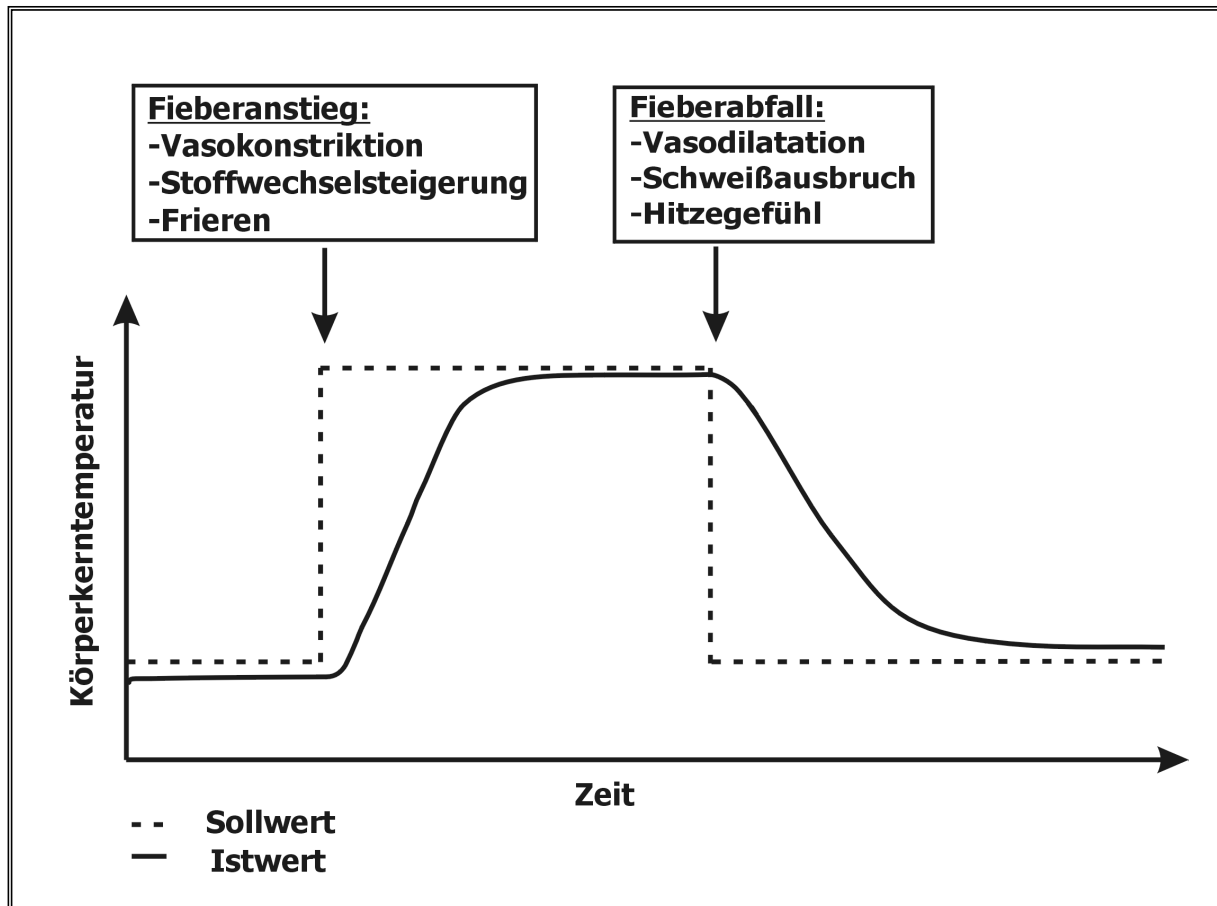


Abbildung 1: Physiologische Veränderungen bei Fieberanstieg und –abfall

IL1 tritt in der ersten Phase der Immunabwehr als Mediator auf. Diese erste Phase wird als *Akut-Phase-Reaktion* bezeichnet. Limitierte Anstiege der Körperkerntemperatur sind für den Organismus unschädlich, solange keine anderen Körperfunktionen beeinträchtigt werden. Fieber kann bei Infektionen zu den vorteilhaften Effekten der humoralen Immunabwehr beitragen (IUPS Thermal Commission, 1987). Die Veränderungen der Körpertemperatur während eines typischen Fiebers sind in Abbildung 1 dargestellt.

Definition Hyperthermie: Hyperthermie ist der Zustand der Temperaturregulation, in dem sich die Körperkerntemperatur oberhalb ihrer festgesetzten Bandbreite befindet.

Diese Bandbreite ist für normal aktive Angehörige einer Spezies festgelegt. Ist die Temperaturregulation aufgrund einer Überhitzung aktiv, so beruht die Hyperthermie auf dem Missverhältnis zwischen der Wärmeaufnahme und dem Vermögen der Wärmeabgabe. Eine Beeinträchtigung der Thermoregulation kann zur Entstehung einer Hyperthermie beitragen (IUPS Thermal Commission, 1987) (siehe Abbildung 2).

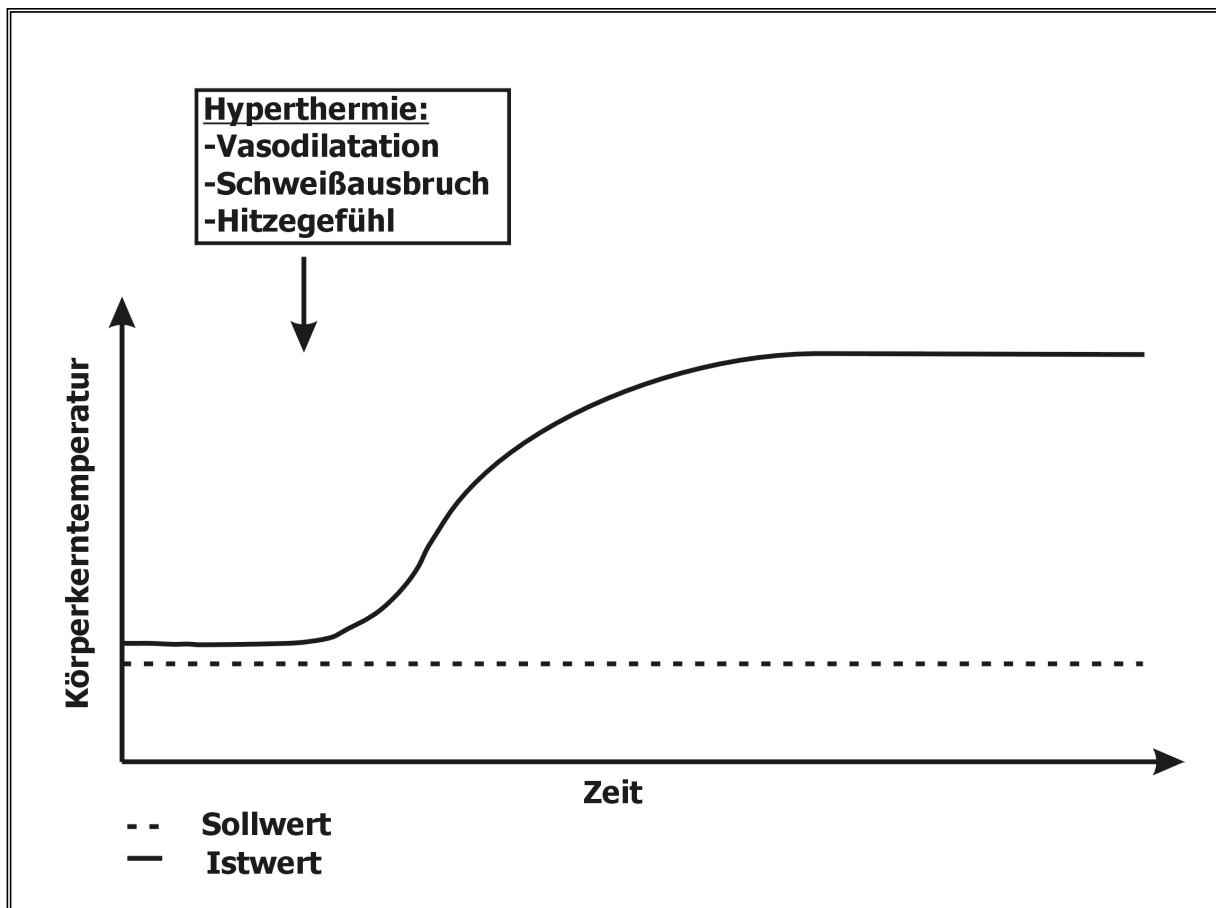


Abbildung 2: Physiologische Veränderungen während der Hyperthermie

Die obigen Abbildungen (1 und 2) sollen den Unterschied zwischen einer Hyperthermie und Fieber verdeutlichen (modifiziert nach Hensel 1979). Gemäß der genannten Definitionen befindet sich der Körper in der frühen Phase des Fieberanstiegs unterhalb des nach oben regulierten Sollwertes. Der fiebernde Organismus empfindet dadurch Kälte und aktiviert oder induziert wärmekonservierende und -produzierende physiologische Reaktionen (z.B. Vasokonstriktion und Stoffwechselsteigerung) oder entsprechende Verhaltensänderungen. Dies geschieht solange, bis der Istwert den erhöhten Sollwert erreicht hat.

In diesem Stadium wird keine Kälte mehr empfunden. Wird der Sollwert wieder auf die normale Körpertemperatur gesenkt, so werden jetzt Reaktionen bzw. Verhaltensänderungen aktiviert oder induziert, um Wärme an die Umgebung abzugeben (z.B. vermehrtes Schwitzen und Vasodilatation). Durch diese Vorgänge wird der Istwert wieder dem Sollwert angeglichen.

### Akute-Phase-Reaktion (APR)

Fieber ist ein Teil einer komplexen Abwehrstrategie des Wirtsorganismus gegen eingedrungene Mikroorganismen, deren Komponenten oder gegen als körperfremd erkannte Moleküle (z.B. Fremdeiweiße). Die vom Körper getroffenen Abwehrstrategien gegen das eingedrungene Pathogen sind sehr unterschiedlich. Sie sind abhängig von der Art des Pathogens, seiner Konzentration, dem früheren Kontakt des Körpers mit diesem Pathogen und noch anderen Faktoren. Die Immunantwort gegen Mikroorganismen kann in zwei Phasen aufgeteilt werden. In der ersten, frühen Phase wird die Vermehrung der Mikroorganismen gehemmt bzw. ganz gestoppt. In einer zweiten, sich anschließenden Phase werden die Mikroorganismen von spezifischen Antikörpern markiert und anschließend von speziellen Abwehrzellen zerstört. Die frühe erste Phase beinhaltet sehr viele komplexe systemische Reaktionen, die als Akute-Phase-Reaktion (APR) zusammengefasst werden. Die APR wird von einer Reihe von Zytokinen initiiert und gesteuert. Diese Zytokine werden von einer Anzahl von Zelltypen freigesetzt, z.B. von polymorphkernigen Leukozyten, Monozyten, Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen usw.. In der APR kommt es zu einem Anstieg der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und ihrer Vorstufen. Desweiteren wird die Synthese von bestimmten Proteinen, den sog. Akute-Phase-Proteinen (APPs), in der Leber angeregt. APPs sind eine Gruppe von nahezu dreißig verschiedenen Proteinen, deren Blutspiegel in den ersten 90 min. nach der Infektion ansteigen bzw. sinken. Die APPs haben viele unterschiedliche Aufgaben, hier sollen nur einige Beispiele genannt werden.

- APPs regulieren die Immunantwort
- APPs stimulieren oder hemmen Entzündungsprozesse
- APPs agieren als Transportmoleküle für Entzündungsprodukte
- APPs sind an der Regeneration von zerstörtem Gewebe beteiligt
- APPs agieren als Zytokine
- APPs beeinflussen die Chemotaxis von Zellen
- APPs haben antiproteolytische Effekte

In der initialen Phase der APR ist eine Neutropenie, die von einer Neutrophilie gefolgt wird, zu beobachten (Cannon et al. 1992). Desweiteren entwickelt sich eine Monozytopenie, eine Lymphozytopenie (Richardson et al. 1989) und es kommt zu einer Freisetzung von Laktoferrin. Das freigesetzte Laktoferrin führt zu einer Verminderung des Plasmaeisens (Elin & Wolff 1974), welche wiederum die Replikationsrate von Bakterien reduziert.

Die APR beeinflusst auch eine Reihe von anderen Körperfunktionen, z.B. das endokrine System, die Nahrungsaufnahme, das Schlafbedürfnis und die Thermoregulation. Fieber ist somit nur ein Element aus einem „Pool“ von Abwehrstrategien des Organismus gegen eingedrungene Mikroorganismen oder Fremdeiweiße. Eine Überexpression der fiebererzeugenden Pyrogene kann zum Systemischen-Inflammatorischen-Reaktions-Syndrom (SIRS) und zu einer Sepsis führen (Horn 1998).

## **1.2 Die phylogenetische Entwicklung von Fieber**

Ist der Effekt des Fiebers für den Organismus nun schädlich oder ist er sogar nützlich für ihn? Bennett und Nacastri (1960) stellten in ihrem Review Argumente dar, die dafür und dagegen sprechen. Da das Phänomen Fieber nicht nur auf Organismen beschränkt ist, die ihre Körperkerntemperatur durch Regelkreise innerhalb einer bestimmten Schwankungsbreite halten können (homoiotherme Organismen), sondern auch wechselwarme (poikilotherme) Organismen zur Fieberentwicklung im Stande sind, wurden auch Studien an diesen Organismen durchgeführt. Unter anderem untersuchte man die Fieberentwicklung bei Wüstenleguanen (Kluger et al. 1975). Hierbei wurden die LD<sub>50</sub>-Daten (LD<sub>50</sub> ist die Dosis, bei der 50 % einer bestimmten Population sterben) von zwei Versuchsgruppen verglichen. In einer Gruppe wurde die Fieberentwicklung nach Injektion von Bakterien unterdrückt und in der anderen nicht. Das Ergebnis war, dass die Tiere, die Fieber entwickeln konnten, eine höhere Überlebensrate hatten als die Tiere, die kein Fieber entwickeln konnten.

Das Phänomen der höheren Überlebensrate durch die Induktion von Fieber unterstützt die These, dass die Fieberentwicklung im Verlauf einer bakteriellen Infektion günstig für den kranken Organismus ist.

Die gesteigerte Überlebensrate bei Fieber könnte verschiedene Ursachen haben (Kluger et al. 1975):

- Steigerung der Immunabwehr durch die erhöhte Körpertemperatur
- Abschwächung der Toxizität der Bakterientoxine durch die erhöhte Körpertemperatur
- Verlangsamung des Bakterienwachstums bei Erhöhung der Körpertemperatur auf 42 °C

Allerdings ist ein Fieber von mehr als 42 °C über einen Zeitraum von mehreren Tagen schädlich und gefährlich für den Organismus.

Im weiteren sind einige ausgewählte Experimente bei einzelnen Arten der verschiedenen Tierklassen aus dem Stamm der Vertebraten aufgeführt.

- Aves (Vögel): In Experimenten mit Tauben (*Columba livia*) wurde nachgewiesen, dass diese nach der Injektion von lebenden Pasteurellen (*Pasteurella multocida*) dazu in der Lage sind, Fieber zu entwickeln. Unterschiedliche Dosen von abgetöteten Pasteurellen lösten auch eine komplexe dosisabhängige Fieberantwort aus. Dieses Fieber konnte durch Antipyretika unterdrückt werden (D'Alecy et al. 1975).
- Reptilien (Kriechtiere): Die gleichen Bakterien, die bei Kaninchen Fieber induzieren, führen auch bei Eidechsen, z.B. dem Wüstenleguan (*Dipsosaurus dorsalis*), zu einem gleichartigen Fieber. Aus zweierlei Gründen wird vermutet, dass Reptilien ebenfalls dazu in der Lage sind, Fieber zu entwickeln. Der erste Grund hierfür ist die Analogie der zentralnervösen Steuerung der Thermoregulation des Körpers von Säugetieren und Reptilien. Der zweite Grund ist, dass der Fieberanstieg bei Säugetieren wie auch bei Reptilien mit einer Veränderung des Verhaltens verbunden ist (Vaughn et al. 1974); z.B. suchen sie bei der Fieberentstehung eine wärmere Umgebung auf. Bei den in den Versuchen verwendeten Wüstenleguanen war ein signifikanter Anstieg der Körpertemperatur allerdings erst drei Stunden nach der Injektion des Pyrogens zu beobachten. Diese Beobachtung beruht wahrscheinlich auf der niedrigeren Stoffwechselrate von poikilothermen Tieren gegenüber den homoiothermen.

Wurde die Umgebungstemperatur dagegen konstant gehalten, konnten die Wüstenleguane ihre Körpertemperatur nach der Injektion von Bakterien nicht erhöhen (Vaughn et al. 1974), also kein Fieber entwickeln.

- Amphibien (Lurche): Aus der Gruppe der Amphibien wurden von Kluger (1977) Experimente mit dem grünen Baumfrosch (*Hyla cinerea*) durchgeführt. Durch Injektion von *Aeromonas hydrophila* wurde bei dieser Froschart ein Fieber mit einem mittleren Temperaturanstieg um 2 °C erreicht. Dieses Niveau wurde über einen Zeitraum von 2-4 Stunden gehalten und nach spätestens 24 Stunden war die normale Körpertemperatur wieder erreicht. Wurden die Frösche nur in einer Umgebung ohne unterschiedliche Temperaturgradienten gehalten, entwickelten diese nach Injektion von *Aeromonas hydrophila* kein Fieber. Dies beweist, dass Amphibien, ebenso wie Reptilien, Fieber nur durch das Wählen eines wärmeren Mikroklimas entwickeln können. Der festgestellte Temperaturanstieg nach Injektion von *Aeromonas hydrophila* war zwar statistisch signifikant, aber bei den Tieren ließ sich eine individuelle Variabilität feststellen.
- Osteichthyes (Knochenfische): Die wechselwarmen Knochenfische können ebenfalls, wie auch Reptilien und Amphibien, ein verhaltensgesteuertes Fieber entwickeln. In dem Versuch wurden den Fischen abgetötete *Aeromonas hydrophila* injiziert. Die Fische entwickelten daraufhin ein signifikantes Fieber bzw. sie zeigten eine signifikante Präferenz für eine bestimmte Umgebungstemperatur (Reynolds et al. 1976). Bei diesen Versuchen wurden verschiedene Fischarten getestet.

Säugetiere (Mammalia) und Vögel (Aves) sind gleichwarme (homoiotherme) Tiere. Um die Körpertemperatur während des Fiebers zu steigern, nutzen diese nicht nur ihre Fähigkeit, dies selbst auf physiologischem Wege zu tun, sondern sie nutzen auch die Umgebungstemperatur zu diesem Zweck, indem sie durch ihr Verhalten Wärmeverluste mindern (z.B. eine wärmeres Mikroklima aufsuchen). Den wechselwarmen (poikilothermen) Tieren wie den Reptilien, den Amphibien und den Knochenfischen steht allerdings nur eine Möglichkeit offen, ihre Körpertemperatur während des Fiebers zu erhöhen. Sie können nur über die Wahl des sie umgebenden Mikroklimas, also über ihr Verhalten, ein den homoiothermen Tieren vergleichbares Fieber entwickeln.



Die Regulation der Fieberantwort all dieser Tierklassen (physiologisch- oder verhaltensgesteuert) geschieht zentralnervös in den thermoregulatorischen Strukturen des Hypothalamus. Läsionen im vorderen Hypothalamus führen zu einem Unvermögen, eine erhöhte Körpertemperatur aufrecht zu erhalten. Mediatoren des Fiebers sind Pyrogene, die auf den Hypothalamus einwirken (Reynolds et al. 1976).

Aufgrund der Tatsache, dass auch Knochenfische Fieber entwickeln können, kann angenommen werden, dass der entwicklungsgeschichtliche Ursprung von Fieber als Reaktion des Körpers in der frühen Phase der Entwicklung der Vertebraten lag, noch bevor diese das Land eroberten. Zeitlich ist dieser Ursprung im Ordovizium (vor 500-400 Millionen Jahre) anzusiedeln. Aus dieser Vermutung lässt sich noch ein weiterer Schluss ziehen, nämlich dass der Effekt des Fiebers seit er bei den frühen Vertebraten auftrat, seine Funktion als nützliche Komponente der Immunantwort gegen eingedrungene Krankheitserreger bis heute in den verschiedenen Tierklassen beibehalten hat. Weiterhin kann angenommen werden, dass der bei Wüstenleguanen nachgewiesene positive Effekt des Fiebers auf die Überlebensrate auch auf Säugetiere und Vögel übertragbar ist (D'Alecy & Kluger 1975).

	<b>Knochenfische</b>	<b>Amphibien</b>	<b>Reptilien</b>	<b>Vögel</b>	<b>Säugetiere</b>
Fieberinduktion durch lebende Bakterien	?	+	+	+	+
Fieberinduktion durch tote Bakterien	+	+	+	+	+
Acetylsalicylsäure (Aspirin®) reduziert das Fieber	?	?	+	+	+
Fieber ist hilfreich für die Bekämpfung von Krankheitserregern	?	?	+	?	+

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Fieberantworten ausgewählter Tierklassen;

? → Reaktion unbekannt; + → Antwort positiv (modifiziert nach Bernheim et al. 1979)

Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die einzelnen Tierklassen unabhängig voneinander das Symptom Fieber als Komponente der Immunantwort auf den Kontakt mit Endotoxinen entwickelt haben (Vaughn et al. 1974).

Inzwischen ist auch bei verschiedenen wirbellosen (Invertebraten) Arten ein verhaltensgesteuertes Fieber als Abwehrreaktion des Organismus auf eingedrungene Krankheitserreger bzw. Endotoxine bekannt. In einer Übersichtsarbeit von Kluger (1991) sind diese dargestellt. Es handelt sich hierbei um Blutegel, Skorpione, Krebse und Heuschrecken. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man vermuten, dass das Symptom Fieber schon lange bevor die ersten Vertebraten in der Erdgeschichte auftauchten, zu den Abwehrmechanismen einiger Tiere gehörte.

### **1.3 Mediatoren der Fieberreaktion**

Mediatoren der Fieberreaktion sind exogene Pyrogene, die wiederum endogene Pyrogene freisetzen können oder auch direkte Reaktionen im Organismus hervorrufen. „Gegenspieler“ dieser Pyrogene sind die körpereigenen Kryogene. Diese sollen die Fieberantwort limitieren und dafür sorgen, dass die Körperkerntemperatur nicht in einen Bereich ansteigt, der für den Organismus schädlich bzw. sogar tödlich ist. Diese Begriffe sind ebenfalls von der „Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission)“ definiert worden.

#### *1.3.1 Exogene Pyrogene*

Der Begriff des exogenen Pyrogens wurde von der IUPS Thermal Commission wie folgt definiert:

Definition exogenes Pyrogen: Ein exogenes Pyrogen ist eine Substanz, die beim Eindringen in einen vielzelligen Organismus eine Fieberreaktion induziert. Meist ist nicht das exogene Pyrogen selbst fieberauslösend, sondern endogene Pyrogene, deren Produktion stimuliert wird und/oder die freigesetzt werden. Die wirkungsvollsten exogenen Pyrogene sind hitzestabile Lipopolysaccharide (LPS), es handelt sich hierbei um Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien (siehe hierzu auch Abschnitt 2.4.3 LPS im Kapitel Material & Methoden). Lipopolysaccharide werden auch als Endotoxine bezeichnet. Neben LPS existieren noch viele weitere exogene Pyrogene, die allerdings eine andere molekulare Struktur besitzen. So können Pyrogene aus Komponenten von Bakterien, Viren, Pilzen, Mykobakterien und einigen Protozoen bestehen, oder aber es handelt sich um Fremdproteine oder -steroiden (IUPS Thermal Commission 1987; siehe auch Tabelle 2).

Das am besten erforschte und potenteste exogene Pyrogen ist das von gramnegativen Bakterien stammende LPS. Es hat einen komplexen Aufbau und besteht aus mehreren Komponenten (siehe hierzu Abschnitt 2.4.3 im Kapitel 2 Material & Methoden). Als biologisch aktive Komponente wurde das Lipid A charakterisiert (Freundenberg und Galanos 1990). Gram-positive Bakterien besitzen Peptidoglykane, deren aktive Komponente das Muramyl-dipeptid (MDP) ist (Krueger 1990). Dieses Peptid hat eine ähnliche biologische Aktivität wie LPS, ist jedoch ein nicht so potentes Pyrogen wie dieses (Zeisberger & Roth 1998). Bei den fiebererzeugenden viralen Komponenten handelt es sich um doppelsträngige Polyribonukleotide (Cooper et al. 1988).

<b>Exogene Pyrogene</b>	<b>Mikroorganismen</b> (Viren, Bakterien, Mykobakterien, Pilze & Parasiten)
	<b>Nicht-Mikrobielle-Agentien</b> (Antigene, Entzündungsmediatoren, pflanzliche Lektine oder Alkaloide)
	<b>synthetische Produkte</b> (Polynukleotide, Antitumor-Produkte, Immun-adjuvanzien)
	<b>körpereigene Substanzen*</b> (Antigen-Antikörperkomplexe, zerstörtes Gewebe, Fragmente von aktivierten Komplementfaktoren, bestimmte Metaboliten, Lymphozytenprodukte)

Tabelle 2: Übersichtstabelle exogener Pyrogene  
\*laut Definition oben eigentlich keine exogenen Pyrogene

Experimentelle Studien über die Effekte von exogenen Pyrogenen wurden zum größten Teil mit LPS durchgeführt.

### 1.3.2 Endogene Pyrogene

Erste Anzeichen für die Existenz von endogenen Pyrogenen beschrieb Beeson (1948). Er fand heraus, dass Granulozyten, die aus einem pyrogenfreien Bauchhöhlenpunktat stammten, Pyrogene freisetzen konnten. Bennett & Beeson (1953 a,b) demonstrierten, dass ein von Leukozyten gewonnenes Pyrogen hitzelabil war, der Organismus keine Toleranz nach mehrmaliger Applikation dagegen entwickelte und in Tieren, die tolerant gegenüber bakteriellem Pyrogen waren, trotzdem Fieber auslösten. Dieses Pyrogen wurde als Leukozyten-Pyrogen (LP) bezeichnet. Es wurden noch verschiedene andere Pyrogene gefunden, wie z.B. Leukozyten-Endogener-Mediator (LEM) (Kampschmidt 1978) oder Lymphozyten-Aktivierender-Faktor (LAF) (Gery & Waksman 1972). Erst in den letzten zwanzig Jahren fand man heraus, dass es sich bei LP, LEM und LAF um ein und dieselbe Substanz handelte. Heute wird diese Substanz als Interleukin1 (IL1) bezeichnet.

Mittlerweile sind noch andere endogene Pyrogene bekannt, deren genaue biochemische Struktur ebenfalls erforscht ist.

Von der IUPS Thermal Commission wurde der Begriff des endogenen Pyrogens wie folgt definiert:

Definition endogenes Pyrogen: Ein endogenes (körpereigenes) Pyrogen ist ein hitzelabiles körpereigenes Polypeptid, das von bestimmten Zellen eines vielzelligen Organismus produziert wird und in diesem Fieber verursacht. Diese Produktion wird einerseits durch exogene Pyrogene und andererseits auch durch pathologische endogene Komponenten wie z.B. Antigen-Antikörper-Komplexe stimuliert. Das wohl am besten untersuchte endogene Pyrogen ist Interleukin1, es ist auch mit großer Wahrscheinlichkeit das bedeutendste. Es ist eine Komponente der Akute-Phase-Reaktion (APR) und wird von mononukleären Phagozyten (einschließlich den Makrophagen) produziert und freigesetzt. Auch bei vielen anderen nicht-makrophagenartigen Zellen (Keratinozyten, Langerhans-Zellen, Mikroglia-Zellen, Astrozyten, Tumorzellen, Gingival- und Korneaepithelzellen) wird vermutet, dass sie als Quelle von Substanzen in Frage kommen, die zu den endogenen Pyrogenen gezählt werden. Noch viele andere endogene Peptide außer IL1 wirken direkt als Pyrogene z.B. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) oder Interferon (INF,  $\text{INF } \alpha$  und  $\gamma$ ) (IUPS Thermal Commission 1987).

Um die Zuordnung von Substanzen zur Klasse der endogenen Pyrogene zu vereinheitlichen, postulierte Kluger (1991) fünf Kriterien, die ein endogenes Pyrogen erfüllen sollte:

- Kriterium 1: Die Applikation von einem potenziellen endogenen Pyrogen an seinen vermuteten Wirkungsort resultiert in einem Anstieg der Körpertemperatur.
- Kriterium 2: Induziert ein exogenes Pyrogen Fieber, so steht das daraufhin freigesetzte potenzielle endogene Pyrogen in einem quantitativen Zusammenhang zu der Höhe des Anstiegs der Körpertemperatur. Die Menge des freigesetzten endogenen Pyrogens entspricht der Menge des Pyrogens, die benötigt wird, um denselben Fieberanstieg nach der Applikation an den vermuteten Wirkungsort zu erreichen.

- Kriterium 3: Der Anstieg der Körpertemperatur nach der Applikation eines potenziellen endogenen Pyrogens sollte auch mit einer entsprechenden thermoregulatorischen Antwort verbunden sein, wie sie bei einer Erhöhung des thermoregulatorischen Setpoints beobachtet werden kann (Vasokonstriktion, Kältegefühl, Verhaltensänderung, gesteigerte Wärmeproduktion).
- Kriterium 4: Substanzen, die die Produktion eines potenziellen endogenen Pyrogens blockieren, sollten auch einen Anstieg der Körpertemperatur verhindern. (Sollte die Substanz die Produktion des potenziellen endogenen Pyrogens zwar blockieren, aber die Fieberentstehung nicht ganz bzw. nur unvollständig hemmen, so kann vermutet werden, dass noch andere Pyrogene an der Fieberinduzierung beteiligt sind.)
- Kriterium 5: Substanzen, die die Wirkung eines potenziellen endogenen Pyrogens blockieren, sollten auch einen Anstieg der Körpertemperatur verhindern. (Sollte die Substanz die Wirkung des potenziellen endogenen Pyrogens zwar blockieren, aber die Fieberentstehung nicht ganz bzw. nur unvollständig hemmen, so kann vermutet werden, dass noch andere Pyrogene an der Fieberinduzierung beteiligt sind.)

Keines der bisher bekannten endogenen Pyrogene erfüllt die oben angeführten Kriterien vollständig, und als Resultat dessen konnte bisher die genaue Rolle der bekannten endogenen Pyrogene bei der Fieberentstehung nicht bis ins Detail geklärt werden. Die meisten endogenen Pyrogene gehören zur Familie der Zytokine. Der Begriff Familie bezeichnet bei den Zytokinen keine einheitliche Struktur, sondern eine funktionelle Gemeinsamkeit der Substanzen, die zu dieser Familie gezählt werden. Zytokine sind meist Glykoproteine von einem MG von 8-25 kDa. Die Zytokine werden von einer Vielzahl von Zellen synthetisiert, z.B. von Makrophagen, Monozyten, B- und T-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen oder von Astrozyten. Bei der Fieberinduktion spielen vor allem die Zytokine aus den Zytokingruppen der Interleukine (ILs), der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNFs), der Interferone (INFs) und der Makrophagen-Inflammatorischen-Proteine (MIPs) eine Rolle. Diese Mediatoren bilden im Körper ein Kommunikationsnetzwerk, das sogenannte Zytokinnetzwerk, welches an jeder Immunantwort beteiligt ist (Roitt et al. 1995).

Hierbei ist kennzeichnend, dass nur das Zusammenspiel der einzelnen Zytokine miteinander eine kompetente Immunabwehr hervorbringt. Dies erklärt auch die Schwierigkeit der Untersuchung nur eines einzigen Zytokins bzw. dessen Effekte im Körper.

Bezeichnung	MG	Biochemische Formen	Effekte (im Zusammenhang mit der Fieberinduktion)	Wirkung als endogenes Pyrogen	Freigesetzte Mediatoren	Vorkommen	
						Peripherie	ZNS
<b>Interleukin 1 (IL1)</b> <small>IL1<math>\alpha</math>→membran-gebunden IL1<math>\beta</math>→ freie/gelöste Form</small>	IL1 $\alpha$ 33 kDa IL1 $\beta$ 17,5kDa	IL1 $\alpha$ IL1 $\beta$	-Initiierung von APP -Aktivierung der HPA-Achse -Initiierung von $\delta$ -Schlaf u. Anorexie	+++	PGE <sub>2</sub> NO IL6 IL8	X	X
<b>Interleukin 6 (IL6)</b>	20 kDa	-	-Initiierung von APP -Senkung der Plasmakonzentrationen von Zink u. Eisen -Aktivierung der HPA-Achse	++	PGE <sub>2</sub> im ZNS	X	X
<b>Interleukin 8 (IL8)</b>	8 kDa	-	-	+	-	X	-
<b>Tumor-Nekrose-Faktor <math>\alpha</math> (TNF<math>\alpha</math>)</b>	50 kDa	TNF $\alpha$	-Aktivierung der HPA-Achse -beteiligt an der Entstehung der Sepsis	++ (?)	PGE <sub>2</sub> IL6 NO	X	X
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	8 kDa	-	-	+	-	X	X
<b>PGE<sub>2</sub></b>	351 g/mol	-	-Erhöhung der Gehirndurchblutung -beteiligt an der Entstehung der Sepsis	+++	NO	X	X
<b>Stickstoffmonoxid (NO)</b>	30 g/mol	-	-Erhöhung der Gehirndurchblutung -beteiligt an der Entstehung der Sepsis	++	PGE <sub>2</sub>	X	X

Tabelle 3: Übersicht über die endogenen Pyrogene, die nach Kontakt mit LPS im Körper gebildet werden

Quelle: Roitt et al. 1995, Colotta et al. 1998, Kluger et al. 1991, Krueger et al. 1994, Hellerstein et al. 1989, Shalaby et al. 1989, Roth et al. 1993, Roth et al. 1998 b, Sakata et al. 1991, Akira et al. 1990, Schöbitz et al. 1995, Zampronio et al. 1994a, Van Zee et al. 1991, Minano et al. 1996, Roth et al. 1998 c/d

Wie oben bereits erwähnt, erfüllen die meisten endogenen Pyrogene die Kriterien, die sie als solche charakterisieren, nicht vollständig (Kluger 1991). Beispielsweise wird die Rolle von  $\text{TNF}\alpha$  als endogenes Pyrogen kontrovers diskutiert.  $\text{TNF}\alpha$  induziert zwar, wenn man es in hohen Dosen verabreicht, beim Menschen (Michie et al. 1988) und bei verschiedenen Tierarten [Kaninchen (Dinarelo et al. 1986 b), Ratten (Long et al. 1990), Meerschweinchen (Goldbach et al. 1997a), Mäusen (Kozak et al. 1995)] Fieber, aber ist es wirklich ein endogenes Pyrogen? Was dagegen spricht ist, dass die  $\text{TNF}\alpha$ -Plasmaspiegel nur wenig mit der simultan gemessenen fieberhaften Erhöhung der Körpertemperatur korrelieren (Kluger 1991). In einem anderen Tierexperiment wurde ein  $\text{TNF}$ -Antiserum eingesetzt. Die Anwendung dieses Antiserums bei der Ratte in Kombination mit LPS führte nicht zu einer Fiebersenkung, sondern zu einer Fieberverstärkung (Long et al. 1990). Die Art der Wirkungsweise von  $\text{TNF}\alpha$  (pyretisch oder antipyretisch) könnte einerseits durch die Art des Stimulus (Pyrogen) (Long et al. 1990; Cooper et al. 1994; Leon et al. 1997) und/oder durch die Dosis des Stimulus (Leon et al. 1997) bedingt sein. Aber auch speziesspezifische Unterschiede in der Wirkungsweise von  $\text{TNF}\alpha$  müssen in Betracht gezogen werden.  $\text{TNF}\alpha$  wirkt beim Tiermodell Meerschweinchen jedenfalls als endogenes Pyrogen (Goldbach et al. 1997a; Roth et al. 1998 b).

Die Zytokine beeinflussen sich auch gegenseitig. So induzieren z.B.  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$  die Biosynthese von  $\text{IL6}$  (Akira et al. 1990, Shalaby et al. 1989); dieses wiederum hemmt die Freisetzung seiner beiden Inducer oder aber die Zytokinfreisetzung wird durch das Zytokin selbst reguliert (negatives Feedback), wie beispielsweise bei  $\text{IL1}\beta$ . Nach dem Eindringen eines exogenen Pyrogens wird eine als Zytokinkaskade bezeichnete Reaktionskette in Gang gesetzt. Neben den Zytokinen existieren aber auch noch andere endogene Pyrogene. Die beiden wichtigsten sind Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) und Stickstoffmonoxid (NO). Zytokine wie z.B. Interleukin1 ( $\text{IL1}$ ), Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) oder auch Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) induzieren wiederum unter anderem die Biosynthese dieser Pyrogene, wie z.B. die Bildung der induzierbaren Enzymform der Cyclooxygenase ( $\text{COX-2}$ ) welche an der Biosynthese von Prostaglandinen beteiligt ist (Breder et al. 1996, Cao et al. 1997) oder der Stickstoffmonoxid-Synthase ( $\text{iNOS}$ ) (Nathan et al. 1992, Schmid et al. 1998). Die Mediatoren können sowohl in der Peripherie als auch im Gehirn vorkommen. Die meisten Zytokine sind multifunktionell, d. h. sie beeinflussen meist viele Organe bzw. Körperfunktionen.

So hat IL1 beispielsweise Effekte auf die hämopoetischen Zellen, auf das Blutgefäßsystem, das neuroendokrine System, auf die Akute-Phase-Reaktion oder auf das ZNS.

Bei der Fieberinduktion werden zwei verschiedene Wege vermutet, ein mehr oder weniger Prostaglandin-(PG)-E<sub>2</sub>-abhängiger Weg (Zetterström et al. 1998) und ein PGE<sub>2</sub>-unabhängiger Weg (Davatellis et al. 1989, Zampronio et al. 1994a, Szelényi et al. 1997).

- PGE<sub>2</sub>-abhängiger Weg: exogenes Pyrogen → IL1β & TNFα → IL6 → PGE<sub>2</sub> → Fieber\*
  - PGE<sub>2</sub>-unabhängiger Weg: exogenes Pyrogen → MIP, Substanz P & IL-8 → Fieber\*
- (\* stark vereinfachte Darstellung)

PGE<sub>2</sub> spielt bei der Fieberinduktion im Gehirn eine Schlüsselrolle. Diese Schlüsselrolle wird durch folgende Versuche bekräftigt:

- Werden Prostaglandine in die Gehirnventrikel injiziert, wird Fieber induziert (Milton & Wendlandt 1971, Bligh & Milton 1973, Bligh 1998)
- Während eines pyrogeninduzierten Fiebers können im Liquor cerebrospinalis Prostaglandine nachgewiesen werden (Feldberg & Gupta 1973, Feldberg et al. 1973)
- Die Liquor- (Abul et al. 1997, Sehic et al. 1996a) und Plasmaspiegel (Rotondo et al. 1988) von Prostaglandinen korrelieren stark mit den Temperaturveränderungen während des pyrogeninduzierten Fiebers
- Die durch exogene oder endogene Pyrogene induzierte Prostaglandinsynthese und somit auch das induzierte Fieber können durch Cyclooxygenaseinhibitoren vermindert oder sogar verhindert werden (Vane 1971, Vane & Botting 1998, Milton 1998)
- Mäuse, denen ein spezieller PGE<sub>2</sub>-Rezeptor (EP3) fehlt, zeigen nach einer peripheren Injektion von IL1β oder LPS eine verminderte Fieberantwort (Ushikubi et al. 1998)

Neben den Prostaglandinen spielt auch NO eine große Rolle bei der Fieberinduktion. LPS und einige Zytokine (IL1β und TNFα) induzieren in Makrophagen und Gefäßendothelzellen die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Moncada et al. 1991) (siehe auch im Kapitel: „Material & Methoden“, Abschnitt L-NAME). NO kann somit als thermoregulatorische Substanz bezeichnet werden (Schmid et al. 1998).



Bei der Wirkungsweise von NO auf die Fieberantwort gibt es speziesspezifische Unterschiede. Beim Kaninchen wirkt NO beispielsweise antipyretisch, NO-Donoren reduzieren die Fieberantwort und NO-Inhibitoren verstärken die Fieberantwort (Gourine 1995, Weihrauch & Riedel 1997).

Dieser Umstand ist dadurch zu erklären, dass Kaninchen zur Fieberinduktion hauptsächlich Blutkreislauf-Regelmechanismen einsetzen, wie z.B. eine periphere Vasokonstriktion und somit auch eine verminderte Wärmeabgabe über die Hautoberfläche. NO wirkt bei dieser Tierart als Vasodilatator und somit als Antipyretikum. Beim Meerschweinchen (Roth et al. 1998 c) und bei der Ratte (Reimers et al. 1994) wirkt NO eher als Pyretikum. Diese Tierarten benutzen hauptsächlich wärmeerzeugende Mechanismen zur Fieberentstehung, wie z.B. die Noradrenalin-vermittelte Stoffwechselsteigerung im braunen Fett. NOS-Inhibitoren haben bei Ratten und Meerschweinchen (Roth et al. 1998 c/d) den Effekt, diese wärmeerzeugenden Mechanismen zu hemmen. NO greift aber auch noch anders in die Fieberinduktion ein, beispielsweise stimuliert NO direkt die Synthese von PGE<sub>2</sub> (Salvemini et al. 1994). Auf diesem Weg könnte eine Hemmung der NOS durch L-NAME die durch LPS induzierte Freisetzung von PGE<sub>2</sub> reduzieren. Eine andere Erklärung für die Fiebersenkung durch NOS-Inhibitoren könnte die Tatsache sein, dass die Hemmung der HPA-Achse aufgrund der Wirkung von NO durch NOS-Inhibitoren vermindert wird, und so antipyretisch wirkende Glukokortikoide in größeren Mengen freigesetzt werden.

### 1.3.3 *Kryogene*

Die „Gegenspieler“ der endogenen Pyrogene sind die endogenen Kryogene. Diese werden in der Regel von den endogenen Pyrogenen oder den exogenen Pyrogenen induziert und sollen die Fieberantwort limitieren.

Von der IUPS Thermal Commission wurde der Begriff des Kryogens wie folgt definiert:

Definition Kryogen: Ein Kryogen ist eine endogene oder exogene Substanz, die den Setpoint der Körperkerntemperatur nachdem dieser durch Pyrogene heraufgesetzt wurde wieder auf seinen Normalwert zurückführt und somit eine Temperatursenkung (Anapyrexie) auslöst (IUPS Thermal Commission, 1987).

Kluger (1991) postulierte fünf Kriterien, die ein endogenes Kryogen erfüllen sollte. Diese Kriterien entstanden in Anlehnung an die Kriterien für endogene Pyrogene. Ebenso wie bei diesen gibt es keine Substanz, die alle Kriterien erfüllt.

- Kriterium 1: Die Applikation von einem potenziellen endogenen Kryogen an seinen vermuteten Wirkungsort resultiert in einem Abfall der Körpertemperatur.
  - Kriterium 2: Das während eines Fiebers freigesetzte potenzielle endogene Kryogen sollte in einem quantitativen Zusammenhang zu dem Abfall der Körpertemperatur stehen. Die Menge des freigesetzten endogenen Kryogens entspricht der Menge des Kryogens, die benötigt wird, um denselben Temperaturabfall nach der Applikation an den vermuteten Wirkungsort zu erreichen.\*
  - Kriterium 3: Die durch das endogene Kryogen induzierte Antipyrese sollte von gleichgerichteten thermoregulatorischen Effektorreaktionen begleitet sein, die zu einer Herabsetzung des thermoregulatorischen Setpoints führen (Vasodilatation, Reduzierung der Stoffwechselaktivität, Steigerung der evaporativen Wärmeabgabe durch Schwitzen oder Hecheln).
  - Kriterium 4: Substanzen, die die Produktion eines potenziellen endogenen Kryogens blockieren, sollten zu einem stärkeren fieberhaften Anstieg der Körpertemperatur führen. Sollte die Substanz die Produktion des potenziellen endogenen Kryogens zwar blockieren, aber die Fieberreduzierung nicht ganz bzw. nur unvollständig verhindern, so kann vermutet werden, dass noch andere Kryogene an der Fieberreduktion beteiligt sind.
  - Kriterium 5: Substanzen, die die Wirkung eines potenziellen endogenen Kryogens blockieren, sollten auch eine Reduzierung der Körpertemperatur verhindern. Sollte die Substanz die Wirkung des potenziellen endogenen Kryogens zwar blockieren, aber die Fieberreduzierung nicht ganz bzw. nur unvollständig verhindern, so kann vermutet werden, dass noch andere Kryogene an der Fieberreduzierung beteiligt sind.
- \* Die Erfüllung dieses Kriteriums setzt allerdings voraus, dass die Anzahl der Rezeptoren für das endogene Kryogen gleichbleibt, denn eine Erhöhung der Rezeptordichte während des Fiebers würde eine Korrelation zwischen der Konzentration des endogenen Kryogens (Plasma oder Liquor cerebrospinalis) und der Fieberantwort verhindern.

Die wichtigsten endogenen Kryogene sind das Arginin Vasopressin (AVP; ADH - Anti-Diuretisches-Hormon), das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende-Hormon ( $\alpha$ MSH) und die Glukokortikoide. Die endogenen Kryogene wirken nicht nur im ZNS. So zeigten Versuche bei Ratten, dass  $\alpha$ MSH ebenfalls nach peripherer Injektion die Fieberantwort unterdrückte (Bull et al. 1990, Martin et al. 1990).

Wird die Wirkung der endogenen Kryogene z.B. durch Antiseren (Shih et al. 1986) oder Rezeptorantagonisten (Kovacs et al. 1992) unterdrückt, so kommt es zu einer Verlängerung und Verstärkung der Fieberantwort.

Substanz	Vorkommen	Substanz wird induziert durch	Wirkung*
<b>AVP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ZNS &amp; Peripherie</li> <li>• wird von der Neurohypophyse freigesetzt</li> <li>• negatives Feedback über Prostaglandine (?)</li> </ul>	IL1 $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• induziert <math>\alpha</math>MSH</li> <li>• setzt den thermoregulatorischen Setpoint herab</li> </ul>
<b><math>\alpha</math>MSH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ZNS &amp; Peripherie</li> <li>• Abspaltungsprodukt von ACTH</li> </ul>	AVP IL1 $\beta$ IL2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunsuppressiv</li> <li>• Antagonisiert Wirkung der endogenen Pyrogene</li> </ul>
<b>Glukokortikoide</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Freisetzung aus der Nebennierenrinde nach Aktivierung der HPA-Achse</li> </ul>	IL1 $\beta$ IL6 TNF $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hemmt die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> und von IL6</li> <li>• Immunsuppression</li> </ul>

Tabelle 4: Übersicht der wichtigsten endogenen Kryogene Quelle:

Martin

& Lipton 1990

\*hier sind nur die Effekte aufgezählt, die zur Antipyrese beitragen

Es gibt Hinweise darauf, dass Antipyretika wie z.B. Acetylsalicylsäure (ASS; Aspirin<sup>®</sup>) die Produktion von AVP induzieren und über diesen Weg die Fieberantwort blockieren (Alexander et al. 1989). Aufgrund dieser Möglichkeit scheint es wahrscheinlich, dass Prostaglandine (PGs) über einen negativen Feedback-Mechanismus die Freisetzung von AVP hemmen (Kluger et al. 1998a).

Ein anderes wichtiges endogenes Kryogen stellen die Glukokortikoide dar. Diese werden nach der Aktivierung der Hypophysen-Nebennieren-(HPA)-Achse durch die endogenen Pyrogene (IL1 $\beta$ , IL6 und TNF $\alpha$ ) (Roitt et al. 1995) aus der Nebennierenrinde freigesetzt.

Die freigesetzten Glukokortikoide sind einerseits an der Kontrolle der Immunantwort beteiligt und hemmen andererseits die Freisetzung der Zytokine (IL1 $\beta$ , IL6 und TNF $\alpha$ ), die die HPA-Achse aktivieren (negatives Feedback; Colotta et al. 1998). Siehe hierzu Abbildung 3.

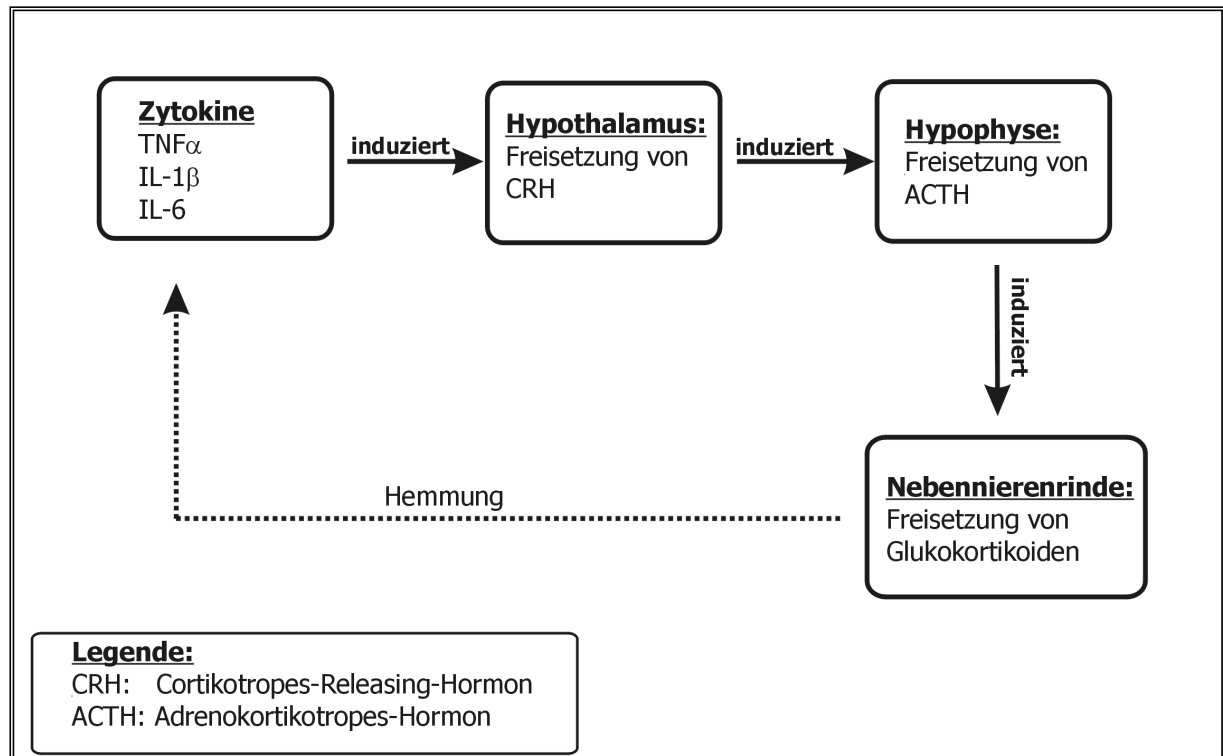


Abbildung 3: Übersichtsbild zur Kontrolle der HPA-Achse

#### 1.4 Theorien zu Signalübertragungsmechanismen bei der Fieberantwort

Über welche Mechanismen gelangen nun die peripheren pyrogenen Signale ins Gehirn und lösen dort eine Fieberantwort aus?

Das thermoregulatorische Zentrum liegt im vorderen Hypothalamus in der Präoptischen Region (preoptic area; POA). Diese, wie auch das übrige Gehirn, ist durch die Blut-Hirn-Schranke (Blood-Brain-Barrier; BBB) vom übrigen Körper abgeschottet. Die Endothelzellen der Kapillaren schließen im Gehirn dichter als in anderen Geweben aneinander, sie besitzen sogenannte Tight junctions. Zusätzlich sind die Kapillaren im Gehirn noch von einer Schicht aus Gliazellen (Membrana gliae limitans perivaskularis) umgeben. Auch die Möglichkeit zur Transzytose (transzellulärer Transport) ist bei den Endothelzellen stark eingeschränkt. Diese Schutzmechanismen machen die Gehirnkapillaren nahezu impermeabel. Die Blut-Hirn-Schranke ist nur für lipidlösliche, nichtpolare Substanzen durchlässig, diese können entsprechend ihrem Diffusionsgradienten durch die Membran der Endothelzellen hindurch diffundieren. Aber auch die Tight junctions zwischen den Endothelzellen sind nicht absolut undurchlässig; so können durch sie Moleküle wie z.B. Wasser, die eine geringere relative Molekülmasse als 90 und einen Molekülradius von höchstens 0,2 nm haben, passieren.

Somit scheint der passive Transport von endogenen Pyrogenen, wie z.B. den Zytokinen (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL6), durch die BBB unmöglich zu sein. Allerdings ist die Permeabilität der BBB bei bestimmten pathophysiologischen Vorgängen, wie z.B. Fieber, Hypoxie oder einer durch Bakterien verursachte Toxämie erhöht.

Für die Signalübertragung der peripheren Immunsignale zum Gehirn gibt es verschiedene Theorien:

- Aktiver Transportmechanismus für Zytokine durch die Blut-Hirn-Schranke. Dieser Vorgang ist sättigbar. In Ratten und Mäusen wurden solche aktiven Transportvorgänge für IL1, IL6 und TNF $\alpha$  beschrieben (Banks et al. 1995, Banks & Kastin 1996, Plotkin et al. 1996, Pan et al. 1997, Maness et al. 1998). Allerdings ist die Menge an Zytokinen, die über solche Transportmechanismen die Präoptische Region (POA) erreicht, für die Initiierung der Fieberreaktion höchstwahrscheinlich nicht ausreichend. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Weg für die weitere Fieberentwicklung oder auch für Vorgänge, die mit der Fieberantwort zusammenhängen (Anorexie usw.), eine Rolle spielen (Blatteis et al. 1997).
- Eintritt der endogenen Pyrogene über bestimmte ZNS-Regionen, in denen die Blutkapillaren fenestriert sind. Diese Bereiche, in denen keine vollständige BBB existiert, werden auch zirkumventrikuläre Organe genannt. Zu den zirkumventrikulären Organen zählt das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), das Subfornicale Organ (SFO), die Eminentia mediana, die Neurohypophyse, die Area postrema, das Subkommissurale Organ und Teile der Epiphyse. All diese Gebiete erlauben den Eintritt von peripheren Immunsignalen ins Gehirn. Wegen seiner Nähe zur POA wird das OVLT von einigen Autoren als die wichtigste Region zur Fieberinduktion angesehen. Das OVLT liegt in der vorderen ventralen Wand des dritten Ventrikels in unmittelbarer Nachbarschaft zur umgebenden POA. Die Zytokine können durch die fenestrierten Kapillaren in den perivaskulären Raum eindringen, anschließend werden möglicherweise sekundäre Signale zur POA vermittelt. Eine direkte Diffusion der Zytokine zur POA ist eher unwahrscheinlich (Blatteis et al. 1997). Man vermutet, dass die Zytokine die lokale Bildung von PGE<sub>2</sub> in Neuronen, Astrozyten, Makrophagen und Endothelzellen des OVLT induzieren.

Das freigesetzte PGE<sub>2</sub> soll wiederum an Neurone binden, die in die POA projizieren (Blatteis et al. 1997). Somit wirkt PGE<sub>2</sub> im Gehirn als Second-messenger.

- Bindung von zirkulierenden, peripheren Zytokinen an spezifische Rezeptoren im perivaskulären Raum der zirkumventrikulären Organe. Diese spezifischen Rezeptoren befinden sich an den Ausläufern von Gliazellen, die die Kapillaren umgeben, oder sie befinden sich auf der Zelloberfläche von Gehirnendothelzellen. Diese Zellen setzen daraufhin wieder Second-messenger, wie NO oder PGs auf ihrer „luminalen“ Seite frei (Zeisberger 2000).
- Signalübertragung der peripheren Immunsignale ins Gehirn durch Lymphozyten. T-Lymphozyten besitzen die Möglichkeit, die BBB zu überwinden. Im Gehirn können diese dann proinflammatorische Zytokine freisetzen. Diese aktivieren wiederum Gliazellen zur Freisetzung von Mediatoren z.B. Zell-Adhäsions-Molekülen, NO oder PGs (Neuman & Wekerle 1998).
- Neuronale Signalübertragung über afferente Bahnen des autonomen, peripheren Nervensystems. Beweise für eine Beteiligung des Nervus vagus (N. vagus) an dem Transport von peripheren Immunsignalen zum Gehirn ergaben sich aus der Beobachtung, dass eine Durchtrennung der abdominalen Stränge des N. vagus (subdiaphragmatische Vagotomie) eine Reihe von ZNS-kontrollierten Begleitsymptomen der Immunantwort, welche normalerweise nach intraperitonealer (i.p.) oder intravenöser (i.v.) Applikation von moderaten LPS-Dosen oder von proinflammatorischen Zytokinen zu beobachten sind, teilweise unterdrückt oder sogar ganz aufhebt (Goehler et al. 1995, Sehic & Blatteis 1996b, Watkins et al. 1994a, Goldbach 1997b).  
So kann beispielsweise das typische Verhalten von kranken Tieren („sickness behaviour“), welches durch i.p. Injektion von LPS (Bluthe et al. 1994) oder von IL1 $\beta$  (Bluthe et al. 1996) induziert werden kann, durch subdiaphragmatische Vagotomie verhindert werden. Auch die durch LPS oder durch Zytokine hervorgerufene Aktivierung der HPA-Achse (Gaykema et al. 1995, Fleschner et al. 1998), Hyperalgesie (Watkins et al. 1994b) oder Steigerung des  $\delta$ -Schlafes (Hansen et al. 1997) können durch eine subdiaphragmatische Vagotomie unterdrückt werden.

Sogar die durch LPS induzierte Expression von cfOS („immediate early genes“; neuronaler Aktivitätsmarker) und von IL1 $\beta$  innerhalb des Gehirns wurde durch die Vagotomie bei Ratten und Mäusen unterdrückt (Wan et al. 1994, Laye et al. 1995). Auch über eine Unterdrückung von LPS induziertem Fieber beim Meerschweinchen (Blatteis et al. 1997, Goldbach et al. 1997b) und bei Ratten (Romanovsky et al. 1997) wird berichtet. Allerdings scheint dieser Effekt einerseits von der injizierten LPS-Dosis (Romanovsky et al. 1997) und andererseits von der Applikationsart (lokal oder systemisch) abhängig zu sein (Goldbach et al. 1997b). In einer anderen Studie, die bei Ratten durchgeführt wurde, wird dagegen berichtet, dass eine subdiaphragmatische Vagotomie keine signifikante Unterdrückung der Fieberantwort nach LPS- oder IL1-Gabe bewirkte (Luheshi 1998).

Es könnte allerdings auch sein, dass die oben erwähnten Effekte nicht auf die Beteiligung des N. vagus an der Signalübertragungskette Immunsystem-Gehirn beruhen, sondern sie als Reaktion auf die Vagotomie selbst anzusehen sind. Die Vagotomie könnte beispielsweise eine potente Störgröße in der Körperhomöostase darstellen. Diese Schlussfolgerung kann allerdings verneint werden, da mittlerweile die Existenz von IL1 $\beta$  Rezeptoren in der Portalregion der Leber nachgewiesen worden ist. Diese Rezeptoren befinden sich an den freien Nervenendigungen des N. vagus Astes, der die Leber versorgt (Niiijima 1996). Eine Vorbehandlung der Tiere mit einem IL1 Rezeptor Antagonisten (IL1ra) verhinderte die Entstehung von Krankheitssymptomen, die nach intraperitonealer Endotoxin- oder IL1 $\beta$ -Injektion entstehen würden (Goehler et al. 1998, Maier et al. 1993, Schotanus et al. 1993, Watkins et al. 1994a).

Es wird sogar vermutet, dass die Aktivierung von afferenten Ästen des N. vagus in der Leber von IL1 $\beta$  über PGE<sub>2</sub> vermittelt wird (Niiijima 1996). Die parasymphatischen Paraganglien, die im Halsbereich und im Thorax liegen, besitzen gleichfalls Rezeptoren für IL1 (Goehler et al. 1997). Und diese Paraganglien besitzen wiederum Verbindungen zum N. vagus.

Weitere Experimente wiesen auch die Expressierung von *cfos* in primären afferenten Neuronen des N. vagus nach intraperitonealer Injektion von LPS oder IL1 $\beta$  nach (Goehler et al. 1998, Maier et al. 1993, Schotanus et al. 1993, Watkins et al. 1994a+b). Die afferenten Bahnen des N. vagus werden aber auch nach intravenöser Applikation von LPS aktiviert (Gaykema et al. 1998). Wahrscheinlich spielen hierbei wiederum die Paraganglien eine Rolle (Goehler et al. 1997, Gaykema et al. 1998). Somit kann angenommen werden, dass der N. vagus an dem neuronalen Signalweg beteiligt ist, der im Gehirn zur Fieberinduktion führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keinen exklusiven Weg der Signalübertragung von peripheren Immunsignalen ins Gehirn gibt. Jeder der oben beschriebenen Wege ist Teil einer komplexen Reaktion des Körpers. Im „Kapitel: 4. Diskussion“ werden diese Theorien noch eingehend erörtert, die obige Aufstellung soll nur einen kurzen Einblick in die Thematik geben.

### 1.5 Regelkreis der Fieberentstehung

Die Fieberentstehung unterliegt, wie viele andere physiologische Prozesse, einem *Regelkreis*. Der vordere Hypothalamus stellt den *Regler* (thermoregulatorisches Zentrum) dar, der den *Sollwert* mit dem *Istwert* vergleicht. Werden aufgrund einer Infektion, eines Traumas oder einer Verletzung endogene Pyrogene freigesetzt, so führen diese direkt oder indirekt im vorderen Hypothalamus zu einer Verstellung des Sollwertes („Setpoints“) nach oben, es kommt zu einer sogenannten *Sollwertverstellung*. Der Körper hat nun verschiedene Möglichkeiten die Körpertemperatur zu erhöhen und somit den Istwert wieder dem veränderten Sollwert anzupassen. Die *Stellglieder*, die zur Erhöhung bzw. zur Erniedrigung der Körpertemperatur benutzt werden, sind Verhaltensänderungen und Veränderungen in der Wärmeproduktion bzw. der Wärmeabgabe, wie z.B. Zittern, Schwitzen, Vasokonstriktion und –dilatation oder Stoffwechselsteigerung im braunen Fett.



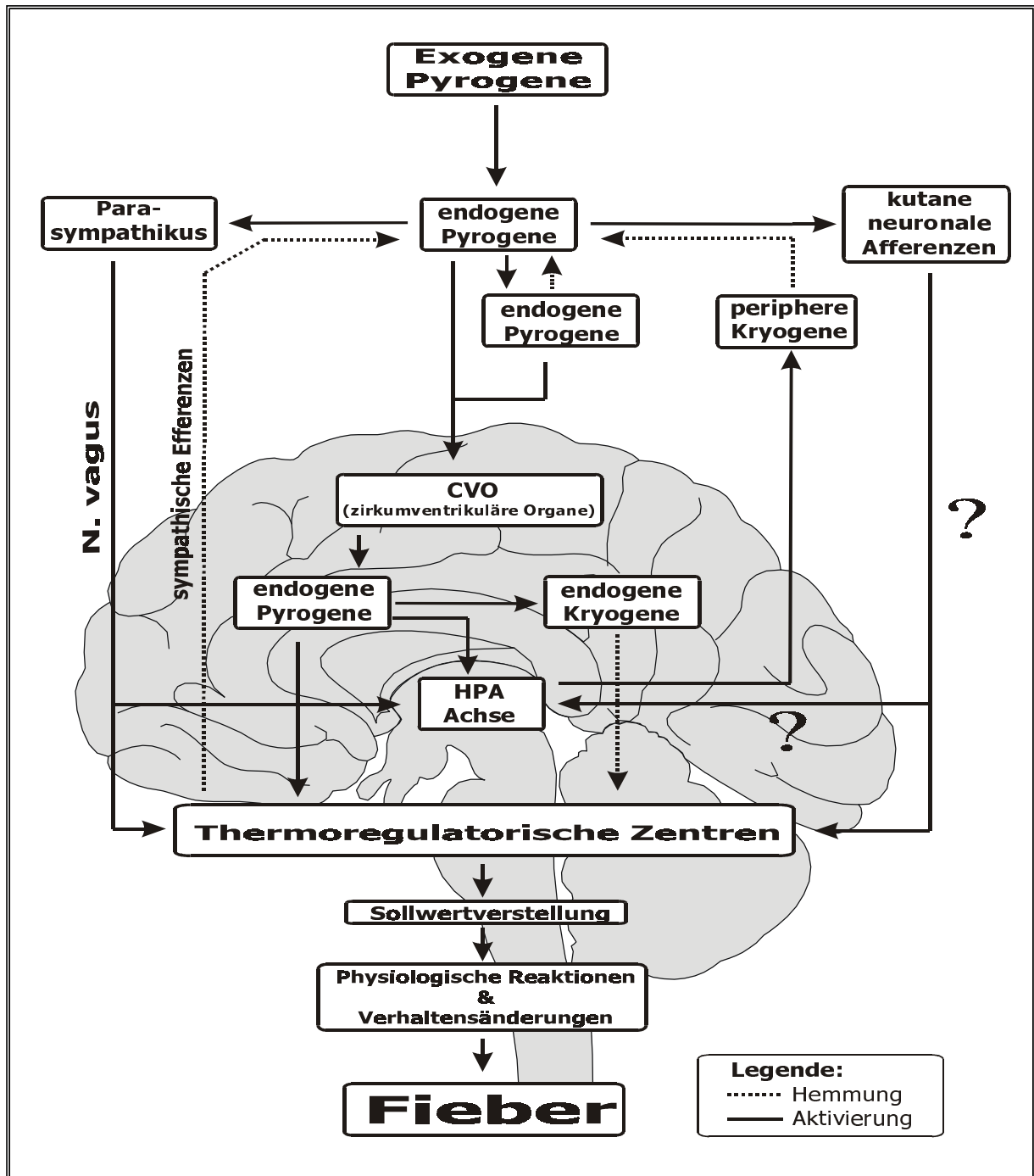


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Mechanismen der Fieberentstehung und -regulierung

Die Veränderungen der Körperkerntemperatur werden von zwei unterschiedlichen Rezeptortypen erfasst. Im Körperkern dominieren die sogenannten Warmrezeptoren und in der Peripherie (Haut) die Kaltrezeptoren. Die Aktivität der Warmrezeptoren nimmt mit steigender Temperatur zu und die der Kaltrezeptoren dagegen ab. Bei sinkender Temperatur ist es genau umgekehrt. Die Thermorezeptoren stellen die *Messglieder* dar. Die Reglerfunktion übernehmen Neuronenverbände in der Präoptischen Region (Area praeoptica) des Hypothalamus.

Die Neuronenverbände bestehen aus 30 % warmsensitiven, 10 % kaltsensitiven und 60 % thermosensitiven Neuronen (Boulant 1991). In diesen Verbänden konvergieren die afferenten Temperatursignale aus verschiedenen Teilen des Körperkerns und auch des Hypothalamus selbst zu einem integrierten Körperkerntemperatursignal.

Die verschiedenen Neuronentypen (warm-, kalt- und thermosensitiv) kontrollieren unterschiedliche Effektorneurone und beeinflussen über diese auch Veränderungen im Verhalten, der Wärmeproduktion und –abgabe unterschiedlich. Die Aktivierung warmsensitiver Neurone fördert zum Beispiel die Wärmeabgabe und hemmt die Wärmeproduktion. Dagegen hat eine Aktivierung kaltsensitiver Neurone genau gegensätzliche Effekte.

Ist der Input auf die Effektorneurone ausgeglichen, d.h. die Effektorneurone, welche die Wärmeabgabe oder –produktion kontrollieren, sind nicht aktiv, so ist der Sollwert (Setpoint) eingestellt. Damit die Körpertemperatur bei der Fieberentstehung nicht in für den Körper schädliche Bereiche (längerfristig  $<42^{\circ}\text{C}$ ) ansteigt, gibt es Antipyretika, die Kryogene, die die Produktion von endogenen Pyrogenen hemmen oder direkt am vorderen Hypothalamus angreifen und so die Fieberantwort kontrollieren bzw. das Ausmaß und die Dauer dieser limitieren.

### **1.6 Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit**

In dem vorangegangenen Abschnitt „1.4 Theorien zu Signalübertragungsmechanismen bei der Fieberantwort“ wurde schon die Möglichkeit des Transportes von Signalen vom aktivierten Immunsystem zum Gehirn über Afferenzen des N. vagus beschrieben. Aus diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob auch Afferenzen von Hautnerven an der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn beteiligt sind (Zeisberger 2000). Solche Untersuchungen bedingen auch die Möglichkeit einer Quantifizierung von lokal gebildeten Zytokinen innerhalb eines begrenzten subkutanen Hautareals und dem Bezug einer solchen lokalen Zytokininduktion zur entstehenden Fieberantwort bzw. die Modifikation von anderen ZNS-gesteuerten Funktionen (z.B die Aktivierung der HPA-Achse). Bei Ratten führte die Applikation von LPS in eine subkutane Luftkammer (Air-pouch) zur Fieberentstehung und zur Bildung von Zytokinen (Miller et al. 1997a, Miller et al. 1997b). Von allen proinflammatorischen Zytokinen konnte nur IL6 in kleinen Mengen im Blutkreislauf nach der lokalen LPS-Applikation in den Air-pouch nachgewiesen werden (Miller et al. 1997a).

In der hier vorgestellten Studie wurde eine verbesserte Methode, eine mit einem Katheter versehene subkutan implantierte Teflonkammer, eingesetzt. Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen verwendet, die einen intraarteriellen Verweilkatheter besaßen. Diese Methode erlaubte im Gegensatz zur Air-pouch-Methode die wiederholte und simultane Messung der bioaktiven Konzentration der Zytokine IL6 und TNF in der Lavage der subkutanen Kammer und im Blutkreislauf bei dem gleichen Tier und während verschiedener Stadien des Experimentes.

Aufgabenstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit war die Abklärung folgender Punkte:

- Inwiefern sind Afferenzen von Hautnerven an dem Fieber, welches auf Grund von lokal in der Subkutis gebildeten proinflammatorischen Zytokinen induziert wird, beteiligt?
- Lässt sich durch die lokale Applikation (subkutane Kammer) eines Lokalanästhetikums die Fieberantwort nach lokaler LPS Applikation (subkutane Kammer) beeinflussen?
- Inwieweit beruht die eventuelle Beeinflussung der Fieberantwort durch das Lokalanästhetikum auf dessen Übertritt in den Blutkreislauf und einer eventuellen systemischen Wirkung?
- In welcher Menge werden proinflammatorische Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$  und IL6) in der subkutanen Kammer nach der Applikation von LPS gebildet? Und wie ist der zeitliche Verlauf der Zytokinkonzentration in der subkutanen Kammer?
- In welcher Quantität treten die lokal gebildeten Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$  und IL6) in den Blutkreislauf über und wie ist hier der zeitliche Verlauf der Zytokinkonzentration?
- Ist zwischen dem Verlauf des Fiebers bzw. der Modifikation von bestimmten Gehirnfunktionen und der Konzentration von bestimmten Zytokinen (IL6 &  $\text{TNF}\alpha$ ) im Blutkreislauf eine Korrelation erkennbar?
- Wie verändert sich die Fieberantwort, wenn das „Primärzytokin“  $\text{TNF}\alpha$ , welches nach LPS-Applikation in der subkutanen Kammer gebildet wird, von einem TNF-Bindungsprotein sofort abgefangen und neutralisiert wird?
- Inwiefern spielt die lokale Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) bei der Vermittlung der Fieberantwort nach der LPS-Applikation in die subkutane Kammer eine Rolle?

- Kann durch die Applikation eines kompetitiven Hemmstoffes der NO-Synthase in die subkutane Kammer die Fieberantwort, welche auf die lokale LPS-Applikation in die subkutane Kammer folgt, verändert werden?
- Inwiefern spielt die lokale Bildung von PGE<sub>2</sub> bei der Vermittlung der Fieberantwort nach der LPS-Applikation in die subkutane Kammer eine Rolle?
- Hat die Applikation eines COX-Inhibitors, welcher die PGE<sub>2</sub>-Produktion hemmt, in die subkutane Kammer eine Auswirkung auf die Fieberantwort, welche auf die lokale LPS-Applikation in die subkutane Kammer folgt?
- Gibt es bei den oben zugrundeliegenden Fragestellungen Unterschiede bei der Verwendung von einer hohen LPS-Dosis im Vergleich zu einer niedrigen LPS-Dosis?

## KAPITEL 2: MATERIAL & METHODEN

### 2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen (*Cavia aperea porcellus*) eingesetzt. Die Meerschweinchen entstammten ausschließlich einer institutseigenen Zucht. Sie wurden bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2^1$  °C unter einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus aufgezogen. Die Haltung erfolgte in ca. 0,55 m<sup>2</sup> großen Käfigen in Gruppenhaltung mit einer Gruppengröße von 8–12 Muttertieren. Die Tiere erhielten Futter und Trinkwasser ad libidum. Als Nahrung dienten Heu und eine pelletierte Meerschweinchen-Zuchtdiät der Fa. Altromin GmbH, D-32791 Lage (siehe Tabelle 5).

INHALTSSTOFFE [%]		ZUSATZSTOFFE JE KG FUTTER	
Rohprotein	15,5 %	Vitamin A	16.000 IE
Lysin	0,8 %	Vitamin D <sub>3</sub>	650 IE
Rohfett	4,0 %	Vitamin E	80 mg
Rohfaser	19,5 %	Vitamin C	1,038 mg
Rohasche	8,0 %		
Calcium	0,8 %		
Phosphor	0,6 %		

Tabelle 5: Zusammensetzung der Zuchtdiät Fa. Altromin

Als Einstreu für die Tiere diente Animal-Bedding (Granular) der Fa. Altromin GmbH; D-32791 Lage. Nach Erreichen ihres Absatzgewichtes von ca.  $235 \pm 15^1$  g wurden die Tiere in transparente Polycarbonat-Käfige (Macro 2808) Typ IV (Fa. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-79312 Emmendingen) umgesetzt. Die Maße der Käfige betragen: 38 x 59 x 20 [cm] (Breite x Tiefe x Höhe).

Dort verblieben die Tiere, bis sie ihr Operationsgewicht von  $380 \pm 5^1$  g erreicht hatten. Nach der Operation wurden die Tiere über einen Zeitraum von sieben Tagen einzeln in oben genannten Käfigen gehalten. Nach diesem Zeitraum wurden die Versuchstiere in den Versuchsraum gebracht. Dort herrschten die gleichen Umweltbedingungen wie bei der Aufzucht. Während der Versuche erhielten die Tiere wiederum freien Zugang zu Wasser, Pellets und Heu.

<sup>1</sup>Schwankungsbreite

Die Tiere wurden in Einzeltierhaltung in transparenten Polycarbonat-Käfigen (Macro 2808) Typ III (Fa. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH; D-79312 Emmendingen) gehalten. Der Käfig besaß folgende Abmessungen: 26,5 x 42 x 15 [cm] (Breite x Tiefe x Höhe). Eine Übersicht ausgewählter Lebensdaten dieser Tierart bietet Tabelle 6 (van der Gulden et al. 1975).

<b>Lebensdaten vom Meerschweinchen</b> <b>(<i>Cavia aperea porcellus</i>)</b> Die Zahlen sind Mittelwerte: Rasse, Stamm und Umweltfaktoren können zu Abweichungen führen		
<b>Zucht</b>	Zuchtreife	3 - 4 Monate ♀ 1 Monat ♂
	Brunstzyklus	16 Tage
	Brunsdauer	ca. 50 Stunden
	Trächtigkeitsdauer	63 Tage
	Beginn der Brunst nach dem Werfen	< 24 Stunden
	Wurfgröße	3 - 4 Tiere
	Absatzalter	ca. 21 Tage
	Geschlechtsreife	21 - 28 Tage ♂ 70 Tage ♀
<b>Physiologische Werte</b>	Geburtsgewicht	70 - 100 g
	Absatzgewicht	180 - 200 g
	Gewicht der ausgewachsenen Tiere	700 - 1000 g
	Urinabgabe / Tag	20 - 25 ml
	Kotabgabe / Tag	ca. 15 g
	Körpertemperatur	37,8 - 39,5 °C
	Atemfrequenz [Atemzüge/min.]	82 - 90
	Herzfrequenz [Schläge/min.]	200 - 280
<b>Haltung</b>	Raumtemperatur	19 - 23 °C
	Relative Luftfeuchte [%]	50
	Futteraufnahme / Tag	ca. 35 g
	Wasseraufnahme / Tag	50 - 100 ml
<b>Quelle:</b> Dr. W. J. I. van der Gulden, C. L. van Hooijdonk, P. de Jong, Dr. A. K. Kremer ; Versuchstier und Versuchstiertechnik; Basel (1975)		

Tabelle 6: Lebensdaten vom Meerschweinchen

Alle drei Tage wurden die Käfige und das Wasser gewechselt. Der Futterfüllstand und der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere wurden täglich kontrolliert.

Nach dem Ende der Versuche wurden die Tiere durch intraarterielle Injektion (Verweilkatheter) einer Überdosis einer gesättigten Urethan-Lösung (Ethylcarbamat, Fa. Serva, Heidelberg) eingeschläfert.

### **2.1.2 Vermeidung von Stresseffekten auf die Körpertemperatur**

Fieber wird hervorgerufen durch die Aktivität einiger Mediatoren des peripheren Immunsystems an thermoregulatorischen Strukturen im Hypothalamus. Mittels verschiedener Effektororgane können diese den Wärmeverlust reduzieren und die Wärmeproduktion steigern mit dem Effekt, die Körperkerntemperatur zu erhöhen. Um einen exzessiven, schädlichen Anstieg der Körperkerntemperatur zu verhindern wird die Fieberantwort von Neuropeptiden (endogenen Kryogenen) kontrolliert. Diese antipyretischen Systeme können auch durch nicht-immunologische Effekte, wie z.B. Stress aktiviert werden, so dass die Fieberantwort auf dasselbe Pyrogen bei verschiedenen physiologischen Situationen variieren kann (Roth 1998a).

Stresseffekte können bereits durch Haltung der Tiere in zu engen, nicht artgerechten Käfigen entstehen (Kuhnen 1996). Andererseits können „handling“, d.h. der Umgang mit den Tieren, oder ein Wechsel der gewohnten Umgebung, z.B. durch einen Käfigwechsel, einen Körpertemperaturanstieg auslösen (Roth 1998a). Daher erfolgte die Umsetzung der Tiere in die Käfige, die während der Versuche benutzt wurden, mindestens einen Tag vor dem Beginn des Experimentes. Außerdem wurden die Tiere schon vor Versuchsbeginn an das „handling“ gewöhnt. Ein Einfluss von derartigen Stressoren auf die Fieberreaktion wurde hauptsächlich durch den Einsatz der Radiotelemetrie vermieden (siehe unten).

## **2.2 Implantation von Verweilkatheter, Sender & subkutaner Kammer**

### *2.2.1 Verweilkatheter*

Eine zuverlässige und unverfälschte Bestimmung von Hormonen und anderen Mediatoren im Blutplasma erfordert Methoden der Blutabnahme, die bei Versuchstieren möglichst keinen physischen oder psychischen Stress verursachen. Durch Implantation eines Verweilkatheters in die Arteria carotis sinister bis zum Aortenbogen waren stressfreie Blutabnahmen über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen bei wachen, in ihrer Bewegungsfreiheit nicht eingeschränkten Tieren möglich. Hierbei zeigten die Versuchstiere keine sichtbaren und keine messbaren Reaktionen auf die durchgeführten Manipulationen.

Die Katheter zur Implantation in die Arteria carotis sinister wurden nach Shrader & Everson (1968) hergestellt. Aufbau und Form eines solchen Katheters sind in Abbildung 5 dargestellt.

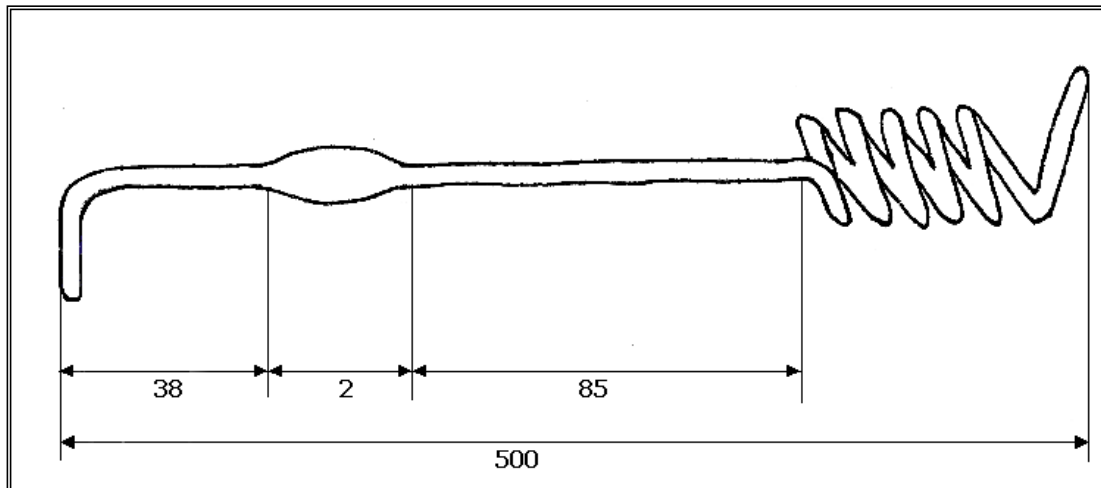


Abbildung 5: Katheter zur Blutabnahme beim Meerschweinchen  
(nicht maßstabsgetreu) [mm]

#### 2.2.1.1 Herstellung des Verweilkatheters

Bei der Herstellung des Verweilkatheters wurde ein Mikro-Schlauch aus Polyethylen (PE-10; Ref.800/140/100; Fa. Portex Ltd; Kent England) mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm und einem Außendurchmesser von 0,8 mm an einer Stelle erwärmt und rasch wieder abgekühlt, so dass sich beim Zusammenschieben der erwärmten Stelle eine Blase bildete. Das Ende des Mikro-Schlauches, welches näher an der Blase lag, wurde über eine stumpfe gebogene Nadel gesteckt und in einem Wasserbad erwärmt. Nach Abkühlung war der Schlauch an diesem Ende gebogen. Die Entfernung von diesem Ende bis zum Beginn der Blase betrug 38 mm. An dem anderen Ende wurde der Schlauch in einer Entfernung von 85 mm von der Blase um eine 1 ml Spritze gewickelt und ebenfalls im Wasserbad erwärmt, wodurch er auf dieser Seite nach Abkühlung die Form einer Spirale erhielt.

#### 2.2.1.2 Implantation des Verweilkatheters

Die Implantation des Verweilkatheters in die Arteria carotis sinister erfolgte zusammen mit der Implantation des Senders und der subkutanen Kammer unter Vollnarkose.

Als Narkose wurde eine Kombination von Ketaminhydrochlorid (Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn GmbH, D-91052 Erlangen) 100 mg/ml mit Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer Vital, D-51368 Leverkusen) 20 mg/ml verwendet.



Die Dosis betrug Ketavet<sup>®</sup> 1 ml/kg und Rompun<sup>®</sup> 0,1 ml/kg . Die Verabreichung der Narkose erfolgte intraperitoneal in einer Mischspritze (Wilk 1988). Nach dem Einsetzen der Narkose wurde das Tier im Halsbereich (Regio thyreodia et supraficialis) auf einer Fläche von 1 cm x 3 cm mit einem Langhaarschneider rasiert und anschließend wurde die Stelle mit pilca<sup>®</sup> med creme (Fa. Willy Rusch Hospital Vertriebs GmbH, D-71034 Böblingen) behandelt um die Haare vollständig zu entfernen. Danach wurde das Tier in Rückenlage gebracht und die Hautoberfläche mit Softasept<sup>®</sup> N (Fa. B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) desinfiziert. Anschließend wurde ein Hautschnitt von ca. 2 cm Länge in dem zuvor präparierten Hautareal durchgeführt, der darunterliegende Hautmuskel in Längsrichtung auf gleicher Länge durchtrennt und die Arteria carotis sinister durch stumpfe Präparation auf einer Länge von einem cm dargestellt. Die Arterie wurde rostral mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial ligiert. Danach wurde caudal der Ligatur die Arterie mit einer Mikroschere inzisiert, so dass der Verweilkatheter mit dem gebogenen Ende voran durch die entstandene v-förmige Öffnung eingeführt werden konnte. Der Katheter wurde bis einschließlich der oben beschriebenen Blase in der Arterie vorgeschoben. Anschließend wurde intraoperativ die Position des Katheters durch Aspiration von Blut kontrolliert, gegebenenfalls erfolgte eine Lagekorrektur. Bei richtigem Sitz des Katheters wurde rostral und caudal direkt neben der Blase die Arterie zusammen mit dem Katheter mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial mit Einzelheften fixiert. Ein weiteres Einzelheft wurde noch 1 cm caudal der Blase gesetzt. Danach wurde der Katheter mit einer Mischung aus isotonischer Kochsalzlösung (Fa. B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) und Heparin-Natrium (Liquemin<sup>®</sup> N 25000, Hoffmann-La Roche AG, D-79630 Grenzach-Wyhlen) in einem Mischverhältnis von 1 Teil Heparin-Natrium und 5 Teilen Natriumchlorid (NaCl) 0,9 % gespült. Anschließend wurde das andere Ende des Katheters durch Erhitzen verschlossen. Der Hautmuskel wurde hiernach mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl<sup>®</sup>, 1,5 metric, Fa. ETHICON, D-22851 Norderstedt) mit Einzelheften verschlossen. Für den Katheter wurde linksseitig zur Regio cervicalis dorsalis ein subkutaner Gang stumpf präpariert und der Katheter anschließend über einen Hautschnitt nach außen geführt. Anschließend wurde die Haut mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Mersilene<sup>®</sup>, 3 metric, Fa. ETHICON, D-22851 Norderstedt) mit Einzelheften genäht und der Katheter noch zusätzlich mit dem gleichen Nahtmaterial an seiner Austrittsstelle fixiert.

Der Wundbereich wurde hiernach mit Sprühverband (Band-AID<sup>®</sup>, Johnson & Johnson Medical GmbH, D-22844 Norderstedt) abgedeckt. Der freie Teil des Katheters (Spirale) wurde danach mit einem Pflaster umwickelt, um zu verhindern, dass sich das Tier direkt oder indirekt den Katheter ziehen kann.

### 2.2.2 Sender

Der Sender (Transmitter; VM-FH-Disc; Fa. Mini-Mitter Company Inc.; Sunriver, OR, USA) diente zur telemetrischen Aufzeichnung der abdominalen Körpertemperatur.

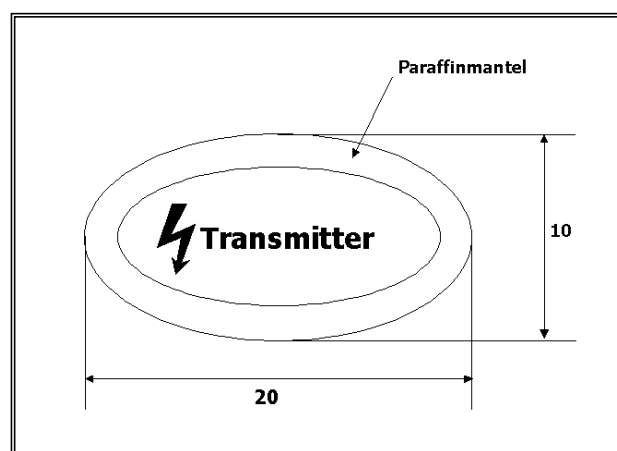


Abbildung 6: Sender [mm]

Der pillenförmige Sender (Abbildung 6) wurde vor der Implantation zum Schutz vor Körperflüssigkeiten mit einem Paraffinmantel (Elvax<sup>®</sup>; E.I. Du Pont De Nemours and Co.; Wilmington, Del. USA) überzogen. Außerdem konnten durch diesen Mantel auch die Fremdkörperreaktionen minimiert werden. Der so präparierte Sender nahm ein Volumen von ungefähr 4 ml ein und hatte ein Gewicht von ca. 5,5 g. Das wesentliche Bauelement des Transmitters war ein wärmeempfindlicher Transistor, ein sogenannter Thermistor mit negativem Temperaturkoeffizienten (NTC). Proportional zur Temperaturänderung änderte sich die Frequenz des Senders. Eine ansteigende Temperatur resultierte in einer ansteigenden Impulsrate und umgekehrt (genauerer siehe Abschnitt Telemetrische Aufzeichnung).

### 2.2.2.1 Implantation des Senders

Die Implantation des Senders erfolgte wie schon erwähnt zusammen mit der Implantation des Verweilkatheters und der subkutanen Kammer (Narkose siehe Implantation des Verweilkatheters).

Das Tier lag auf dem Rücken. Auch hier wurde das betroffene Hautareal zuvor geschoren, enthaart und desinfiziert (siehe 2.2.1.2 Implantation des Verweilkatheters). Das Hautareal lag supraumbilikal, hier wurde in der Medianen ein ca. 2 cm langer Hautschnitt gesetzt und die Linea alba dargestellt. Entlang der Linea alba wurde anschließend das Abdomen eröffnet und der Sender im Bauchraum plziert. Die Bauchmuskulatur und das Peritoneum wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl<sup>®</sup>, 1,5 metric, Fa. ETHICON, D-22851 Norderstedt) mit zwei Diagonalheften (Sultannaht) verschlossen. Die Hautinzision wurde anschließend mit einem Skin-Stapler (Appose<sup>®</sup> ULC 35W) verschlossen. Danach wurde der Operationsbereich mit Sprühverband (Band-AID<sup>®</sup>) abgedeckt. Die Klammern wurden nach 10 Tagen mit einem Klammerentferner (Fa. Albrecht) entfernt.

### 2.2.3 Subkutane Kammer

Die subkutane Kammer stellt eine Weiterentwicklung des sogenannten „Air-pouch“ dar (Miller et al., 1997a; Miller et al. 1997b; Roth et al. 2000). Sie bestand aus einem 1 mm starkem Rohr aus Polytetrafluoroethen (Teflon<sup>®</sup>). Dieser Kunststoff wurde gewählt, weil er einerseits leicht zu verarbeiten und widerstandsfähig war (chemisch und thermisch) und andererseits, weil er nur eine minimale Fremdkörperreaktion im Körper (Ehmer 1996) auslöste. Die Kammer hatte ein Volumen von 1,3 ml. Die subkutane Kammer wurde in der institutseigenen Werkstatt für Feinmechanik selbst hergestellt. An Vorder- und Hinterende war der Zylinder in einem Winkel von 45° abgeschrägt. Die Öffnungen an den beiden Enden hatten dadurch einerseits eine größere Kontaktfläche zum umgebenden Gewebe, andererseits wurde die Reibung der Kanten mit der Haut vermindert und damit ebenfalls die mechanische Irritation. Die Kontaktfläche zum umgebenden Gewebe betrug 1,02 cm<sup>2</sup>, also bei beiden Flächen zusammen ca. 2 cm<sup>2</sup>. Alle Kanten der Kammer waren abgerundet. Zur genauen Form der subkutanen Kammer siehe Abbildung 7.

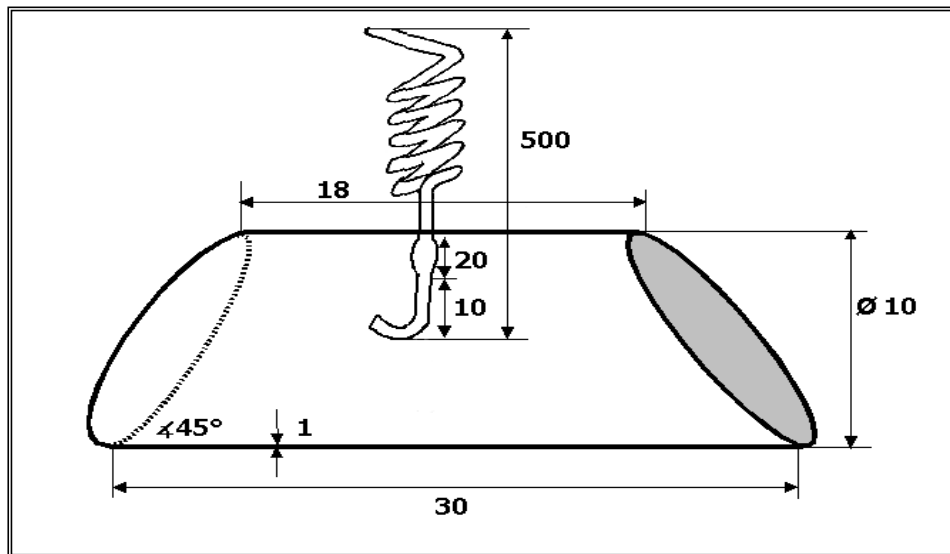


Abbildung 7: subkutane Kammer [mm] (nicht maßstabsgetreu)

Die Vorteile bei der Verwendung der subkutanen Kammer gegenüber dem Air-pouch sind folgende:

1. Einsparung von Versuchstieren. Durch Verwendung der Kammer können mehrere Versuche mit ein und demselben Tier vorgenommen werden. Bei Verwendung der Air-pouch Technologie müsste man pro Versuch vier Tiere veranschlagen.
2. Wiederholte Probengewinnung von demselben Tier, dadurch Vermeidung der interindividuellen Variation.

#### 2.2.3.1 Implantation der subkutanen Kammer

Die Implantation der subkutanen Kammer erfolgte ebenfalls zusammen mit der Implantation des Verweilkatheters und des Senders (Narkose siehe 2.2.1.2 Implantation des Verweilkatheters). Hierbei lag das Tier auf der rechten Körperseite. Auch hier wurde das betroffene Hautareal zuvor geschoren, enthaart und desinfiziert (siehe 2.2.1.2 Implantation des Verweilkatheters). Das Hautareal lag auf der linken Körperseite im Bereich der Skapula. In diesem Bereich wurde etwa 2 cm unterhalb der Wirbelsäule beginnend ein Hautschnitt gesetzt und nach distal verlängert. Seine Länge betrug ca. 1,5 cm. Anschließend wurde mit einem Plexiglasstab (mit einem kegelförmig zulaufenden Ende) der Bereich für den späteren Sitz der Kammer vorgetunnelt und die subkutane Kammer anschließend plaziert. Für den Katheter wurde linksseitig zur Regio cervicalis dorsalis ein subkutaner Gang stumpf präpariert und der Katheter anschließend über einen Hautschnitt nach außen geführt.

Die Austrittsstelle des Katheters der subkutanen Kammer lag durchschnittlich etwa 1 cm hinter der Austrittsstelle des Verweilkatheters. Hiernach wurde der Hautschnitt mit dem Skin-Stapler (Appose<sup>®</sup>) verschlossen. Danach wurde der Operationsbereich mit Sprühverband (Band-AID<sup>®</sup>) abgedeckt. Die Klammern wurden nach 10 Tagen mit einem Klammerentferner (Fa. Albrecht) entfernt. Anschließend wurde der Hautschnitt für die Austrittsstelle des Katheters mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Mersilene<sup>®</sup>) mit einem Einzelheft genäht und der Katheter noch zusätzlich mit dem gleichen Nahtmaterial an seiner Austrittsstelle fixiert. Der Wundbereich wurde hiernach mit Sprühverband (Band-AID<sup>®</sup>) abgedeckt. Der freie Teil des Katheters (Spirale) wurde danach mit einem Pflaster umwickelt, um zu verhindern, dass sich das Tier direkt oder indirekt den Katheter ziehen konnte.

### **2.3 Telemetrische Erfassung der Körperkerntemperatur**

Das System umfaßte wie in Abbildung 8 dargestellt einen Sender (siehe 2.2.2 Sender), einen RA 1000 Radioreceiver (Empfänger), eine BCM-100 Consolidation Matrix (Signalverstärker) sowie ein Daten-Acquisitionssystem (Software: Dataquest IV, Data Sciences Inc., St. Paul, MN, USA). Der Transmitter bestand im wesentlichen aus einem Thermistor, einer Batterie und einer Sendeantenne. Die Bauelemente waren zur Implantation hermetisch gegen Körperflüssigkeiten versiegelt (siehe 2.2.2 Sender). Das Radiofrequenzsignal (RF)-Signal wurde von einem unter dem Tierkäfig platzierten Receiver empfangen. Dessen Hauptelemente waren zwei Empfangsantennen sowie ein Analog-Digital-Konverter, wodurch der aktuelle Temperaturwert, respektive das RF-Signal, als eine Spannungsgröße in Volt kodiert wurde. Diese digitalisierte Information wurde vom BCM-100 Consolidation Matrix verstärkt und über Kabel an einen nicht im Versuchsraum selber stehenden Computer bzw. ein Daten-Acquisitionssystem zur Speicherung und späteren Auswertung übertragen.

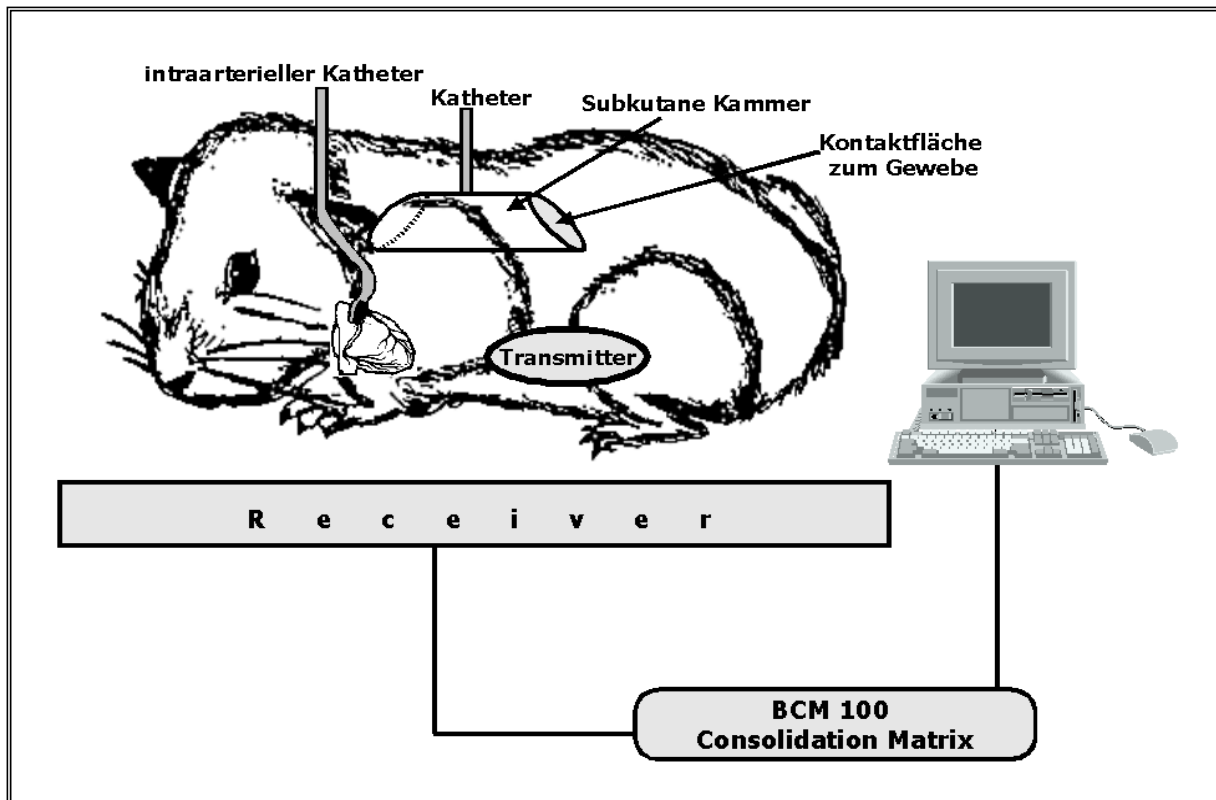


Abbildung 8: Schematische Übersicht des Telemetrischen Systems

Bei der Benutzung des Dataquest IV Programms konnte ein Zeitraum festgelegt werden, über den Daten gesammelt werden. Aus diesen Daten wurde ein Mittelwert gebildet. Der Zeitraum betrug bei den vorliegenden Messungen zehn Sekunden. Alle fünf Minuten wurden sie wiederholt und aufgezeichnet. Die Temperaturmessungen erfolgten mit einer Sensitivität von  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  und konnten in Abhängigkeit von der Lebensdauer der Batterie bis zu sechs Monate mit einer Langzeitstabilität von  $0,05\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt werden. Spätestens nach diesem Zeitraum wurden die Batterien ausgetauscht und die Sender neu kalibriert. Obwohl die Kurvenform von Temperatur versus Frequenz identisch für jeden Transmitter war, konnten sich Verschiebungen ergeben und somit die Skalierungen ändern. Um eine spezifizierte Genauigkeit zu erhalten, mussten individuelle Kalibrierungen für jeden Sender durchgeführt werden. Die Kalibrierung beinhaltete die Messung des Ausgangssignals bei zwei verschiedenen Temperaturen. Die Kalibrierung erforderte ein äußerst konstantes Temperaturbad (Lauda-Thermostat, Messgeräte Werk Lauda, Dr. Wobser KG, Germany) sowie ein geeichtes Thermometer (Quat 100, Fa. Heraeus, D-Hanau). Die Genauigkeit des angewandten Messsystems war abhängig von einer konstanten und gleichmäßig verteilten Temperatur des Wasserbades.

Deshalb wurden eventuell vorhandene Temperaturgradienten innerhalb des Wasserbades durch ein Rührwerk eliminiert. Die zur Kalibrierung verwendeten Temperaturen wurden um den normalen Bereich der zu beobachtenden Temperatur, d.h. zwischen 36 °C und 42 °C zentriert. Im einzelnen wurden zunächst die Frequenzen eines Senders bestimmt, die sich in einem jeweils konstant gehaltenen Wasserbad bei 37 °C, 39 °C und 41 °C einstellten. Mit dem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) wurde zur Kontrolle der Linearität und der korrekten Messwertermittlung aus den Wertepaaren eine lineare Regressionsgerade errechnet. (siehe Abbildung 9).

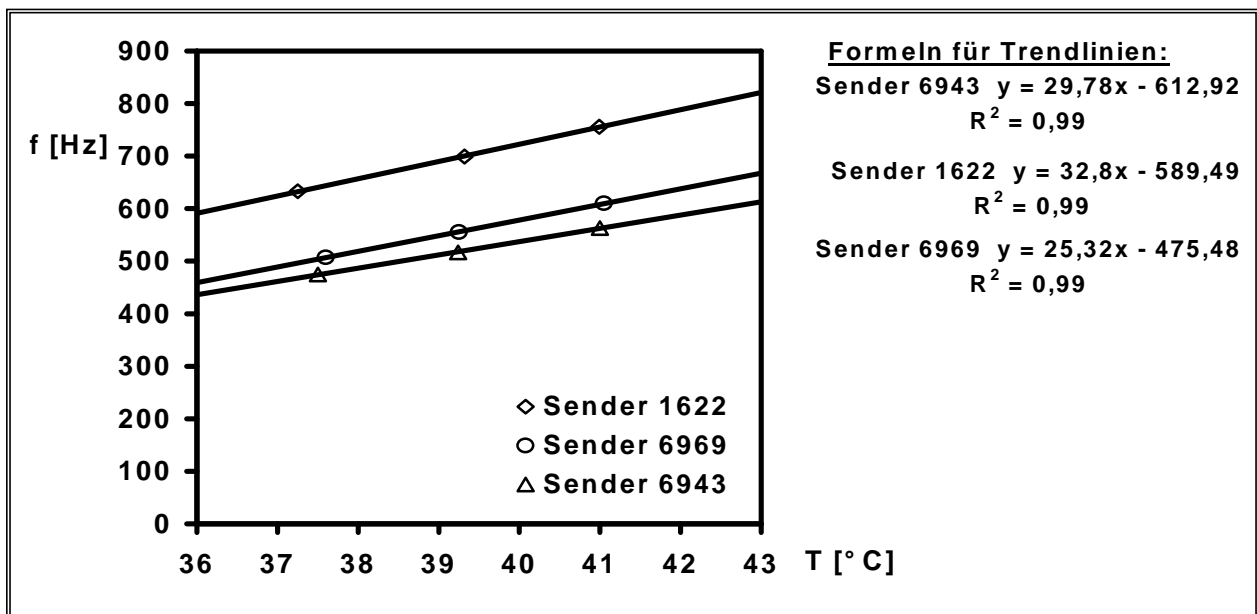


Abbildung 9: Ermittlung der Eichkurven

Die ermittelten Kalibrierungsdaten wurden anschließend für jeden Sender in die Dataquest IV–Software übertragen.

## 2.4 Verwendete Substanzen

Die verwendeten Substanzen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Im folgenden sollen die bisher noch nicht erläuterten Stoffe beschrieben werden:

Substanz	Beschreibung	Bezugsquelle
Diclofenac	Diclofenac Natrium, Lot B19360	Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, Ca 92039-2087
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginine-methylester ·HCL	ALEXIS Corporation, CH-4448 Läfelfingen (Switzerland)
LPS	Lipopolysaccharid von Escherichia coli (Stamm 0111: B4)	Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO 63178 USA
NaCl	Isotone Natriumchloridlösung 0,9%, Solvent und Lösungsmittel	B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
Propanol	2-Propanol 99,8% (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O), Lösungsmittel	RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG, D-30926 Seelze
Ropivacain	Ropivacainhydrochlorid (C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O · HCl · H <sub>2</sub> O) Naropin <sup>®</sup> 10 mg/ml, Injektionslösung für die epidurale und perineurale Anwendung	Astra GmbH, D-22876 Wedel
TNFbp	Tumor-Nekrose-Faktor-Bindungs-Protein	AMGEN Inc., Thousand Oaks, Calif. USA

Tabelle 7: Liste der verwendeten Substanzen und ihrer Bezugsquellen

### 2.4.1 Diclofenac

Diclofenac gehört zu der Gruppe der **Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID)**. Die NSAID werden heute gegenüber den steroidalen Entzündungshemmern bevorzugt eingesetzt, da sie im Vergleich zu diesen keine so gefährlichen Nebenwirkungen haben. Die Wirkung der NSAID beruht darauf, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu hemmen. Dazu greifen sie in die Prostaglandinsynthese auf der Stufe des Enzyms Cyclooxygenase ein. Das Enzym Cyclooxygenase (COX) oxidiert zuerst Arachidonsäure zu Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) und anschließend peroxidiert es PGG<sub>2</sub> zu PGH<sub>2</sub>. PGH<sub>2</sub> dient als Ausgangssubstanz für andere Prostaglandine (PGE<sub>2</sub> usw.), für Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), und für Prostacyclin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>).



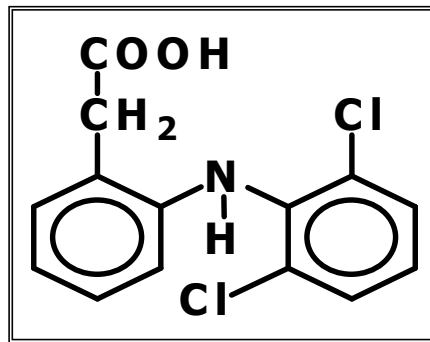


Abbildung 10: Strukturformel von Diclofenac

Im Organismus existieren zwei unterschiedliche Formen der Cyclooxygenase, eine konstitutive (COX-1) und eine induzierbare (COX-2) Form (siehe Abbildung 11). COX-1 ist für die Produktion von PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> zuständig, COX-2 befindet sich in Makrophagen, anderen Entzündungszellen, sowie Endothelzellen und wird im Gegensatz zur konstitutiven Form erst nach einem inflammatorischen Stimulus in den Zellen exprimiert.

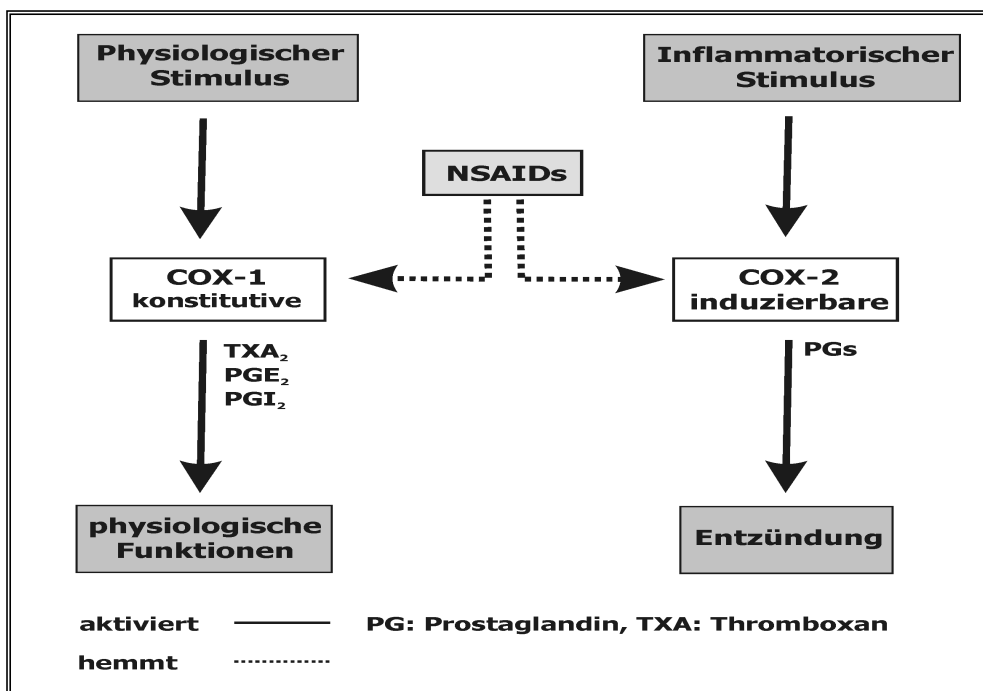


Abbildung 11: Prostaglandinsynthese und -hemmung

Die NSAIDs haben eine unterschiedliche Affinität zu den zwei Enzymformen. Aus dieser Tatsache heraus lassen sich auch einige Nebenwirkungen der NSAID erklären. So hemmen sie z.B. im Magen-Darm-Trakt die Produktion von Schleimstoffen, die beispielsweise die Schleimhaut des Magens vor der Magensäure schützen sollen. Fällt diese Schutzfunktion weg, kann es zur Entstehung einer einfachen Magenschleimhautentzündung bis hin zu einem Magengeschwür kommen.

Eine weitere Nebenwirkung liegt in der Hemmung der Thromboxan A<sub>2</sub> Produktion, was zu einer erhöhten Blutungsneigung führt. Diese Nebenwirkungen beruhen auf der Hemmung der konstitutiven COX. Die NSAID wirken allerdings nicht nur analgetisch und entzündungshemmend, sondern sie wirken auch antipyretisch, indem sie die Bildung von PGE<sub>2</sub> hemmen. Bei Diclofenac handelt es sich um ein Phenyllessigsäurederivat. Es besitzt eine Plasmaproteinbindung von 95 % und eine Bioverfügbarkeit von 50 %. Es wirkt analgetisch, antiinflammatorisch und antipyretisch. Seine Toxizität ist mit der von Acetylsalicylsäure zu vergleichen. Diclofenac hemmt beide COX-Formen, wobei das Verhältnis stärker bei der konstitutiven Form (COX-1) liegt.

Das pulverförmige Diclofenac wurde in einer Kombination aus 10 % Propanol (99,8%) und 90 % NaCl 0,9% gelöst. Die Konzentration der Lösung betrug 5 mg/ml Diclofenac. Als Einzeltierdosis wurden 5 mg/kg KG verabreicht, dies entspricht etwa der doppelten Dosis, die postoperativ zur Analgesie beim Meerschweinchen im allgemeinen gegeben werden sollte. Diese Dosis hatte auch im Vergleich zum Solvent keinen Einfluss auf den Temperaturverlauf. Das Diclofenac wurde einzeln und in Kombination mit der niedrigen und hohen LPS-Dosis gleichzeitig verabreicht. Der Applikationsort war die subkutane Kammer.

#### 2.4.2 L-NAME

N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-methylester·hydrochlorid (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>·HCl; MG 233,2 g/mol) gehört zu den N<sup>G</sup>-substituierten L-Argininanaloge. L-NAME ist der Methylester von N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin und leichter löslich als dieser. Die Ausgangssubstanz ist pulverförmig und wasserlöslich (siehe Abbildung 12).

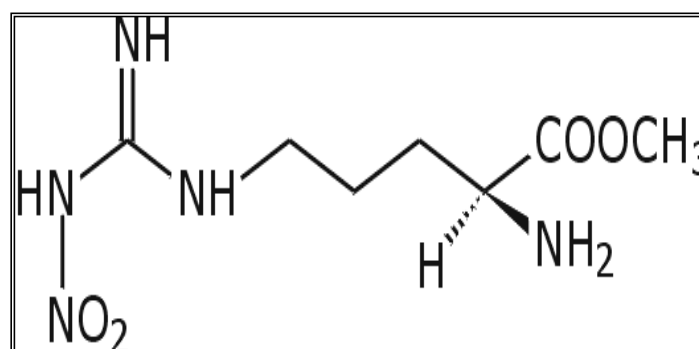


Abbildung 12: Strukturformel von L-NAME

Stickstoffmonoxid (NO) kann in vielen Zellen des Körpers aus L-Arginin gebildet werden. Dreh- und Angelpunkt dieser Reaktion ist das Enzym NO-Synthase. Das Enzym kommt in drei verschiedenen Formen vor, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Man unterteilt sie in die endotheliale Form (eNOS), die neuronale Form (nNOS) und die induzierbare Form (iNOS). Die eNOS und die nNOS sind beides konstitutive Formen. Sie sind  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin abhängig und bewirken nur eine kurzzeitige Freisetzung von geringen Mengen NO. Beide Formen werden auch durch  $\text{Ca}^{2+}$  induziert. Die iNOS ist  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängig, aber Calmodulin abhängig. Sie wird durch inflammatorische Stimuli, z.B. durch Zytokine induziert und bewirkt eine langfristige Freisetzung von größeren Mengen NO. NO ist eine sehr labile Verbindung mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden (siehe Abbildung 13). NO hat verschiedene biologische Effekte, so aktiviert NO beispielsweise die COX und das Guanylcyclase-cGMP-System, NO bewirkt eine Vasodilatation, NO verhindert die Plättchenaggregation und -adhäsion und NO ist Neurotransmitter im ZNS und PNS (Ignarro & Murad 1995). Diese Auswahl beinhaltet nur einige Beispiele der durch NO induzierten Effekte.

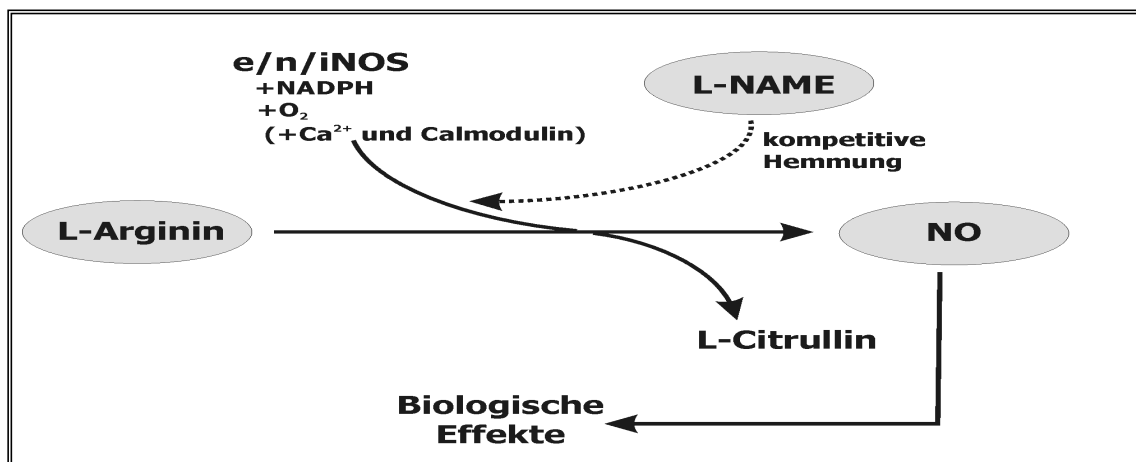


Abbildung 13: NO-Synthese

L-NAME gehört, wie bereits erwähnt, zu den N<sup>G</sup>-substituierten L-Arginin-Analoga. Diese können wie auch L-Arginin von dem aktiven Zentrum der NOS gebunden werden, allerdings können sie nicht umgesetzt werden und blockieren somit das Enzym. Dabei ist der Effekt abhängig von der Konzentration von L-Arginin und dem Analogon. Die Analoga besitzen eine unterschiedliche Affinität zu den unterschiedlichen NOS-Isoformen. L-NAME besitzt eine viel höhere Affinität zur eNOS als zur iNOS.

Zur Herstellung der Injektionslösung wurde das pulverförmige L-NAME in einer 0,9% NaCl-Lösung aufgelöst. In einer ersten Versuchsreihe wurde die optimale Dosis für den Versuch ermittelt. Hierbei wurden Dosen von 10, 20 und 50 mg/kg KG eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass eine Dosis von 20 mg/kg KG am geeignetsten für den Versuch war. Bei dieser Dosis waren keine Auffälligkeiten (Temperaturverlauf) zu beobachten. Als Lösung wurde eine Konzentration von 20 mg/ml hergestellt. Diese Lösung wurde einzeln und in Kombination gleichzeitig mit der 10 oder 100 µg/kg KG LPS-Dosis in die subkutane Kammer injiziert.

### 2.4.3 LPS

Lipopolysaccharide (LPS) sind Zellwandbestandteile von gram-negativen Bakterien, und zwar hauptsächlich von Bakterienarten, die den Enterobakterien zuzuordnen sind. Sie werden entweder bei der Zelllyse der Bakterien oder aber von noch intakten Bakterien freigesetzt und können in dem befallenen Wirtsorganismus verschiedene Reaktionen auslösen (Freundenberg & Galanos 1990). Früher wurde angenommen, dass sie nur bei einer Zelllyse frei werden, man nannte sie deshalb Endotoxine. Lipopolysaccharide bestehen aus zwei Anteilen, einem hydrophilen Kohlenhydratanteil (Polysaccharid) und einem hydrophoben und kovalent gebundenen Lipidanteil, dem sogenannten Lipid A (Rietschel et al. 1994, Freundenberg & Galanos 1990). Das Lipid A stellt die Verankerung des LPS-Moleküls in der Zellwand dar. Es besteht bei *E. coli* aus einem zweifach phosphorylierten Glucoseaminyl- $\beta$ -1,6-glucosamin-disaccharid, das mit sechs gesättigten Fettsäuren verestert ist (siehe Abbildung 14).

Auf das Lipid A folgt nach außen hin ein Kernoligosaccharid (KDO) und auf dieses ein spezifisches Oberflächenantigen, das sogenannte thermostabile O-Antigen. Die Bezeichnung „O“ bedeutet „ohne Hauch“, dies ist eine Charakterisierung des Koloniewachstums von Bakterien. Geißelte Bakterien bilden einen feinen grauen Film (Hauch) um ihre eigentliche Kolonie – ungeißelte dagegen nicht. Dies führte dazu, Geißelantigene als „H-Antigene“ und Zellwandantigene als „O-Antigene“ zu bezeichnen. Dieses O-Antigen besteht aus sich wiederholenden Abschnitten von Oligosacchariden, die bezüglich ihrer Zahl und Struktur variieren. Die O-Region ist auch für die Antigenität des Bakteriums bzw. des LPS-Moleküls verantwortlich. Aufgrund dieser Variabilität in der Antigenität können Bakterienstämme bzw. die Endotoxine klassifiziert werden.

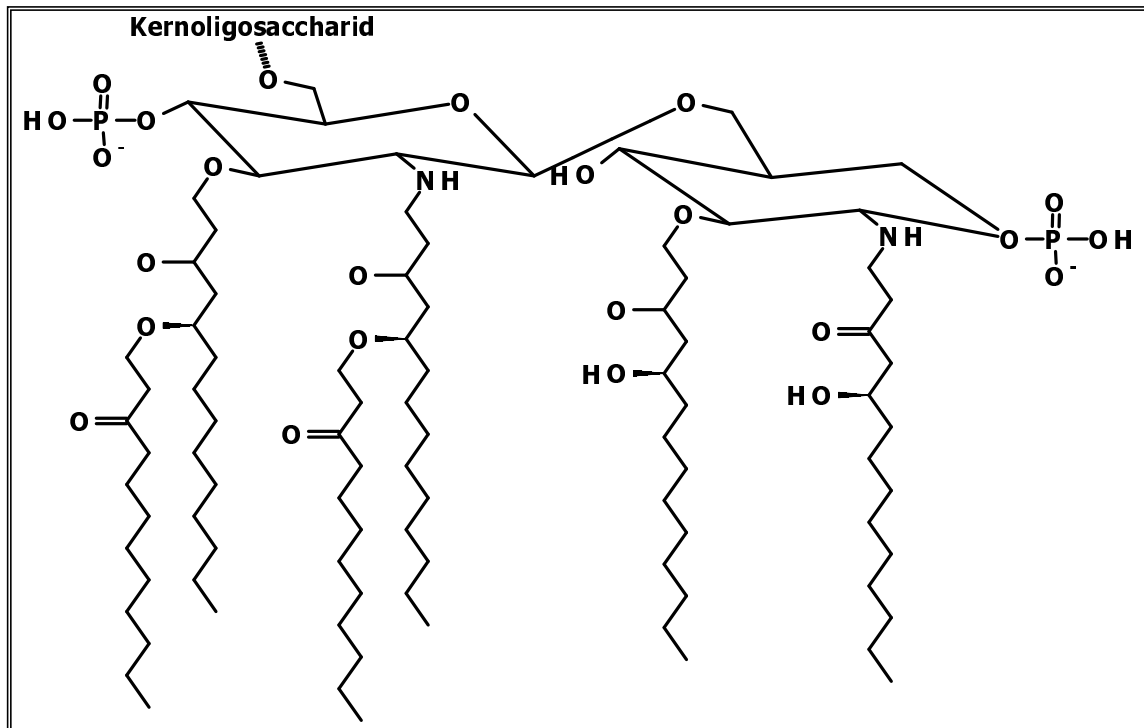


Abbildung 14: chemische Struktur des Lipid A von *E. coli*

LPS wirkt im Säugetierorganismus als Endotoxin und vermittelt im Körper verschiedene Reaktionen. LPS kann zu einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems, zu einer Aktivierung des Komplementsystems und/oder zur Induktion eines septischen Schocks führen. Die Effekte werden allerdings nicht direkt von LPS induziert, sondern werden über Second-messenger, die Zytokine, wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) vermittelt (Raetz et al. 1991). Zu den Zellen, die auf LPS reagieren, gehören Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, Endothel- und Epithelzellen (Ulevitch et al. 1994). Nicht das gesamte LPS-Molekül spielt für die Vermittlung endotoxischer Effekte im Organismus eine Rolle, sondern nur sein Lipid A-Anteil. Hierbei spielen Substituenten an den Phosphatgruppen keine Rolle. Gelangt LPS in den Kreislauf eines Säugetieres, so kann es einerseits an High-Density-Lipoprotein (HDL) gebunden werden (Freudenberg & Galanos 1990) oder andererseits an ein spezifisches Glykoprotein (LPS-Bindungs-Protein). Wird es an ein HDL gebunden, so wird es dadurch neutralisiert und eine Bindung an andere Zellen verhindert. Die Metabolisierung dieses Komplexes geschieht in der Leber, der Milz und den Nebennieren. Wird es hingegen an ein LPS-Bindungs-Protein (LBP) gebunden, so kann die Endotoxin-Signalkaskade in Gang gesetzt werden.

Das LBP wird in der Leber synthetisiert, hat ein Molekulargewicht von 60 KDa und wird zu den Akut-Phase-Proteinen gezählt (Roth 1996). Das LBP bindet an dem Lipid A Anteil des LPS-Moleküls. Dieser LBP-LPS-Komplex bindet nun an einen auf der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptor (mCD-14) oder an denselben im Plasma gelösten Rezeptor (sCD-14). Der mCD-14 Rezeptor befindet sich auf Makrophagen, Monozyten und in geringen Mengen auch auf Granulozyten (siehe Abbildung 15).

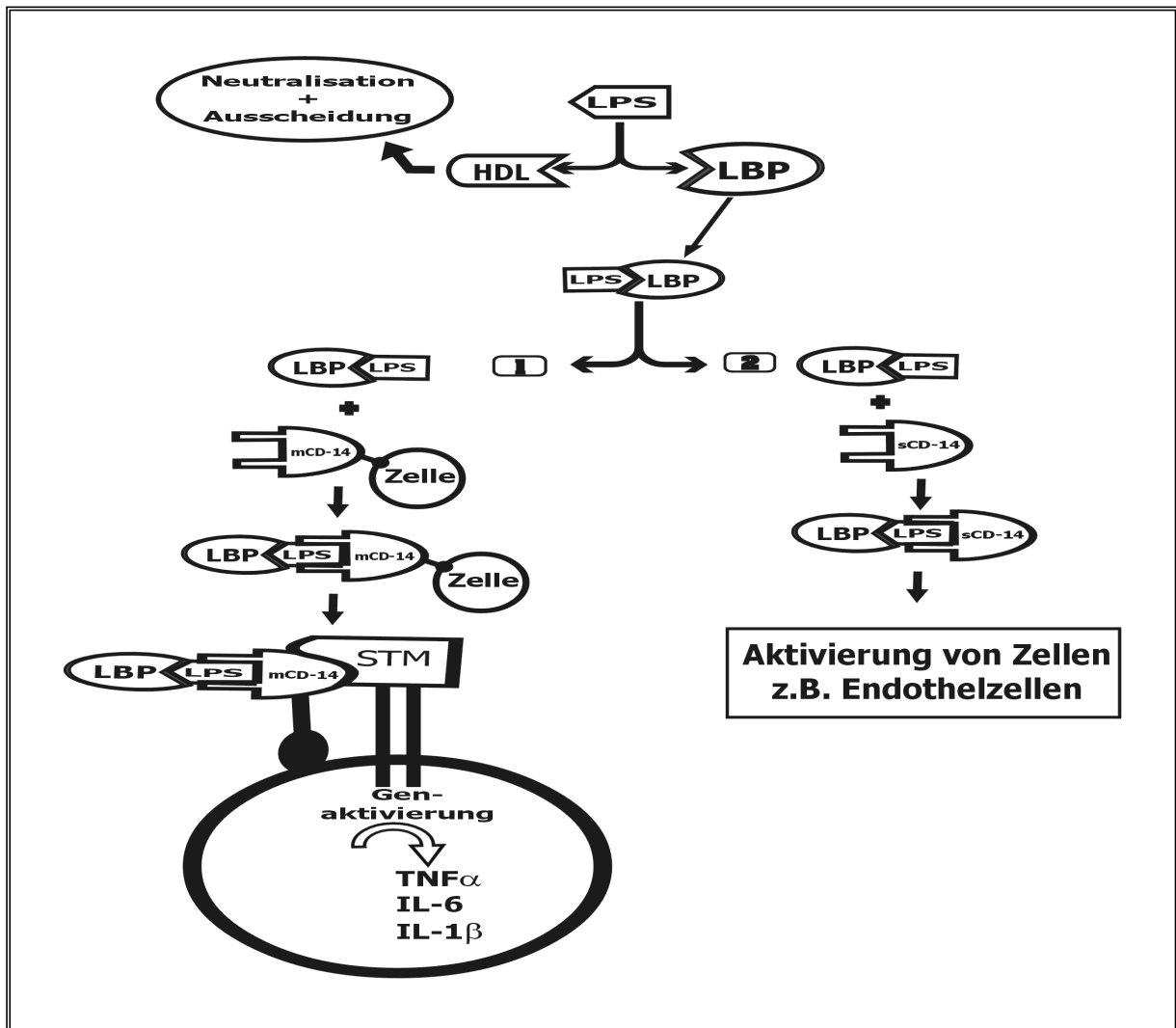


Abbildung 15: Transport von LPS und Signalinduktion durch LPS (Erläuterungen siehe Text Seite 44)

Durch LBP kommt es zu einer Signalverstärkung, so dass schon geringe LPS-Mengen zur Zellaktivierung ausreichen. Der Komplex aus LBP-LPS und CD-14 aktiviert transmembranär über ein bisher unbekanntes Signaltransduktionsmolekül (STM) verschiedene Proteinkinasen und Proteinphosphorylierungen.

Infolge dessen kommt es zur Transkription, Translation und Freisetzung verschiedener Mediatoren, wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$  (Roth 1998a). Da nicht alle oben erwähnten Zelltypen einen CD-14 Rezeptor exprimieren und trotzdem eine Reaktion nach LPS-Kontakt zeigen, lässt sich daraus schließen, dass es noch mehr Rezeptoren für LPS gibt. Diese spielen aber bei den endotoxinvermittelten Reaktionen keine so große Rolle wie der CD-14 Rezeptor (Chaby 1993).

Das pulverförmige LPS wurde in 0,9 % Kochsalzlösung aufgelöst und es wurden zwei verschiedene Konzentrationen von LPS hergestellt. Die erste Lösung enthielt 100  $\mu\text{g/ml}$ , die zweite 10  $\mu\text{g/ml}$ . Ein Grund für den Einsatz von Meerschweinchen ist ihre vergleichsweise geringe Sensitivität gegenüber LPS. So lässt sich bei ihnen eine Fieberreaktion erst durch Dosen von 5 bis 50  $\mu\text{g/kg KG}$  hervorrufen (Roth 1996) – im Vergleich hierzu reicht beim Menschen schon eine Dosis von 0,4  $\text{ng/kg}$  intravenös verabreicht um eine sechstündige Fieberreaktion zu verursachen (Pollmächer et al. 1993). Diese Tatsache sorgt dafür, dass bei Meerschweinchen geringfügige LPS-Kontaminationen gentechnisch hergestellter Substanzen keine Akut-Phase-Reaktion auslösen können. Die Festlegung der Dosishöhe, die bei den Tieren eingesetzt worden ist, beruht auf laboreigenen Erfahrungswerten. Die Dosierungen führten jeweils zu qualitativ und quantitativ wiederholbaren Fieberreaktionen. Bei den Tieren wurde LPS in einer Dosis von 10  $\mu\text{g/kg KG}$  und in einer Dosis von 100  $\mu\text{g/kg KG}$  eingesetzt. Die Applikation erfolgte alleine oder in Kombination mit Diclofenac, L-NAME,  $\text{TNFbp}$  und zeitversetzt auch mit Ropivacain. Applikationsort war die subkutane Kammer. Obwohl die Tiere pro Versuchsreihe je einmal die 100 und die 10  $\mu\text{g/kg KG}$  Dosis LPS in randomisierter Reihenfolge injiziert bekamen, war eine Toleranzentwicklung gegenüber LPS nicht zu erwarten. Erstens wurden die beiden LPS-Injektionen nur im Abstand von mindestens einer Woche vorgenommen und zweitens sind relevante Toleranzeffekte erst bei Tieren zu beobachten, die mehr als dreimal in wöchentlichem Abstand LPS-Gaben erhielten (Unger 1992).

#### 2.4.4 Ropivacain

Ropivacain ist ein Lokalanästhetikum und wird zu der Amid-Gruppe (wie z.B. auch Lidocain) gezählt. Wie nahezu alle Lokalanästhetika besteht auch Ropivacain aus einem polaren und einem apolaren Bestandteil sowie einer Zwischenkette. Um die Substanz besser wasserlöslich zu machen, wurde sie als Salz (Ropivacainhydrochlorid) eingesetzt (siehe Abbildung 16). Lokalanästhetika verhindern bzw. vermindern die Weiterleitung von Impulsen entlang der Nervenfasern. Dabei beruht ihre Hauptwirkung auf der Blockade der Natriumkanäle und in sehr hohen Dosen auch der Kaliumkanäle, dadurch wird eine Re- bzw. eine Depolarisation der Nervenfasern verhindert. Je nach Nerventyp setzt die Wirkung nach kürzerer oder längerer Zeit nach der Injektion ein, am schnellsten setzt sie an marklosen autonomen Nerven, dann an sensiblen und schließlich auch an motorischen Nerven ein.

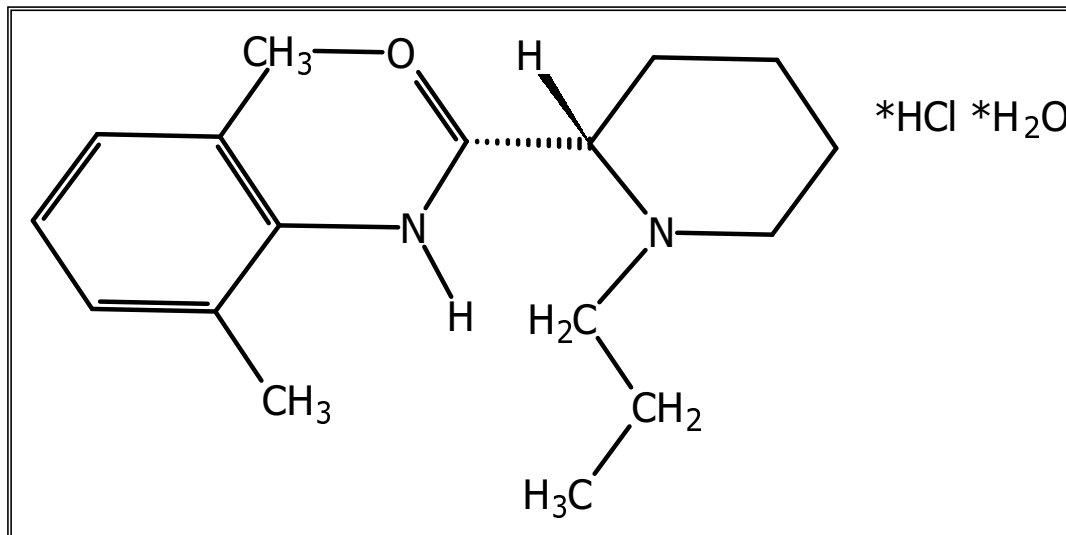


Abbildung 16: Struktur von Ropivacainhydrochlorid

Der hydrophile Anteil (Aminogruppe) kann protoniert sein, dadurch liegt das Molekül je nach pH-Wert in einer nicht-ionisierten und in einer ionisierten Form vor. Der aromatische, lipophile Anteil ist für den Transport des Moleküls durch die Nervenscheide und die erregbare Membran verantwortlich. Im Inneren der Nervenzelle kommt es zur Ionisierung des hydrophilen Anteils und das Kation blockiert dadurch die  $\text{Na}^+$ -Kanäle. Infolge dessen wird die Erregbarkeit der Membran an dieser Stelle verhindert. Die Wirkdauer des Lokalanästhetikums wird durch seine Verweildauer am Wirkort und seine Elimination an diesem bestimmt. Der Abbau von Ropivacain geschieht in der Leber durch Monooxygenasen.



Die Ausscheidung der Metaboliten geschieht über die Nieren und den Darm. Eine der Nebenwirkungen des Ropivacains und auch anderer Lokalanästhetika liegt in ihrer kardiodepressiven Eigenschaft. Ropivacain vermindert die Kontraktionskraft, führt zu einer Abnahme der Depolarisationsgeschwindigkeit und der Aktionspotentialamplitude (Wulf 1993).

Ropivacain zeichnet sich vor allem durch seine lange Wirksamkeit aus. Der Wirkungseintritt liegt bei einer Leitungs- und Infiltrationsanästhesie bei ca. 15 Minuten und die Wirkdauer bei ca. 3-6 Stunden. Bei den Versuchstieren wurde das Ropivacain mit einer Konzentration von 10 mg/ml und in einer Dosis von 10 mg/kg KG eingesetzt. Aufgrund der Latenzzeit bis zum Wirkungseintritt wurde das Lokalanästhetikum 30 min. nach der ersten Probensammlung in die subkutane Kammer injiziert. Eine halbe Stunde später wurde dann entweder nichts in die subkutane Kammer injiziert (Kontrollversuch nur mit Ropivacain), oder aber es wurde LPS in einer Dosis von 10 bzw. 100 µg/kg KG appliziert. Der Wirkungseintritt bzw. die Wirkung des Ropivacains wurde durch den Panniculusreflex überprüft, dieser war während des Versuchs (bis 360 min. nach t=0 min.) in einem Bezirk von 3-4 cm rund um die subkutane Kammer nicht mehr vorhanden bzw. stark reduziert.

In einem weiteren Kontrollversuch wurden potentielle systemische Effekte von Ropivacain überprüft, hierbei wurde das Ropivacain subkutan in der oben erwähnten Dosis auf der kontralateralen Seite (bezüglich der subkutanen Kammer) injiziert. Die Injektionsstelle lag im Bereich des Oberschenkels (Regio femoralis). Auch hier diente der Panniculusreflex als Kontrolle für den Wirkungseintritt bzw. die Wirkung des Ropivacains.

#### *2.4.5 TNF-Bindungsprotein*

Bei dem in diesem Versuch verwendeten Tumor-Nekrose-Faktor-Bindungsprotein (TNFbp) handelt es sich um die lösliche Form des humanen Typ 1 TNF-Rezeptors, der als Dimer kovalent an ein Polyethylenglycol-Molekül gebunden ist (PEG-(rsTNF-RI)<sub>2</sub>). Durch das kovalent gebundene Polyethylenglycol verlängert sich die Plasma-halbwertszeit und erhöht sich die Fähigkeit TNF $\alpha$  zu binden und dadurch zu neutralisieren. Das dimere PEG-(rsTNF-RI)<sub>2</sub> hat eine ca. zwanzigmal höhere Effektivität TNF $\alpha$  zu neutralisieren als die monomere Form.

Das TNFbp wird auf gentechnischem Wege über die E. coli Zelllinie FM 15 hergestellt. Anschließend wird es gereinigt und das Polyethylenglycol (PEG) kovalent gebunden. Das so gewonnene PEG-(rsTNF-R1)<sub>2</sub> ist selbst nur mit <0,2 EU/mg Protein verunreinigt (Solorzano et al. 1998). Die Struktur des TNFbp entsprach der extrazellulären Domäne des humanen TNF-Typ 1 Rezeptors. Dieses Protein neutralisiert nicht nur das humane TNF $\alpha$ , sondern auch das von Pavianen (*Papio anubis*; Solorzano et al. 1998) und von Meerschweinchen (*Cavia aperea porcellus*; Roth et al. 1998b). Es wirkt somit speziesübergreifend. Im Gegensatz hierzu sind die Zytokine und somit auch die Antikörper gegen diese speziesspezifisch (Roth et al. 1998b). Von dem löslichen TNF-Rezeptor existieren zwei Formen, eine mit einem Molekulargewicht von 55 kDa und eine andere mit 75 kDa. Nur der 55 kDa TNF-Rezeptor hat eine protektive Wirkung in einer gram-negativen Sepsis, der 75 kDa TNF-Rezeptor nicht. Diese Diskrepanz entsteht dadurch, dass der lösliche 75 kDa TNF-Rezeptor das gebundene TNF $\alpha$  wieder freigibt, im Gegensatz zu dem 55 kDa TNF-Rezeptor (Evans et al 1994).

Lösliche TNF-Rezeptoren kommen auch natürlicherweise bei Infektionen und Traumata im Körper vor. Es gibt zwei Formen dieser Rezeptoren - eine im Kreislauf zirkulierende Form und eine an die Zellmembran gebundene Form (Novick et al. 1989). Im Gegensatz zur membrangebundenen Form hat der lösliche TNF-Rezeptor keine Triggerfunktion auf die Zellfunktion. Der lösliche TNF-Rezeptor hemmt sogar die Zytokinkaskade (Enayatie und Fong 1994). TNF $\alpha$  ist ein wichtiger Mediator in der Zytokinkaskade, die nach LPS-Kontakt ausgelöst wird. TNF $\alpha$  triggert zusammen mit IL1 $\beta$  unter anderem auch die Freisetzung von IL6. Durch die Neutralisierung von TNF $\alpha$  durch das TNFbp kann die zweite Phase des durch die intraarterielle LPS-Injektion induzierten Fiebers reduziert werden. Ebenso wird auch die Freisetzung von zirkulierendem IL6 vermindert (Roth et al. 1998b). In diesem Versuch wurde eine Konzentration von 1 mg/ml TNFbp verwendet. Diese Konzentration wurde den Tieren alleine oder in Kombination mit der hohen und niedrigen LPS-Dosis verabreicht. Applikationsort war die subkutane Kammer. Die verwendete Dosis beruht auf Versuchen in diesem Labor, wobei das LPS und das TNFbp intraarteriell verabreicht wurde und die verwendete Dosis das zirkulierende TNF $\alpha$  vollständig neutralisierte (Roth et al. 1998b).

### 2.4.6 NaCl

Die isotone Kochsalzlösung wurde als Solvent eingesetzt. Es wurde in einer Dosis von 1 ml/kg KG angewandt und in die subkutane Kammer injiziert

## 2.5 Versuchsdurchführung

Um Einflüsse einer zirkadianen Rhythmik der Körpertemperatur auszuschalten, wurden die Versuche immer zwischen 10.<sup>00</sup> und 11.<sup>00</sup> Uhr gestartet.

### 2.5.1 Gewinnung der arteriellen Blutprobe und der Lavage aus der subkutanen Kammer

Pro Versuch wurden von jedem Tier drei Blut- und Lavageproben gewonnen. Die Zeitpunkte der Probengewinnung waren 60 min. (t=-60 min.) vor Applikation der verschiedenen Substanzen in die subkutane Kammer und jeweils 60 (t=60 min.) und 180 min. (t=180 min.) nach Applikation der Substanzen. Dieser Zeitplan orientierte sich an Studien von Roth et al. (1993) und Jansky et al. (1995) und berücksichtigte die Verläufe der Zytokinspiegel beim Meerschweinchen nach systemischer Endotoxingabe. Während der Probengewinnung waren die Tiere wach und freibeweglich. Bei der Abnahme wurde darauf geachtet, dass die Tiere möglichst stressfrei blieben, um hierdurch bedingte Veränderungen der Körpertemperatur zu vermeiden.

#### 2.5.1.1 Vorbereitung der Probengewinnung

Für die Blutgewinnung wurden pro Blutentnahme drei Spritzen zu 1 ml (Becton Dickinson GmbH, Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg) vorbereitet. Auf zwei Spritzen wurden Luer-Kanülen mit einem Durchmesser von 0,45 mm und einer Länge von 23 mm (Terumo Europe N.V. 3001 Leuven-Belgium) aufgesetzt. Diese beiden Spritzen wurden mit einer Mischung aus isotoner Kochsalzlösung 0,9 % (Fa. B. Braun Melsungen AG; D-34209 Melsungen) und Heparin-Natrium (Liquemin<sup>®</sup> N 25000; Hoffmann-La Roche AG; D-79630 Grenzach-Wyhlen) in einem Mischverhältnis von 1 Teil Heparin-Natrium zu 5 Teilen 0,9 % NaCl gefüllt.

Eine Spritze (Aspirationsspritze) hiervon diente zum Aspirieren von Blut und die andere (Spülspritze) zum abschließenden Spülen des Katheters und Auffüllen desselben mit dem Heparin-Natrium/NaCl-Gemisch um eine Gerinnung im Katheter zu verhindern.

In die dritte Spritze (Probenspritze) wurde 0,01 ml unverdünntes Heparin-Natrium (s.o.) zur Vermeidung der Blutgerinnung aufgezogen. Für die Gewinnung der Lavage aus der subkutanen Kammer wurden ebenfalls drei Spritzen zu 1 ml vorbereitet. Eine Spritze diente wieder der Aspiration (Aspirationspritze) von eventuell schon vorhandener Flüssigkeit in der Kammer. Hierzu wurde eine Luer-Kanüle (siehe oben) aufgesetzt. Eine weitere Spritze wurde ebenfalls mit einer gleichartigen Kanüle versehen und anschließend mit 1 ml isotoner Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) gefüllt. Diese Spritze wurde zum Spülen (Spülspritze) genutzt. Die dritte Spritze (Probenspritze) wurde ebenfalls mit 1 ml isotoner Kochsalzlösung gefüllt.

#### *2.5.1.2 Gewinnung der arteriellen Blutprobe*

Zur Blutabnahme selbst wurde der intraarterielle Katheter an seinem distalen Ende abgeklemmt und das Ende des Katheters gekappt. Nachdem die Aspirationspritze auf den Katheter aufgesetzt worden war, wurde die Klemme gelöst und solange mit der Spritze aspiriert, bis das Blut den Konus der Spritze erreicht hatte. Anschließend wurde die Spritze von der Kanüle abgesetzt und die Probenspritze auf die Kanüle aufgesetzt. Jetzt wurde über einen Zeitraum von 1-2 Minuten langsam ein Blutvolumen von ca. 0,6 ml aspiriert. Danach wurde der Katheter wieder abgeklemmt und die Probenspritze samt Kanüle abgenommen und die Spülspritze mit der Kanüle auf den Katheter aufgesetzt. Der Katheter wurde wieder mit der schon in Abschnitt „Vorbereitung der Probengewinnung“ beschriebenen Mischung aus Heparin-Natrium und NaCl gefüllt.

Danach wurde der Katheter wiederum abgeklemmt und die Spülspritze mit der Kanüle abgezogen. Anschließend wurde der Katheter verschlossen und so präpariert wie dies im Abschnitt „Implantation des Verweilkatheters“ beschrieben wurde. Während dieses Vorganges zeigten die Tiere keinerlei sichtbare Stressreaktionen. Der ganze Vorgang dauerte ca. 5 min..

#### *2.5.1.3 Gewinnung der Lavage aus der subkutanen Kammer*

Die Gewinnung der Lavageprobe geschah jeweils im Anschluss an die Gewinnung der Blutprobe. Auch hierbei waren die Tiere nicht in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt.

Der Katheter wurde an seinem Ende gekappt und die Aspirationsspritze aufgesetzt. Hierbei konnte in einigen Fällen 0,1 bis 0,2 ml Flüssigkeit aus der subkutanen Kammer gewonnen werden. Anschließend wurde die Spritze von der Kanüle abgesetzt und die Probenspritze aufgesetzt. Jetzt wurde 1 ml isotoner Kochsalzlösung langsam über einen Zeitraum von 1-2 min. in die Kammer injiziert und anschließend die Lavage wieder aspiriert. Durch dieses Vorgehen konnten ca. 0,7–1,0 ml der injizierten Flüssigkeit rückgewonnen werden. Danach wurde die Spritze samt Kanüle abgesetzt, die Spülspritze aufgesetzt und der Katheter mit ca. 0,2 ml isotoner Kochsalzlösung gespült. Danach wurde die Spritze wieder entfernt und der Katheter, wie in dem Abschnitt „Implantation der subkutanen Kammer“ beschrieben, verschlossen und präpariert.

#### 2.5.1.4 Applikation der Substanzen

Die Substanzen (NaCl, LPS, Diclofenac, L-NAME und Ropivacain) wurden zum Zeitpunkt  $t=0$  min. in die subkutane Kammer injiziert. Dies geschah mit einer schon oben beschriebenen Einmalspritze, hierbei wurden die Substanzen nicht in einer Mischspritze verabreicht. Eine Ausnahme stellte das Ropivacain dar, dies wurde wenn es in Kombination mit LPS (10 bzw. 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG) verabreicht wurde, 30 min. vor diesem in die Kammer bzw. in die *Regio femoralis* injiziert. Grund hierfür war die Latenzphase bis zum Wirkungseintritt (siehe Abschnitt 2.4.4 Ropivacain).

#### 2.5.1.5 Aufbereitung der Proben (Lavage und Blut)

Nach der Probengewinnung wurden die Blutproben und die gewonnenen Lavageproben in die Reaktionsgefäße 3810 (1,5 ml; Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, 22331 Hamburg) umgefüllt und anschließend bei 5000 U/min. für drei Minuten zentrifugiert (Zentrifuge 5414S, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, 22331 Hamburg). Die Überstände wurden jeweils abpipettiert und bei einer Temperatur von  $-60^\circ\text{C}$  eingefroren und bis zur weiteren Analyse gelagert.

## 2.5.2 Analyse der Plasma- und Lavageproben

Die Plasma- und die Lavageproben der einzelnen Experimente und Serien wurden zunächst gesammelt und später gemeinsam analysiert. Bei der Auswertung kamen Bioassays für TNF und IL6, ein Radioimmunoassay (RIA) zur Cortisolbestimmung und ein quantitativer Test zum Nachweis von LPS zum Einsatz. Die Bioassays wurden jeweils mit den Plasma- und den Lavageproben durchgeführt. Die Cortisolwerte (RIA) und das eventuell vorhandene LPS wurden im Plasma bestimmt.

### 2.5.2.1 Bioassays

Zytokine können prinzipiell durch zwei Methoden nachgewiesen werden. Zum einen können sie aufgrund ihrer Antigenität in Immunoassays nachgewiesen werden. Hierbei werden speziesspezifische Antikörper eingesetzt. Zum anderen sind bestimmte Zelllinien gegenüber den Zytokinen empfindlich und lösen bei diesen eine spezifische biologische Reaktion aus. Diese biologische Aktivität kann in Bioassays quantitativ bestimmt werden (Gearing et al. 1994). Die Immunoassays, die in der Zytokinanalytik verwendet werden und auf dem Markt verfügbar sind, weisen in ihrer Sensitivität teilweise erhebliche Unterschiede auf (Mire-Sluis et al. 1995). Ein weiterer Grund für die Verwendung von Bioassays gegenüber Immunoassays liegt darin, dass Zytokine speziesspezifisch sind und so diese Assays nur für eine Spezies eingesetzt werden können. Außerdem detektieren sie nicht nur die biologisch aktiven Quantitäten eines Zytokines, sondern auch die inaktiven Anteile. Bioassays erfassen nur die wirklich biologisch aktiven Anteile und sind nicht speziesspezifisch. Im Vergleich zu den Immunoassays sind Bioassays mit einem höheren Arbeits- und Zeitaufwand verbunden und die Zellreaktionen können unter Umständen auch von anderen Faktoren beeinflusst werden. Um eine gute Vergleichbarkeit zu garantieren, wurden Proben einer Serie immer zusammengefasst und in einem Assay ausgewertet. Im Rahmen dieser Dissertation kamen zwei Bioassays zum Einsatz – ein TNF-Bioassay und ein IL6-Bioassay. Die zu untersuchenden Plasma- und Lavageproben wurden vor Beginn der Assays nach Bedarf noch vorverdünnt. Hierzu wurde das jeweilige Kulturmedium des TNF- oder des IL6-Bioassays benutzt.

### 2.5.2.1.1 TNF-Bioassay

Das Prinzip, das dem TNF-Bioassay zugrunde liegt, ist der zytotoxische Effekt von TNF auf bestimmte Zelltypen. Je nach der in der Plasmaprobe vorhandenen Menge an TNF wird im Testansatz eine bestimmte Menge an Zellen getötet. Nach einer gewissen Inkubationszeit wird dem Testansatz der gelbe Farbstoff 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) hinzugegeben, dieser Farbstoff wird in den Mitochondrien der nicht von TNF abgetöteten Zellen zu einem blauen Farbstoff verstoffwechselt. Durch diese Farbreaktion kann anschließend die optische Dichte in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte photometrisch bestimmt werden. Aus verschiedenen Verdünnungsreihen ergibt sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die anhand einer Standardreihe quantifiziert werden kann. Durch die Verwendung internationaler Standards ist ein Vergleich zwischen verschiedenen Labors möglich (Meager und Gaines-Das 1994).

Die zur TNF-Bestimmung verwendete Zelllinie WEHI (**W**alter and **E**lizabeth **H**all Institute) 164 Subklon 13 wurde 1973 von Rollinghoff und Warner eingeführt. Die Zelllinie ist in der American Tissue Culture Collection (ATCC) auch unter der Bezeichnung CRL 1751 geführt. Die Zellen stammen ursprünglich aus einem Fibrosarkom, das durch die subkutane Injektion von Methylcholanthren in BALB/c Mäusen induziert worden ist. Espevik & Nissen-Meyer (1986) konnten hieraus einen Subklon isolieren, der äußerst empfindlich gegenüber TNF reagierte. Eine Nachweisbarkeit von 2 bis 2,5 pg/ml humanes TNF wurde schon berichtet (Gearing et al. 1994). Die Zelllinie ist so spezifisch, dass weder Dexamethason noch PGE<sub>2</sub> in Konzentration von 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-7</sup> und 10<sup>-9</sup> mol/l das Assay beeinflussen (Eskandari et al. 1990). Auch durch Konzentrationen von 0,02 pg/ml bis 1 µg/ml von IL1 (α und β), IL2 oder IL6 konnte in dieser Zelllinie kein Zelltod ausgelöst werden und so das Testergebnis modifiziert werden.

Studien zeigten auch, dass mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren der Plasmaproben sich nicht nachteilig auf die zytolytische Aktivität auswirkte. Aus diesen Gründen wird das WEHI-Assay als ein Assay mit großer Reproduzierbarkeit angesehen. Mit dem Assay wird nicht nur TNFα nachgewiesen, sondern auch Substanzen, die eine vergleichbare Aktivität wie TNFα haben. Solche Substanzen sind TNFβ und Lymphotoxin β (Browning et al. 1993).

Die TNF-ähnliche Aktivität bzw. Konzentration wird im folgenden vereinfacht TNF-Aktivität bzw. Konzentration genannt. Die Fibroblasten wurden in einem speziellen Kulturmedium kultiviert. Das Medium bestand aus **Rothwell Park Memorial Institute Medium** (RPMI 1640, Fa. Life Technologies, Paisley, Scotland) mit einem Zusatz von 10 % fetalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum, 1 ml L-Glutaminsäure [1mmol/ml] sowie 1% Penicillin- Streptomycin (50000 I.E./ml). Alle obengenannten Substanzen stammen von der Fa. Life Technology. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Nach 3 Tagen hatten sich etwa 80 % der spindelförmigen Fibroblasten an der Bodenfläche einer 250 ml Kulturflasche (Greiner GmbH, Maybachstr. 2, D-72636 Frickenhausen) angeheftet. Diese wurden nach 3-4 Tagen in ein neues Medium passagiert. Sollten die Zellen für ein Assay genutzt werden, wurde zusätzlich 3-4 Tage vor dem Assay eine 600 ml Kulturflasche (Greiner GmbH) angesetzt, um genügend Zellen für den Assay verfügbar zu haben. Zum Passagieren der Zellen wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche entfernt (dekantiert). Anschließend wurde in die Kulturflasche, entweder 12 ml bei der kleinen oder 30 ml bei der großen Flasche, PBS-Lösung (phosphatgepufferte, kalzium- und magnesiumfreie Kochsalzlösung mit pH 7,4; Life Technologies, Paisley, Scotland) zugegeben, um die vorhandenen Kalziumionen auf der Zellschicht auszuwaschen. Denn diese würden das anschließend zugegebene Trypsin inaktivieren. Nach etwa 3 min. wurde der Überstand dekantiert und das Trypsin zugegeben. Nach etwa 5 min. hatten sich alle Zellen abgelöst und abgekugelt. Nach Zugeben von 20 bzw. 30 ml Kulturmedium konnte die Zellsuspension entweder passagiert werden oder die Suspension für ein TNF-Assay aufbereitet werden.

Der erste Schritt bei der Aufbereitung der Zellsuspension für den Assay war das zehnmünütige Zentrifugieren bei 2300 U/min.. Der Überstand wurde anschließend dekantiert und 20 ml neues Kulturmedium zugegeben und die Zellen resuspendiert. Dieser Vorgang wurde anschließend noch einmal wiederholt. Nachdem die Zellen zweimal resuspendiert worden sind, wurden 50 µl der Suspension entnommen, auf eine Zählkammer (Hämozytometer nach Thoma, Fa. Kretschmer, Gießen) gegeben und die lebenden Zellen gezählt. Aufgrund der ermittelten Zellanzahl wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 50000 Zellen/100µl Medium hergestellt.



Anschließend wurde dieser Zellsuspension Actinomycin D (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 4 µg/ml Zellsuspension hinzugefügt. Dieses stoppte einerseits das weitere Zellwachstum und erhöhte andererseits die Empfindlichkeit der Zellen um das fünfzig- bis hundertfache (Fiers 1991).

Die TNF-Assays wurden in sterilen Mikrotiterplatten (Cellstar<sup>®</sup> MICRO-PLATTE mit Abdeckplatte, TC, steril, Greiner GmbH, Maybachstr. 2, D-72636 Frickenhausen) durchgeführt. Die Platten hatten 96 Vertiefungen. In die einzelnen Vertiefungen wurde 100 µl der aufbereiteten Zellsuspension und 100 µl der zu untersuchenden Probe gegeben. Bei jedem Assay wurden zwei Standards und zwei Qualitätskontrollen erstellt. Die Qualitätskontrollen und Standards bestanden aus festgelegten Mengen von murinem rekombiniertem TNF $\alpha$  (Referenz-Code 88/532, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Großbritannien). Die TNF-Konzentration des Standards betrug 100 pg mTNF $\alpha$ /ml und die der Qualitätskontrollen 10 und 25 pg mTNF $\alpha$ /ml. Mit den Standards, den Qualitätskontrollen und den Proben wurden Verdünnungsreihen erstellt. In einzelnen wurden die Proben in der Verdünnungsreihe immer um den Faktor 1:1 verdünnt. Dieser Vorgang wurde zehnmal bei den Standardreihen (Einfachbestimmung; erste Vertiefung blieb frei und in die letzte kam nur das oben erwähnte Kulturmedium) und fünfmal bei den übrigen Reihen (Doppelbestimmung) wiederholt, so dass am Ende der Verdünnungsreihe ein Faktor von 1:16 in den Reihen mit den Proben vorlag. Die letzte Vertiefung der Standardreihen enthielt kein mTNF $\alpha$ . Bei den Proben und den Kontrollen wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden in jede Vertiefung 25 µl MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS-Lösung pipettiert. Anschließend wurden die Platten wieder für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wandelten Succinyl-Dehydrogenasen in den Mitochondrien der noch lebenden Zellen das gelbe MTT-Tetrazoliumsalz in dunkelblaue bis violette MTT-Formazan-Kristalle um (Ibelgaufts 1995, Mosmann 1983). Bis zu diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen unter einer Reinheitsbank (VFR 1206, LAF Bank, Fa. Tecnormara, Fernwald) durchgeführt. Nach vier Stunden wurden aus jeder Vertiefung 125 µl abpipettiert und verworfen.

Anschließend wurde in jede Vertiefung 100 µl eines Gemisches aus Isopropanol mit 2N Salzsäure (HCl) pipettiert. Dieser Zusatz ist für das Auflösen der Kristalle notwendig. Danach wurden die Platten für weitere 12 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Mikrotiterplatten bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Photometer (MR 7000, Fa. Dynatech Laboratories, Denkendorf) ausgewertet.

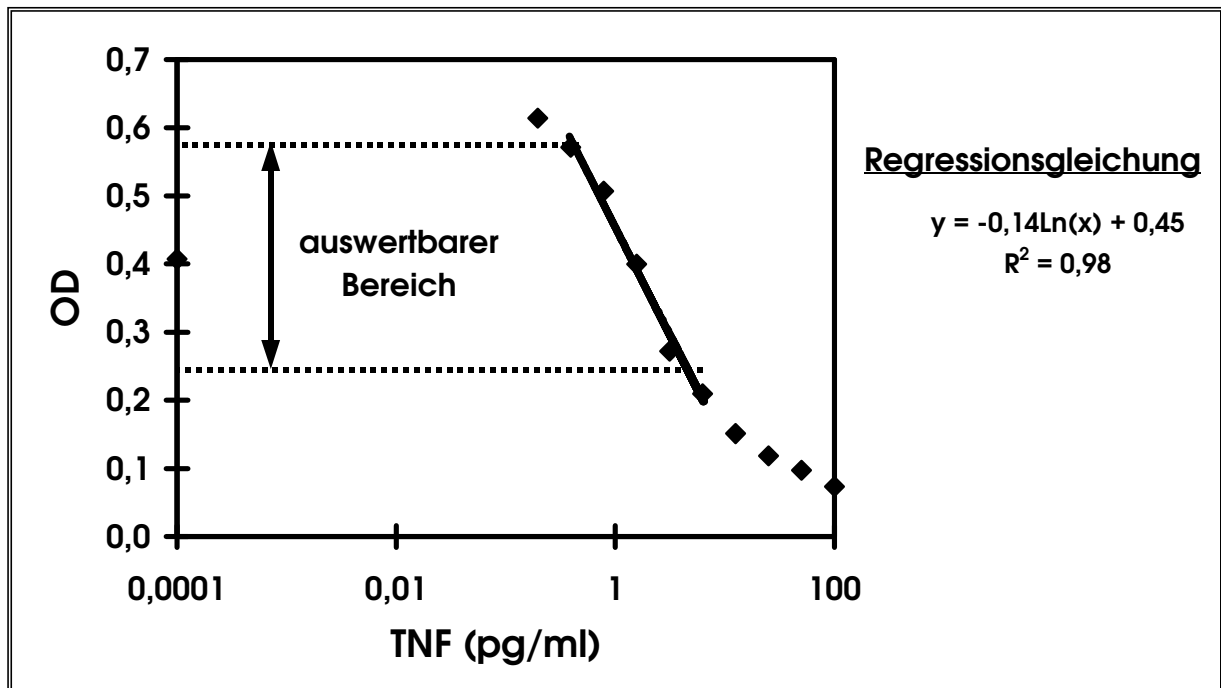


Abbildung 17: Eichkurve für TNF-ähnliche Aktivität

Mit Hilfe eines Kalkulationsprogrammes (Microsoft Excel 7.0) wurden die gemittelten Absorptionswerte bzw. die optische Dichte der Standards auf der Ordinate gegen ihre jeweilig bekannte TNF-Konzentration auf der Abzisse aufgetragen und eine Eichkurve erstellt. Für die zu analysierenden Proben wurden diejenigen Verdünnungen ausgewählt, die in den linearen Bereich der Eichkurve fielen. Je geringer die TNF-Aktivität in der Probe war, desto mehr Zellen überlebten und konnten in ihren Mitochondrien MTT Tetrazolium zu MTT Formazan-Kristallen verstoffwechseln, und desto mehr Farbstoff befand sich daher nach dem Auflösen der Kristalle in der Vertiefung. Die Probe hatte dadurch eine größere optische Dichte. Bei hoher TNF-Aktivität ist dieses Verhältnis aufgrund der Zytotoxizität von TNF genau umgekehrt.

Durch das Einsetzen der entsprechenden Absorptionswerte der Proben, die innerhalb des auswertbaren Bereiches lagen, in die Gleichung für die Trendlinie konnte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration an TNF in der Probe berechnet werden (siehe Abbildung 17). Die Mittelwerte aus dem Doppelansatz für jede Probe lieferten die Konzentration an TNF in der Probe.

#### 2.5.2.1.2 IL6-Bioassay

Das Prinzip des IL6-Bioassays beruht auf der Förderung der Proliferation der Hybridoma Zelllinie B9 (Aarden et al. 1987, Oers et al. 1988) durch IL6. Diese Zelllinie wird hochspezifisch und dosisabhängig durch IL6 zum Wachstum stimuliert. Je höher die IL6 Aktivität in der zu untersuchenden Probe ist, desto mehr Zellen sind nach der Inkubation der Platten pro Vertiefung vorhanden. Nach der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung ein Farbstoff (MTT) hinzugegeben, welcher in den Mitochondrien der lebenden Zellen verstoffwechselt wird und danach nicht mehr gelb sondern blau ist. Durch diese Farbreaktion kann anschließend die optische Dichte photometrisch bestimmt werden. Aus verschiedenen Verdünnungen ergibt sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die anhand von einer Standardreihe quantifiziert werden kann. Durch die Verwendung internationaler Standards ist ein Vergleich zwischen verschiedenen Labors möglich (Meager und Gaines-Das 1994). Die Hybridoma Zelllinie wurde von Lansdorp et al. 1986 entwickelt. Durch die Injektion von Pristane (2,6,10,14-Tetramethylpentacane) in die Bauchhöhle von Balb/c Mäusen, wird die Entstehung von Plasmazytomen induziert. Durch die Verschmelzung von Milzzellen von Balb/c Mäusen mit Hybridplasmazytomzellen (Sp2/OAg14) entstand die Hybridoma Zelllinie B 13.29. Eigentliches Ziel der Forschergruppe war es, eine Zelllinie zu entwickeln, die Antikörper gegen menschliche Oberflächenantigene produziert. Zur Kultivierung dieser Zellen mußten dem Ansatz noch Helferzellen bzw. „feeder-cells“ (**H**umane-**E**ndothel-**Z**ellen-**H**EC) zugesetzt werden. Diese Zellen lieferten den Wachstumsfaktor (**H**ybridoma-**G**rowth-**F**actor) HGF. Dieser Wachstumsfaktor HGF ist identisch mit Interleukin6 (IL6; Oers et al. 1988). Ein Subklon der B 13.29 Zelllinie ist die B 9 Zelllinie. Diese Zelllinie hat eine viel größere Sensitivität gegenüber IL6, als die B 13.29 Zelllinie. Mit dieser Zelllinie kann schon die Menge IL6 nachgewiesen werden, die ein einziger menschlicher Monozyt produziert (Aarden et al. 1987). Die B9-Zellen wurden in einem speziellen Kulturmedium kultiviert.

Das Medium bestand aus **Rothwell Park Memorial Institute Medium** (RPMI 1640, Fa. Life Technologies, Paisley, Scotland) mit einem Zusatz von 5,5 % fetalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum, 1 ml L-Glutaminsäure (Konzentration 1 mmol/ml), 100 µl Gentamycin sowie 250 ml Mercaptoethanol.

Alle obengenannten Substanzen sind von der Fa. Life Technology. Für das Wachstum der Zellen wurde dem Medium noch IL6 in einer Konzentration von 500 IU/ml zugesetzt. Dieser Zusatz fehlte bei der Verwendung des Mediums im Testansatz. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Nach 3 Tagen wurden die Zellen in neues Medium in eine 50 ml Kulturflasche (Greiner GmbH, Maybachstr. 2, D-72636 Frickenhausen) passagiert. Zum Passagieren wurde in eine neue Kulturflasche 9 ml des oben beschriebenen Kulturmediums (inkl. IL6) pipettiert und anschließend hierzu 1 ml der Zellsuspension aus der alten Kulturflasche hinzugefügt.

Der erste Schritt bei der Aufbereitung der Zellsuspension für das Assay war das zehnmünütige Zentrifugieren bei 2300 U/min.. Der Überstand wurde anschließend dekantiert um die Zellen durch die Zugabe von 9 ml IL6-freiem Kulturmedium wieder zu resuspendieren. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nachdem die Zellen dreimal resuspendiert waren, wurden 50 µl der Suspension entnommen, auf eine Zählkammer (Hämozytometer nach Thoma) gegeben und die lebenden Zellen gezählt. Aufgrund der ermittelten Zellanzahl wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 5000 Zellen/100 µl Medium hergestellt.

Die IL6-Assays erfolgten in sterilen Mikrotiterplatten (Cellstar®). Die Platten hatten 96 Vertiefungen. In jede dieser Vertiefungen wurden 100 µl der aufbereiteten Zellsuspension und 100 µl der zu untersuchenden Probe gegeben. Bei jedem Assay wurden zwei Standards und zwei Qualitätskontrollen erstellt. Die Qualitätskontrollen und Standards bestanden aus festgelegten Mengen von humanem rekombiniertem IL6 (Referenz-Code 89/548, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Großbritannien). Die IL6 Konzentration des Standards betrug 50 IU/ml und die der Qualitätskontrollen 10 und 30 IU/ml. Mit den Standards, den Qualitätskontrollen und den Proben wurden Verdünnungsreihen erstellt.

Im einzelnen wurden die Proben in der Verdünnungsreihe immer um den Faktor 1:1 verdünnt. Dieser Vorgang wurde zehnmal bei den Standardreihen (Einfachbestimmung; erste Vertiefung blieb frei und in die letzte kam nur das oben erwähnte Kulturmedium) und fünfmal bei den übrigen Reihen (Kontrollen und Proben; Doppelbestimmung) wiederholt, so dass am Ende der Verdünnungsreihe ein Faktor von 1:16 in den Reihen mit den Proben vorlag.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde in jede Vertiefung 25 µl MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 5 mg/ml PBS-Lösung pipettiert. Anschließend wurden die Platten wieder für vier Stunden im Brutschrank inkubiert (Reaktion, Auflösen der Kristalle, Messverfahren und Auswertung, siehe TNF-Bioassay). Je mehr IL6 in der Probe vorhanden war, desto mehr Zellen waren vorhanden und desto mehr MTT konnte in den Mitochondrien verstoffwechselt werden. Dies bedeutete mehr blaue MTT-Formazankristalle, was wiederum in einer höheren gemessenen optischen Dichte resultierte. Eine entsprechende Eichkurve ist in Abbildung 18 dargestellt.

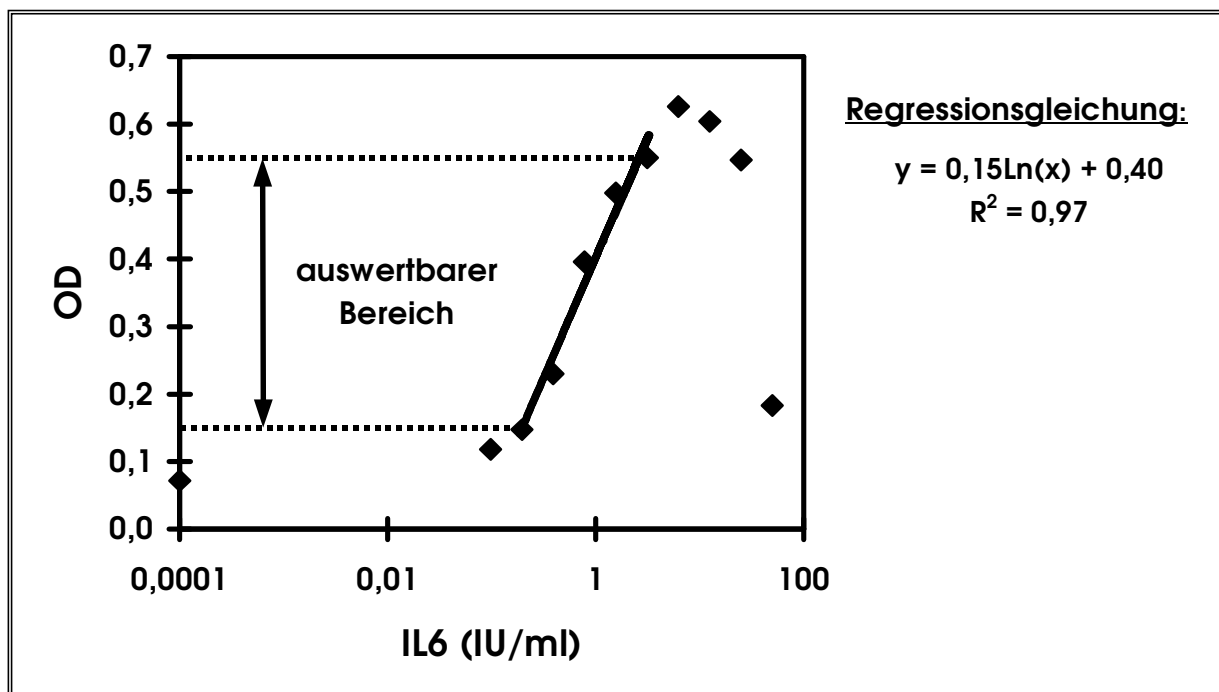


Abbildung 18: Eichkurve für die IL6 Konzentration

### 2.5.2.2 Cortisol-Radioimmunoassay

Die Messung von Cortisol erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay (Coat-A-Count, DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim). Das Prinzip beruht auf der Konkurrenz zwischen radioaktiv markiertem Cortisol ( $^{125}\text{I}$ ) und Cortisol in der Plasmaprobe um die Bindung an spezifische Cortisol-Antikörper, die der Innenwand von Polypropylenröhren anhaften (Foster & Dunn 1974).

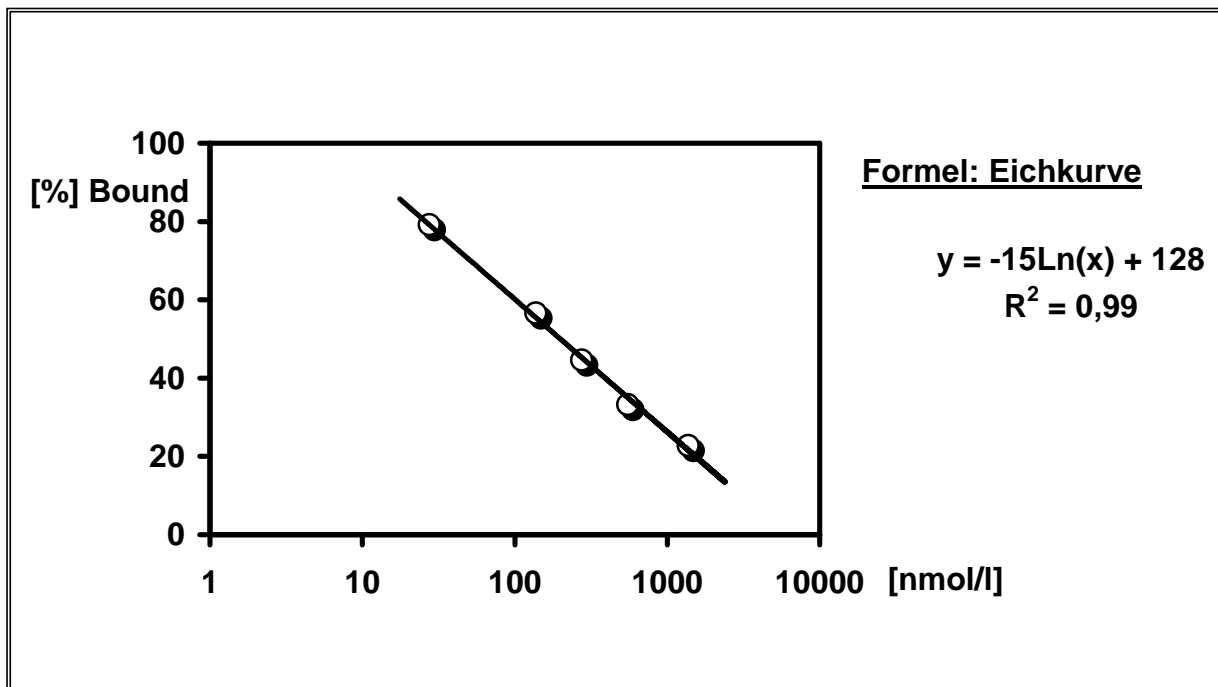


Abbildung 19: Eichkurve für die Cortisol-Konzentration

Hierzu wurden 25  $\mu\text{l}$  der Standards und der zu analysierenden Proben auf den Boden der beschichteten Teströhrchen pipettiert. Die Standardreihe umfasste folgende Konzentrationen von Cortisol: 0, 28, 138, 276, 552 und 1380 nmol/l. Die Standardreihe und die Proben wurden im Doppelansatz pipettiert. Die Proben wurden nur dann 1:2 und 1:3 vorverdünnt, wenn bei einer vorausgegangenen Messung die Werte dieser Proben außerhalb des auswertbaren Bereichs lagen. Ferner wurden 1000  $\mu\text{l}$  radioaktiv markiertes Cortisol hinzugegeben und mit den Proben in den Röhrchen vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C wurde die Flüssigkeit aus den Röhrchen abgegossen. Danach erfolgte die Messung der Teströhrchen über eine Minute im  $^{125}\text{I}$ -Kanal eines Gamma-Counters (Cobra™, QC Modell 5005, Fa. Canberra Packard GmbH, Frankfurt/M.). Die ermittelte Zählrate nahm hierbei mit steigender Cortisolkonzentration im Plasma ab.

Zur Auswertung wurde aus den Messwerten der Duplikate von Standards und Proben der Mittelwert berechnet. Bezogen auf den Nullstandard wurde aus den Mittelwerten für jeden Standard und Probe die Bindung in Prozent ermittelt. Anschließend wurde die Bindung in Prozent der Standards auf die Ordinate gegen die zugehörigen Cortisol-Konzentrationen auf der Abzisse logarithmisch aufgetragen und die Eichkurve bestimmt (Abbildung 19). Aus den Bindungswerten in Prozent der unbekanntenen Proben konnte nun mit Hilfe der Regressionsgleichung für die Eichkurve die jeweilige Cortisol-Konzentration in nmol/l ermittelt werden.

#### 2.5.2.3 *Limulus Amöbozyten Lysat Test*

Bei dem *Limulus Amöbozyten Lysat* –(LAL)- Test handelt es sich um das kommerziell erwerbare Testkit QCL-1000<sup>®</sup> (quantitative chromogenic LAL) der Fa. Bio Whittaker (Bio Whittaker, Inc; 8830 Biggs Ford Road; P.O. Box 127; Walkersville, MD 21793). Dieser Test kann Endotoxin gram-negativer Bakterien quantitativ nachweisen. Das zugrundeliegende Testprinzip ist auf folgende Beobachtung zurückzuführen:

Eine Infektion des Pfeilschwanzkrebses oder auch Hufeisenkrebses (*Limulus polyphemus*) mit gram-negativen Bakterien löst eine intravasale Koagulation aus (Bang 1956). Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass diese Koagulation auf die Reaktion des Endotoxins mit einem gerinnungsauslösenden Protein der zirkulierenden Amöbozyten zurückzuführen war (Levin & Bang 1964, Levin & Bang 1968). Aufgrund dieser Beobachtung wurde ein Lysat der Amöbozyten hergestellt (Levin & Bang 1968). Dieses Lysat (LAL) reagierte sehr sensitiv auf die Anwesenheit von Endotoxin. Das gerinnungsauslösende Protein wurde isoliert und es zeigte sich, dass die Koagulation durch eine enzymatische Reaktion ausgelöst wurde (Solum 1970; Solum 1973; Young et al. 1972). Das Prinzip des Testkits QCL-1000<sup>®</sup> beruht auf den oben angeführten Beobachtungen. Das in der Testflüssigkeit eventuell vorhandene Endotoxin gram-negativer Bakterien katalysiert die Aktivierung des Proenzym, wobei die initiale Aktivierung direkt mit der Konzentration des Endotoxins korreliert. Das aktivierte Enzym katalysiert die Abspaltung von p-Nitroanilin (pNA) von dem farblosen synthetischen Substrat (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA). Das abgespaltene pNA führt zu einer Gelbfärbung der Testflüssigkeit. Nach dem Stopp der oben beschriebenen Reaktion durch die Zugabe von 25 %-iger Essigsäure, wird die pNA-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 405-410 nm bestimmt.

Die Korrelation zwischen der Absorption und der Endotoxinkonzentration ist in einem Bereich von 0,1 bis 1,0 EU/ml (10 bis 100 pg/ml) linear.

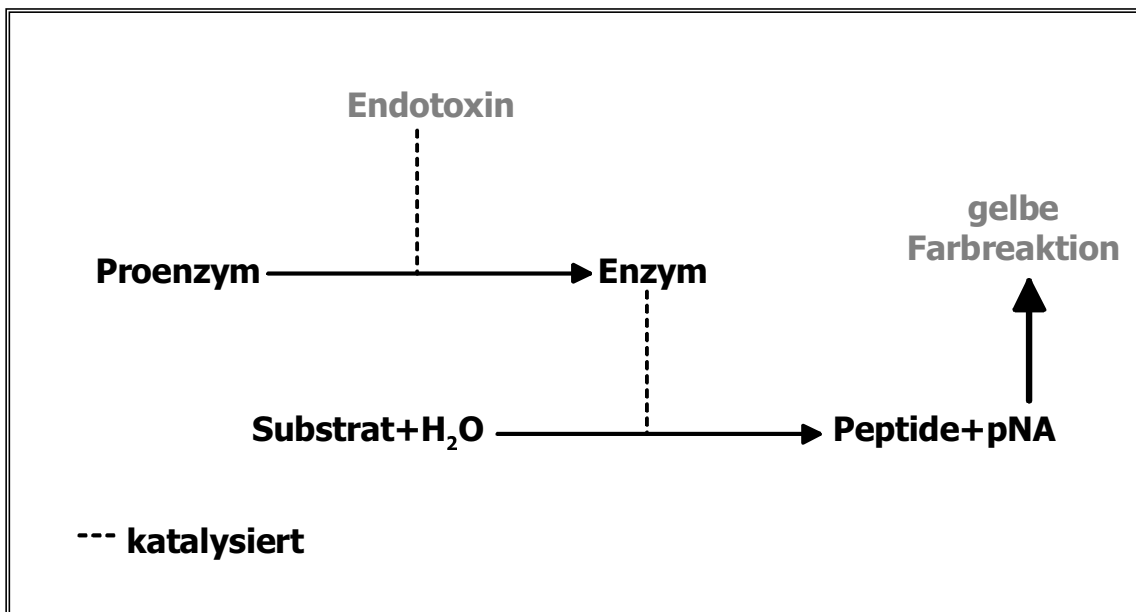


Abbildung 20: Reaktionsablauf beim LAL-Test (QCL-1000<sup>®</sup>)

Zur Endotoxinbestimmung wurden die Plasmaproben, die eine Stunde nach der Applikation von LPS bzw. Solvent in die subkutane Kammer gewonnen worden sind, herangezogen. Die Plasmaproben stammten aus drei Versuchstiergruppen:

- fünf Tiere aus der Gruppe, bei welcher Solvent in die Kammer injiziert wurde
- fünf Tiere aus der Gruppe, bei welcher LPS 100 in die Kammer injiziert wurde
- fünf Tiere aus der Gruppe, bei welcher LPS 10 in die Kammer injiziert wurde

Zu Anfang der Testdurchführung wurde eine Standardreihe mit folgenden Konzentrationen an Endotoxin (E. coli; 0111:B4) hergestellt: 0, 12,5, 25, 50, 100 und 200 pg/ml. Von den Standards bzw. von den Proben wurden jeweils 50 µl in ein Reagenzglas überführt und diese anschließend für fünf Minuten auf einem Multiblockheizer auf eine Temperatur von 37 °C gebracht. Danach wurde in jedes Reagenzglas 50 µl LAL zugegeben und die Standards bzw. Proben für weitere zehn Minuten auf dem Multiblockheizer inkubiert. Anschließend wurde in jedes Reagenzglas 100 µl Chromogen pipetiert und wiederum für weitere sechs Minuten inkubiert. Nach Ablauf der sechs Minuten wurde die Reaktion in jedem Reagenzglas durch Zugabe von 100 µl 25%-iger Essigsäure abgestoppt.



Aus jedem Reagenzglas wurden anschließend 100 µl auf eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption mit Hilfe eines Photometers bei 405 nm gemessen.

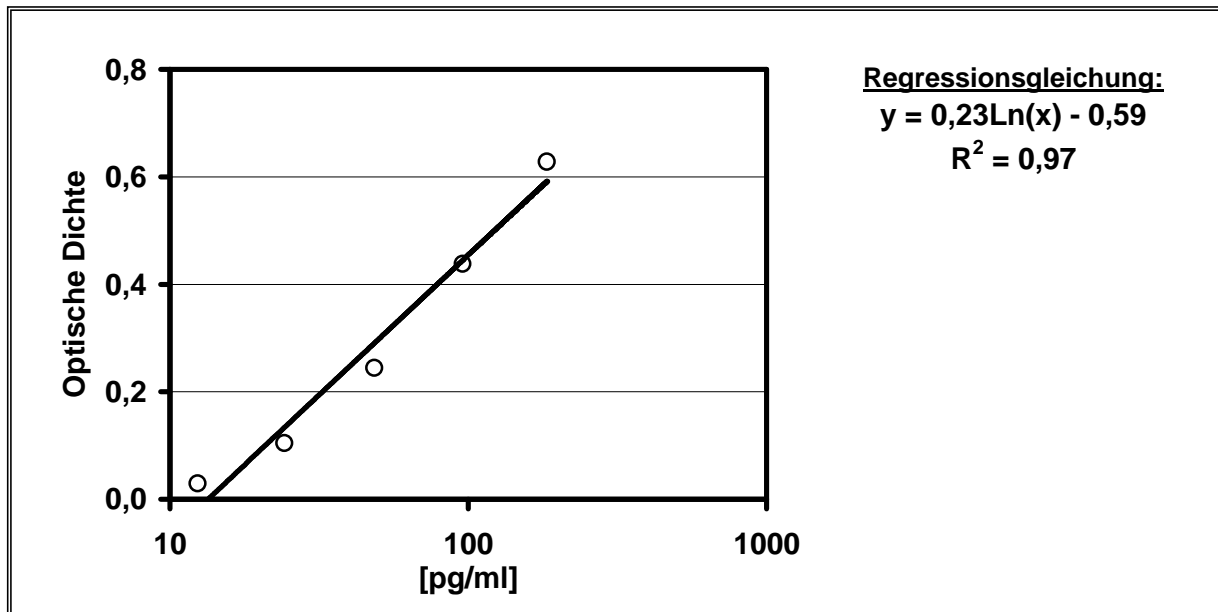


Abbildung 21: ermittelte Eichkurve des LAL-Testes

Die in den Proben vorhandenen Konzentrationen wurden mit Hilfe der ermittelten Standards errechnet.

### 2.5.3 Versuchsauswertung und Statistik

Zur Darstellung der Fieberverläufe unter verschiedenen experimentellen Bedingungen wurden die Mittelwerte der Abdominaltemperaturen einer Versuchsreihe mit dem jeweiligen Standardfehler auf der Ordinate gegen die Zeit auf der Abszisse aufgetragen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Temperaturwerte im Diagramm in Intervallen von 15 min. dargestellt. Bei diesen Temperaturdiagrammen wurden zur Ermittlung der Nulllinien die absolut gemessenen Körperkerntemperaturen der Versuchstiere innerhalb der letzten zwei Stunden vor Injektion der jeweiligen Substanzen in die subkutane Kammer gemittelt ( $t = -120$  min. bis  $t = 0$  min.). Dieser Wert wurde als Nulllinie definiert. Im folgenden wurden im Zeitraum  $t = -120$  min. bis  $t = 360$  min. jeweils die Differenzen zwischen den gemessenen Absolutwerten und dem gemittelten Wert der Nulllinie errechnet und im Diagramm dargestellt ( $\Delta T_{\text{abd.}} [^{\circ}\text{C}]$ ). Als Parameter für die Größe der gesamten Fieberreaktion wurde der Fieberindex (F.I.) errechnet.

Dieser ergibt sich für das individuelle Tier aus der Integration der Fläche zwischen der Temperaturverlaufskurve und der horizontalen Geraden, die durch den Mittelwert der Ausgangstemperaturen des untersuchten Tieres definiert ist. Die Fieberverläufe zweier Tiergruppen mit unterschiedlicher Vorbehandlung wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Die jeweils unterschiedliche Vorbehandlung der Tiere definierte hierbei den Gruppenfaktor (z.B. Injektion von LPS versus Injektion von LPS plus Ropivacain). Den zweiten Faktor repräsentierte die Zeit mit wiederholten Messungen beim gleichen Tier zu den untersuchten Zeitpunkten innerhalb eines analysierten Zeitintervalls. Die errechneten Fieberindizes der einzelnen Tiergruppen aus jeder der 4 Teiluntersuchungen dieser Arbeit wurden mittels einfaktoriellen Varianzanalysen verglichen. Im Anschluß an jede durchgeführte Varianzanalyse wurden mit Hilfe des Scheffé-Tests als post-hoc-Test auf dem 5 % Niveau die in der ANOVA als signifikant unterschiedenen Gruppen in Einzelvergleichen aufgeschlüsselt (Bortz 1989).

Konzentrationen von TNF, Cortisol und IL6 in der Lavage bzw. im Blutplasma zu den untersuchten Zeitpunkten wurden wie die Fieberindices mittels einfaktorieller ANOVA und post-hoc-Test nach Scheffé verglichen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Softwarepakets StatView<sup>®</sup> (Abacus Concepts, Berkeley, Kalifornien, 1992) durchgeführt.

### KAPITEL 3: ERGEBNISSE

Der nachstehend dargestellten Tabelle (Tabelle 8), können die Abkürzungen für die im folgenden beschriebenen Versuchstiergruppen entnommen werden. Gleichzeitig können dieser Tabelle auch die Anzahl der im Versuch verwendeten Tiere, die verwendeten Dosierungen eingesetzter Pharmaka sowie die Kapitelnummern entnommen werden.

Versuchstiergruppe	Dosis <sup>4</sup>	Anzahl der verwendeten Tiere [n]	Verwendete Abkürzung	Kapitel
Solvent (NaCl)	1 ml	6	<b>SOL</b>	
LPS 100	100 µg	7	<b>L100</b>	
LPS 10	10 µg	7	<b>L10</b>	
<b>ROPIVACAIN-VERSUCHSREIHE KAPITEL 3.1</b>				
ROPI	10 mg	6	<b>RO</b>	3.1.1
LPS 100 <sup>3</sup> + ROPI <sup>2</sup>	10 mg	7	<b>L100+RO</b>	3.1.2
LPS 10 <sup>3</sup> + ROPI <sup>2</sup>	10 mg	7	<b>L10 + RO</b>	3.1.3
LPS 10 <sup>3</sup> + ROPI <sup>2</sup> (contralateral) <sup>1</sup>	10 mg	6	<b>L10+ROc.I.</b>	3.1.4
<b>TNFbp-Versuchsreihe<sup>2</sup> Kapitel 3.2</b>				
TNFBP	1 mg <sup>5</sup>	5	<b>TBP</b>	3.2.1
LPS 100 <sup>3</sup> + TNFbp	1 mg <sup>5</sup>	5	<b>L100+TBP</b>	3.2.2
LPS 10 <sup>3</sup> + TNFbp	1 mg <sup>5</sup>	5	<b>L10+TBP</b>	3.2.3
<b>L-NAME-Versuchsreihe Kapitel 3.3</b>				
L-NAME	20 mg	6	<b>LN</b>	3.3.1
LPS 100 <sup>3</sup> + L-NAME	20 mg	4	<b>L100+LN</b>	3.3.2
LPS 10 <sup>3</sup> + L-NAME	20 mg	4	<b>L10+LN</b>	3.3.3
<b>Diclofenac-Versuchsreihe 3.4</b>				
DICLOFENAC	5 mg	8	<b>DICLO</b>	3.4.1
LPS 100 <sup>3</sup> + Diclofenac	5 mg	6	<b>L100+DICLO</b>	3.4.2
LPS 10 <sup>3</sup> + Diclofenac	5 mg	5	<b>L10+DICLO</b>	3.4.3

Tabelle 8: Übersichtstabelle der verschiedenen Versuchsreihen mit Dosierungen, Anzahl der Versuchstiere und den entsprechenden Abkürzungen

<sup>1</sup> Applikationsort des ROPI war nicht die subkutane Kammer, sondern der contralateral von dieser gelegene Bereich des Oberschenkels (Regio femoralis). Injektion erfolgte subkutan und ebenfalls 30 min. vor Versuchsbeginn.

<sup>2</sup> ROPI wurde aufgrund seiner Wirklatenz immer 30 min. vor der Injektion von LPS 100 oder LPS 10 in die subkutane Kammer appliziert

<sup>3</sup> LPS wurde immer in entsprechender Dosis eingesetzt [LPS 10 entspricht 10 µg; LPS 100 entspricht 100 µg]

<sup>4</sup> Dosisangaben beziehen sich immer auf kg Körpergewicht

<sup>5</sup> TPB-Dosis bezieht sich nicht auf das Körpergewicht, jedes Tier erhielt die gleiche Menge TNFbp

Angaben der TNF-Aktivität erfolgen in [pg/ml], der IL6-Konzentration in [IU/ml] und der Cortisolkonzentration in [nmol/l]. In allen Diagrammen und Tabellen sind die Mittelwerte mit dem S.E.M. angegeben. Die mittleren Fieberindizes sind ebenfalls mit dem S.E.M. angegeben.

### **3.1 Injektion von Ropivacain in Kombination mit LPS 100 oder mit LPS 10 in die subkutane Kammer**

#### *3.1.1 Injektion von Ropivacain im Vergleich zur Injektion von Solvent in die subkutane Kammer*

Im Verlauf des Versuches wurden 60 min. vor sowie 60 min. und 180 min. nach Versuchsbeginn Proben aus der subkutanen Kammer (Lavage) und Blutplasmaproben gewonnen. In den Proben aus der Lavage wurden die mittlere TNF-Aktivität und die IL6-Konzentration zu den genannten Zeitpunkten bestimmt. Im Blutplasma wurde zusätzlich zu den oben erwähnten Zytokinen mittels eines Radioimmunoassays die Cortisolkonzentration bestimmt. Dieser Test sollte Aufschluss über das Ausmaß der Aktivierung der HPA-Achse geben.

In der subkutanen Kammer waren sowohl 60 min. vor sowie 60 min. und 180 min. nach der Injektion von SOL und RO vergleichsweise moderate Konzentrationen an TNF (80 bis 586 pg/ml) und IL6 (400 bis 1500 IU/ml) in der gesammelten Lavageflüssigkeit nachweisbar. Bei einzelnen Tieren wurden für IL6 sogar deutlich höhere Mengen an biologisch aktivem IL6 gemessen. Dieser Befund spricht für eine lokale inflammatorische Reaktion im Bereich der subkutanen Kammer, die sich jedoch nicht auf physiologische Parameter (Körpertemperatur) und Verhaltensparameter (Fress- und Trinkverhalten, Entwicklung des Körpergewichtes) auswirkte. Im Blutplasma waren in beiden Gruppen (SOL- und RO-Gruppe) keine nennenswerten Spuren an TNF und lediglich moderate Konzentration von IL6 (60 bis 400 IU/ml) nachweisbar. Diese zirkulierenden IL6-Konzentrationen entsprachen den in zahlreichen vorangegangenen Studien ermittelten basalen Werten für dieses Zytokin, die in der systemischen Zirkulation von Meerschweinchen immer nachweisbar sind (Roth et al. 1993, 1994a & 1997).

Die Auswirkung einer Injektion von ROPI oder SOL in die subkutane Kammer auf die Körpertemperatur ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Temperaturverläufe waren bei beiden Gruppen nahezu identisch. Beim Vergleich der Fieberindizes der beiden Versuchsgruppen konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die RO-Gruppe hatte einen mittleren F.I. von  $1,43 \pm 0,44$  [ $^{\circ}\text{C h}$ ], bei der SOL-Gruppe lag der mittlere F.I. bei  $0,89 \pm 0,52$  [ $^{\circ}\text{C h}$ ] (Abbildung 36).

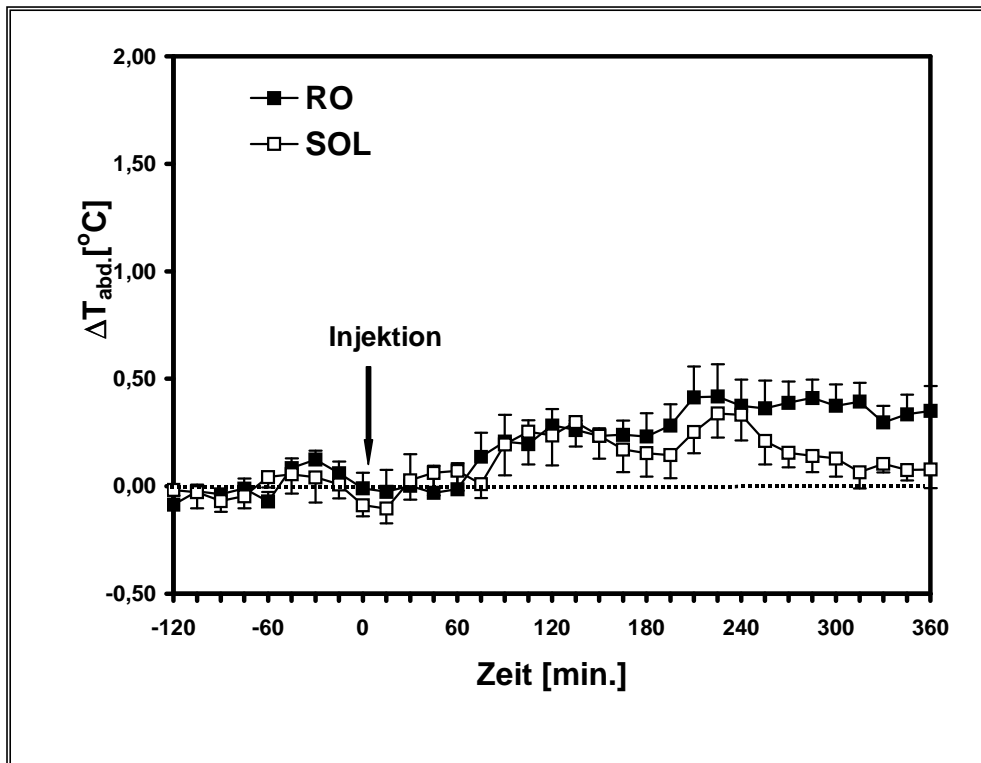


Abbildung 22: Temperaturverlauf bei zwei Gruppen von Meerschweinchen nach der Injektion von SOL und RO in die subkutane Kammer

Im Blutplasma der SOL- und RO-Gruppe lagen 60 min. vor Versuchsbeginn (Injektion von SOL bzw. RO) die mittleren Cortisolkonzentrationen bei Werten von 190 bis 302 nmol/l. Diese Werte waren 60 bzw. 180 min. nach Injektion der Lösung in die subkutane Kammer tendenziell höher (346 bis 770 nmol/l), wobei diese wahrscheinlich stressinduzierten leichten Anstiege der Cortisol-Spiegel nicht signifikant waren. Außerdem waren zu keinem der untersuchten Zeitpunkte statistisch signifikante Unterschiede der Cortisol-Spiegel zwischen SOL- und RO-behandelten Meerschweinchen zu verzeichnen.

3.1.2 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 100 und der Injektion von LPS 100 in Kombination mit Ropivacain

Die Injektion von 100 µg/kg KG LPS in die subkutane Kammer führte zu einem Anstieg der Konzentrationen von TNF (Tabelle 9, Abbildung 23) und IL6 (Tabelle 10, Abbildung 24) in der Lavage, die 60 bzw. 180 min. nach LPS-Gabe aus der subkutanen Kammer gewonnen wurde. Spuren von TNF waren besonders 60 min. nach der LPS-Injektion auch im Blutplasma nachweisbar, was auf einen Übertritt geringer Mengen dieses Zytokins in den Blutkreislauf hindeutet.

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
L100	500 ±300	18600 ±4100	39300 ±11800	n.d.	200 ±200	n.d.
L100+RO	200 ±100	1700 ±800	6400 ±2600	n.d.	40 ±20	20 ±20

Tabelle 9: mittlere TNF-Aktivitäten der L100-Gruppe und der L100+RO-Gruppe in der Lavage und im Blutplasma [pg/ml]

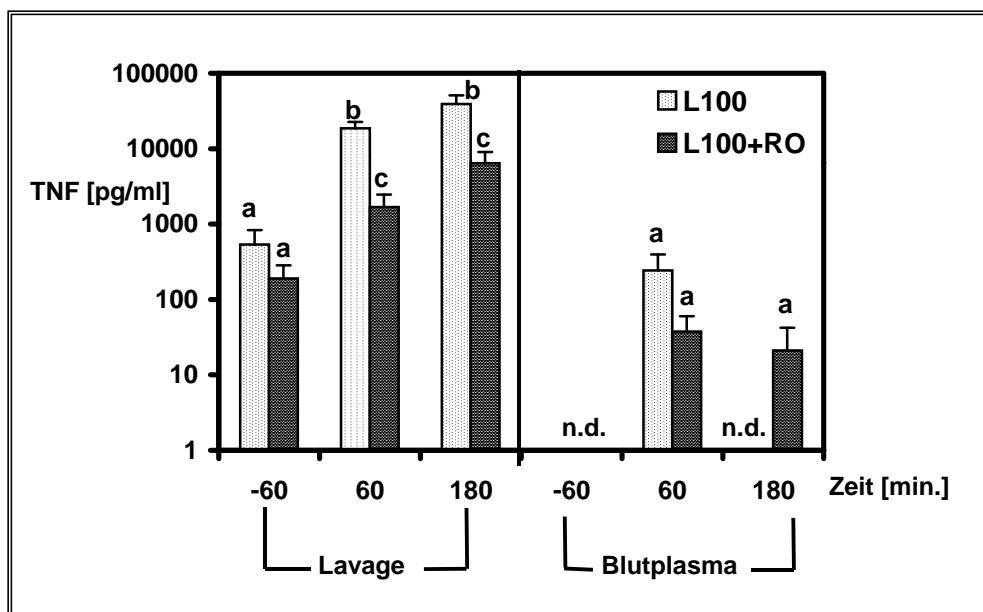


Abbildung 23: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma aus der L100- und der L100+RO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Die im Blut von Meerschweinchen immer nachweisbaren Konzentrationen von biologisch aktivem IL6 (basale Blutplasmaspiegel eine Stunde vor LPS-Gabe) stiegen nach der LPS-Gabe an.

Im Blutplasma beider Gruppen waren die IL6-Konzentrationen drei Stunden nach der LPS-Injektion um bis zu zwanzigmal höher als der entsprechende Basalwert (t=-60 min.).

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	700 ±400	13700 ±2600	80500 ±30420	50 ±30	620 ±280	920 ±240
<b>L100+RO</b>	3800 ±2400	3810 ±800	38810 ±14780	110 ±80	620 ±240	2400 ±570

Tabelle 10: mittlere IL6-Konzentrationen der L100- und der L100+RO-Gruppe in der Lavage und im Blutplasma [IU/ml]

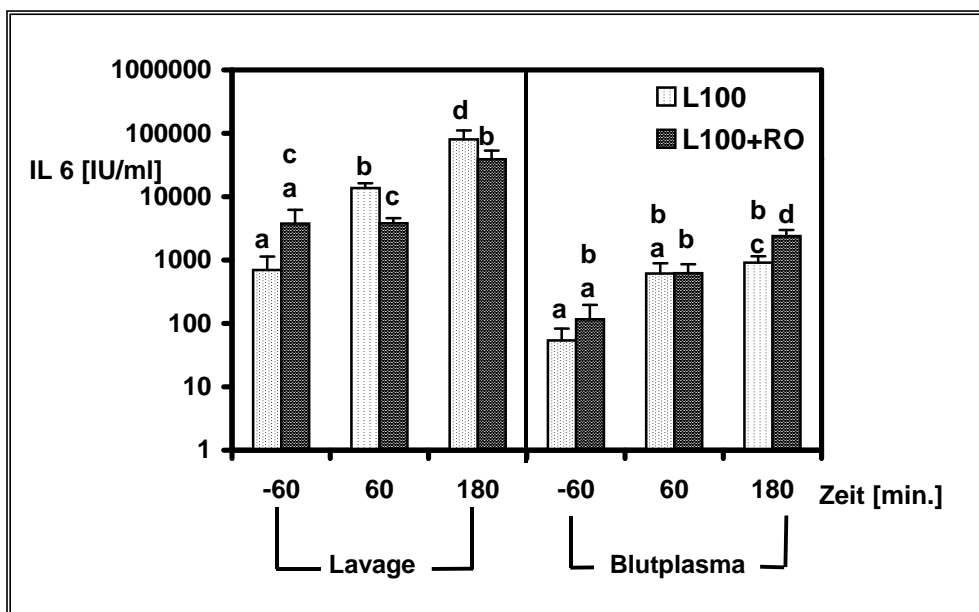


Abbildung 24: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma aus der L100- und der L100+RO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Die Konzentrationen beider Zytokine im Blutplasma lagen größenordnungsmäßig im Bereich von 0,5 bis 4 % der Konzentrationen, die in der Lavage aus der subkutanen Kammer gemessen wurden. Durch die Vorbehandlung mit dem Lokalanästhetikum Ropivacain wurde der LPS-induzierte Anstieg von TNF (60 und 180 min. nach LPS-Gabe) und IL6 (60 min. nach LPS-Gabe) in der Lavageflüssigkeit abgeschwächt. Auf die im Kreislauf zirkulierenden, geringen Konzentrationen der analysierten Zytokine wirkte sich die Behandlung mit Ropivacain dagegen nicht im Sinne einer Reduktion der Blutplasmaspiegel aus.

Die Behandlung mit der hohen LPS-Dosis führte neben der lokalen Zytokininduktion im Bereich der subkutanen Kammer zu einer ausgeprägten Fieberreaktion (Abbildung 25). Die Fieberreaktion wurde weder in der erreichten Höhe des Fiebers noch in ihrem zeitlichen Verlauf durch die Vorbehandlung mit dem Lokalanästhetikum modifiziert. Die L100-Gruppe hatte einen mittleren F.I. von  $5,46 \pm 0,35$  [° Gh] und bei der L100+RO-Gruppe lag der mittlere F.I. bei  $5,81 \pm 0,57$  [° Gh] (Abbildung 36).

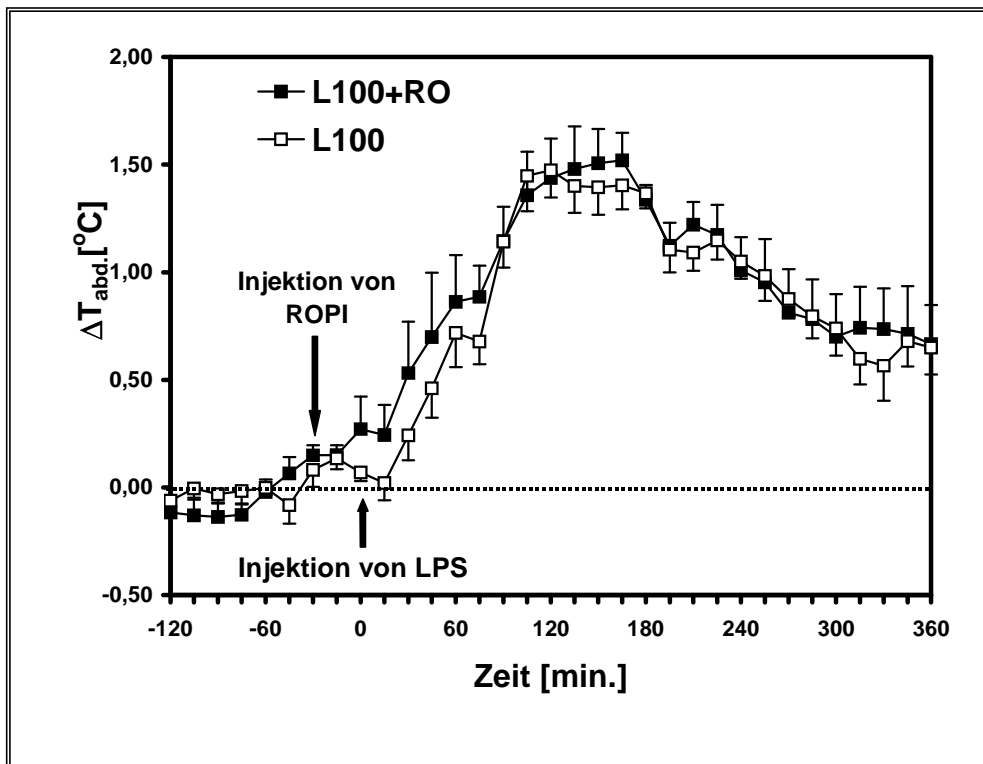


Abbildung 25: Temperaturverlauf von zwei Gruppen von Meerschweinchen nach der Injektion von LPS 100 und LPS 100 in Kombination mit Ropivacain in die subkutane Kammer

In beiden Gruppen konnte drei Stunden nach LPS-Gabe ein Anstieg der Cortisolkonzentrationen um das drei- bis vierfache des Basalwertes beobachtet werden (Tabelle 11, Abbildung 26). Auf die zirkulierenden Cortisolkonzentrationen hatte die Behandlung mit dem Lokalanästhetikum keinen Einfluss.

Versuchsgruppe	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
L100	530±110	1100±150	2270±230
L100+RO	400±190	1390±1080	1440±430

Tabelle 11: mittlere Cortisolwerte im Blutplasma der L100- und der L100+RO-Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten [nmol/l]



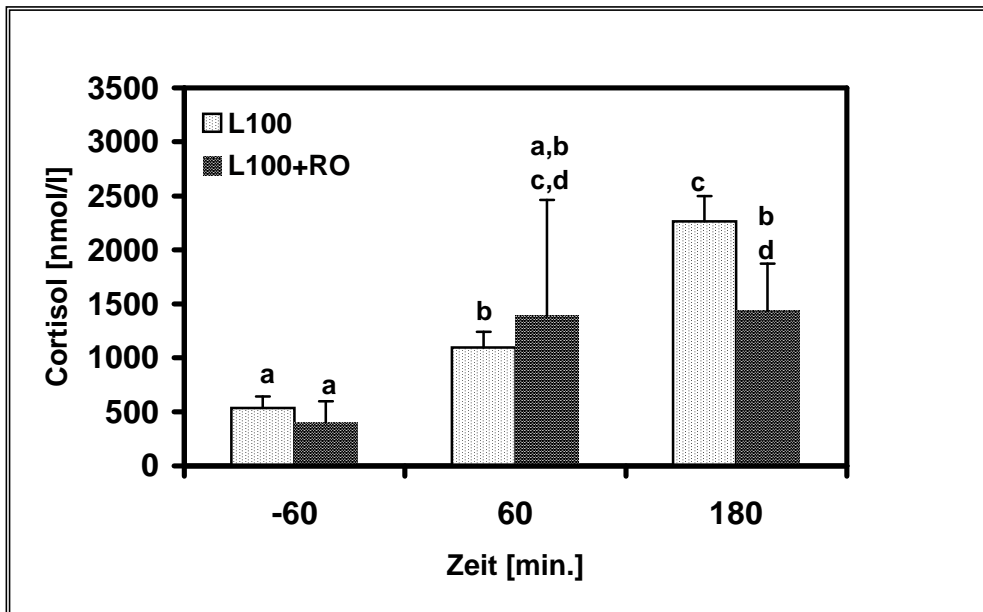


Abbildung 26: mittlere Cortisol-Konzentrationen im Blutplasma der L100- und der L100+RO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Plasma-Messungen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

### 3.1.3 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 und der Injektion von LPS 10 in Kombination mit Ropivacain

Auch die Injektion von 10  $\mu\text{g/kg}$  KG LPS in die subkutane Kammer resultierte in einem Anstieg der Konzentrationen von TNF (Tabelle 12, Abbildung 27) und IL6 (Tabelle 13, Abbildung 28) in der Lavage, die nach der LPS-Gabe aus der Kammer gewonnen wurde. Die LPS-induzierte subkutane Zytokinbildung war jedoch im Vergleich zur Behandlung mit der hohen LPS-Dosis deutlich schwächer ausgeprägt. Nach Injektion der niedrigen LPS-Dosis in die subkutane Kammer war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte innerhalb des Versuchsverlaufs biologisch aktiver TNF im Blutplasma nachweisbar. Dagegen war als Reaktion auf die LPS-Gabe wiederum ein moderater Anstieg der zirkulierenden IL6-Konzentrationen zu verzeichnen, der schwächer ausgeprägt war als nach Injektion der hohen LPS-Dosis. Innerhalb der ersten drei Stunden nach der LPS-Injektion war ein bis zu zwanzigfacher Anstieg der IL6-Konzentrationen im Blutplasma gegenüber den Basalwerten zu beobachten.

Die Vorbehandlung mit Ropivacain resultierte 60 min. nach der LPS-Gabe wiederum in einer Abschwächung der TNF-Induktion, jedoch nicht der IL6-Induktion, im Bereich der subkutanen Kammer. Auf die zirkulierenden IL6-Spiegel wirkte sich die Vorbehandlung mit Ropivacain nicht aus. Biologisch aktiver TNF war, wie bereits erwähnt, nach Injektion der niedrigen LPS-Dosis in die subkutane Kammer bei keinem Versuchstier im Blutplasma nachweisbar, unabhängig davon, ob eine Vorbehandlung mit Ropivacain erfolgte.

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
L10	270±100	13900 ±4880	14420 ±2780	n.d.	n.d.	n.d.
L10+RO	70±20	2560 ±2370	5530 ±4420	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 12: mittlere TNF-Aktivitäten der L10-Gruppe und der L10+RO-Gruppe in der Lavage und im Blutplasma [pg/ml]

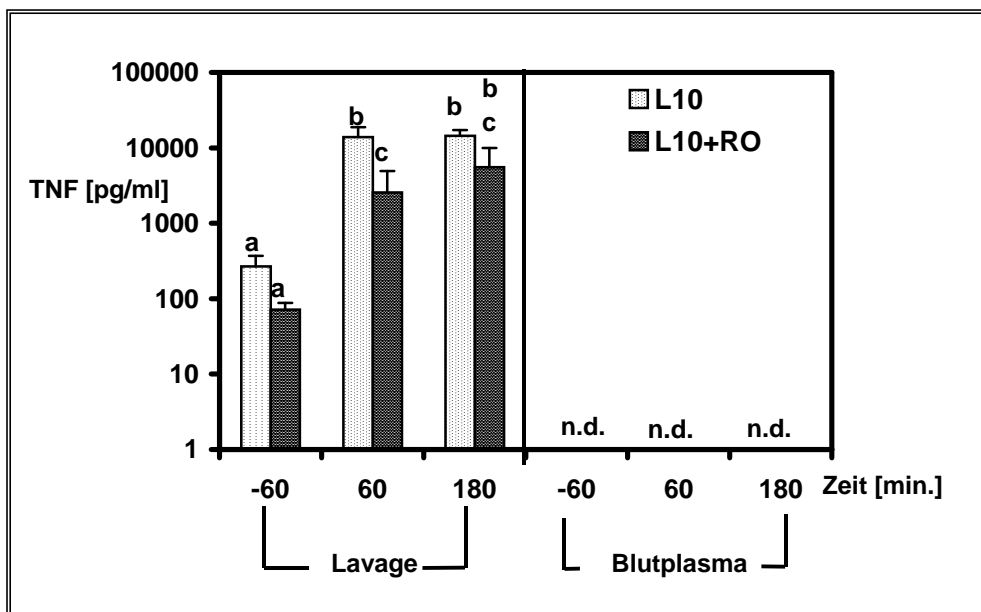


Abbildung 27: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+RO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Versuchs- gruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt – 60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L10</b>	290±160	7400 ±3120	26460 ±6910	20±10	270±130	540±140
<b>L10+RO</b>	2200 ±300	1210 ±370	13400 ±3320	50±20	210±100	490±120

Tabelle 13: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma der L10-Gruppe und der L10+RO-Gruppe [IU/ml]

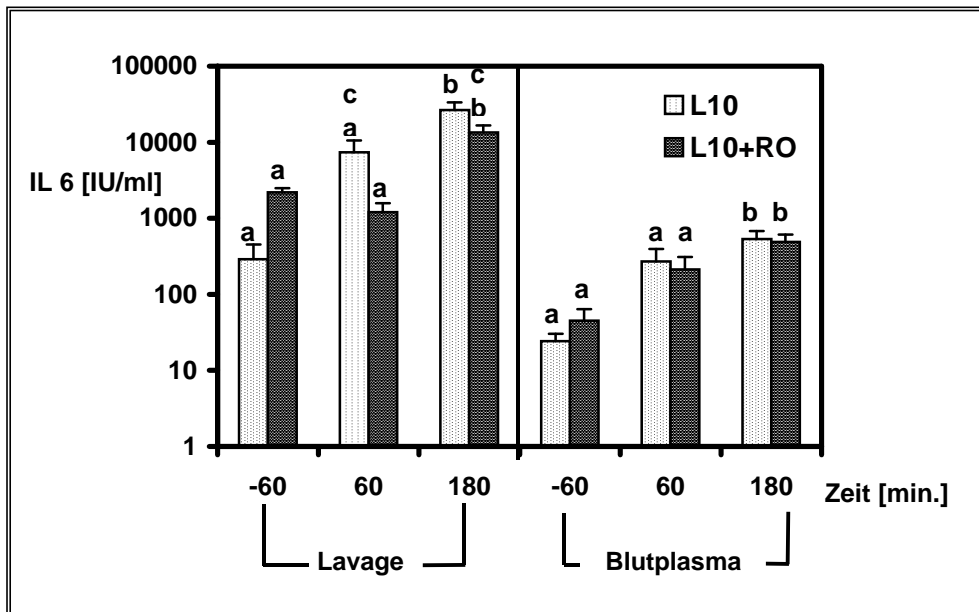


Abbildung 28: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+RO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Die Injektion der niedrigen LPS-Dosis (10 µg/kg KG) in die subkutane Kammer führte zu einer Fieberreaktion, die moderater ausfiel als nach Gabe von LPS in der hohen Dosis (100 µg/kg KG). Interessanterweise konnte das durch die niedrige LPS-Dosis induzierte Fieber im Zeitraum von 60 bis 240 min. nach LPS-Gabe durch die Vorbehandlung mit Ropivacain abgeschwächt werden (Abbildung 29). Der mittlere F.I. der L10+RO-Gruppe ( $2,46 \pm 0,57$  [° Ch]) betrug ca. nur 50 % des F.I. der L10-Gruppe ( $4,06 \pm 0,34$  [° Ch]).

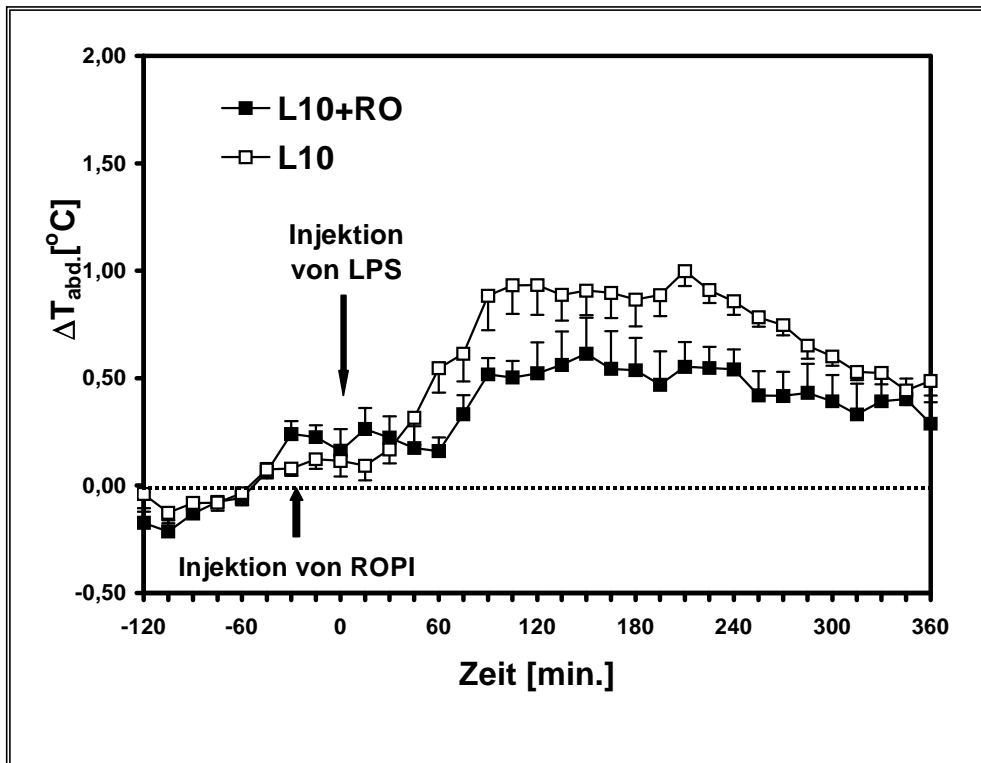


Abbildung 29: Verlauf der Abdominaltemperatur der L10- und der L10+RO-Gruppe. Im Zeitraum von 60 bis 240 min. nach LPS-Injektion wurde die Fieberantwort durch Vorbehandlung mit Ropivacain signifikant abgeschwächt ( $p < 0,05$ ; zweifaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Im Gegensatz zur Fieberreaktion wurde der zirkulierende Cortisol-Spiegel durch die Vorbehandlung mit Ropivacain nicht modifiziert (Tabelle 14, Abbildung 30).

Versuchsgruppe	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
L10	50±3	770±290	710±130
L10+RO	340±70	790±190	1020±320

Tabelle 14: mittlere Cortisolwerte im Blutplasma der L10- und der L10+RO-Gruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten [nmol/l]

Für den signifikant niedrigeren Cortisol-Ausgangswert der nicht mit Ropivacain vorbehandelten Tiere, der 60 min. vor der LPS-Gabe gemessen wurde, liegt keine plausible Erklärungsmöglichkeit vor.

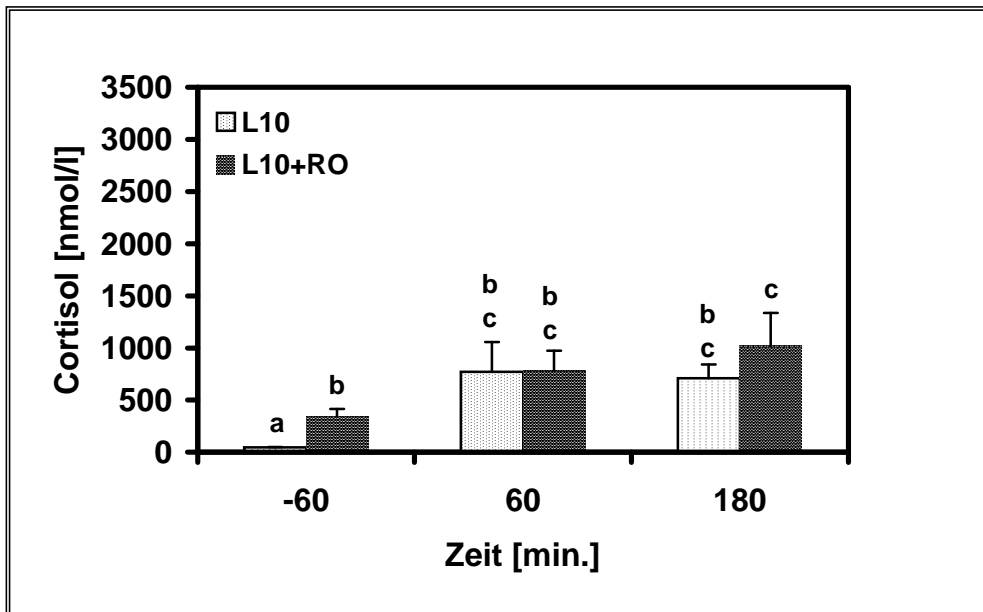


Abbildung 30: mittlere Cortisol-Konzentrationen im Blutplasma der L10- und der L10+RO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Plasma-Messungen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

### 3.1.4 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 in die subkutane Kammer und der Injektion von LPS 10 in Kombination mit der subkutanen Injektion von Ropivacain auf der contralateralen Seite im Bereich des Oberschenkels (*Regio femoralis*)

Um auszuschließen, dass die im vorangehenden Abschnitt geschilderte Fieberreduktion unter Ropivacaineinfluss auf einen systemischen Effekt des Lokalanästhetikums beruhte, wurde der Versuch nochmals wiederholt. Jedoch wurde nun das Lokalanästhetikum nicht in die subkutane Kammer, sondern in das subkutane Areal auf der zur Kammerposition contralateral gelegenen Seite in die *Regio femoralis* injiziert. Auf die LPS-induzierte Induktion der Zytokine TNF (Tabelle 15, Abbildung 31) und IL6 (Tabelle 16, Abbildung 32) hatte die contralaterale Applikation des Lokalanästhetikums im Vergleich zur L10-Gruppe keinen Einfluss.

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt – 60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt –60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L10</b>	270±100	13900 ±4880	14420 ±2780	n.d.	n.d.	n.d.
<b>L10+ROc.I.</b>	120±40	18570 ±3480	17380 ±9750	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 15: mittlere TNF-Aktivitäten der L10-Gruppe und der L10+ROc.I.-Gruppe in der Lavage und im Blutplasma [pg/ml]

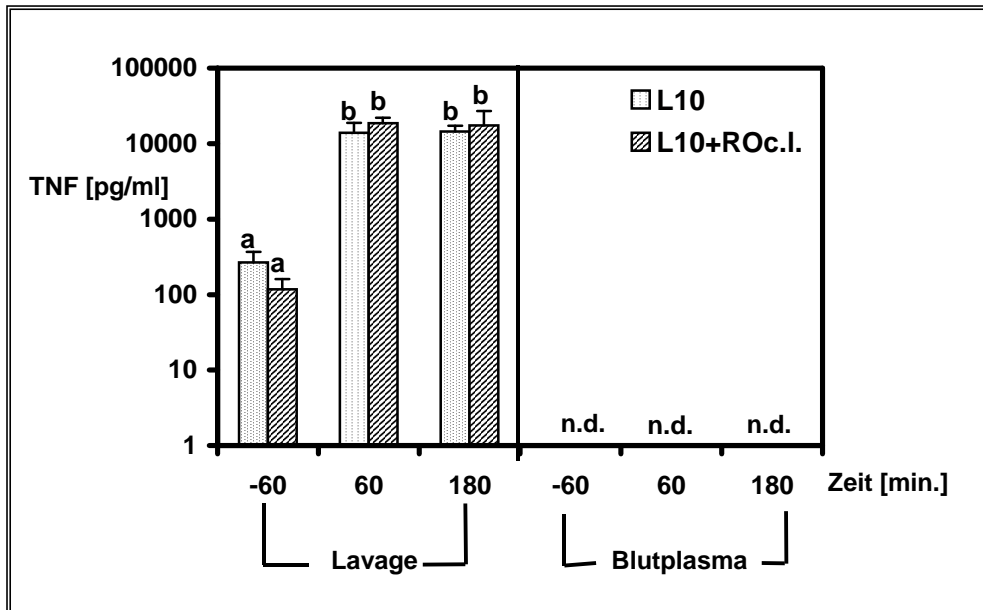


Abbildung 31: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+ROc.I.-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt – 60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt –60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L10</b>	290±160	7400 ±3120	26460 ±6920	20±10	270±130	540±140
<b>L10+ROc.I.</b>	1250 ±660	4570 ±1280	35370 ±11230	110±90	240±100	840±220

Tabelle 16: mittlere IL6-Konzentrationen der L10-Gruppe und der L10+ROc.I.-Gruppe in der Lavage und im Blutplasma [IU/ml]

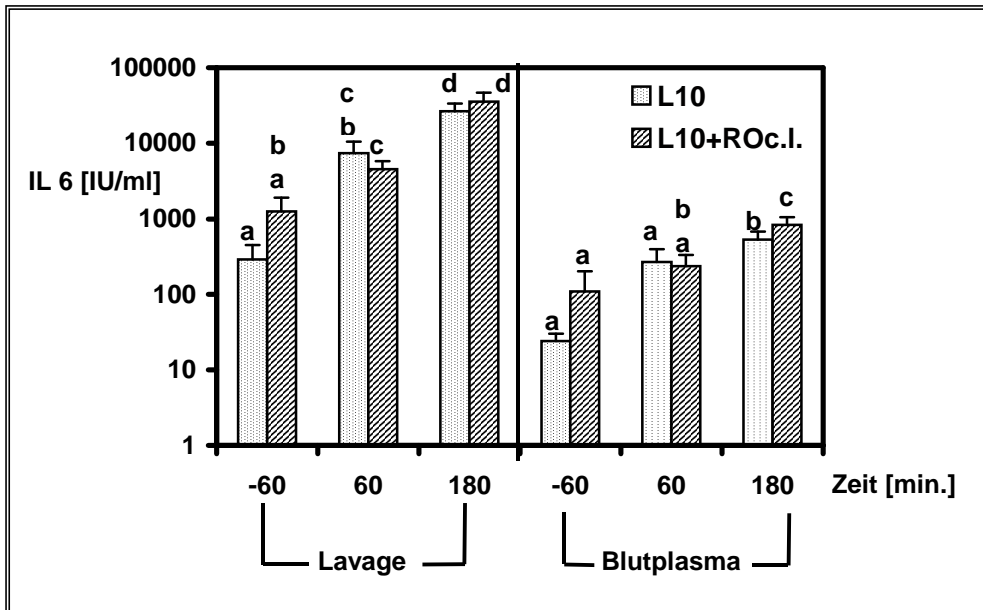


Abbildung 32: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+ROc.I.-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Auch die durch Injektion von 10  $\mu\text{g/kg}$  LPS in die subkutane Kammer induzierte Fieberreaktion wurde durch die Applikation von Ropivacain in das contralateral zur Kammer lokalisierte Hautareal nicht modifiziert (Abbildung 33).

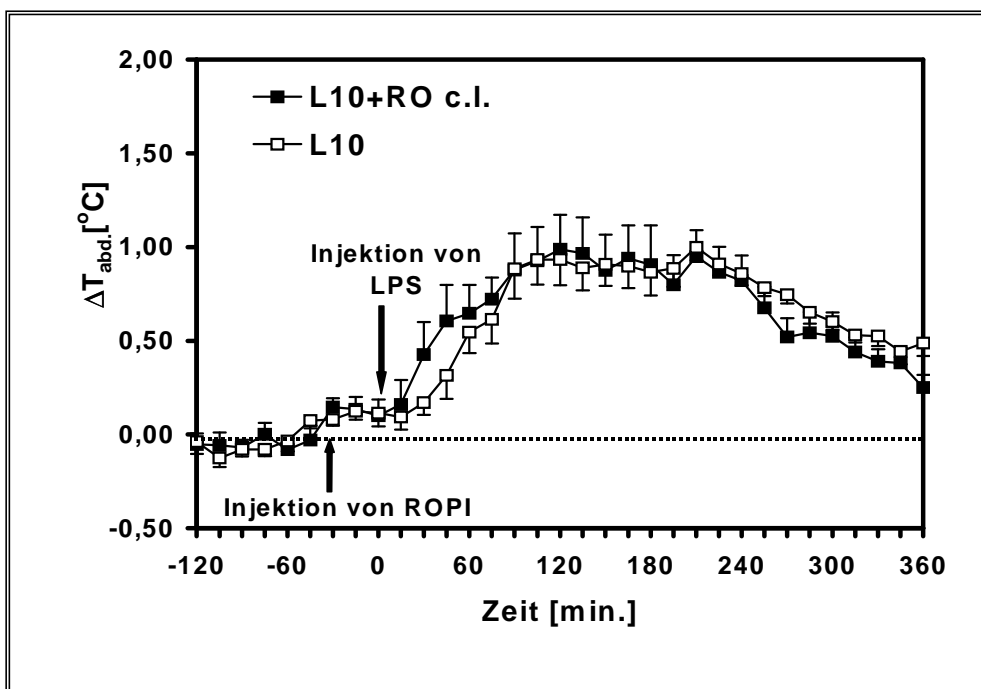


Abbildung 33: Temperaturverlauf der L10- und der L10+ROc.I.-Gruppe

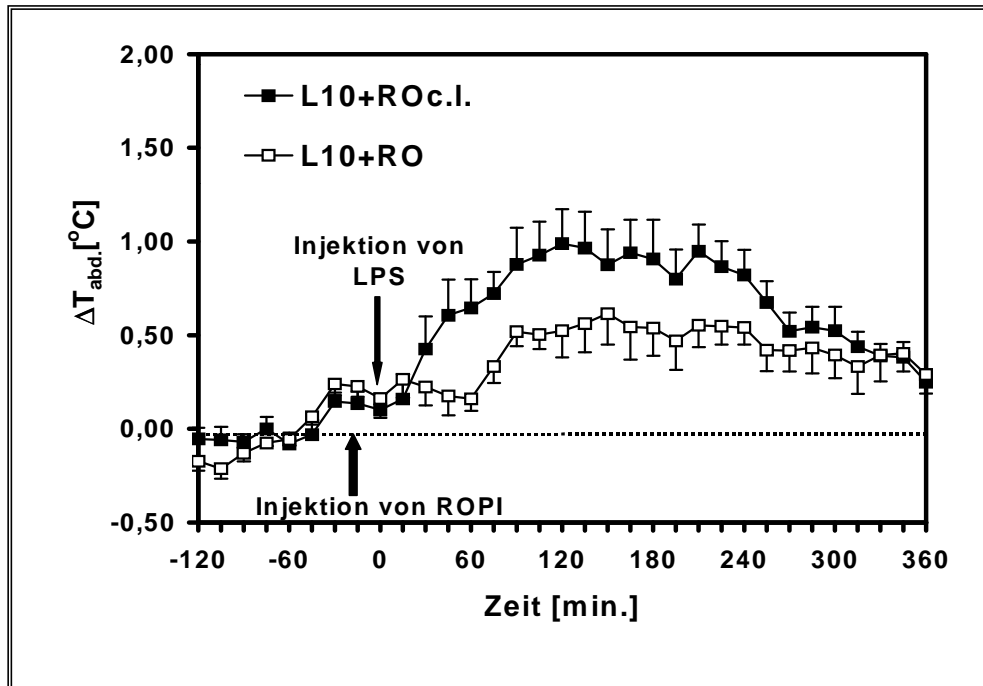


Abbildung 34: Temperaturverlauf der L10+RO- und der L10+ROc.I.-Gruppe. Im Zeitraum von 40 bis 240 min. nach LPS-Injektion war die Fieberantwort in der L10+RO-Gruppe signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ; zweifaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Die Fieberantwort war bei beiden Gruppen qualitativ und quantitativ identisch (L10-Gruppe: F.I.  $4,06 \pm 0,34$  [° Ch], L10+ROc.I.-Gruppe: F.I.  $4,02 \pm 0,53$  [° Ch]). In Abbildung 34 wird nochmals hervorgehoben, dass Ropivacain die Fieberreaktion nur dann abschwächte, wenn es am gleichen Ort (subkutane Kammer) wie der inflammatorische Stimulus ( $10 \mu\text{g/kg}$  LPS) injiziert wurde.

Ein klarer Effekt auf die zirkulierenden Cortisol-Spiegel manifestierte sich unter dem Einfluss der contralateral zur Kammer durchgeführten Injektion des Lokalanästhetikums nicht (Tabelle 17, Abbildung 35). Die LPS-induzierten Anstiege der zirkulierenden Cortisol-Spiegel sind wegen des niedrigen Ausgangswertes, der mit  $10 \mu\text{g/kg}$  KG behandelten Tiere, schwer interpretierbar.



Versuchsgruppe	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
L10	50±3	770±290	710±130
L10+ROc.I.	630±120	480±180	1300±200

Tabelle 17: mittlere Cortisolwerte im Blutplasma der L10-Gruppe und der L10+ROc.I.-Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten [nmol/l]

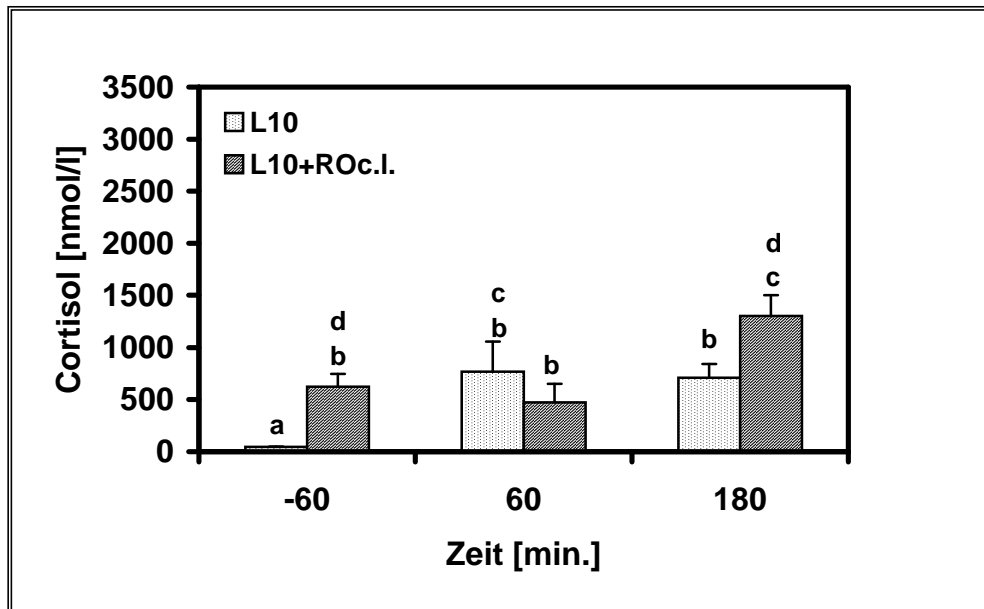


Abbildung 35: mittlere Cortisol-Konzentrationen im Blutplasma der L10- und der L10+ROc.I.-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Plasma-Messungen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Die beiden untersuchten physiologischen Endpunktparameter, die integrierte Fieberantwort (Fieberindex) und der 180 min. nach LPS-Gabe gemessene Cortisol-Spiegel (Cortisolpeak) sind für die gesamte Ropivacain-Versuchsreihe zusammenfassend nochmals in Abbildung 36 und Abbildung 37 dargestellt.

Es bleibt festzuhalten, dass erstens die Fieberreaktion nach Injektion der niedrigen LPS-Dosis (10 µg/kg KG) in die subkutane Kammer durch eine Vorbehandlung mit dem Lokalanästhetikum abgeschwächt wurde, dass sich zweitens dieser Effekt nur dann manifestierte, wenn das Lokalanästhetikum an den Ort der inflammatorischen Stimulierung (subkutane Kammer) injiziert wurde, und dass drittens (im Gegensatz zum Fieber) kein Einfluss des Lokalanästhetikums auf die LPS-induzierten Cortisol-Spiegel im Plasma zu dokumentieren war.

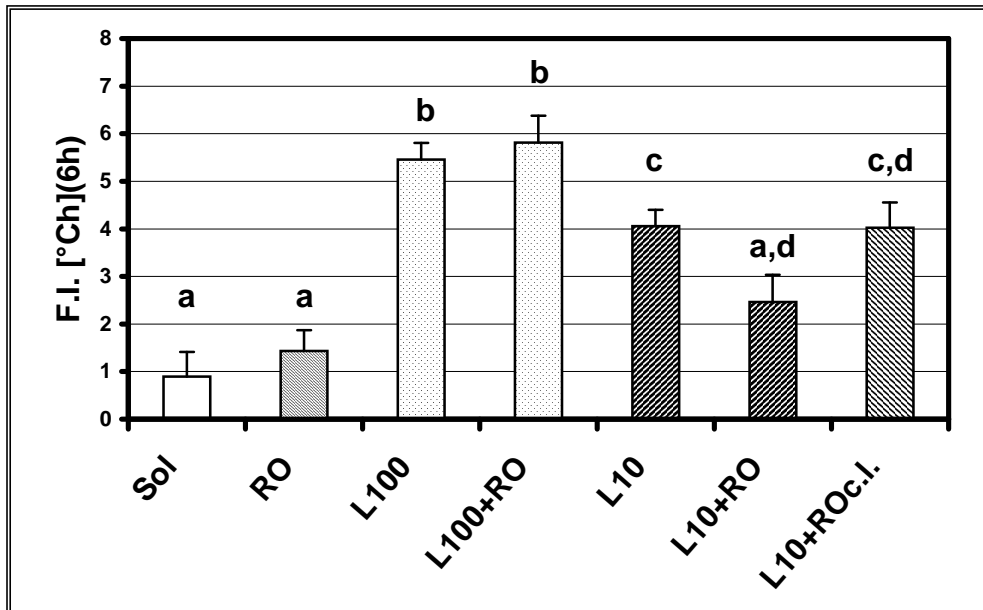


Abbildung 36: mittlere F.I. der Ropivacain-Versuchsreihe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den individuellen Gruppen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

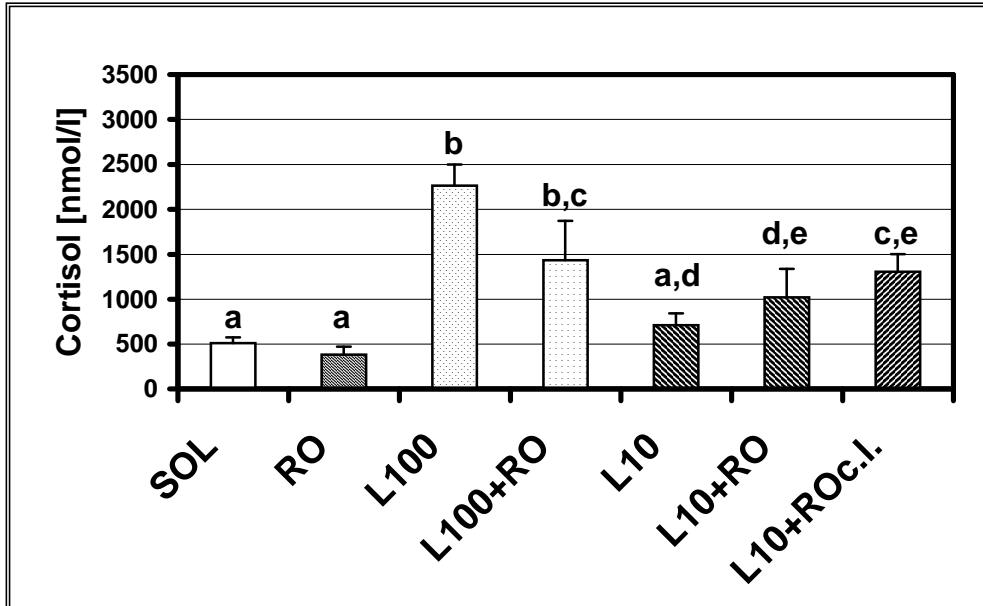


Abbildung 37: Cortisolpeak der Ropivacain-Versuchsreihe (gemessen 180 min. nach der LPS-Injektion; [nmol/l]). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den individuellen Gruppen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

### 3.2 Injektion von TNF-Bindungsprotein in Kombination mit LPS 100 oder mit LPS 10 in die subkutane Kammer

Das TNF-Bindungsprotein wurde nicht pro kg Körpergewicht dosiert, sondern jedem Tier wurde die gleiche Substanzmenge von einem mg in die subkutane Kammer entweder alleine oder in Kombination mit den eingesetzten LPS-Konzentrationen (L10 oder L 100) injiziert.

#### 3.2.1 Injektion von TNF-Bindungsprotein im Vergleich zur Injektion von Solvent in die subkutane Kammer

In diesem Kontrollversuch wurde überprüft, ob die Injektion von TNFbp in die subkutane Kammer einen Eigeneffekt auf die untersuchten Parameter hatte. Basale Konzentrationen von TNF und IL6 waren 60 min. vor Injektion von TNFbp oder steriler Kochsalzlösung (SOL) in der Lavage, die aus der subkutanen Kammer gewonnen wurde, bei allen Tieren nachweisbar. Diese basalen Konzentrationen von biologisch aktivem TNF fielen bei den mit TNFbp behandelten Tieren 60 bzw. 180 min. nach der Injektion bis fast an die Nachweisgrenze ab, was auf der TNF-neutralisierenden Wirkung dieser Substanz beruhte. Auf die basalen Konzentrationen von IL6 in der Lavage hatte die Behandlung mit TNFbp keinen Einfluss.

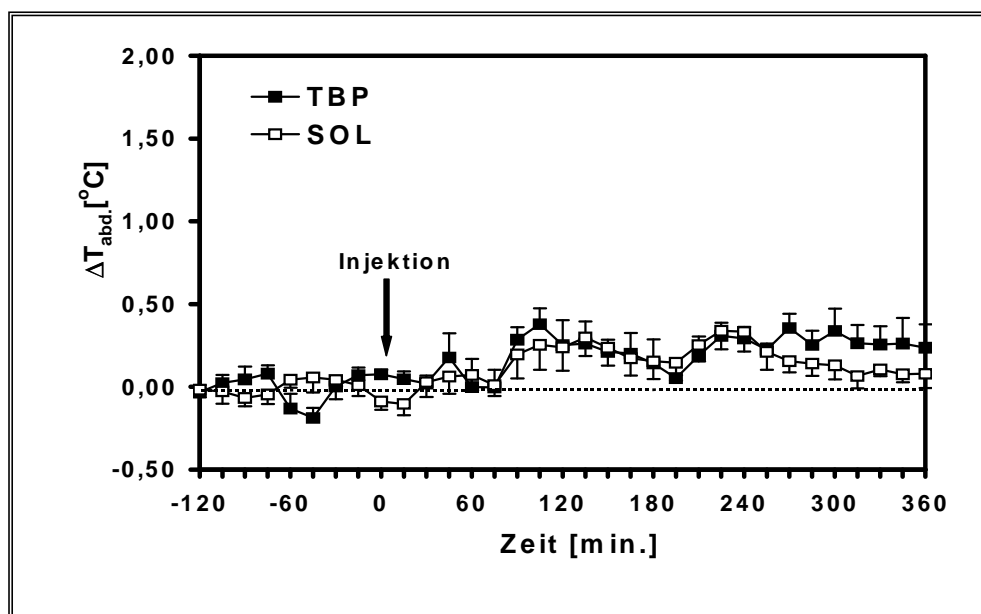


Abbildung 38: Temperaturverlauf in der SOL- und in der TBP-Gruppe nach der Injektion von SOL bzw. TBP in die subkutane Kammer

Der Verlauf der Körperkerntemperatur war nach Injektion von TNFbp oder SOL in die subkutane Kammer nahezu identisch (Abbildung 38). Der F.I. der SOL-Gruppe betrug  $0,89 \pm 0,52$  [°Ch] und der F.I. der TBP-Gruppe  $1,62 \pm 0,56$  [°Ch]. Auch die zirkulierenden Cortisol-Spiegel wurden durch die Injektion von TNFbp in die subkutane Kammer im Vergleich zu SOL nicht beeinflusst.

3.2.2 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 100 und der Injektion von LPS 100 in Kombination mit TNFbp

Auf den durch Injektion der hohen LPS-Dosis (100 µg/kg KG) induzierten Konzentrationsanstieg von biologisch aktivem TNF in der Lavage hatte die Behandlung mit TNFbp (L100+TBP-Gruppe) einen hochsignifikanten Einfluss. Der nach LPS-Gabe in hohen Konzentrationen in der Lavage messbare TNF (L100-Gruppe) wurde durch die Neutralisation mit TNFbp (L100+TBP-Gruppe) auf weniger als 0,05 % reduziert (Tabelle 18, Abbildung 39). Im Plasma waren, wenn überhaupt, nur Spuren an biologisch aktivem TNF nachweisbar.

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt – 60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	540 ±300	18590 ±4120	39300 ±11760	n.d.	240 ±150	n.d.
<b>L100+TBP</b>	280 ±170	10 ±5	20 ±10	n.d.	2 ±2	5 ±5

Tabelle 18: mittlere TNF-Aktivität der L100- und der L100+TBP-Gruppe in der Lavage und im Blutplasma [pg/ml]

Auf den LPS-induzierten Anstieg an IL6 in der Lavage (um bis zum hundertfachen der Basalwerte) und im Plasma (um bis zum fünfzehnfachen der Basalwerte) hatte die Behandlung mit TNFbp keinen Einfluss (Tabelle 19, Abbildung 40).

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt – 60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	700 ±440	13690 ±2600	80490 ±30420	50 ±30	620 ±280	920 ±240
<b>L100+TBP</b>	5210 ±520	27640 ±12960	86510 ±33100	170 ±40	670 ±290	1820 ±880

Tabelle 19: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma der L100-Gruppe und der L100+TBP-Gruppe [IU/ml]

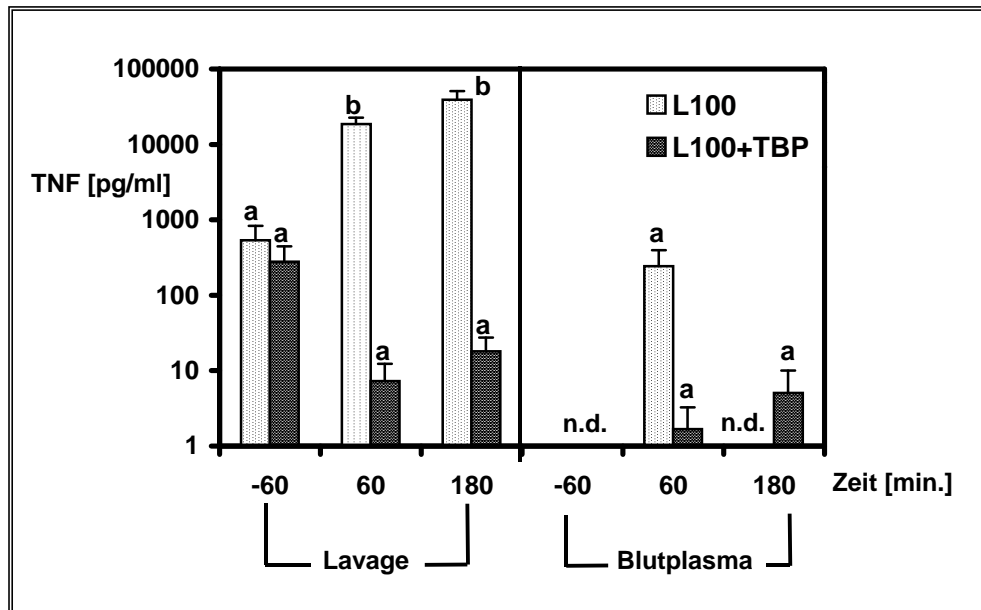


Abbildung 39: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma aus der L100- und der L100+TBP-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

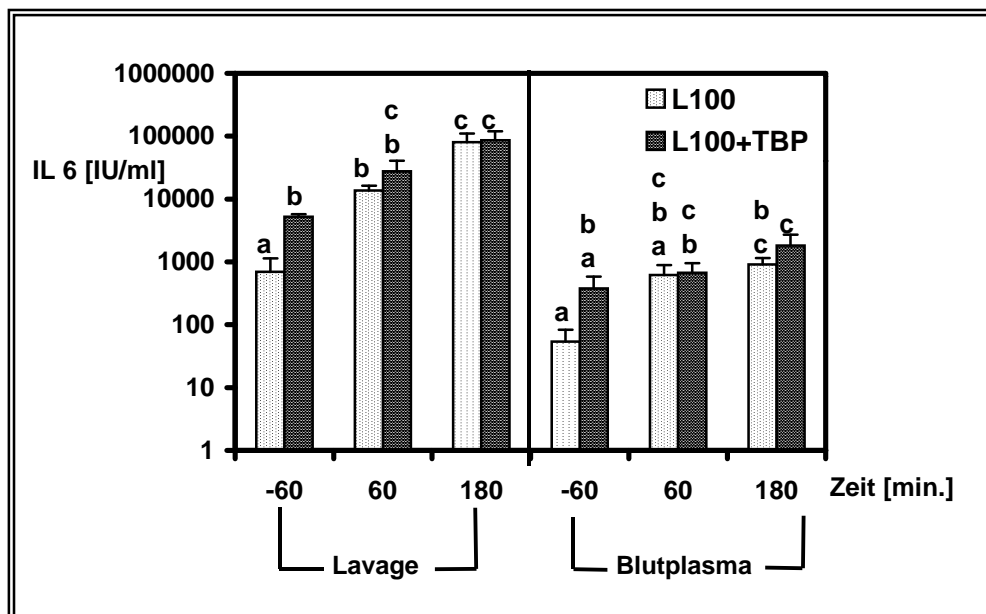


Abbildung 40: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma aus der L100- und der L100+TBP-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Das durch Injektion der hohen LPS-Dosis (100 µg/kg KG) in die subkutane Kammer induzierte Fieber wurde durch die Behandlung mit TNFbp nicht modifiziert. Die Fieberverläufe der L100- sowie der L100+TBP-Gruppe waren qualitativ und quantitativ identisch (Abbildung 41). Der mittlere F.I. der L100-Gruppe betrug  $5,46 \pm 0,35$  [° Ch] und der F.I. der L100+TBP-Gruppe  $5,07 \pm 1,59$  [° Ch] (Abbildung 47).

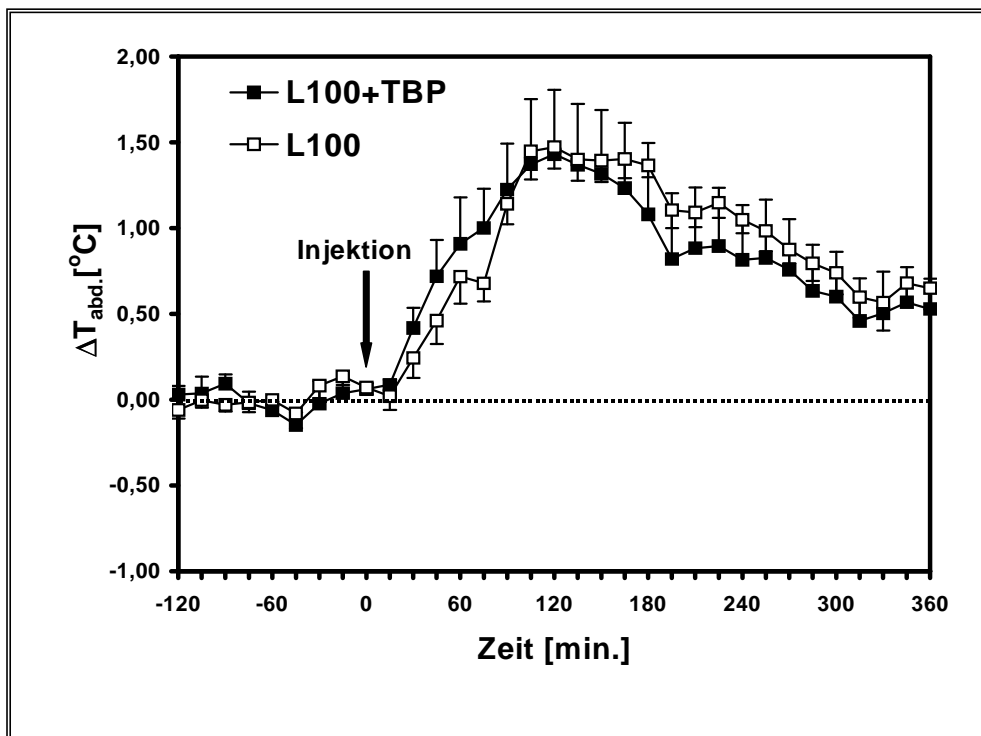


Abbildung 41: Temperaturverlauf der abdominal gemessenen Körpertemperatur der L100- und der L100+TBP-Gruppe.

Auch auf den LPS-induzierten Anstieg des zirkulierenden Cortisol-Spiegel hatte die Injektion von TNFbp keinen Einfluss. Innerhalb beider Gruppen war ein Anstieg der Cortisol-Spiegel (t=180 min.) bis zum vierfachen der Basalwerte (t=-60 min.) zu beobachten (Tabelle 20, Abbildung 42).

Versuchsgruppe	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	530±110	1100±150	2270±230
<b>L100+TBP</b>	630±220	1890±540	2470±590

Tabelle 20: mittlere Cortisolkonzentration im Blutplasma der L100- und der L100+TBP-Gruppe [nmol/l]

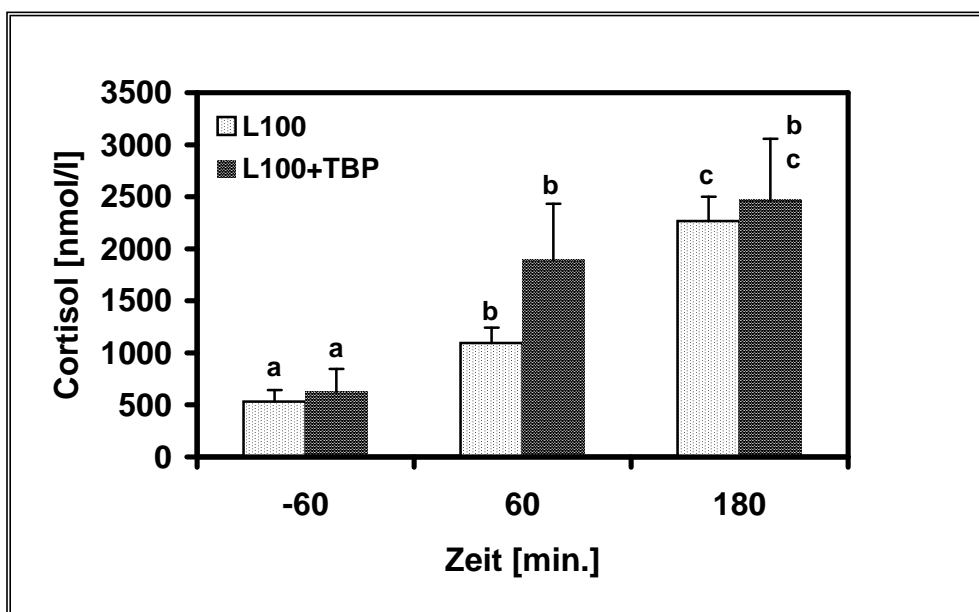


Abbildung 42: mittlere Cortisol-Konzentrationen im Blutplasma der L100- und der L100+TBP-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Plasma-Messungen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

### 3.2.3 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 und der Injektion von LPS 10 in Kombination mit TNFbp

Auch der durch die Injektion der niedrigen LPS-Dosis (10  $\mu\text{g/kg}$  KG, L10-Gruppe) induzierte Anstieg an biologisch aktivem TNF in der Lavage wurde durch die Coinjektion von TNFbp (L10+TBP-Gruppe) durch dessen neutralisierende Wirkung fast vollständig blockiert. Es konnte eine Reduzierung auf bis zu 0,2 % der entsprechenden Vergleichswerte aus der L10-Gruppe beobachtet werden (Tabelle 21, Abbildung 43). Im Blutplasma war TNF weder in der L10- noch in der L10+TBP-Gruppe nachweisbar.

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L10</b>	270 $\pm 100$	13900 $\pm 4880$	14420 $\pm 2780$	n.d.	n.d.	n.d.
<b>L10+TBP</b>	280 $\pm 130$	20 $\pm 10$	20 $\pm 20$	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 21: mittlere TNF-Aktivität in der Lavage und im Blutplasma der L10- und der L10+TBP-Gruppe [pg/ml]

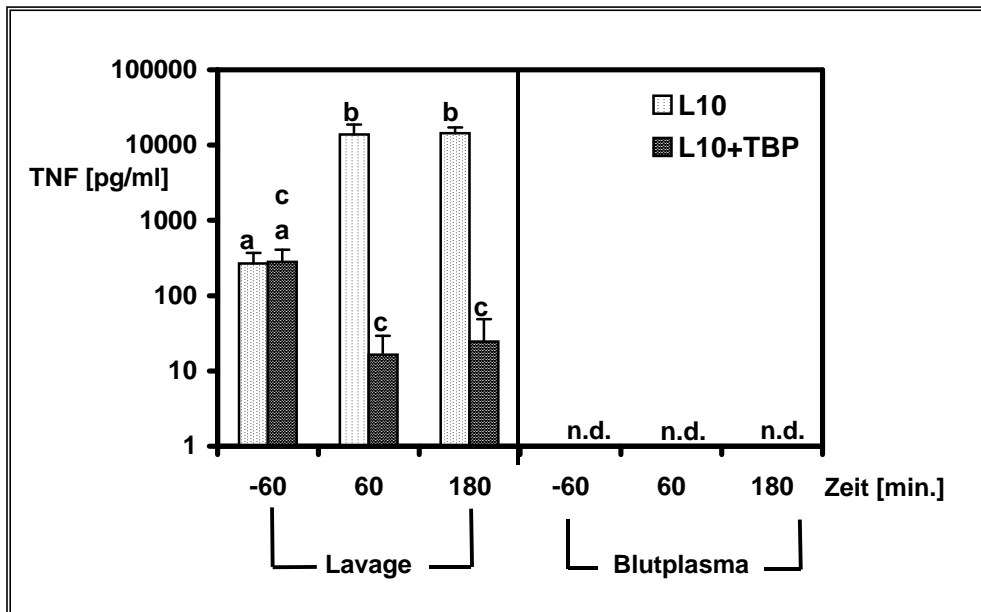


Abbildung 43: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+TBP-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Dagegen hatte die Behandlung mit TNFbp auf den LPS-induzierten Anstieg an IL6 in der Lavage und im Blutplasma wiederum keinen Einfluss (Tabelle 22, Abbildung 44). Der Grund für die im Mittel höheren IL6-Basalwerte ( $t = -60$  min.), sowohl in der Lavage als auch im Blutplasma, der L10+TBP-Gruppe gegenüber der L10-Gruppe bleibt spekulativ.

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
L10	290 ±160	7400 ±3120	26460 ±6920	20 ±10	270 ±130	540 ±140
L10+TBP	8150 ±2350	24470 ±10010	35710 ±9870	340 ±110	950 ±320	2220 ±1640

Tabelle 22: mittlere IL6-Konzentration in der Lavage und im Blutplasma der L10- und der L10+TBP-Gruppe [IU/ml]



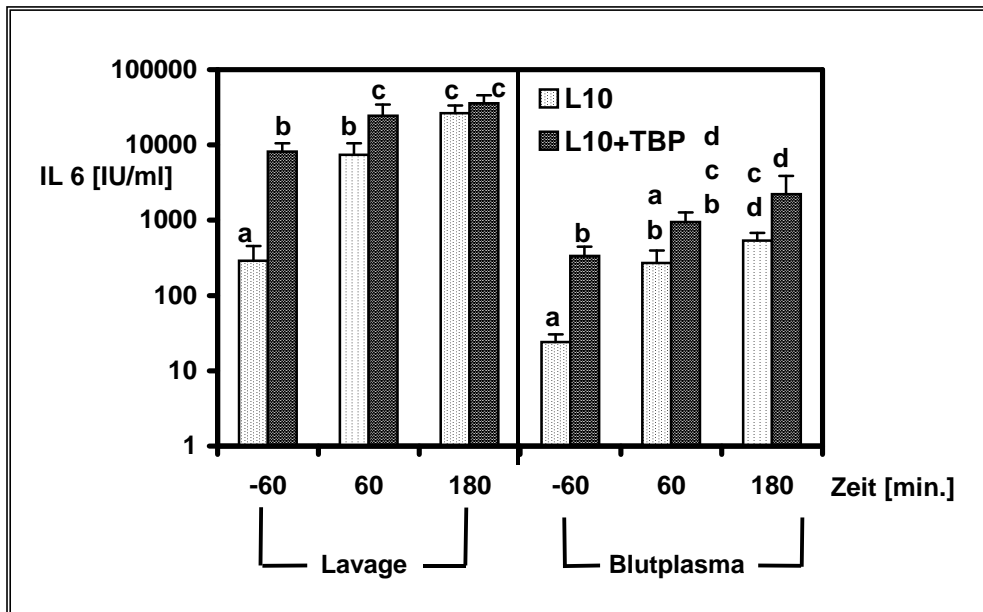


Abbildung 44: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+TBP-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Auf die durch die niedrige LPS-Dosis ( $10 \mu\text{g/kg KG}$ ) in die subkutane Kammer induzierte Fieberreaktion hatte die Behandlung mit TNFbp jedoch einen nachweisbaren Einfluss (Abbildung 45). Die Entfieberung erfolgte unter dem Einfluss der TNF-Neutralisierung wesentlich schneller, so dass die zweite Hälfte der Fieberreaktion der L10+TBP-Gruppe gegenüber der L10-Gruppe signifikant erniedrigt war (analysierter Zeitraum 210 bis 360 min. p.i. von LPS). Der mittlere F.I. der L10-Gruppe betrug  $4,06 \pm 0,34$  [ $^{\circ}\text{Ch}$ ] und der F.I. der L10+TBP-Gruppe  $2,45 \pm 0,95$  [ $^{\circ}\text{Ch}$ ] (Abbildung 47).

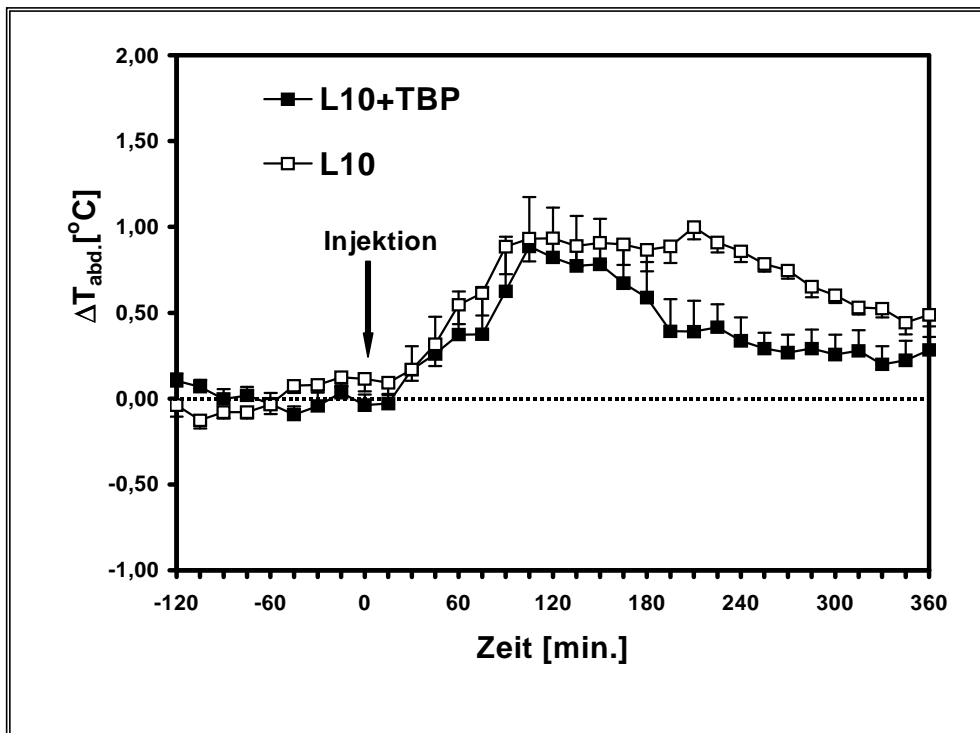


Abbildung 45: Temperaturverlauf der L10- und der L10+TBP-Gruppe. Im Zeitraum von 210 bis 360 min. nach LPS-Injektion war die Fieberantwort in der L10+TBP-Gruppe signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ; zweifaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Auf die zirkulierenden Cortisol-Spiegel hatte die Behandlung mit TNFbp dagegen keinen Einfluss (Tabelle 23, Abbildung 46).

Versuchsgruppe	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
L10	50±3	770±290	710±130
L10+TBP	330±190	340±90	570±50

Tabelle 23: mittlere Cortisolkonzentration im Blutplasma der L10- und der L10+TBP-Gruppe [nmol/l]

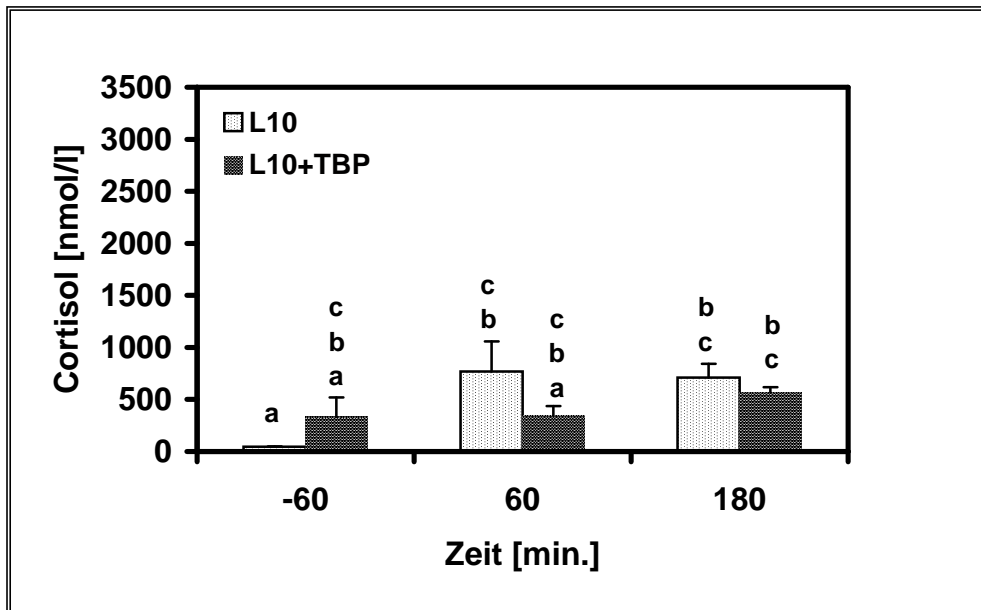


Abbildung 46: mittlere Cortisol-Konzentrationen im Blutplasma der L10- und der L10+TBP-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Plasma-Messungen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Die nachfolgenden Abbildungen stellen die erfassten Endpunktparameter (Fieberindex und Cortisolpeak) dieser Versuchsreihe dar. So konnte weder bei den Fieberindizes (Abbildung 47) noch bei den 180 min. nach LPS-Gabe gemessenen Cortisol-Spiegeln (Cortisolpeaks) ein Einfluss von TNFbp beobachtet werden.

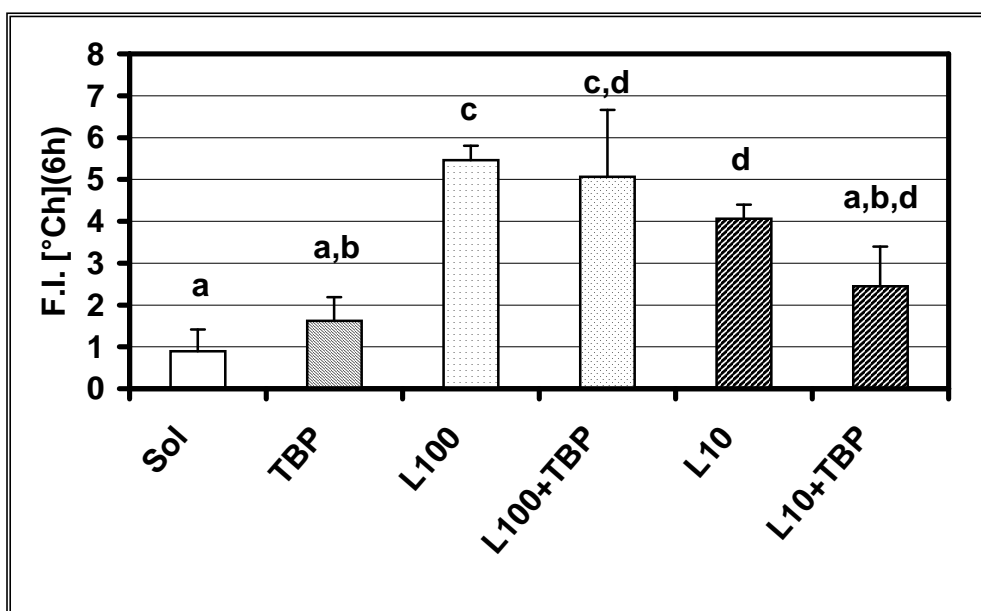


Abbildung 47: mittlere Fieberindizes der TNF-Bindungsprotein-Versuchsreihe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den individuellen Gruppen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

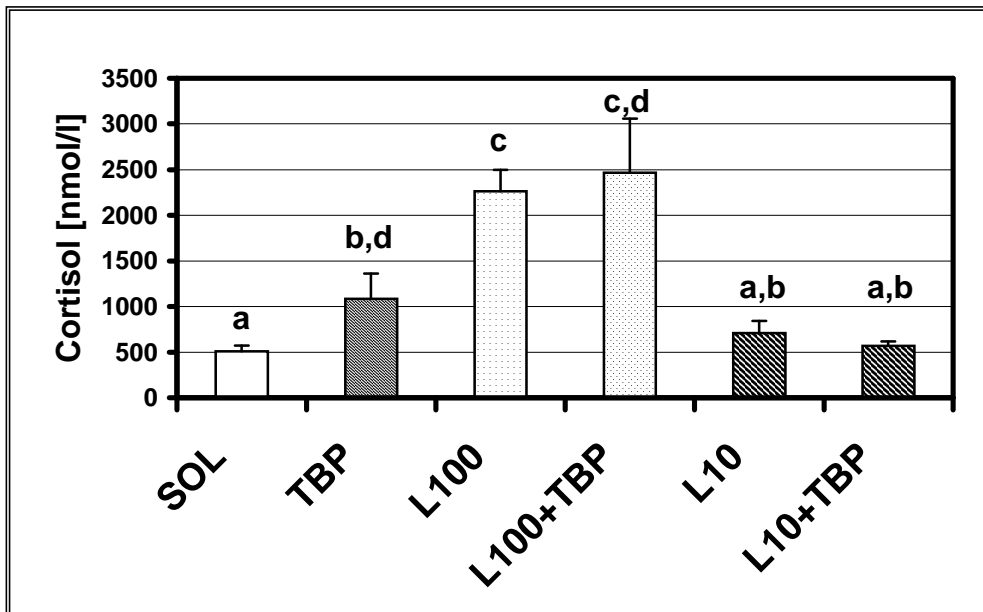


Abbildung 48: Cortisolpeaks in den verschiedenen Versuchstiergruppen drei Stunden nach LPS-Gabe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den individuellen Gruppen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

### 3.3 Injektion von L-NAME in Kombination mit LPS 100 oder LPS 10 in die subkutane Kammer

In einem Vorversuch wurde die optimale Dosierung für L-NAME ermittelt (Abbildung 49). In der eigentlichen L-NAME-Versuchsreihe wurde eine Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht eingesetzt, da diese Dosis keine Auswirkung auf die Körperkerntemperatur der Versuchstiere hatte. Eine höhere Dosis bewirkte dagegen eine Hypothermie. In Abbildung 49 sind die verschiedenen Dosierungen, die getestet wurden, dargestellt. Diese wurden alle bei den gleichen Tieren ( $n=4$ ) in mehrtägigem Abstand getestet. Die Ausbildung der Hypothermie nach der Verabreichung von L-NAME wurde schon in früheren Studien bei Ratten und Meerschweinchen beobachtet (Roth et al. 1998c; Scammell et al. 1996).

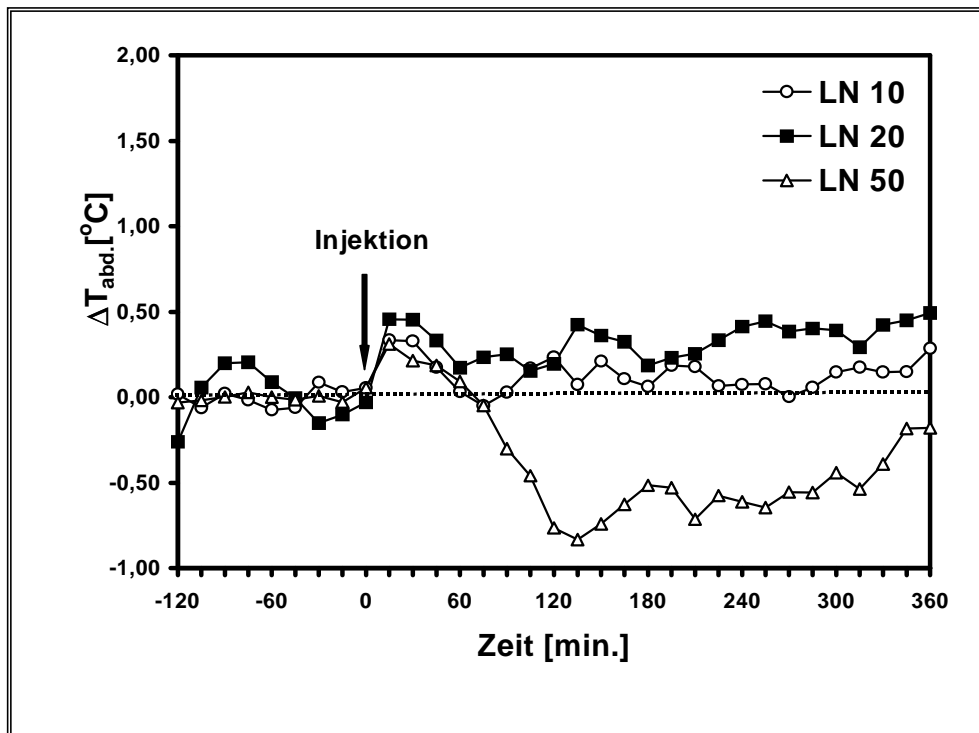


Abbildung 49: Auswirkung von LN in verschiedenen Dosierungen auf die Körpertemperatur

### 3.3.1 Injektion von L-NAME im Vergleich zur Injektion von Solvent in die subkutane Kammer

In diesem Kontrollversuch wurde über den oben beschriebenen Vorversuch hinaus überprüft, welche Eigeneffekte die Injektion von L-NAME in die subkutane Kammer auf die untersuchten Parameter hatte. Sowohl für TNF als auch für IL6 waren 60 min. vor Injektion von L-NAME oder von steriler Kochsalzlösung (SOL) basale Konzentrationen beider Zytokine in der Lavage aus der Kammer bei allen Tieren nachweisbar. In der Lavage der SOL- und der LN-Gruppe wurden eine bzw. drei Stunden nach Injektion der Substanz (SOL oder L-NAME) in die subkutane Kammer im Mittel nur geringe Mengen der beiden Zytokine detektiert (TNF 197 bis 736 pg/ml und IL6 438 bis 8340 IU/ml). Die Zytokinkonzentrationen, die im Blutplasma ermittelt wurden, lagen bei etwa 5 % der jeweiligen Konzentrationen aus der Lavage. Weder auf die TNF- noch auf die IL6-Konzentrationen hatte die Behandlung der Tiere mit L-NAME einen Einfluss. In Abbildung 50 sind die Verläufe der abdominal gemessenen Körpertemperatur der SOL- und der LN-Gruppe dargestellt.

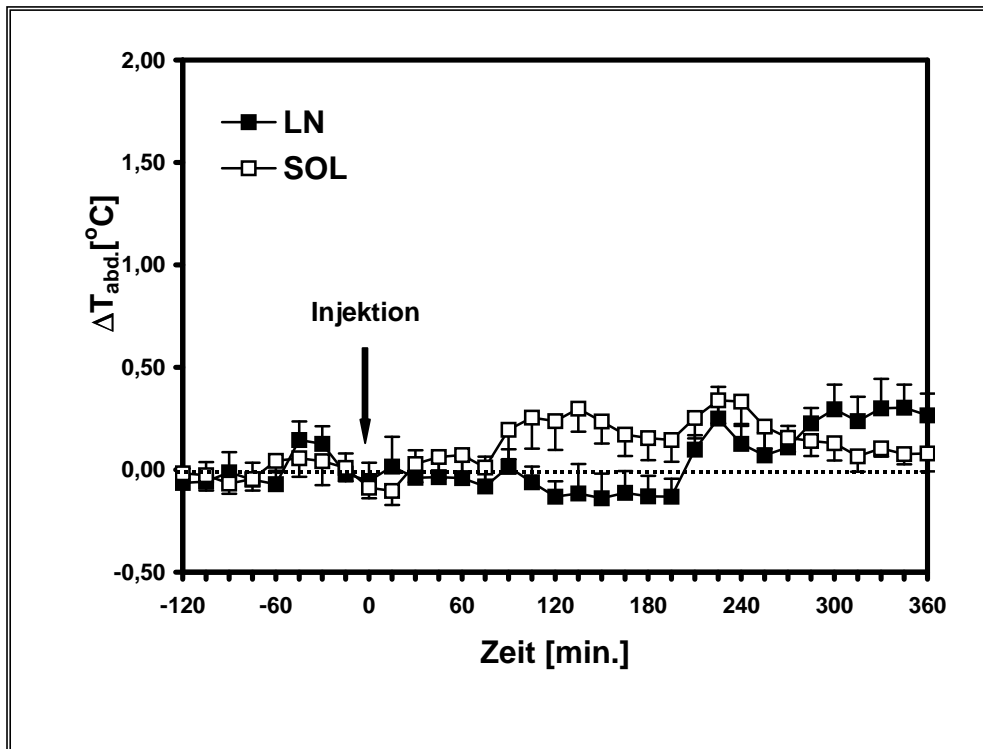


Abbildung 50: Temperaturverlauf der abdominal gemessenen Körpertemperatur der SOL- und der LN-Gruppe

Die Temperaturverläufe beider Gruppen waren nahezu identisch und bewegten sich nahe der Nulllinie ( $0 \pm 0,4$  °C). Für die SOL-Gruppe errechnete sich ein mittlerer F.I. von  $0,89 \pm 0,52$  [° Gh] und für die LN-Gruppe ein F. I. von  $0,25 \pm 0,38$  [° Gh]. Zwar konnte in der LN-Gruppe ein höherer Cortisolpeak gegenüber der SOL-Gruppe beobachtet werden, doch hatte dieser erhöhte Wert keinen Einfluss auf die abdominale Körpertemperatur.

### 3.3.2 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 100 und von LPS 100 in Kombination mit L-NAME in die subkutane Kammer

Auf den durch die hohe LPS-Dosis ( $100 \mu\text{g/kg KG}$ ) induzierten Anstieg der Konzentration von biologisch aktivem TNF (Tabelle 24, Abbildung 51) und von IL6 (Tabelle 25, Abbildung 52) in der Lavage und im Blutplasma hatte die Behandlung der Tiere mit L-NAME (L100+LN-Gruppe) keinen Einfluss.

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt – 60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt –60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	540 ±300	18590 ±4120	39300 ±11760	n.d.	240 ±150	n.d.
<b>L100+LN</b>	80 ±30	15850 ±5120	22350 ±4890	n.d.	200 ±180	10 ±10

Tabelle 24: mittlere TNF-Aktivitäten der L100- und der L100+LN-Gruppe in der Lavage und im Blutplasma [pg/ml]

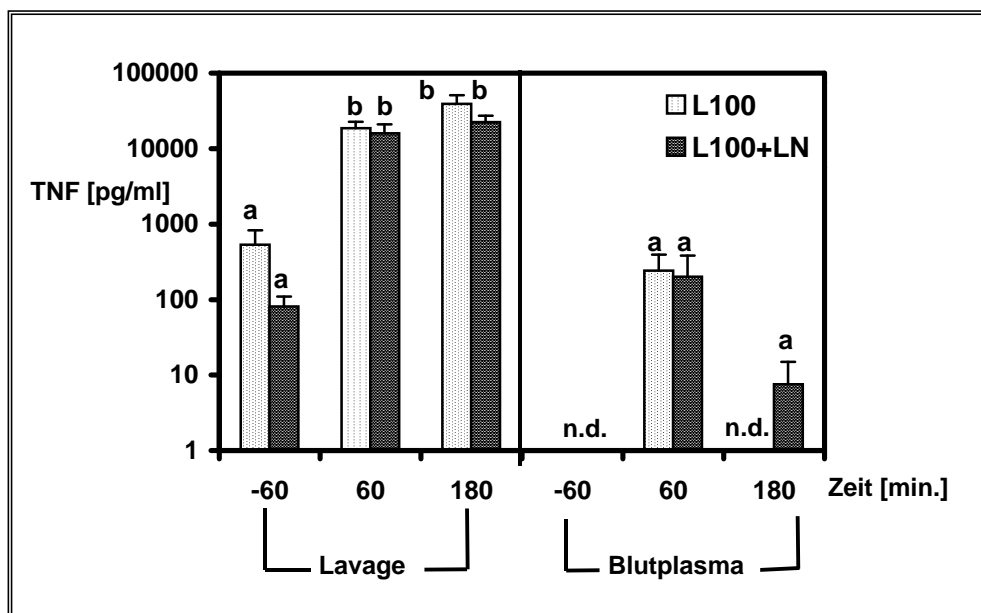


Abbildung 51: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma aus der L100- und der L100+LN-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt – 60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt –60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	700 ±440	13690 ±2600	80490 ±30420	50 ±30	620 ±280	920 ±240
<b>L100+LN</b>	1340 ±390	7460 ±2730	26720 ±9340	20 ±2	970 ±430	700 ±100

Tabelle 25: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma der L100-Gruppe, der L100+LN-Gruppe [IU/ml]

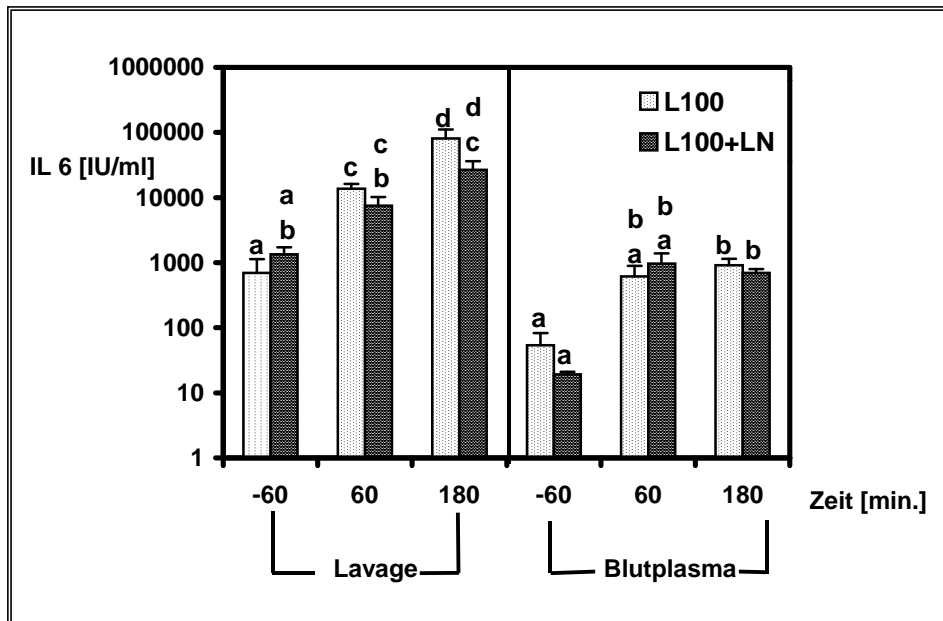


Abbildung 52: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma aus der L100- und der L100+LN-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Die zu beobachtende Fieberreaktion, die der Injektion der hohen LPS-Dosis folgte (Abbildung 53), wurde durch die Behandlung mit L-NAME modifiziert. In beiden Versuchstiergruppen wurde der Fieberpeak zwar zwei Stunden nach der LPS-Injektion in die subkutane Kammer erreicht, aber in der L100+LN-Gruppe war dieser Fieberpeak im Mittel um  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  niedriger als in der L100-Gruppe. Im weiteren Verlauf der Fieberreaktion waren die Temperaturverläufe beider Gruppen zwar nahezu identisch aber um ca.  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  versetzt. Dadurch ergab sich im Zeitraum von 150 bis 330 min. nach der LPS-Injektion in die subkutane Kammer ein niedriger Temperaturverlauf der Versuchstiergruppe, die zusätzlich zu LPS noch mit L-NAME behandelt wurde, gegenüber der Gruppe, die nur LPS injiziert bekam. Der mittlere F.I. der L100-Gruppe betrug  $5,46 \pm 0,35\text{ }[^{\circ}\text{C h}]$  und der F.I. der L100+LN-Gruppe  $3,59 \pm 1,19\text{ }[^{\circ}\text{C h}]$  (Abbildung 59).



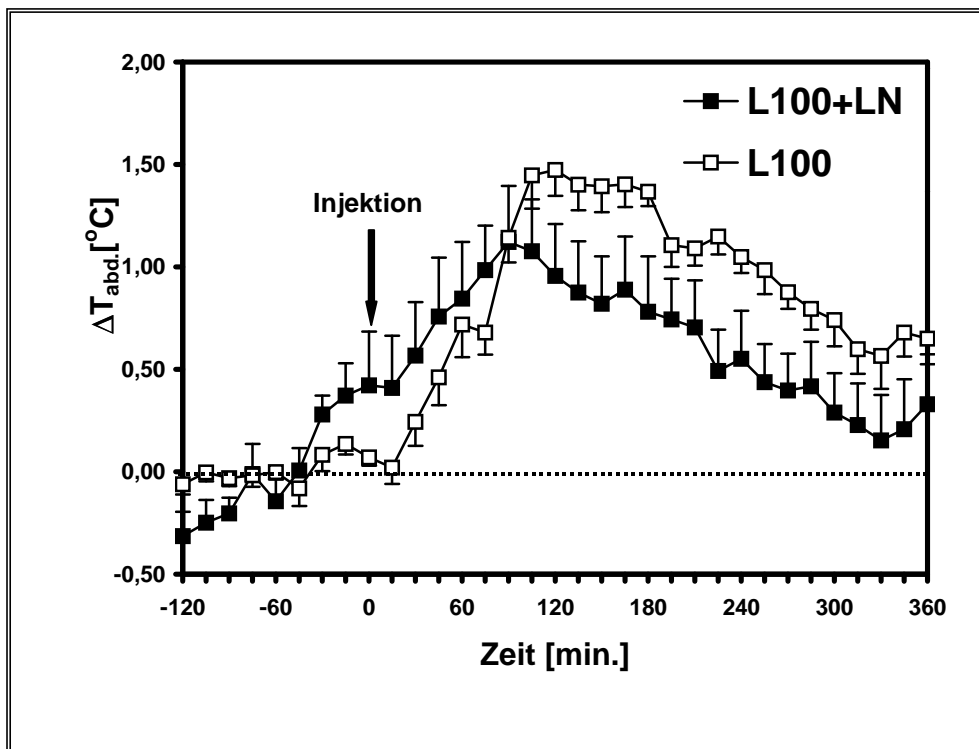


Abbildung 53: Temperaturverlauf der L100- und der L100+LN-Gruppe. Im Zeitraum von 150 bis 330 min. nach LPS-Injektion war die Fieberantwort in der L100+LN-Gruppe signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ; zweifaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Auf die zirkulierenden Cortisol-Spiegel hatte die Behandlung mit L-NAME dagegen keinen Einfluss (Tabelle 26, Abbildung 54). In beiden Gruppen konnte aufgrund der Injektion von der hohen LPS-Dosis ein Anstieg der Cortisolkonzentration beobachtet werden.

Versuchsgruppe	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	530±110	1100±150	2270±230
<b>L100+LN</b>	400 ±110	1620±410	2600±410

Tabelle 26: mittlere Cortisolkonzentrationen im Blutplasma der L100- und der L100+LN-Gruppe [nmol/l]

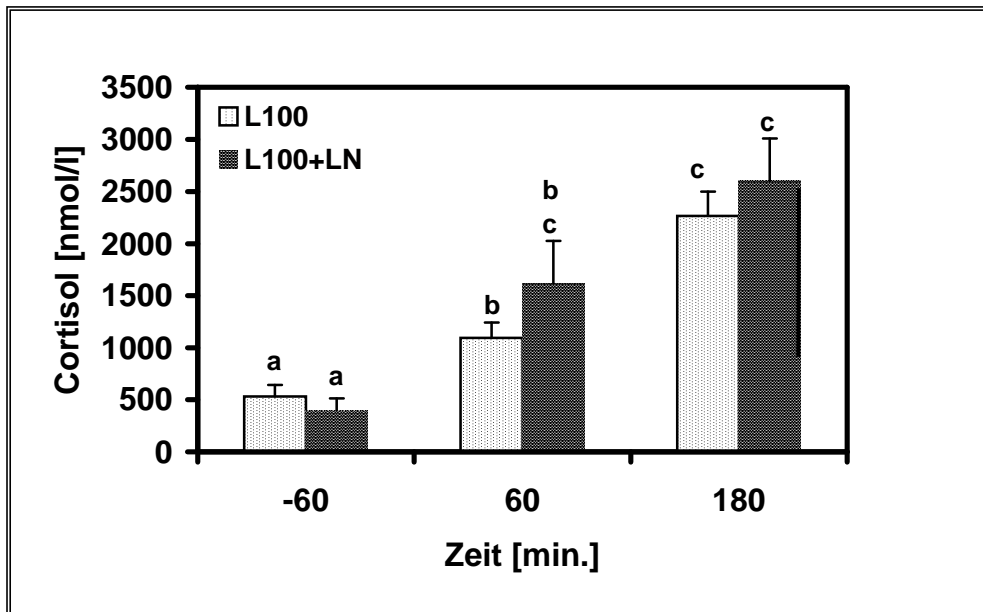


Abbildung 54: mittlere Cortisol-Konzentrationen im Blutplasma der L100- und der L100+LN-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Plasma-Messungen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

### 3.3.3 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 und von LPS 10 in Kombination mit L-NAME

Die Coinjektion von L-NAME in die subkutane Kammer hatte weder auf den LPS-induzierten Konzentrationsanstieg von biologisch aktivem TNF (Tabelle 26, Abbildung 55) noch von IL6 (Tabelle 27, Abbildung 56) einen Einfluss.

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L10</b>	270 ±100	13400 ±4880	14420 ±2780	n.d.	n.d.	n.d.
<b>L10+LN</b>	170 ±110	14840 ±2210	19530 ±3640	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 26: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma der L10- und der L10+LN-Gruppe [pg/ml]

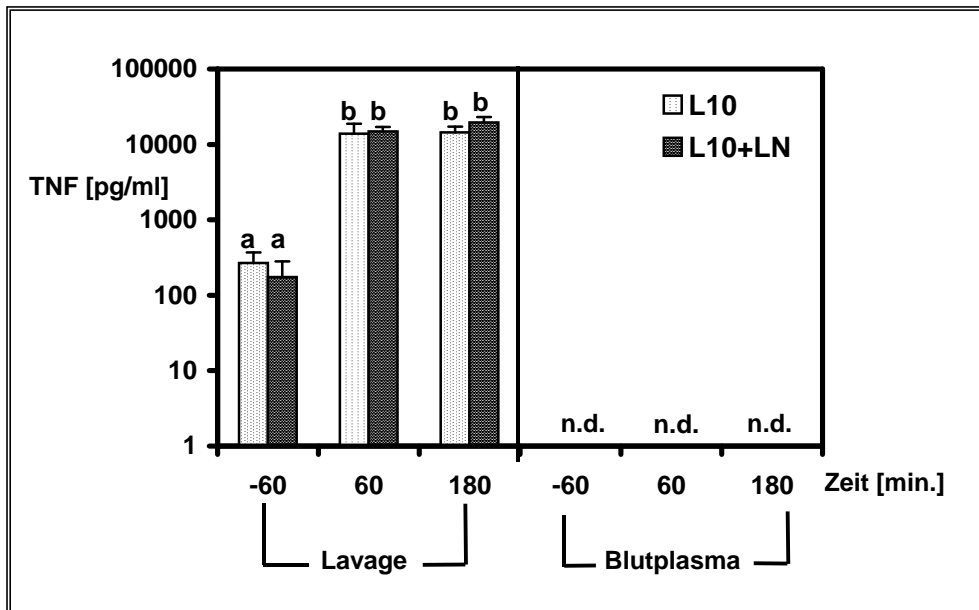


Abbildung 55: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+LN-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt – 60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt –60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L10</b>	290 ±160	7400 ±3120	26460 ±6920	20 ±10	270 ±130	540 ±140
<b>L10+LN</b>	3030 ±1800	2470 ±560	36910 ±11870	10 ±2	40 ±10	230 ±70

Tabelle 27: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma der L10- und der L10+LN-Gruppe [IU/ml]

Der Grund für die relativ hohen Basalwerte ( $t = -60$  min.) von IL6 in der Lavage der L10+LN-Gruppe bleibt spekulativ.

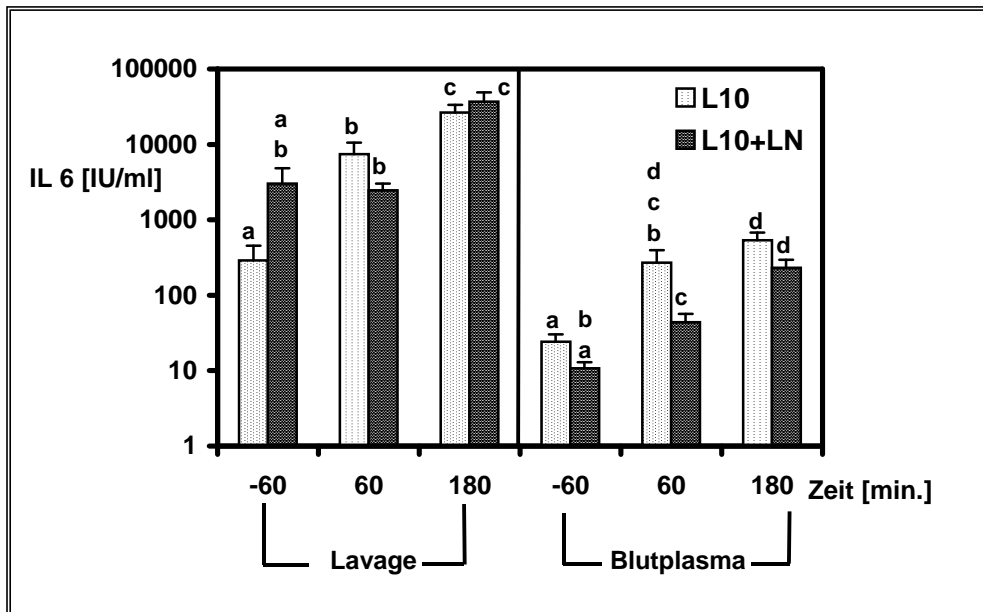


Abbildung 56: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+LN-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Auf die durch Injektion der niedrigen LPS-Dosis induzierte Fieberreaktion hatte die Behandlung der Tiere mit L-NAME jedoch einen nachweisbaren Einfluss (Abbildung 57). So war in den ersten 30 min. nach der LPS-Injektion in die subkutane Kammer zwar auch in der L10+LN-Gruppe parallel zur L10-Gruppe ein leichter Anstieg der abdominalen Körpertemperatur zu beobachten (ca.  $\pm 0,25$  °C), doch sank in der L10+LN-Gruppe danach die Körperkerntemperatur wieder ab und pendelte sich im weiteren Verlauf des Versuches auf die Ausgangstemperatur ein. Somit kam es in dieser Gruppe zu einer vollständigen Unterdrückung der Fieberreaktion, wie sie normalerweise nach LPS-Gabe zu beobachten gewesen wäre. Der mittlere F.I. der L10-Gruppe betrug  $4,06 \pm 0,34$  [°C·h] und der F.I. der L10+LN-Gruppe  $0,13 \pm 0,59$  [°C·h] (Abbildung 59).

Auch auf die zirkulierenden Cortisol-Spiegel hatte die Coinjektion von L-NAME einen signifikanten Einfluss (Tabelle 28, Abbildung 58). So konnte aufgrund der Behandlung in der L10+LN-Gruppe ein etwa dreifach höherer Cortisolpeak ( $t=180$  min.) wie in der L10-Gruppe beobachtet werden.

Versuchsgruppe	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
L10	50±3	770±290	710±130
L10+LN	650±50	990±160	2220±420

Tabelle 28: mittlere Cortisolkonzentrationen im Blutplasma der L10- und der L10+LN –Gruppe [nmol/l]

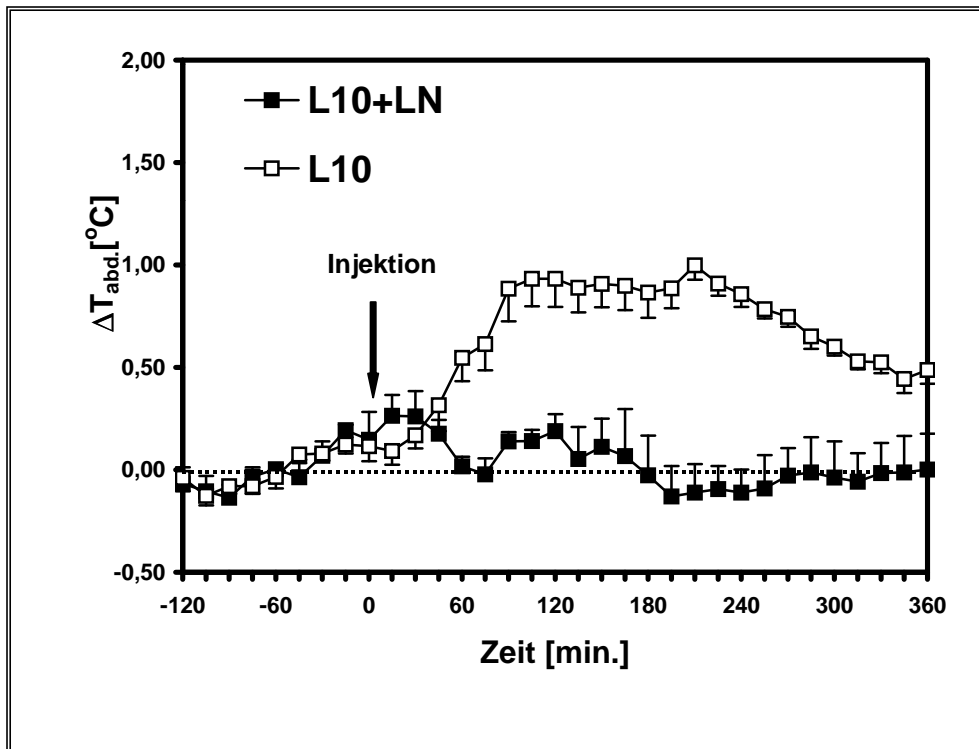


Abbildung 57: Temperaturverlauf der L10- und der L10+LN-Gruppe nach LPS-Injektion. Im Zeitraum von 60 bis 360 min. nach LPS-Injektion war die Fieberantwort in der L10+LN-Gruppe signifikant unterdrückt ( $p < 0,001$ ; zweifaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen mit post-hoc-Test nach Scheffé).

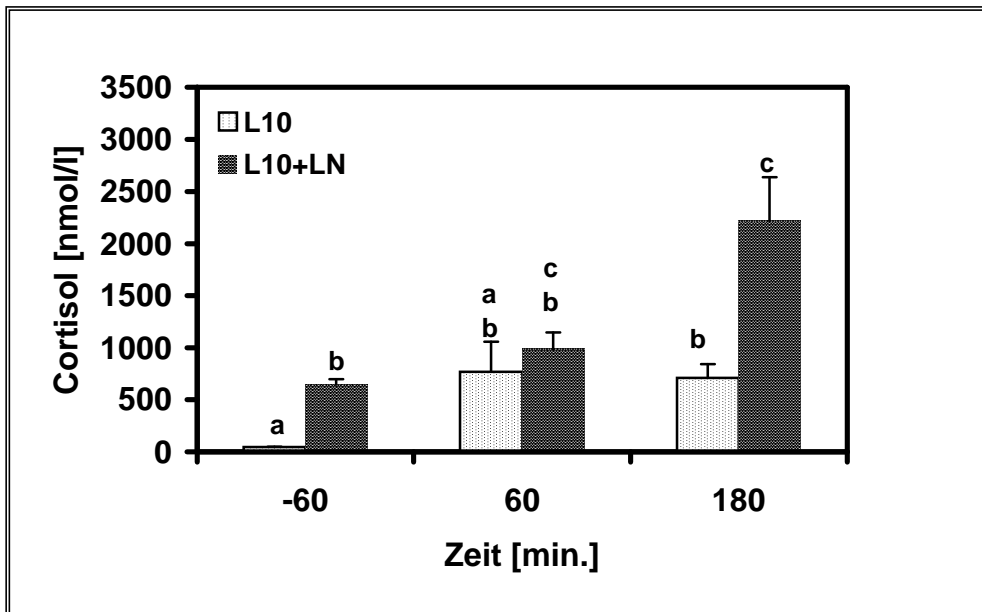


Abbildung 58: mittlere Cortisol-Konzentrationen im Blutplasma der L10- und der L10+LN-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Plasma-Messungen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Den Einfluss, den die Behandlung der Tiere mit L-NAME in der gesamten L-NAME-Versuchsreihe auf die untersuchten physiologischen Endpunktparameter hatte, sind in Abbildung 59 (Fieberindizes) und in Abbildung 60 (Cortisolpeaks) zusammenfassend nochmals dargestellt.

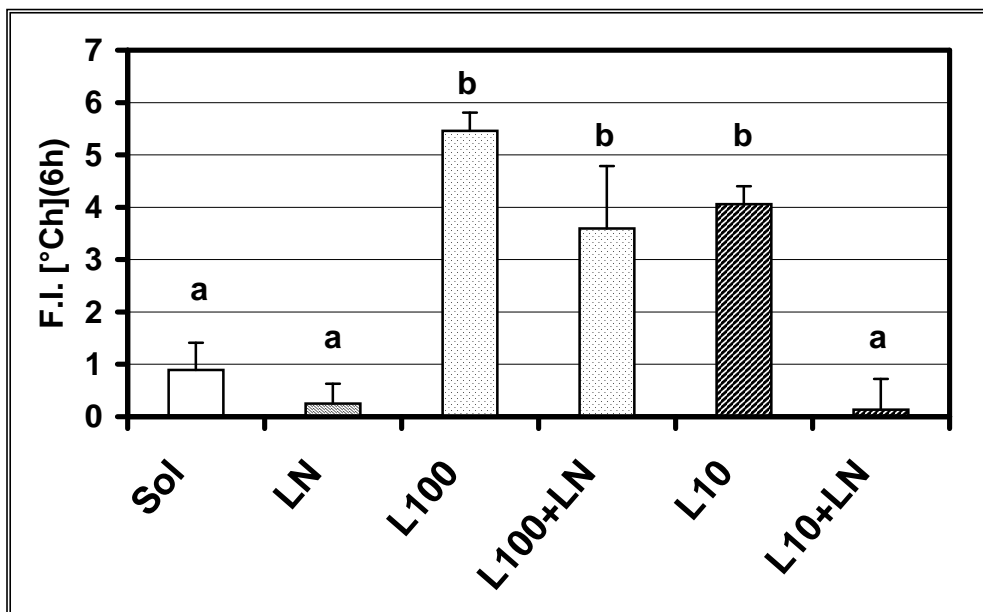


Abbildung 59: mittlere Fieberindizes der L-NAME-Versuchsreihe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den individuellen Gruppen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Die Abbildung 59 zeigt deutlich, dass die Coinjektion von L-NAME nur in Kombination mit der niedrigen LPS-Dosis (10 µg/kg KG) eine Reduzierung der integrierten Fieberantwort bewirkte.

Auf den Cortisolpeak (Abbildung 60) hatte L-NAME einen genau gegenteiligen Effekt. Zwar wurde der Cortisolpeak auch nur bei Kombination von L-NAME mit der niedrigen LPS-Dosis beeinflusst, doch bewirkte L-NAME hier keine Reduzierung, sondern eine Erhöhung des Cortisol-Spiegels.

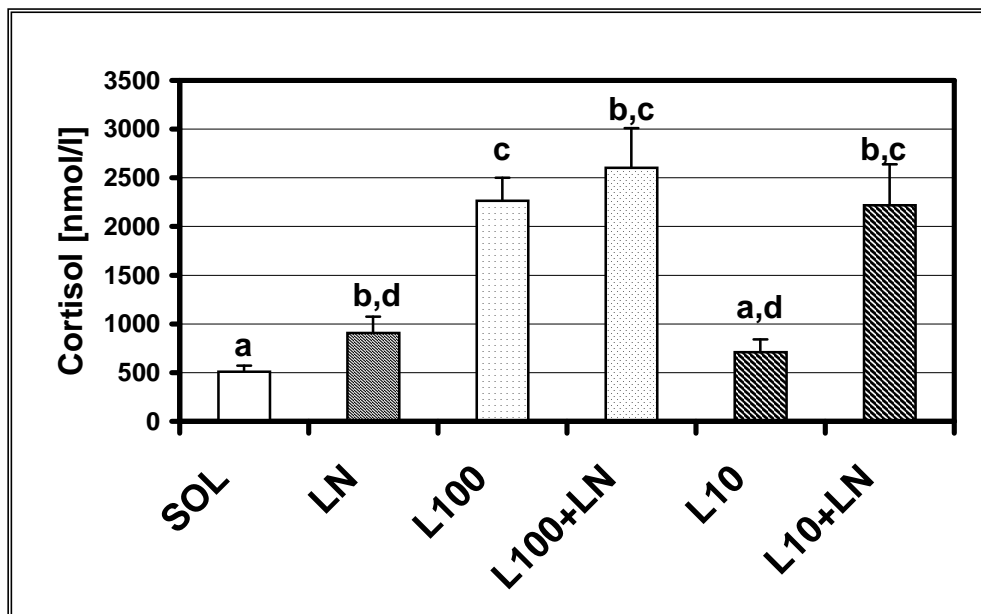


Abbildung 60: mittlere Cortisolpeaks (t=180 min.) der L-NAME Versuchsreihe im Vergleich [nmol/l]. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den individuellen Gruppen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

### 3.4 Injektion von Diclofenac in Kombination mit LPS 100 oder LPS 10 in die subkutane Kammer

#### 3.4.1 Injektion von Diclofenac im Vergleich zur Injektion von Solvent in die subkutane Kammer

Die Injektion von 5 mg/kg Diclofenac in die subkutane Kammer führte im Vergleich zur Injektion von steriler Kochsalzlösung zu keiner Veränderung der basalen Konzentrationen an TNF in der Lavage (182 bis 582 pg/ml).

Die Konzentrationen von biologisch aktivem TNF im Plasma lag bei fast allen Proben Diclofenac-behandelter Tiere unterhalb der Nachweisgrenze. Auch die zirkulierenden IL6-Spiegel wurden durch die Injektion von Diclofenac in die subkutane Kammer nicht beeinflusst (9 bis 404 IU/ml).

Lediglich in der Lavage war eine Stunde vor sowie drei Stunden nach der Gabe von Diclofenac ein im Vergleich zur Behandlung mit steriler Kochsalzlösung erhöhter Gehalt an IL6 zu verzeichnen. Dieser Befund lässt sich, wie bereits vorher postuliert (Abschnitt 3.1.1), durch mögliche inflammatorische Reaktionen einzelner Tiere im Bereich der subkutan implantierten Kammer erklären.

Die Injektion von Diclofenac in die subkutane Kammer hatte (im Vergleich zur Injektion von SOL) keinen Einfluss auf den Verlauf der Körperkerntemperatur (Abbildung 61). Der F.I. der SOL-Gruppe betrug  $0,89 \pm 0,52$  [ $^{\circ}\text{C h}$ ] und der F.I. der DICLO-Gruppe  $0,07 \pm 0,3$  [ $^{\circ}\text{C h}$ ] (Abbildung 70).

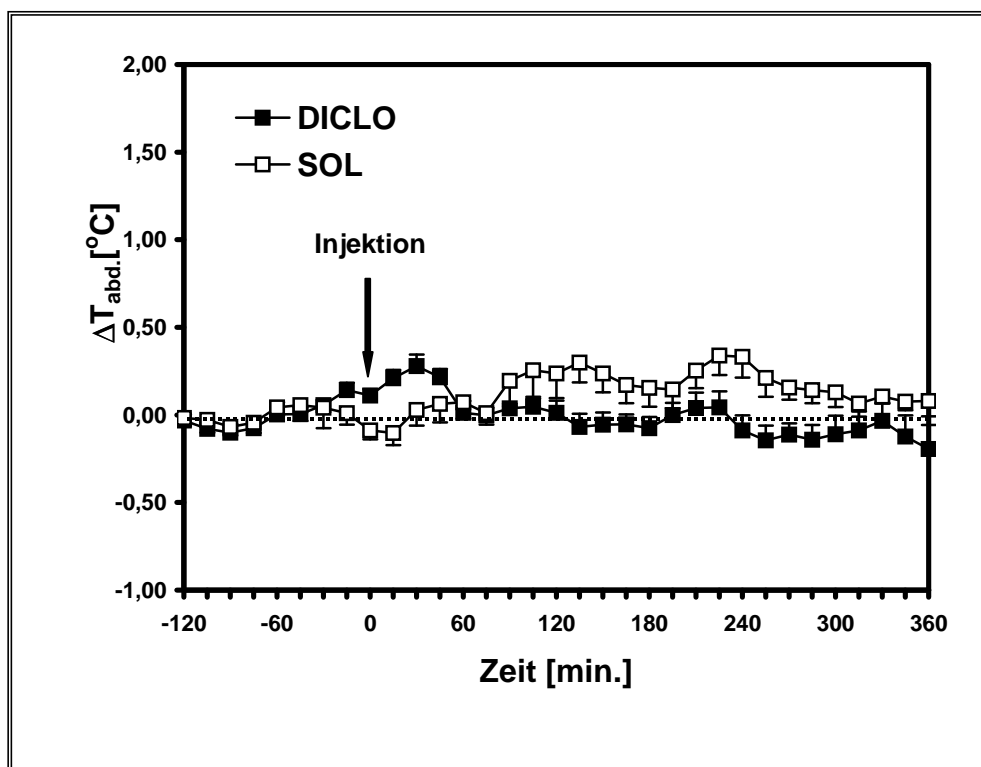


Abbildung 61: Temperaturverlauf der SOL- und der DICLO-Gruppe

Auch die zirkulierenden Cortisol-Spiegel wurden durch die Behandlung mit Diclofenac nicht beeinflusst.



### 3.4.2 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 100 und der von LPS 100 in Kombination mit Diclofenac in die subkutane Kammer

Durch die Behandlung mit Diclofenac wurde die durch Injektion der hohen LPS-Dosis (100 µg/kg KG) induzierte Menge an biologisch aktivem TNF in der Lavage und im Blutplasma nach der Injektion nicht signifikant abgeschwächt. (Tabelle 29, Abbildung 62).

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	540 ±300	18590 ±4120	39300 ±11760	n.d.	240 ±150	n.d.
<b>L100+DICLO</b>	950 ±630	4630 ±1330	13020 ±5840	n.d.	220 ±220	n.d.

Tabelle 29: mittlere TNF-Aktivitäten der L100- und der L100+DICLO -Gruppe in der Lavage und im Blutplasma [pg/ml]

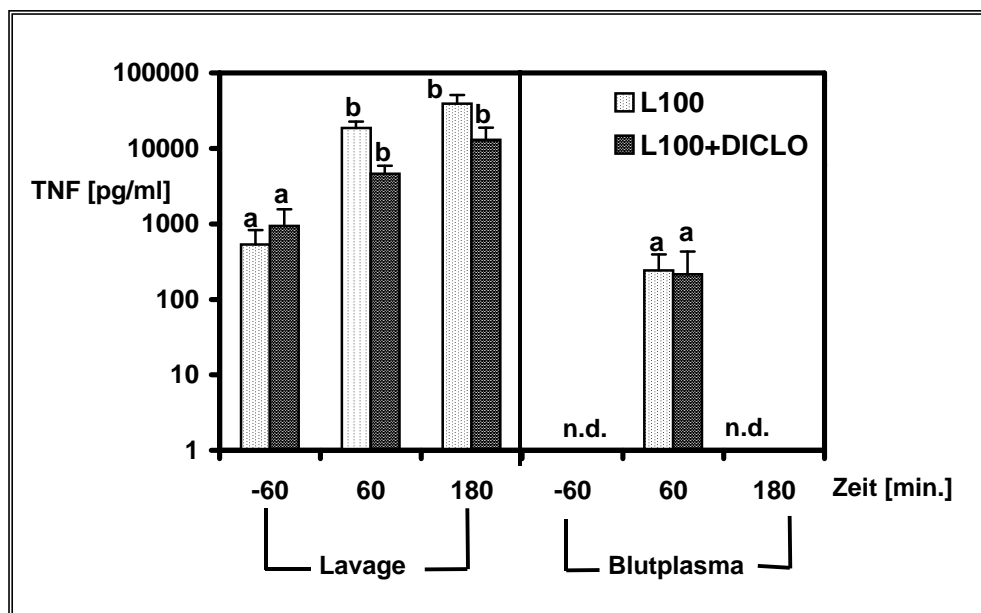


Abbildung 62: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma aus der L100- und der L100+DICLO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Die mit Diclofenac behandelten Tiere zeigten jedoch weder in der Lavage noch im Blutplasma einen signifikanten Anstieg an biologisch aktivem IL6. Zumindest in der Lavage resultierte dieser Befund auf dem vergleichsweise hohen IL6-Ausgangswert (Tabelle 30, Abbildung 63).

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	700 ±440	13690 ±2600	80490 ±30420	50 ±30	620 ±280	920 ±240
<b>L100+DICLO</b>	4860 ±1960	6940 ±1740	20330 ±4400	40 ±20	340 ±190	170 ±40

Tabelle 30: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma der L100- und der L100+DICLO-Gruppe [IU/ml]

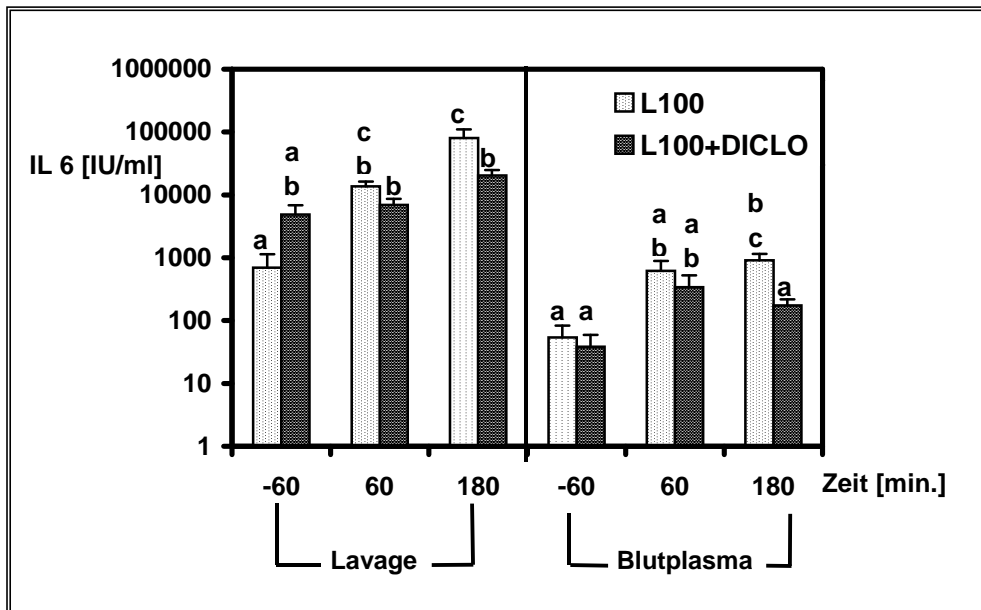


Abbildung 63: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma aus der L100- und der L100+DICLO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Das durch Injektion der hohen LPS-Dosis in die subkutane Kammer induzierte Fieber wurde durch die Behandlung mit Diclofenac vollständig unterdrückt; die Tiere entwickelten sogar eine leichte Hypothermie und ihre gemittelte Körperkerntemperatur lag noch sechs Stunden nach der LPS-Gabe unterhalb der Ausgangstemperatur (Abbildung 64). Der mittlere F.I. der L100-Gruppe betrug  $5,46 \pm 0,35$  [° Ch] und der F.I. der L100+DICLO-Gruppe lag bei  $-1,75 \pm 0,82$  [° Ch] (Abbildung 70).

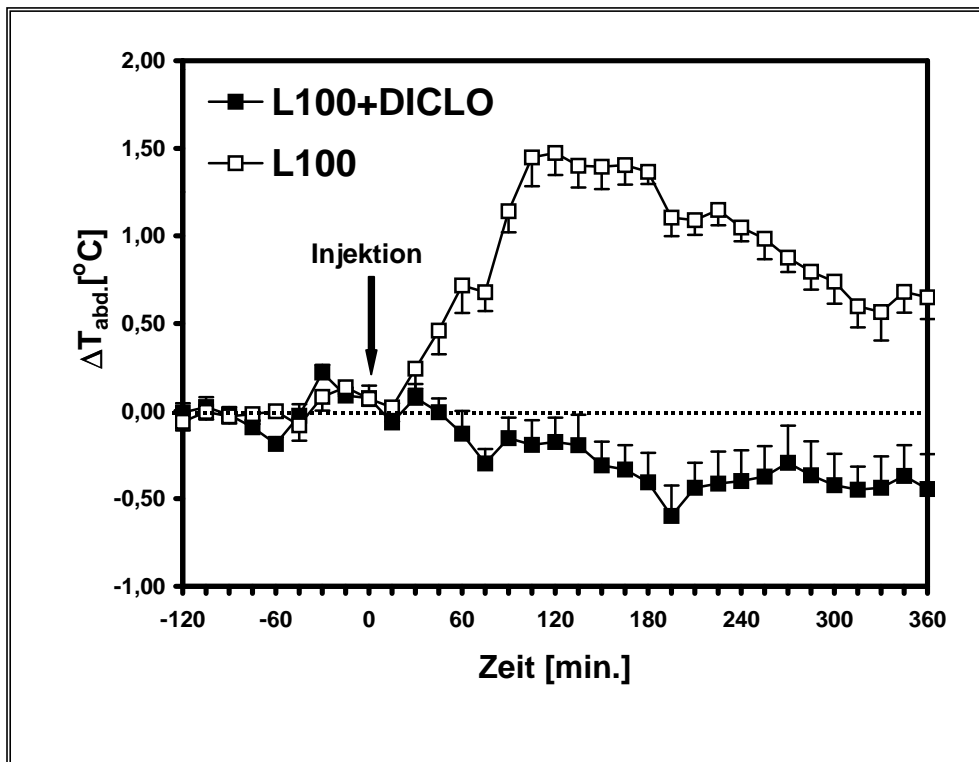


Abbildung 64: Temperaturverlauf der L100- und der L100+DICLO-Gruppe. Im Zeitraum von 60 bis 360 min. nach LPS-Injektion war die Fieberantwort in der L100+DICLO-Gruppe signifikant unterdrückt ( $p < 0,001$ ; zweifaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Der durch LPS-induzierte Anstieg der zirkulierenden Cortisolkonzentrationen wurde jedoch durch die Gabe von Diclofenac in die subkutane Kammer nicht modifiziert (Tabelle 31, Abbildung 65).

Versuchsgruppe	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L100</b>	530±110	1100±150	2270±230
<b>L100+DICLO</b>	440±170	910±90	1810±280

Tabelle 31: mittlere Cortisolkonzentrationen im Blutplasma der L100- und der L100+DICLO-Gruppe [nmol/l]

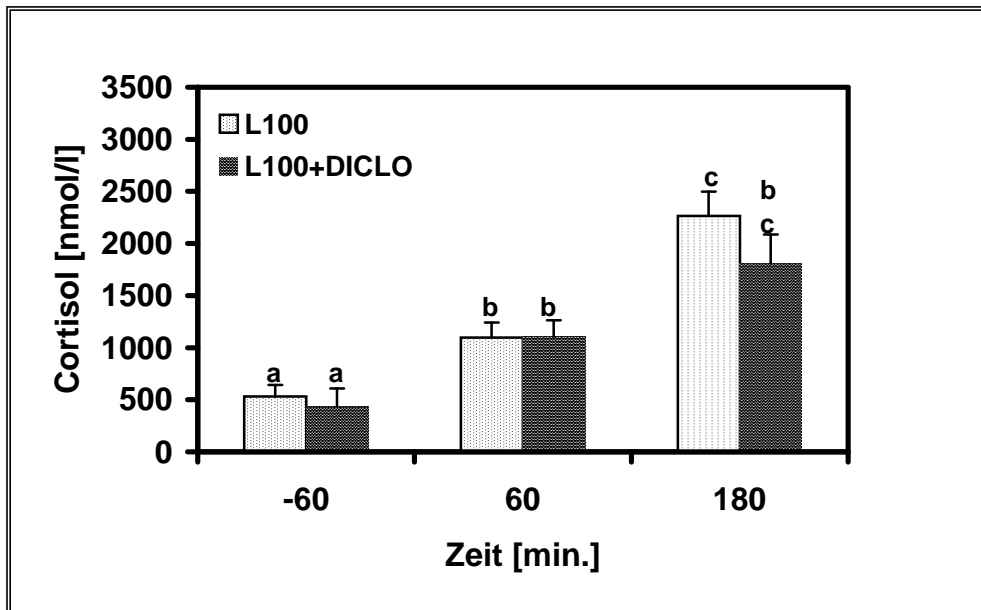


Abbildung 65: mittlere Cortisol-Konzentrationen im Blutplasma der L100- und der L100+DICLO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Plasma-Messungen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

### 3.4.3 Vergleich zwischen der Injektion von LPS 10 und der Injektion von LPS 10 in Kombination mit Diclofenac

Bedingt durch die hohen Ausgangswerte kam es in der L10+DICLO-Gruppe zu keinen signifikanten LPS-induzierten Anstiegen an TNF (Tabelle 32, Abbildung 66) und IL6 (Tabelle 33, Abbildung 67) in der Lavage bzw. im Blutplasma. Ob sich zusätzlich die Gabe von Diclofenac hemmend auf die Zytokinbildung ausgewirkt haben könnte, kann auf Grundlage der vorliegenden Daten noch nicht abschließend beurteilt werden.

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L10</b>	270 ±100	13900 ±4880	14420 ±2780	n.d.	n.d.	n.d.
<b>L10+DICLO</b>	2430 ±2370	1150 ±440	10380 ±2030	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 32: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma der L10- und der L10+DICLO-Gruppe [pg/ml]

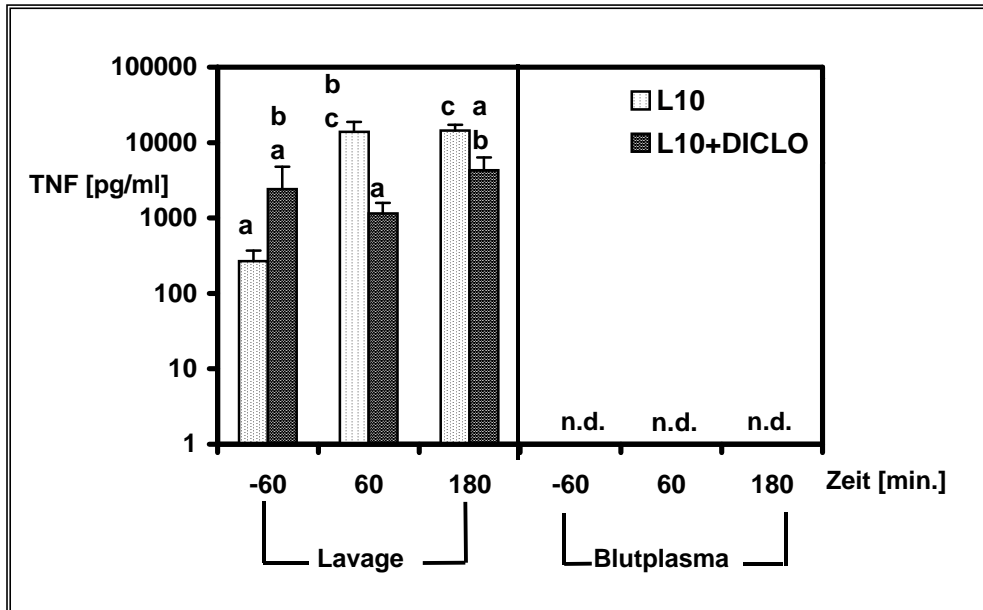


Abbildung 66: mittlere TNF-Aktivitäten in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+DICLO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Versuchsgruppe	Lavage			Blutplasma		
	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
<b>L10</b>	290 ±160	7400 ±3120	26460 ±6920	20 ±10	270 ±130	540 ±140
<b>L10+DICLO</b>	920 ±310	4780 ±3540	7870 ±4140	70 ±40	260 ±190	190 ±140

Tabelle 33: mittlere IL6-Konzentrationen im Blutplasma und in der Lavage der L10- und der L10+DICLO-Gruppe [IU/ml]

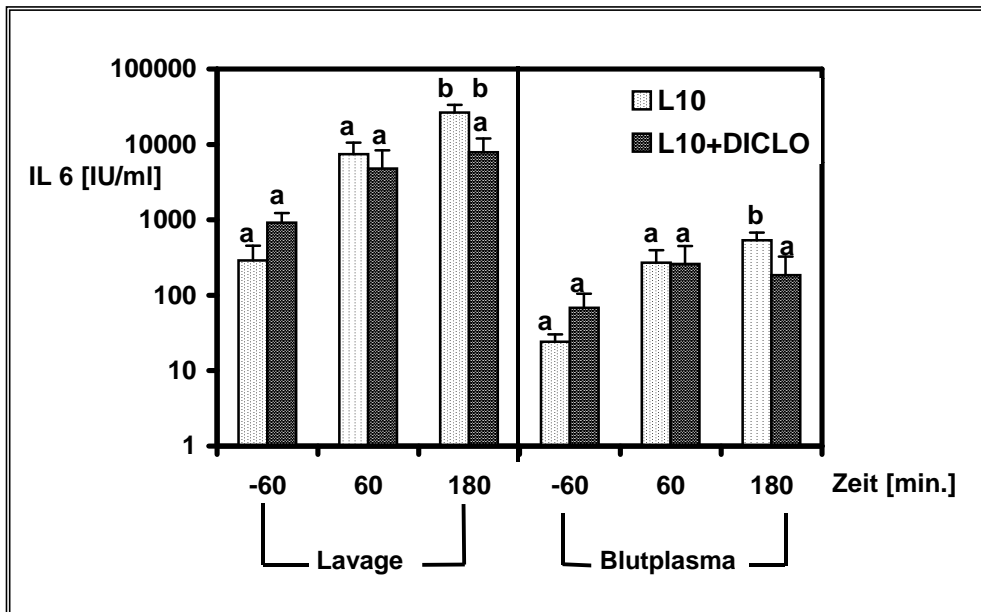


Abbildung 67: mittlere IL6-Konzentrationen in der Lavage und im Blutplasma aus der L10- und der L10+DICLO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Säulen der Lavage-Messungen (linke Bildhälfte) bzw. der Plasma-Messungen (rechte Bildhälfte) an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

So wie schon das durch die hohe LPS-Dosis induzierte Fieber wurde auch das durch die niedrige Dosis induzierte Fieber durch die Coinjektion von Diclofenac vollständig unterdrückt (Abbildung 68). In der L10+DICLO-Gruppe war wiederum die Entwicklung einer leichten Hypothermie ( bis ca.  $-0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) zu verzeichnen. Diese leichte Hypothermie konnte ebenfalls sechs Stunden nach der LPS-Injektion in die subkutane Kammer noch beobachtet werden. Der F.I. der L10-Gruppe betrug  $4,06 \pm 0,34 \text{ [}^\circ\text{C}\cdot\text{h]}$  und der F.I. der L10+DICLO-Gruppe  $-1,04 \pm 0,9 \text{ [}^\circ\text{C}\cdot\text{h]}$  (Abbildung 70).

Ein erkennbarer Einfluss der Diclofenac-Behandlung auf die Cortisol-Konzentrationen, die im Blutplasma gemessen wurden, war nicht zu verzeichnen (Tabelle 34, Abbildung 71).

Versuchsgruppe	Zeitpunkt -60 min.	Zeitpunkt 60 min.	Zeitpunkt 180 min.
L10	$50 \pm 3$	$770 \pm 290$	$710 \pm 130$
L10+DICLO	$750 \pm 160$	$1420 \pm 420$	$1090 \pm 410$

Tabelle 34: mittlere Cortisolkonzentration im Blutplasma der L10- und der L10+DICLO-Gruppe [nmol/l]

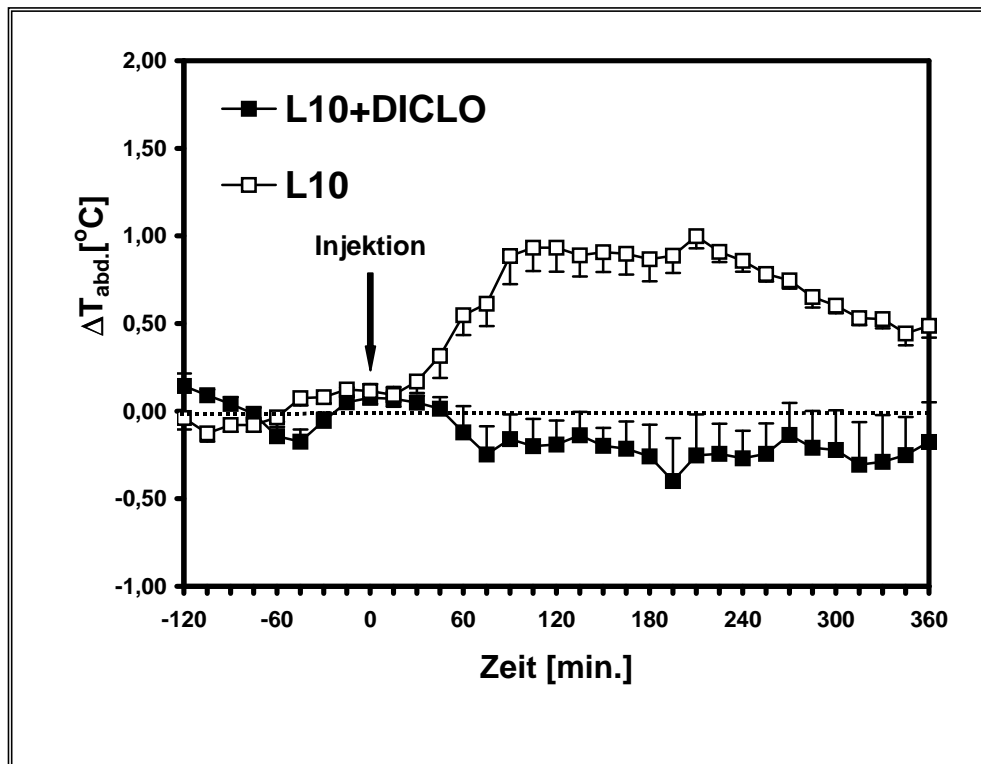


Abbildung 68: Temperaturverlauf der L10- und der L10+DICLO-Gruppe. Im Zeitraum von 60 bis 360 min. nach LPS-Injektion war die Fieberantwort in der L10+DICLO-Gruppe signifikant unterdrückt ( $p < 0,001$ ; zweifaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen mit post-hoc-Test nach Scheffé).

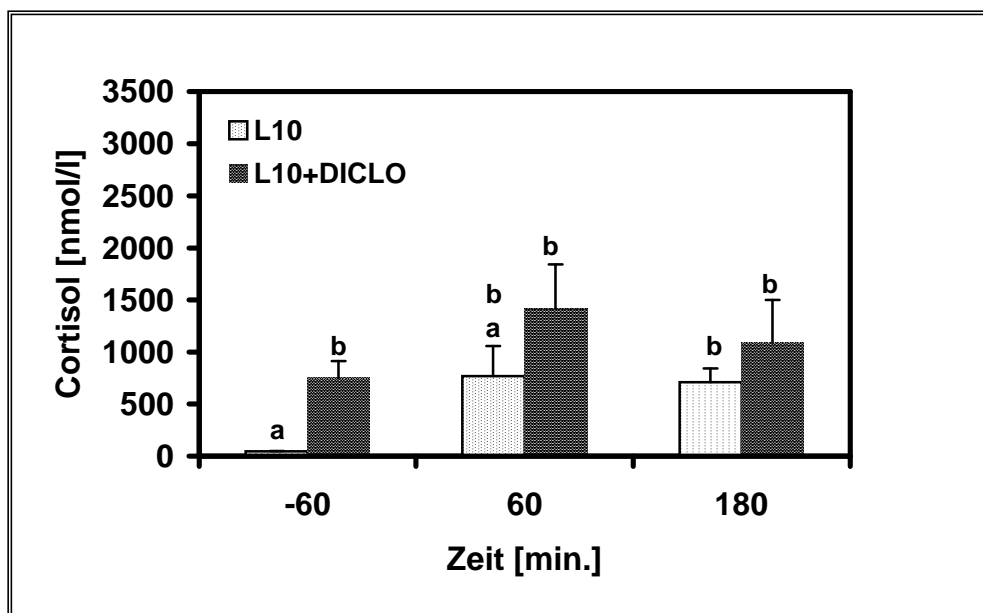


Abbildung 69: mittlere Cortisol-Konzentrationen im Blutplasma der L10- und der L10+DICLO-Gruppe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Plasma-Messungen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

In den nachfolgenden Abbildungen sind nochmals die Endpunktparameter der Diclofenac-Versuchsreihe dargestellt. So ist deutlich der Effekt erkennbar, den die Coinjektion von Diclofenac auf die Fieberreaktion hatte. Sowohl in Kombination mit der hohen als auch mit der niedrigen LPS-Dosis konnte eine vollständige Fieberunterdrückung durch Diclofenac beobachtet werden (Abbildung 70).

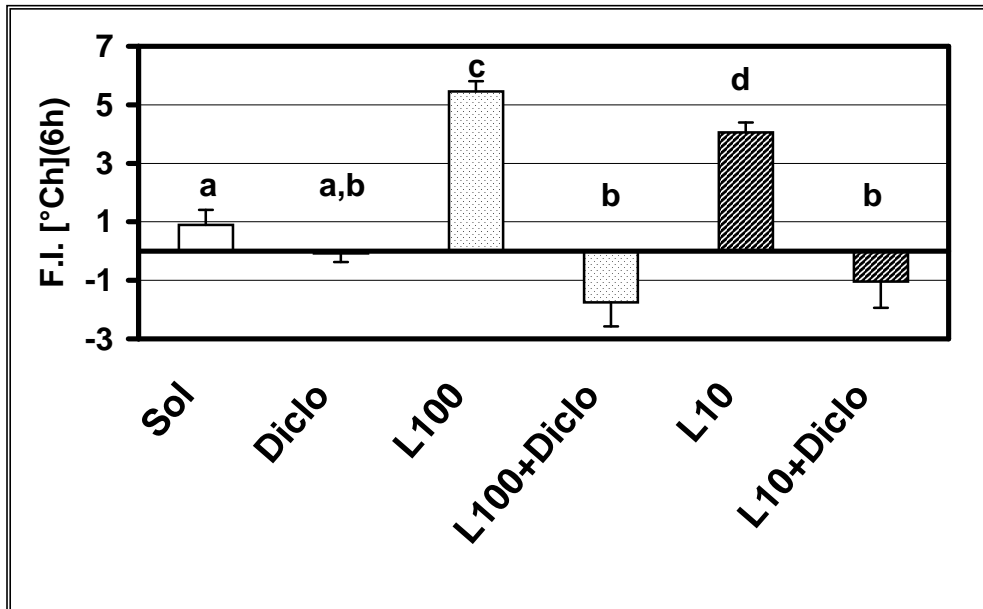


Abbildung 70: mittlere Fieberindizes der Diclofenacversuchsreihe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den individuellen Gruppen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).



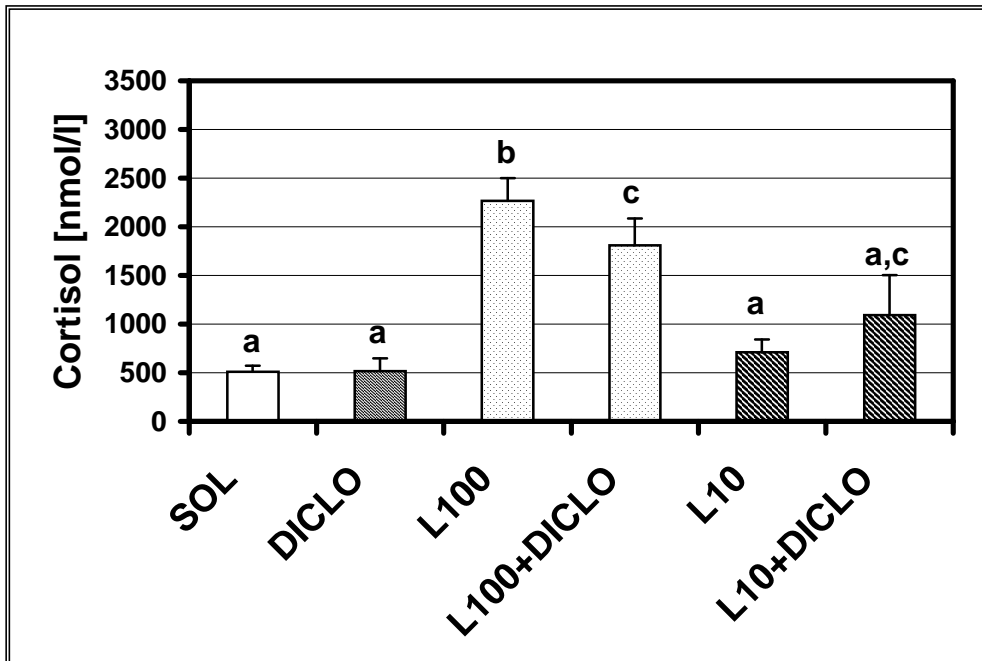


Abbildung 71: mittlere Cortisolpeaks innerhalb der Diclofenacversuchsreihe. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den individuellen Gruppen an (einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Scheffé).

Auf die 180 min. nach LPS-Injektion gemessenen Cortisolpeaks hatte die Behandlung der Tiere mit Diclofenac keinen Einfluss (Abbildung 71).

### 3.5 Nachweis von zirkulierendem LPS im Blutplasma

Der Limulus Amöbozyten Lysat -(LAL)- Test diente dem Nachweis eines möglichen Übertritts von LPS aus der subkutanen Kammer in den Blutkreislauf. Der LAL-Test sollte folgende Frage klären: Kommt es nach der Injektion von LPS in die subkutane Kammer zu einem Übertritt von LPS in den Blutkreislauf? Wäre dies der Fall, so könnte LPS systemisch zu einer Reihe von Reaktionen führen, z.B. Aktivierung von Makrophagen und der Induktion von Zytokinen. In Tabelle 35 sind die Werte dargestellt, die im Blutplasma von jeweils fünf Tieren eine Stunde nach der Injektion von SOL, LPS 100 und von LPS 10 in die subkutane Kammer, gemessen wurden.

Versuchstier	injizierte Substanz		
	SOL	LPS 100	LPS 10
A	n.d.	n.d.	n.d.
B	n.d.	n.d.	n.d.
C	n.d.	n.d.	n.d.
D	n.d.	69,0	n.d.
E	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 35: LPS-Konzentration im Blutplasma eine Stunde nach der Injektion der Substanzen in die subkutane Kammer [pg/ml]

Lediglich bei einem Versuchstier, das eine Injektion der hohen LPS-Dosis erhalten hatte, war 60 min. später LPS in niedriger Konzentration im Blutplasma nachweisbar. Bei allen anderen Tieren lagen die Werte (n.d.) von LPS im Plasma unter der Nachweisgrenze bzw. unter der am niedrigsten konzentrierten LPS-Kalibrierungsprobe, welche die Nachweisgrenze (Nachweisgrenze 10 pg LPS/ ml) repräsentiert.

## KAPITEL 4: DISKUSSION

In der Tabelle 36 sollen zu Anfang der Diskussion nochmals die untersuchten Endpunktparameter im Zusammenhang dargestellt werden. Danach werden die einzelnen Versuchsreihen in der Chronologie ihrer Abhandlung im Ergebnisteil besprochen.

	Fieberindex [° Ch] (6h)		Cortisolpeak Zeitpunkt: t=180 min.	
	niedrige LPS-Dosis	hohe LPS-Dosis	niedrige LPS-Dosis	hohe LPS-Dosis
<b>ROPI</b>	↓	=	=	=
<b>TBP</b>	= <sup>1</sup>	=	=	=
<b>LN</b>	↓↓	= <sup>1</sup>	↑↑ <sup>2</sup>	=
<b>DICLO</b>	↓↓	↓↓	=	=

Tabelle 36 : Gegenüberstellung der Effekte der getesteten Substanzen auf die physiologischen Endpunktparameter jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe  
 ↓: Reduzierung gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe (↓=Verminderung um ca. 50%; ↓↓= Verminderung >50%); ↑: Erhöhung gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe (↑=Erhöhung um ca. 50%; ↑↑= Erhöhung >50%) ; =: keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe

<sup>1</sup> Varianzanalyse ergab lediglich für einen Abschnitt der Fieberreaktion einen niedrigeren Fieberverlauf der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe (L10- bzw. L100-Gruppe; schnellere Entfieberung; siehe Abbildungen der Temperaturverläufe im Ergebnisteil)

<sup>2</sup> Wert um ca. 300 % größer gegenüber der Kontrollgruppe (L10-Gruppe)

### 4.1 Einfluss des Lokalanästhetikums Ropivacain auf die Fieberantwort bei einer lokalen peripheren Inflammation

Die Ergebnisse der Ropivacain-Versuchsreihe können wie folgt zusammengefasst werden: Nach Applikation des Lokalanästhetikums in Kombination mit der niedrigen LPS-Dosis (10 µg/kg) in die subkutane Kammer konnte gegenüber der Kontrollgruppe (L10-Gruppe) eine Reduzierung der Fieberantwort beobachtet werden. Bei Verwendung der hohen LPS-Dosis (100 µg/kg) in Kombination mit dem Lokalanästhetikum und bei der contralateralen Injektion des Lokalanästhetikums in Kombination mit der niedrigen LPS-Dosis (10 µg/kg) war dieser Effekt beim Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen (L100- und L10-Gruppe) nicht zu beobachten. Das Ropivacain verminderte die TNF-Konzentrationen in der Lavage zeigte aber keinen Einfluss auf die IL6- bzw. Cortisolkonzentrationen.

Die Reduzierung der Fieberantwort bei Verwendung der niedrigen LPS-Dosis aufgrund des Lokalanästhetikums könnte auf die folgenden Wirkmechanismen des Lokalanästhetikums zurückgeführt werden:

1. Reduzierung der Fieberantwort nach subkutaner Applikation von LPS durch Blockade des neuronalen Signalweges
2. Die Reduzierung der Fieberantwort beruht auf einer systemischen Wirkung des Lokalanästhetikums.
3. Das Lokalanästhetikum übt eine inhibitorische Wirkung auf das Immunsystem aus und führt auf diesem Wege zu einer reduzierten Fieberantwort.

#### Punkt 1.: Reduzierung der Fieberantwort nach subkutaner Applikation von LPS durch Blockade des neuronalen Signalweges

Neben dem bereits bekannten humoralen Signalweg (über endogene Pyrogene), der bei der Vermittlung der Fieberantwort nach peripherer subkutaner LPS-Gabe eine entscheidende Rolle spielt, lassen die Ergebnisse vermuten, dass parallel zu diesem noch ein neuronaler Signalweg existiert (siehe Abbildung 72).

Ein solcher neuronaler Signalweg ist schon unter Beteiligung des Nervus vagus (N. vagus) nach intraperitonealer LPS-Gabe mehrfach beschrieben worden. In diesen Experimenten kam es durch eine Unterbrechung des N. vagus durch subdiaphragmatische Vagotomie zu einer Reduzierung der Fieberantwort nach intraperitonealer Applikation von endogenen (IL1) bzw. von exogenen Pyrogenen (LPS/MDP; Goldbach et al. 1997b, Fleshner et al. 1998, Goehler et al. 1995, Watkins et al. 1995a). Bei einigen Untersuchungen wurden nicht nur die Effekte der Vagotomie auf die Fieberantwort analysiert, sondern es wurden auch die Veränderungen in der Aktivierung der HPA-Achse (Gaykema et al. 1995) oder im Sozialverhalten (Porter et al. 1998) der Tiere erfasst. Analog zu unseren Experimenten hatte die Vagotomie nur bei Verwendung der niedrigen LPS-Dosis eine reduzierte Fieberantwort zur Folge. Wurde hingegen eine hohe LPS-Dosis appliziert, hatte die Vagotomie keine Auswirkung auf die Ausprägung des Fiebers (Romanowsky et al. 1997).

Nach erfolgter Vagotomie konnte nach intraperitonealer Applikation von LPS (Layé et al. 1995) oder von IL1 $\beta$  (Hansen et al. 1998) eine Verminderung der Expression und Freisetzung von IL1 $\beta$  im ZNS festgestellt werden.

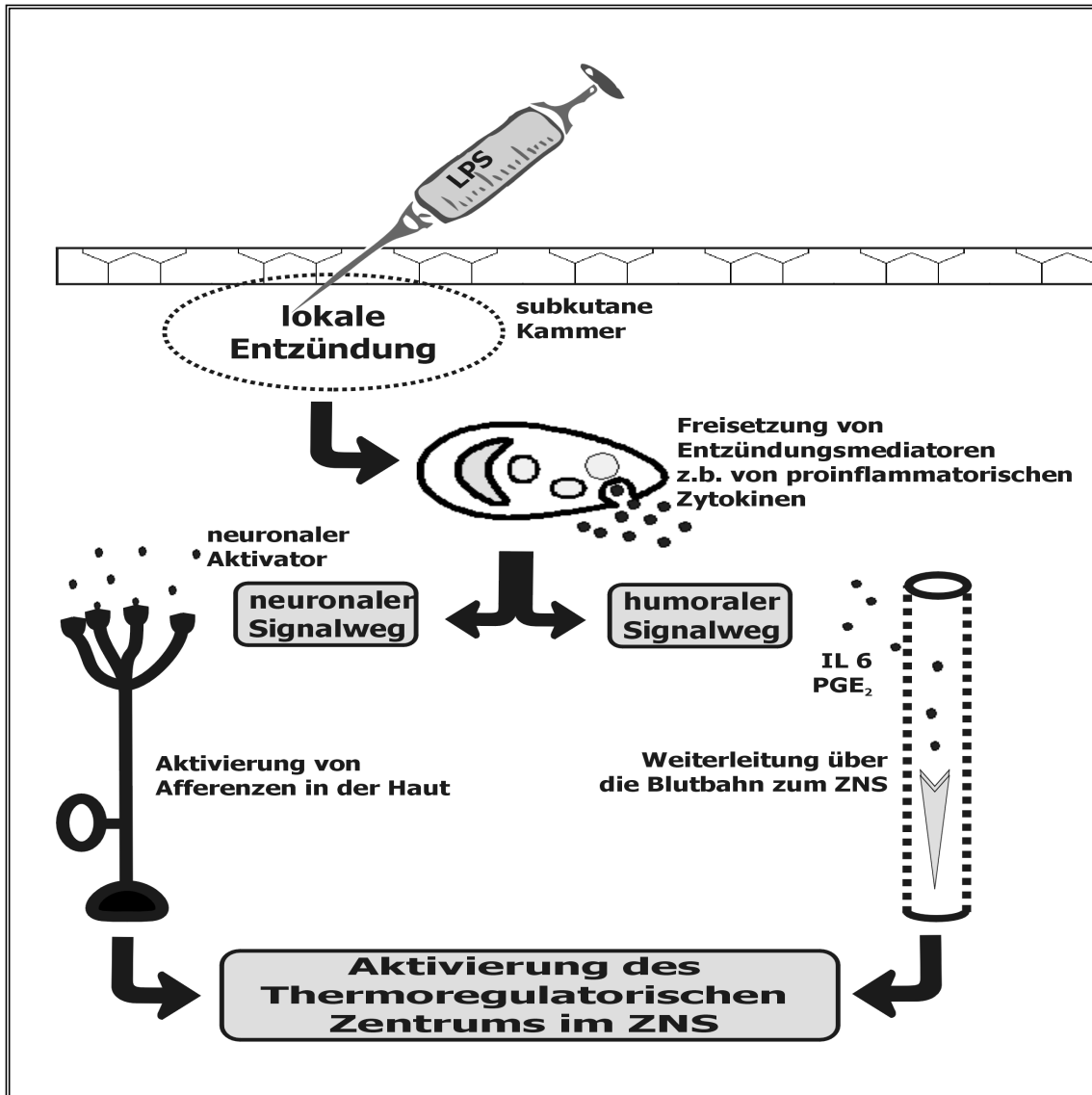


Abbildung 72: vereinfachte schematische Darstellung der Signalwege, die für die Fieberinduktion nach subkutaner Applikation von LPS verantwortlich sind

Welche Ergebnisse sprechen nun für einen analogen neuronalen Signalweg in dem von uns verwendeten Modell? Würde die Fieberantwort nach der lokalen subkutanen Applikation nur auf dem humoralen Wege erfolgen, so müssten zu diesem Zwecke entweder exogenes Pyrogen (LPS) oder aber die durch LPS induzierten endogenen Pyrogene, wie beispielsweise IL6 oder aber auch biologisch aktives TNF, in den Blutkreislauf übertreten.

Der Nachweis von zirkulierendem LPS verlief in unserem Modell negativ bzw. es war nur bei einem Versuchstier nach Injektion der hohen LPS-Dosis (100 µg/kg KG) eine Stunde nach der LPS-Gabe in die subkutane Kammer LPS in geringen Mengen im Blutplasma nachweisbar. Diese Ergebnisse sind konform zu einer Studie, in der Ratten LPS in einer vergleichbaren Dosis in eine subkutane Luftblase (Air-pouch) verabreicht wurde (Cartmell et al. 1998). Der LPS-Nachweis ergab auch hier ein negatives Ergebnis. Diese Ergebnisse zeigen, dass LPS außerhalb der subkutanen Kammer nicht als fieberauslösende Substanz in Frage kommt.

Von den untersuchten endogenen Pyrogenen trat nur IL6 in moderaten Mengen in den Blutkreislauf über. Zirkulierendes, biologisch aktives TNF war zu keinem Zeitpunkt und bei keiner der eingesetzten LPS-Dosis im Blutplasma zu detektieren. Ein Übertritt von geringen IL6-Mengen aus einem lokalen subkutanen Entzündungsherd (subkutaner Air-pouch) in den Blutkreislauf wurde auch in einer Reihe von anderen Studien bei Ratten entdeckt (Miller et al. 1997a, Cartmell et al. 1998, Cartmell et al. 2000). In der Studie, die von Cartmell (Cartmell et al. 2000) durchgeführt wurde, konnte ebenfalls kein zirkulierendes TNF und darüber hinaus auch kein zirkulierendes IL1 nachgewiesen werden. Innerhalb der humoralen Fieberantwort scheint IL6 von zentraler Bedeutung für die Vermittlung von peripheren Signalen zum ZNS zu sein (zirkulierendes endogenes Pyrogen). So konnte in mehreren Studien eine direkte Korrelation zwischen der einsetzenden Fieberantwort nach peripherer LPS-Gabe und den zirkulierenden IL6-Konzentrationen hergestellt werden (Kluger et al. 1991, Kluger et al. 1998b, Miller et al. 1997 a, Roth et al. 1993, Roth et al. 1994a, Roth et al. 1998b). Allerdings gab es auch Experimente, bei welchen peripher verabreichtes IL6 nur eine sehr geringe pyrogene Wirkung zeigte (Sakata et al. 1991, Cartmell et al. 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse spekuliert man, dass IL6 noch einen Co-Faktor zur Fieberinduktion benötigt. Möglicher Kandidat für diesen Co-Faktor ist das Zytokin IL1 (Cartmell et al. 2000) oder aber der lösliche IL6-Rezeptor (Schöbitz et al. 1995). Unter der Annahme, dass nur ein humoraler Signalweg existiert, müsste die zu beobachtende Reduktion der Fieberantwort bei Verabreichung der niedrigen LPS-Dosis in Kombination mit dem Lokalanästhetikum auf einer Reduzierung der zirkulierenden IL6-Menge beruhen. Dies kann allerdings verneint werden, da in allen Gruppen, bei denen die niedrige LPS-Dosis appliziert wurde, die zirkulierenden LPS-induzierten-IL6-Level nahezu identisch waren. Dies spricht wiederum für die Existenz eines neuronalen Signalweges.

Welche neuronalen Afferenzen in dem verwendeten Modell (subkutane Kammer) einer subkutanen Inflammation aktiviert werden, unterliegt der Spekulation, möglicherweise sind in diesem Fall periphere Thermorezeptoren an der Vermittlung der Fieberantwort beteiligt. Die genaue Zuordnung von Hautarealen bezüglich ihrer sensiblen Innervierung gestaltet sich beim Meerschweinchen schwierig. Einerseits sind hierzu keine Daten bekannt, und andererseits können Überlappungen bzw. individualspezifische Unterschiede in der Innervierung nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grunde konnte keine chirurgische Denervierung des untersuchten Gebietes vorgenommen werden. Als einfachere und trotzdem effiziente Methode wurde der Weg über die Lokalanästhesie gewählt. Um genau festzustellen, welche Nerven an der Weiterleitung der fiebererzeugenden Signale aus diesem Gebiet beteiligt sind, könnte man hier in künftigen Studien die Technik des *neuronalen Tracings* verwenden.

Es stellt sich nun weiterhin die Frage, wieso bei Verabreichung des Lokalanästhetikums in Kombination mit der hohen LPS-Dosis (100 µg/kg KG) keine Reduktion der Fieberantwort aufgrund der Wirkung des Lokalanästhetikums festzustellen war. Möglicherweise könnte dies folgendermaßen erklärt werden: Die Fieberinduktion wird zwar auf dem neuronalen und auf dem humoralen Signalweg übermittelt, aber diese beiden Wege sind nicht „gleichberechtigt“. So scheint es, dass der neuronale Signalweg nur für einen kleinen Teil der Informationsübertragung zum Gehirn verantwortlich ist. Der überwiegende Anteil der Informationen wird über den humoralen Weg übermittelt. Nur wenn die Stärke der humoralen Signalkette gegenüber dem neuronalen Signalweg relativ klein ist, so wie bei Verwendung der niedrigen LPS-Dosis, kann durch Blockade des neuronalen Signalweges die Fieberantwort erniedrigt werden. Auf diese Weise kann auch annäherungsweise der Anteil des neuronalen Signalweges an dem nach LPS-Applikation resultierenden Fieber (Fieberindex) ermittelt werden (siehe Abbildung 73). Diese Vermutung wird durch Studien unterstützt, die an vagotomierten Ratten durchgeführt wurden. Der Nervus vagus stellt die neuronale Komponente des Signalweges der Fieberantwort nach intravenöser, peripherer LPS-Applikation dar. Die Unterbrechung des Nervus vagus führte nur bei Verwendung der niedrigen LPS-Dosis (1µg/kg) zu einer verminderten Fieberantwort.

Bei Verwendung der hohen LPS-Dosis (10+100 µg/kg) war die Fieberantwort hingegen nicht beeinträchtigt (Romanovsky et al. 1997).

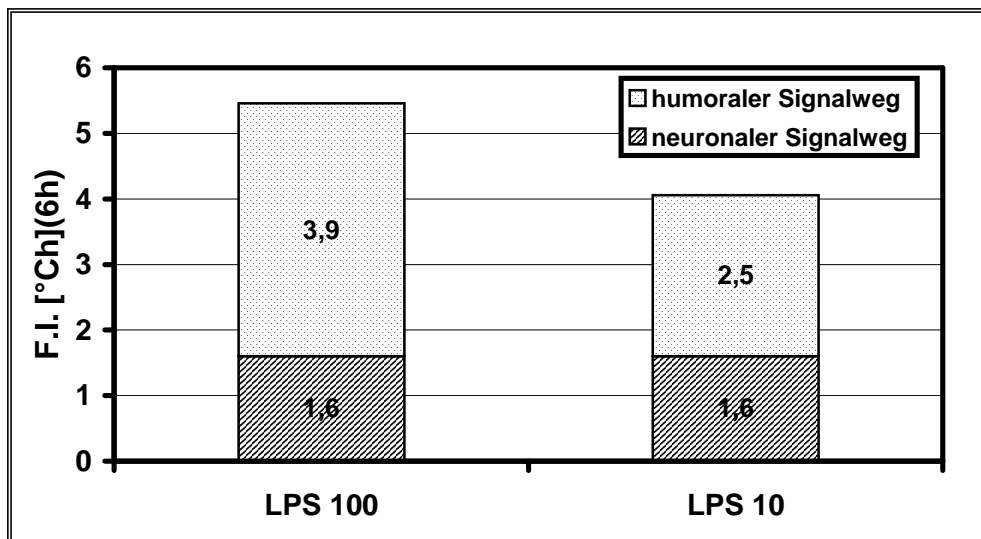


Abbildung 73: relative Beteiligung der humoralen und der neuronalen Signalwege an dem Fieberindex der LPS 100- und der LPS 10-Gruppe. Der im Experiment mit der niedrigen LPS-Dosis (10 µg/kg KG) quantitativ ermittelte Anteil des neuronalen Signalweges wurde für den Fieberindex übernommen, der nach Gabe der hohen LPS-Dosis (100 µg/kg KG) ermittelt wurde

Es stellt sich nun die Frage, wie der oben beschriebene neuronale Signalweg aktiviert wird bzw. auf welchem Weg die afferenten Neurone erregt werden? Diese Frage ist bis heute noch nicht geklärt und deshalb können hier nur Vermutungen geäußert werden. So ist es vorstellbar, dass diese Neurone Bindungsstellen für exogene Pyrogene wie beispielsweise das LPS exprimieren. So existieren auf der Zelloberfläche von Endothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, spezielle LPS-Rezeptoren. Diese Rezeptoren gehören in die Gruppe der Toll-Like-Rezeptoren (TLR; Dinarello et al. 1999). Auch für die endogenen Pyrogene wie IL1, IL6, TNF $\alpha$  und für die diese durch sie freigesetzten Mediatoren (PGEs oder NO) könnten spezifische Bindungsstellen an Neuronen existieren.

Aufgrund des schnellen Anstieges der Körpertemperatur in der Initialphase der Fieberreaktion (30±5 min. nach der LPS-Applikation) müssten die Zytokine IL1, IL6 und TNF $\alpha$  allerdings schon konstitutiv vorhanden sein, ansonsten wäre der schnelle Anstieg des Fiebers nicht zu erklären (Blatteis 2000). Ein möglicher Speicherort für diese bereits vorhandenen Zytokine könnten beispielsweise die Mastzellen darstellen (Gordon et al. 1990).



Die dort gespeicherten Zytokine werden bei der Degranulation der Mastzellen freigesetzt und könnten so unter anderem auch an Rezeptoren von afferenten Neuronen koppeln und diese aktivieren. Nach bisher unveröffentlichten Versuchen von Blatteis scheinen diese von den Mastzellen freigesetzten Zytokine jedoch nicht für die neuronale Aktivierung verantwortlich zu sein. So konnte er an dem Tiermodell Meerschweinchen zeigen, dass nach intravenöser Applikation von LPS ein schneller Anstieg des Fiebers zu beobachten war (frühe Fieberphase), obwohl die Degranulierung der Mastzellen verhindert worden war.

Andererseits wurden IL1-Bindungsstellen im Bereich der Paraganglien, welche mit dem N. vagus assoziiert sind, gefunden (Goehler et al. 1997). Diese Bindungsstellen werden bei intravenös verabreichtem IL1 scheinbar aktiviert, da sich die Aktivität von Afferenzen, welche dem N. vagus zugerechnet werden können, innerhalb kürzester Zeit erhöht (Goehler et al. 1998, Niiijima 1996). Auch bei kutanen Afferenzen, die an dem Phänomen der Hyperalgesie beteiligt sind, wurde das Vorhandensein von IL1 $\beta$ -Rezeptoren nachgewiesen (Fukuoka et al. 1994, Perkins et al. 1994).

Die Rolle von IL6 als Aktivator des neuronalen Signalweges scheint ganz im Gegensatz zu seiner Schlüsselrolle beim humoralen Signalweg eher unbedeutend zu sein (zu TNF $\alpha$  siehe Kapitel 4.2.). Ein weiterer möglicher Inducer des neuronalen Signalweges könnte PGE<sub>2</sub> sein. Aus mehreren Gründen scheint PGE<sub>2</sub> ein erfolgversprechender Kandidat als Aktivator des neuronalen Signalweges zu sein:

- Es wird von allen Makrophagen, einschließlich der Kupffer'schen Sternzellen in der Leber und den Peritonealmakrophagen, synthetisiert.
- Nach LPS-Applikation steigen seine Blutplasmaspiegel schnell an.
- Viele sensorische Neurone (inkl. Afferenzen des N. vagus) besitzen Bindungsstellen für PGE<sub>2</sub> (Ek et al. 1998).

Allerdings ergibt sich auch hier ein ähnliches Problem wie es schon oben für die Zytokine diskutiert wurde. Die durch LPS stimulierte Produktion von PGE<sub>2</sub> in den Makrophagen erfolgt über die Expression des Enzyms COX-2.

Die Transkription und die anschließende Translation dieses Enzyms benötigt mindestens eine Stunde (Lacroix & Rivest 1998). Somit kann PGE<sub>2</sub>, welches über die induzierbare Form des Enzyms (COX-2) gebildet wird, als Inducer des neuronalen Signalweges und damit als Vermittler für das schnelle Einsetzen der Fieberantwort nahezu ausgeschlossen werden.

Aus diesem Grund spielt wahrscheinlich auch NO als Aktivator des neuronalen Signalweges keine Rolle, da auch seine Produktion nach der Applikation von LPS von der Expression der induzierbaren Form der NO-Synthase (iNOS) abhängig ist. Dadurch ergibt sich wiederum eine Latenzzeit bis endogenes NO freigesetzt werden könnte.

Bei dem Aktivator der afferenten Neurone, die an der Signaltransduktion der fieberauslösenden Reize zum Gehirn beteiligt sind, muss es sich also um eine Substanz handeln, die sofort produziert werden kann bzw. deren Freisetzung umgehend ausgelöst wird. Mögliche Kandidaten hierfür sind die Faktoren des Komplementsystems, welches innerhalb weniger Sekunden durch intravenös verabreichtes LPS aktiviert wird (Vukajlovich 1992).

Makrophagen besitzen eine Reihe von Rezeptoren für Komplementfaktoren. So bewirkt z.B. eine Bindung der Komplementfaktoren C3a und C5a an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Kupffer'schen Sternzellen innerhalb von zwei Minuten die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> (Püschel et al. 1993). Bei in vitro Experimenten verursachte die Applikation von C3a und C5a bei Makrophagen die Freisetzung von Zytokinen (Cavaillon et al. 1990). Allerdings benötigt diese Freisetzung einen ähnlichen Zeitraum, der auch für die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung benötigt wird. Somit können die Zytokine wiederum als neuronaler Aktivator ausgeschlossen werden (Blatteis 2000). Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass vor allem der Komplementfaktor C5 an der schnellen Initiierung der Fieberantwort nach der intraperitonealen Applikation von LPS beteiligt ist (Li et al. 2000). Bisher sind aber noch keine Rezeptoren für diesen Komplementfaktor an sensorischen Neuronen bekannt. Allerdings könnte der Komplementfaktor C5 indirekt als neuronaler Aktivator eine Rolle spielen, indem der Faktor C5 die Makrophagen zur Freisetzung von PGE<sub>2</sub> stimuliert. Diese Synthese erfolgt hierbei nicht über die erst zu produzierende induzierbare Cyclooxygenase (COX-2), sondern über die schon vorhandene konstitutive Cyclooxygenase (COX-1).

Auf diesem Weg kann PGE<sub>2</sub>, wie bereits oben erwähnt, innerhalb weniger Minuten in den Makrophagen produziert und anschließend freigesetzt werden. Das nun freigesetzte PGE<sub>2</sub> könnte über den EP3-Rezeptor sensorische Afferenzen aktivieren (Ushikubi et al. 1998). Über den Syntheseweg, der durch die konstitutive Form der Cyclooxygenase katalysiert wird, könnte PGE<sub>2</sub> somit doch als Aktivator des neuronalen Signalweges in Frage kommen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das subkutan verabreichte LPS die Freisetzung eines bisher noch unbekanntes Mediators stimuliert und dieser anschließend direkt oder aber auch indirekt sensorische afferente Neurone aktiviert was letztendlich zur Induktion der Fieberantwort im Gehirn führt. Ein Kandidat hierfür wäre möglicherweise der in seinem Aufbau noch unbekanntes Pre-formed-pyrogenic-faktor (Zampronio et al. 1994b). Dieser bisher unbekanntes Faktor wird von Makrophagen sofort nach dem Kontakt mit LPS freigesetzt und ist an der Induktion der Fieberantwort beteiligt bzw. er stimuliert die Produktion anderer endogener Pyrogene.

Die Tabelle 37 zeigt nochmals eine Liste der möglichen Aktivatoren des neuronalen Signalweges.

Zugehörige Gruppe	Mediator	Aktivator von sensorischen Afferenzen
Zytokine	Interleukin1 $\beta$	-
	Interleukin 6	-
	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$	-
Prostaglandine	PGE <sub>2</sub> (über COX-2)	-
	PGE <sub>2</sub> (über COX-1)	++
Stickstoffmonoxid	NO	-
Komplementfaktor	C5 (nur indirekt via PGE <sub>2</sub> )	++
Unbekanntes Mediator	Faktor X	+

Tabelle 37: Auflistung möglicher Aktivatoren sensorischer Afferenzen nach subkutaner Applikation von LPS und der Wahrscheinlichkeit, mit der sie als solcher agieren (- : negativ; + : Evidenz vorhanden; ++ : sehr starke Evidenz vorhanden)

### Punkt 2: Reduzierung der Fieberantwort aufgrund der systemischen Wirkung des Lokalanästhetikums

Die Vermutung, dass die beobachtete Reduzierung der Fieberantwort nach der subkutanen Applikation der niedrigen LPS-Dosis auf einer systemischen Wirkung des Lokalanästhetikums, wie z.B. auf einer Beeinträchtigung der Herzfunktion (Arlock 1988), beruhte, kann verneint werden. Eine subkutane Injektion des Lokalanästhetikums auf der kontralateralen Körperseite (bezügl. der subkutanen Kammer) in der *Regio femoralis* zeigte keinerlei Auswirkung auf die Fieberantwort, die nach Applikation der niedrigen LPS-Dosis (10 $\mu$ g/kg KG) in die subkutane Kammer gemessen wurde.

Punkt 3: Reduzierung der Fieberantwort aufgrund der inhibitorischen Wirkung des Lokalanästhetikums auf die Produktion bzw. Freisetzung von endogenen Pyrogenen

Eine weitere Möglichkeit, wie das Ropivacain die Fieberantwort beeinflussen könnte, wäre eine inhibitorische Wirkung auf das Immunsystem. So gibt es Hinweise, dass Lokalanästhetika des Amidtyps, denen auch das Ropivacain zuzurechnen ist, die Produktion bzw. die Freisetzung von zahlreichen in Immunzellen gebildeten Substanzen hemmen (Sinclair et al. 1993). Außerdem könnte das Anästhetikum die Chemotaxis bzw. die Migration der Immunzellen in das betroffene Gebiet verhindern (Schmidt et al. 1997). Die Ergebnisse der Ropivacain-Versuchsreihe lassen zwar ebenfalls vermuten, dass das Lokalanästhetikum inhibitorische Wirkungen auf das Immunsystem hat, da es wahrscheinlich zu einer Verminderung der TNF-Aktivität in der subkutanen Kammer führt, aber diese Beobachtung scheint keinen Einfluss auf die Ausprägung der Fieberantwort zu haben. Zweierlei Gründe scheinen hierfür zu sprechen. Erstens konnte im Blutplasma keiner Versuchstiergruppe, die die niedrige LPS-Dosis erhielt, zirkulierendes, biologisch aktives TNF nachgewiesen werden. Zweitens konnte auch in der Tiergruppe, die die hohe LPS-Dosis in Kombination mit Ropivacain erhielt, eine Verminderung der TNF-Aktivität in der Lavage aus der subkutanen Kammer gegenüber der Tiergruppe, die nur die hohe LPS-Dosis erhielt, festgestellt werden, ohne dass aber eine Verminderung der Fieberantwort zu beobachten war.

#### 4.2 Einfluss von TNF-Bindungsprotein auf die Fieberantwort bei einer lokalen peripheren Inflammation

*Die Ergebnisse der TNF-Bindungsprotein-Versuchsreihe können wie folgt zusammengefasst werden: Nach der Applikation von TBP in Kombination mit der niedrigen (10 µg/kg KG) und hohen (100 µg/kg KG) LPS-Dosis konnte gegenüber den Kontrollgruppen keine Reduzierung der entsprechenden Fieberantwort (Vergleich der F.I. 's) beobachtet werden. Nur in einem Zeitfenster von 210 min. bis 360 min. p.i. ergab sich bei Applikation der niedrigen LPS-Dosis in Kombination mit TBP ein niedrigerer Temperaturverlauf gegenüber der Kontrollgruppe. Das TNF-Bindungsprotein neutralisierte nach seiner Applikation in subkutanen Kammer das dort vorhandene TNF nahezu vollständig. Es zeigte aber keinen Einfluss auf die IL6- und Cortisolkonzentrationen.*

Die bereits oben erwähnte Reduzierung des Fiebers bei Verwendung der niedrigen LPS-Dosis in Verbindung mit dem TNF-Bindungsprotein gegenüber der Kontrollgruppe konnte nur in der späten Fieberphase beobachtet werden ( $t > 60$  min.). Somit kann angenommen werden, dass  $\text{TNF}\alpha$  weder direkt noch indirekt an der Aktivierung des neuronalen Signalweges (Induktion der frühen Fieberphase) beteiligt ist (siehe hierzu auch 4.1), sondern  $\text{TNF}\alpha$  eher ein Bestandteil der späten Fieberphase ist. In einer Studie, in der die Bildung von TNF durch Vorbehandlung der Tiere mit Pentoxifylline verhindert wurde, kam es ebenfalls erst in der späten Fieberphase eines LPS-induzierten Fiebers zu einer Reduzierung der Fieberantwort (Goldbach et al. 1997a). Diese Ergebnisse sprechen eher dafür, dass  $\text{TNF}\alpha$  ein Bestandteil der humoralen Signalkette ist. Allerdings kann angenommen werden, dass  $\text{TNF}\alpha$  in dem hier eingesetzten Fiebermodell nur lokal wirkt, da zu keinem Zeitpunkt und in keiner Gruppe biologisch aktives TNF im Blutplasma gemessen werden konnte. Diese Ergebnisse werden auch von einem „Air-pouch-Modell“ beim Meerschweinchen (Roth et al. 2000) und von einem „Air-pouch-Modell“ bei der Ratte (Miller et al. 1997a) gestützt. Wahrscheinlich agiert  $\text{TNF}\alpha$  eher als Inducer anderer endogener Pyrogene, wie z.B. von IL1 (Watkins et al. 1995b), die dann auch in die Zirkulation übertreten und so auf dem humoralen Wege an der Induktion der Fieberantwort beteiligt sind. Die Ergebnisse der TNF-Bindungsprotein-Versuchsreihe deuten darauf hin, dass es sich bei dem durch  $\text{TNF}\alpha$  induzierten endogenen Pyrogen nicht um IL6 handelt, da ein Vergleich der IL6 Konzentrationen weder in Lavage noch im Blutplasma zwischen beiden Gruppen (L10- und L10+TBP) einen Unterschied ergab.

Der Effekt der Fieberreduzierung, der durch die Substanz TBP verursacht wurde, konnte nur bei Verwendung der niedrigen LPS-Dosis beobachtet werden. Bei der Applikation der hohen LPS-Dosis hatte TBP hingegen keinen Effekt auf die Ausprägung der Fieberantwort. Aufgrund der nur schwachen Reduzierung durch die Verwendung von TBP bei der niedrigen LPS-Dosis und einer fehlenden Wirkung in Verbindung mit der hohen LPS-Dosis kann die Bedeutung von  $\text{TNF}\alpha$  (in dem angewandten Modell einer lokalen subkutanen Inflammation aufgrund einer (LPS-Applikation) in seiner Eigenschaft als endogenes Pyrogen als eher gering eingestuft werden. Diese Vermutung steht im Einklang mit Versuchen, die unter Verwendung des „Air-pouch-Modells“ beim Meerschweinchen gemacht wurden (Roth et al. 2000).

#### **4.3 Einfluss von dem kompetitiven Hemmstoff L-NAME auf die Fieberantwort bei einer lokalen peripheren Inflammation**

*Zusammengefasst lassen sich die Ergebnisse der L-NAME-Versuchsreihe wie folgt darstellen: Nach Applikation der hohen LPS-Dosis (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in Kombination mit L-NAME in die subkutane Kammer konnte keine Verminderung des F.I.'s gegenüber der Kontrollgruppe (L100-Gruppe) beobachtet werden. Nur in einem Zeitfenster von 150 min. bis 330 min. p.i. konnte ein niedrigerer Verlauf der Fieberkurve im Vergleich zur Kontrollgruppe verfolgt werden. Nach Gabe der niedrigen LPS-Dosis (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in Kombination mit dem L-NAME konnte die Fieberantwort sogar gänzlich unterdrückt werden. Auffällig war in dieser Versuchsgruppe ein etwa dreifach höherer Cortisolpeak ( $t=180$  min.) gegenüber dem Peak in der Kontrollgruppe. L-NAME zeigte keinen Einfluss auf die untersuchten Zytokine (IL6 und  $\text{TNF}\alpha$ ).*

Es kann vermutet werden, dass die oben beschriebenen Effekte des kompetitiven Hemmstoffes der NO-Synthase auf die Fieberreaktion und auf den Cortisolpeak nicht nur auf der lokalen Wirkung von L-NAME beruhen. So könnte L-NAME von dem lokalen Applikationsort (subkutane Kammer) in den Blutkreislauf übergetreten sein und somit sogar systemische bzw. zentrale Effekte gezeigt haben.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass L-NAME die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Versuche mit verschiedenen Tierarten, unter anderem auch mit Meerschweinchen, zeigten eine Herabsetzung der NOS-Aktivität im ZNS nach peripherer Gabe von L-NAME (Paterson et al. 2000, Traystman et al. 1995).

Aufgrund dieser Annahme hemmte L-NAME also wahrscheinlich nicht nur die lokale Bildung von NO in der subkutanen Kammer, sondern es kam auch zu einer Hemmung der NOS-Aktivität in anderen Körperregionen, wie beispielsweise im Gehirn. Eine mögliche Erklärung, wie die lokale Hemmung der NOS-Aktivität durch L-NAME an der niedrigeren Fieberantwort beteiligt sein könnte, wäre eine verminderte Aktivierung der COX-1/-2 durch NO und die daraus resultierende verminderte Produktion von PGE<sub>2</sub>. Diese indirekt reduzierte PGE<sub>2</sub>-Freisetzung könnte wiederum zu einer verminderten Fieberantwort führen (Salvemini et al. 1994). Zwar scheint eine solche Möglichkeit zu bestehen, aber die in diesem Experiment zu beobachtende Hemmung der Fieberantwort ist wahrscheinlich eher auf die zentralen Effekte von L-NAME zurückzuführen.

Aufgrund der möglichen indirekten Wirkungsweise von NO als Inducer der Fieberantwort (via PGE<sub>2</sub>) und der relativ langen Anlaufphase bis zur Synthese der induzierbaren Form der NO-Synthase, kann angenommen werden, dass NO nur an der Aktivierung des humoralen Signalweges beteiligt ist.

Neben den oben beschriebenen lokalen Effekten sind noch folgende systemische bzw. zentrale Wirkungen einer Hemmung der NOS-Aktivität durch L-NAME anzuführen. Diese Auswahl beschränkt sich auf die Effekte, die auch die Ausprägung einer eventuellen Fieberantwort beeinflussen:

- L-NAME blockiert die durch Noradrenalin induzierte stärkere Durchblutung des braunen Fettgewebes (Nagashima et al. 1994).
- L-NAME führt zu einem stärkeren Blutfluss in den oberflächlichen Gefäßen, wie beispielsweise in den Hautgefäßen, und erhöht damit die Wärmeabgabe (Kajecar et al. 1995).
- Eine Verminderung der Wärmeproduktion von Skelettmuskeln durch die Gabe von NOS-Inhibitoren wurde beschrieben (Perotti et al. 1999).
- L-NAME potenziert die schon durch exogene bzw. endogene Pyrogene induzierte Freisetzung von endogenen Kryogenen (AVP & ACTH) aus dem Hypothalamus. Durch L-NAME wird somit die HPA-Achse aktiviert und es kommt über die Hormone ACTH und CRH zu einer vermehrten Cortisolfreisetzung aus der Nebenniere (Yamamoto et al. 1994, River & Shen 1994, Zeisberger et al. 2000)

Gerade dieser letzte Punkt, eine zusätzliche Aktivierung der HPA-Achse durch L-NAME über die Aktivierung durch die endogenen Pyrogene hinaus, konnte in der L-NAME-Versuchsreihe ebenfalls bei Verabreichung der niedrigen LPS-Dosis in Verbindung mit dem kompetitiven Hemmstoff beobachtet werden (siehe Tabelle 36). Neben der verstärkten Aktivierung der HPA-Achse war gleichzeitig eine nahezu vollständige Unterdrückung der Fieberantwort zu beobachten (siehe Tabelle 36). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese beiden Phänomene in direktem Zusammenhang zueinander stehen. So könnte es durch die zusätzliche Aktivierung der HPA-Achse zu einer vermehrten Freisetzung von endogenen Kryogenen gekommen sein. Die freigesetzten Kryogene könnten dann wiederum zu einer kompletten Fieberunterdrückung geführt haben. Die beobachtete potenzierte Aktivierung der HPA-Achse deutet ebenfalls auf einen Übertritt von L-NAME in den Blutkreislauf bzw. auf seine zentrale Wirkung hin. Bei Verabreichung der hohen LPS-Dosis in Kombination mit L-NAME war der Effekt der gesteigerten Aktivierung der HPA-Achse nicht zu beobachten. Zwar wurde innerhalb eines bestimmten Zeitfensters eine Verminderung der Körpertemperatur gegenüber der Kontrollgruppe (L100-Gruppe) beobachtet, aber es konnte keine Erhöhung von Cortisol im Blutplasma der Tiergruppe, welche LPS in Kombination mit L-NAME injiziert bekam, festgestellt werden. Dieser Umstand kann dadurch erklärt werden, dass L-NAME zu keiner zusätzlichen Aktivierung der HPA-Achse führte, da diese bereits durch LPS bzw. die durch LPS induzierten endogenen Pyrogene maximal stimuliert war. Die niedrige LPS-Dosis führte im Gegensatz zur hohen Dosis zu einer wesentlich moderateren Aktivierung der HPA-Achse (verminderte Cortisolausschüttung), so dass in diesem Fall L-NAME den Effekt auf die HPA-Achse, und damit die Freisetzung von Kryogenen, nochmals steigern konnte.

Abschließend kann nochmals gesagt werden, dass L-NAME wohl nicht an der Aktivierung des neuronalen Signalweges beteiligt ist. Dagegen legen die oben beschriebenen Ergebnisse (Reduzierung der späten Fieberphase durch L-NAME nach subkutaner Applikation der hohen LPS-Dosis) seine Beteiligung an dem humoralen Signalweg nahe.



#### 4.4 Einfluss von dem COX-Inhibitor Diclofenac auf die Fieberantwort bei einer lokalen peripheren Inflammation

*Die Ergebnisse der Diclofenac-Versuchsreihe lassen sich wie folgt zusammenfassen: Sowohl bei Verwendung der hohen (100 µg/kg KG) als auch bei der Verwendung der niedrigen (10 µg/kg KG) LPS-Dosis in Kombination mit Diclofenac konnte die komplette Fieberantwort im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe vollständig unterdrückt werden. Das verabreichte Diclofenac zeigte keine Wirkung auf die HPA-Achse (im Vergleich zur Kontrollgruppe).*

Die vollständige Unterdrückung der Fieberantwort sowohl bei Verabreichung der hohen als auch bei Verabreichung der niedrigen LPS-Dosis zeigt einerseits, was für ein potentes Antipyretikum Diclofenac ist und andererseits die enorme Bedeutung, die PGE<sub>2</sub> bei der Fieberinduktion infolge einer peripheren subkutanen LPS-Applikation spielt. Man könnte nun aufgrund der oben postulierten Signalwege (neuronal → frühe Fieberphase & humoral → späte Fieberphase) und der vollständigen Unterdrückung der Fieberantwort durch Diclofenac vermuten, dass PGE<sub>2</sub> nicht nur in der Induktion der späten Fieberphase eine Rolle spielt, sondern auch bei Vermittlung der frühen, neuronal vermittelten Fieberphase entscheidend mitwirkt (siehe hierzu Punkt 4.1). Allerdings muss bei dieser Schlussfolgerung bedacht werden, dass die vollständige Unterdrückung der Fieberantwort auch eine Folge der systemischen, wahrscheinlicher sogar noch der zentralen Wirkung von Diclofenac war. Ein Übertritt des lokal injizierten Diclofenac in den Blutkreislauf konnte höchstwahrscheinlich nicht verhindert werden. Für den COX-Inhibitor Diclofenac wird ein passiver Transport durch die Blut-Hirn-Schranke beschrieben. Dieser passive Transport geschieht allerdings relativ langsam (Dehouck et al. 1992). So könnte Diclofenac direkt im ZNS die Bildung von PGE<sub>2</sub> verhindern.

Unabhängig von der Art des eingesetzten exogenen Pyrogens (beispielsweise LPS oder MDP) nimmt PGE<sub>2</sub> innerhalb des ZNS eine Schlüsselrolle als Fiebermediator ein und ist für die Hochregulierung des thermoregulatorischen Sollwerts hauptverantwortlich. Für diese Schlüsselrolle von PGE<sub>2</sub> als endogenes Pyrogen innerhalb des ZNS sprechen die schon im Kapitel 1 (Einleitung) unter dem Unterpunkt 1.3.2 angeführten Ergebnisse verschiedener Autoren. Neben dem PGE<sub>2</sub>-abhängigen Weg bei der Fieberinduktion existieren auch noch mehrere PGE<sub>2</sub>-unabhängige Wege.

Die wichtigsten dieser PGE<sub>2</sub>-unabhängigen Wege werden über MIP (Makrophagen-Inflammatorisches-Protein; Davatelis et al. 1989), über Interleukin-8 (IL8; Zampronio et al. 1994a) und über Substanz-P (Szelényi et al. 1997) vermittelt. Aufgrund dieser alternativen Wege lässt sich auch erklären, wieso die sonst so potenten Antipyretika, die auf dem Prinzip der COX-Inhibition basieren, manche Fieberantworten nicht bzw. nur geringfügig senken.

Prostaglandine können wie auch die Zytokine die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden (Abul et al. 1997). Obwohl von verschiedenen Autoren (Milton et al. 1998, Romanowsky et al. 1999, Rotondo et al. 1988) vermutet wird, dass die Quelle für das im ZNS (Cerebrospinalflüssigkeit) nach entsprechender Stimulation (z.B. periphere LPS-Gabe) vorgefundene PGE<sub>2</sub> der Blutkreislauf ist, kann davon ausgegangen werden, dass das im ZNS selbst gebildete PGE<sub>2</sub> von erheblich größerer Bedeutung für die Fieberinduktion ist. So führt beispielsweise eine intrathekale Injektion von LPS zur Ausprägung einer entsprechenden Fieberantwort, ohne dass steigende PGE<sub>2</sub>-Spiegel im Blut zu messen sind. Desweiteren wird sowohl die induzierbare wie auch die konstitutive Form der Cyclooxygenase von Neuronen innerhalb des Gehirns exprimiert und Gliazellen exprimieren unter dem Einfluss von Pyrogenen die induzierbare Form (Zeisberger 2000). Die Resultate aus der Diclofenac-Versuchsreihe stützen ebenfalls die Vermutung, dass PGE<sub>2</sub> eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Fieberantwort innerhalb des Gehirns spielt. So kann man aufgrund unserer eigenen Ergebnisse und der oben beschriebenen Untersuchungen vermuten, dass beide Signalwege (neuronaler und humoraler) einen gemeinsamen Endpunkt innerhalb des ZNS besitzen: die Aktivierung der PGE<sub>2</sub>-Synthese bzw. seiner Freisetzung.

Dadurch ließe sich erklären, weshalb sowohl bei Verwendung der niedrigen wie auch bei Verwendung der hohen LPS-Dosis in Kombination mit Diclofenac die Fieberreaktion komplett unterdrückt werden konnte (siehe Abbildung 74). Bezüglich der Rolle von PGE<sub>2</sub> bei der Aktivierung des neuronalen Signalweges siehe 4.1.

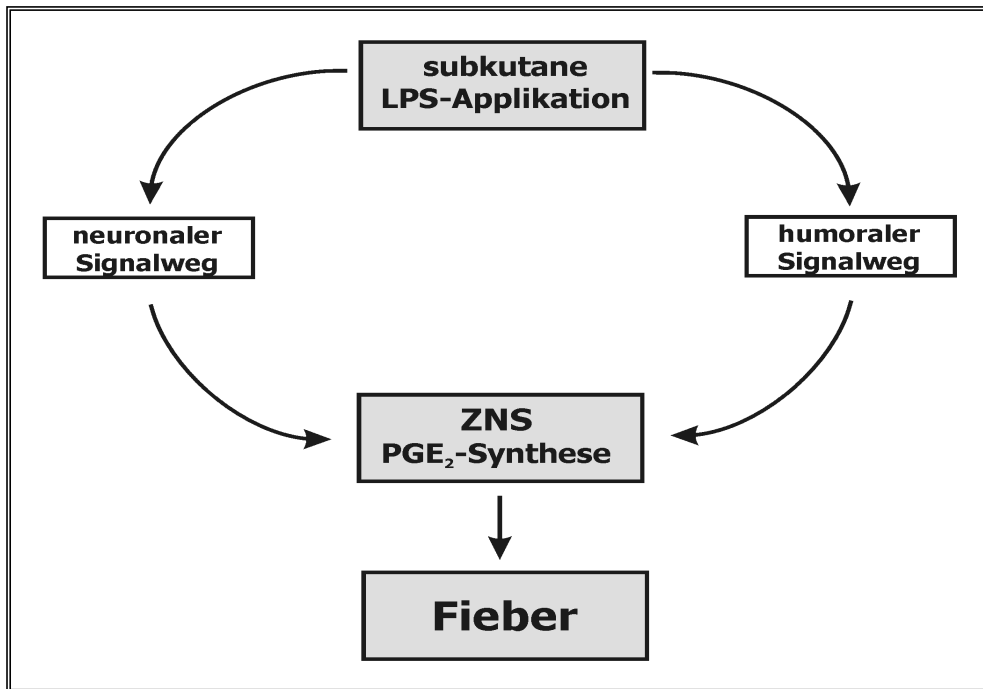


Abbildung 74: Darstellung der zentralen Bedeutung von PGE<sub>2</sub> als Endpunkt des humoralen und neuronalen Signalweges bei der PGE<sub>2</sub>-abhängigen Fieberreaktion

#### 4.5 Schlussbetrachtung

Wie man der Diskussion oben entnehmen kann, handelt es sich bei der Induktion und Regulation der Fieberantwort, die einer peripheren subkutanen LPS-Applikation folgt, um eine sehr komplexe Interaktion zwischen dem Immunsystem einerseits sowie dem peripheren und zentralen Nervensystem andererseits. Für die Kommunikation innerhalb und zwischen den einzelnen Komponenten sind verschiedene Signalwege verantwortlich. Aufgrund der Komplexität und der Notwendigkeit der Forschung am lebenden Organismus gestaltet sich die genaue Erforschung dieser Signalvorgänge als sehr schwierig. So muss man beispielsweise speziesspezifische sowie individual-spezifische Unterschiede berücksichtigen.

Aus diesem Hintergrund heraus ist es natürlich schwierig, einen kleinen, neu entdeckten Teilabschnitt innerhalb des Gesamtbildes richtig, und vor allem auch seiner quantitativen Bedeutung entsprechend, einzuordnen.

Allerdings scheint der propagierte neuronale Signalweg nach einer peripheren Gabe von LPS in ein lokal begrenztes subkutanen Areal eine entscheidende Rolle bei Vermittlung einer Fieberreaktion zu spielen, sofern die applizierte LPS-Dosis nicht so hoch ist, dass die durch LPS induzierten humoralen Signale die Detektion des neuronalen Signalwegs unmöglich machen.

## KAPITEL 5: ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde beim Meerschweinchen (*Cavia aperea porcellus*) ein Experimentalmodell einer lokalisierten subkutanen Entzündungsreaktion mittels einer subkutan implantierten Kammer etabliert. In diese Kammer wurden über einen Katheter inflammatorische Substanzen (bakterielles Lipopolysaccharid, LPS) injiziert und Lavageproben zur Analyse gesammelt. Die durch LPS-Injektion in die subkutane Kammer induzierbare Fieberreaktion wurde unter dem Einfluss des Lokalanästhetikums Ropivacain untersucht. Das Ropivacain wurde in Kombination mit einer LPS-Dosis von 100 µg/kg bzw. von 10 µg/kg in die subkutane Kammer appliziert, wobei das Lokalanästhetikum 30 min. früher als das LPS injiziert wurde. Die eingesetzte Ropivacain-Dosis betrug 10 mg/kg. Das durch 100 µg/kg LPS induzierte Fieber wurde durch die Vorabinjektion von Ropivacain nicht beeinflusst. In der Lavage, welche nach der LPS-Gabe aus der Kammer gewonnen wurde, konnten große Mengen an bioaktivem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Interleukin6 (IL6) bestimmt werden. Vergleichsweise niedrige Konzentrationen (0,5 – 4 % der jeweiligen Lavagekonzentration) beider Zytokine konnten zu denselben Zeitpunkten im Blutplasma gemessen werden. Das durch eine LPS-Dosis von 10 µg/kg induzierte Fieber konnte durch die Vorbehandlung mit dem Lokalanästhetikum auf bis zur 60 % des Fiebers reduziert werden, welches ansonsten bei Applikation dieser LPS-Dosis alleine auftreten würde. Die durch die niedrige LPS-Dosis induzierten Zytokinlevel waren gegenüber den durch die hohe LPS-Dosis induzierten Level signifikant erniedrigt. Das im Blutplasma gemessene TNF lag sogar unterhalb der Nachweisgrenze. Wurde das Ropivacain nicht in die subkutane Kammer, sondern auf die contralaterale Seite subkutan in die *Regio femoralis* appliziert, konnte keine signifikante Reduzierung der Fieberantwort beobachtet werden. Durch diesen Kontrollversuch konnte ausgeschlossen werden, dass die Fieberreduktion auf einer systemischen Wirkung des Lokalanästhetikums beruhte. Diese Ergebnisse belegen eine Beteiligung von afferenten neuronalen Signalen an der Fieberentstehung in diesem Modell. Dieser Effekt ist allerdings nur dann zu beobachten, wenn der gesetzte inflammatorische Stimulus (LPS) nicht so hoch ist, dass eine systemische generalisierte Antwort auf diesen Reiz erfolgt.

Desweiteren wurde die Rolle von anderen möglichen endogenen Fiebermediatoren (TNF, Prostaglandine und NO) in dem eingesetzten Fiebermodell untersucht. Hier wurde entweder ein neutralisierendes TNF-Bindungsprotein, ein kompetitiver Hemmstoff der NO-Synthase (L-NAME) oder aber ein Hemmstoff der Prostaglandinbiosynthese (Diclofenac) verwendet. Die Substanzen wurden bei diesen Versuchen wiederum zusammen mit der hohen bzw. niedrigen LPS-Dosis in die subkutane Kammer appliziert. In den Kontrollgruppen erhielten die Tiere entweder eine LPS-Dosis von 100 µg/kg bzw. 10 µg/kg, oder aber sie bekamen 0,9 % NaCl-Lösung in die subkutane Kammer injiziert.

Durch das TNF-Bindungsprotein konnte das in der Kammer vorhandene biologisch aktive TNF vollständig neutralisiert werden. Die induzierte Fieberantwort bei Verwendung der hohen bzw. der niedrigen LPS-Dosis in Kombination mit dem TNF-Bindungsprotein wurde durch dieses nicht signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe vermindert.

Die Hemmung der NO-Bildung durch die Behandlung mit L-NAME blockierte bei Verwendung der hohen LPS-Dosis Fieberantwort nicht. Hingegen konnte die Fieberantwort erniedrigt werden, wenn die niedrige LPS-Dosis mit L-NAME kombiniert wurde.

Die Injektion des COX-Inhibitors Diclofenac in Kombination mit der hohen bzw. niedrigen LPS-Dosis führte in beiden Fällen zu einer kompletten Unterdrückung der Fieberantwort. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Prostaglandine als eine essentielle Komponente, sowohl des neuronalen als auch des humoralen Signalweges, anzusehen sind, welche an der Übermittlung von peripheren Immunsignalen zum Gehirn beteiligt sind. Eine Beteiligung von NO an diesen Signalwegen scheint zwar wahrscheinlich, aber weniger bedeutend zu sein. Während zirkulierendes TNF an der Induktion der Fieberantwort, welche aufgrund einer systemischen LPS-Applikation verursacht wurde, mitbeteiligt ist, scheint die lokale Bildung von TNF im Rahmen der lokalen subkutanen Entzündung an keinem der Signalwege beteiligt zu sein, die nach der lokalen LPS-Applikation in die subkutane Kammer aktiviert werden.

## KAPITEL 6: SUMMARY

In guinea pigs (*Cavia aperea porcellus*), fever was induced by injections of 100 µg/kg or 10 µg/kg lipopolysaccharide (LPS) into artificial subcutaneous chambers and analysed under the influence of the local anesthetic ropivacaine (ROPI), which was administered into the chamber at a dose of 10 mg/kg 30 min. prior to LPS. In response to injections of 100 µg/kg LPS into the subcutaneous chamber, fever was not modified by pretreatment with ROPI. High amounts of bioactive tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF) and interleukin-6 (IL6) were measured in the lavage of the chambers after administration of LPS. Comparatively low concentrations of both cytokines (0.5 - 4%) of the concentrations in the lavage fluid were detected in blood plasma simultaneously. In response to injections of 10 µg/kg LPS into the subcutaneous chamber, fever was significantly reduced by pretreatment with ROPI to about 60 % of the febrile response of control animals. Levels of TNF and IL6 were lower in response to the reduced dose of LPS. TNF in plasma was even below the limit of detection. The suppression of fever by the local anesthetic was not observed when ROPI was subcutaneously injected into the contralateral site of the chamber position, so that a systemic effect of ROPI in the reduction of fever can be excluded. The results indicate a participation of afferent neural signals in the manifestation of fever. This effect becomes obvious only if the dose of the applied inflammatory stimulus (LPS) is not high enough to activate a systemic generalised inflammatory response. In the following experiments the roles of tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), prostaglandins (PGs) and nitric oxide (NO) in this experimental fever model was investigated. A neutralizing TNF binding protein (TNFbp), or an inhibitor of NO-synthases (N-nitro-L-arginine-methylester, L-NAME), or an inhibitor of cyclooxygenases (diclofenac) was injected along with the high or low dose of LPS into the artificial subcutaneous chamber. In control groups both doses of LPS were administered into the chamber along with 0.9 % saline. The integrated fever responses to the high and low doses of LPS were not significantly attenuated by treatment with TNF bp in spite of a complete neutralization of bioactive TNF within the inflamed tissue area as determined by TNF measurements.

Blockade of NO-formation by the treatment with L-NAME did not alter the febrile response to the high dose of LPS, but significantly attenuated fever induced by the low dose of LPS. Blockade of PG-formation by treatment with diclofenac not only completely abolished fever in response to both applied doses of LPS but even caused a slight hypothermic response. In conclusion, PGs seem to be essential components within the neural and humoral fever pathways from a site of localized tissue inflammation to the brain. A role of NO within these pathways is likely as well but less important. While circulating TNF significantly contributes to fever in response to systemic injections of LPS, the local formation of this cytokine within inflamed subcutaneous tissue seems not to provide a significant contribution within the fever pathways which are activated by localized administration of LPS into artificial subcutaneous chamber.



## KAPITEL 7: LITERATURVERZEICHNIS

- Aarden L., De Groot E., Schaap O., Lansdorp P. (1987). Production of hybridoma growth factors by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **17**, 1411-1416
- Abul S. K., Davidson J., Milton A. S. & Rotondo D. (1997). Prostaglandin E<sub>2</sub> enters the brain following stimulation of the acute phase immune response. IN: Blatteis C. M. (Editor) *Thermoregulation*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **813**, 287-295
- Akira S., Hirano T., Taga T. & Kishimoto T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL6 and related molecules (IL1 and TNF). *FASEB J.* **4** 2860-2867
- Alexander S. J., Cooper K. E. & Veale W. L. (1989). Sodium salicylate: alternate mechanism of central antipyretic action in the rat. *Pflugers Arch.* **413**, 451-455
- Arlock P. (1988). Actions of three local anesthetics: lidocaine, bupivacaine and ropivacaine on guinea pig papillary muscle sodium channels (V<sub>max</sub>). *Pharmacol. Toxicol.* **63**, 96-104
- Bang F.B. (1956). A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **98**, 325
- Banks W. A., Plotkin S. R. & Kastin A. J. (1995). Permeability of the blood-brain-barrier to soluble cytokin receptors. *Neuroimmunomodulation* **2**, 161-165
- Banks W. A. & Kastin A. J. (1996). Reversible association of the cytokines MIP-1 alpha and MIP-1 beta with the endothelia of the blood-brain-barrier. *Neurosci. Lett.* **205**, 202-206
- Breder C. D. & Saper C. B. (1996). Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain. Res.* **713**, 64-69
- Beeson P. B. (1948). Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphnuclear leucocytes. *J. Clin. Invest.* **86**, 39-44
- Bennett I. L. & Beeson P. B. (1953a). Studies of the pathogenesis of fever. I. The effect of injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits. *J. Exptl. Med.* **98**, 477-492
- Bennett I. L. & Beeson P. B. (1953b). Studies in the pathogenesis of fever. II. Characterization of fever-producing substances from polymorphnuclear leukocytes and from fluid of sterile exudates. *J. Exptl. Med.* **98**, 493-508
- Bennett I. L. jr. & Nicastrri A. (1960). Fever as a mechanism of resistance. *Bacteriol. Rev.* **24**, 16-34
- Bernheim H. A., Block L. H. & Atkins E. (1979). Fever: pathogenesis, pathophysiology and purpose. *Ann. Intern. Med.* **91**, 261-270
- Blatteis C. M. & Sehic E. (1997). Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **813**, 445-447

- Blatteis C. M. (2000). Pyrogenic signaling via vagal afferents: what stimulates their receptors? *Auton. Neurosci.* **85**, 66-71 Review
- Bligh J. & Milton A.S. (1973). The thermoregulatory effects of prostaglandins E1 when infused into the lateral cerebral ventricle of the Welsh mountain sheep at different ambient temperatures. *J. Physiol.* **229**, 30-31
- Bligh J. (1998). Mammalian homeothermy: An integrative thesis. *J. Therm. Biol.* **23**, 143-258
- Bluthe R. M., Walter V., Parnet P., Laye S., Lestace J., Verrier D., Poole S., Stenning B. E., Kelley K. W. & Dantzer R. (1994). Lipopolysaccharide induces sickness behavior in rats by a vagal mediated mechanism. *C. R. Academy of Sciences* **317**, 499-503
- Bluthe R. M., Michaud B., Kelley K. W. & Dantzer R. (1996). Vagotomy blocks behavioral effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuro Report* **7**, 2823-2827
- Bortz J. (1989). Statistik. Springer-Verlag, Berlin
- Bouland J. A. (1991). 1. Thermoregulation. IN: ed. Mackowiack P. Fever: Basic Mechanisms and Management. Raven Press Ltd., New York 1-22
- Browning J.L., Ngam-EK A., Lawton P., De Marins J., Tizard R., Chow E.P., Hession C., O'Brine-Greco B., Foley S.F. & Ware C.F. (1993). Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* **72**, 847-856
- Bull D. F., King M. G., Pfister H. P. & Singer G. (1990).  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone conditioned suppression of a lipopolysaccharide induced fever. *Peptides*, **11**, 1027-1030
- Cannon J. G., Granowitz E. V., Dinarello C. A. & Wolff S. M. (1992). Responses of humans to bacterial endotoxin. IN: Neuro-Immunology of Fever, Editors: Bartfai T. & Ottoson D.; Pergamon Press Oxford, pp 97-106
- Cao C., Matsumura K., Yamagata K. & Watanabe Y. (1997). Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am. J. Physiol.* **272**, R1712-R1725
- Chaby R. & Girard R. (1993). Interaction of lipopolysaccharides with cells of immunological interest. *Eur. Cytokine Netw.*, **4**, 399-414
- Cartmell T., Miller A. J., Mistry Y., Rothwell N. J. & Luheshi G. N. (1998). Circulating IL-6 is derived from the site of inflammation in response to a localized injection of lipopolysaccharide in the rat. *J. Physiol.* **513**, 146
- Cartmell T., Poole S., Turnbull A. V., Rothwell N. J. & Luheshi G. N. (2000). Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J. Physiol.* **526**, 653-661
- Cavaillon J. M., Fitting C. & Haeffner-Cavillon N. (1990). Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. *Eur. J. Immunol.* **20**, 253-257

Colotta F., Ghezzi P., Mantovani A. (1998). 1. Interleukin 1. IN: Cytokines; Editor: Mire-Sluis R. A. Academic Press

Cooper K. E., Blähser S., Malkinson T. J., Merker G., Roth J., Zeisberger E. (1988). Changes in body temperature and vasopressin content to brain neurons in pregnant and non-pregnant guinea pigs, during fevers produced by poly I : poly C. *Pflugers Archiv* **412**, 292-296

Cooper A. L., Brouwner S., Turnbull A. V., Luheshi G. N., Hopkins S. J., Kunkel S. L. & Rothwell N. J. (1994). Tumor necrosis factor- $\alpha$  and fever after peripheral inflammation in the rat. *Am. J. Physiol.* **267**, R1431-1436

Davatelis G., Wolpe S. D., Sherry B., Dayer J. M., Chicheportiche R. & Cerami A. (1989). Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science* **243**, 1066-1068

D'Alecy L. G. & Kluger M. J. (1975). Avian Febrile Response. *J. Physiol.* **253**, 223-232

Dehouck M. P., Jolliet-Riant P., Bree F., Fruchart J. C., Cecchelli R. & Tillement J. P. (1992). Drug transfer across the blood-brain barrier : correlation between in vitro and in vivo models. *J. Neurochem.* **58**, 1790-1797

Dinarello C. A., Cannon J. G., Wolff S. M., Bernheim H. A., Beutler B. & Cerami A. (1986 b). Tumor necrosis factor (Cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J. Exp. Med.* **163**, 1433

Dinarello C. A., Gatti S. & Bartfai T. (1999). Fever: Links with an ancient receptor. *Curr. Biol.* **9**, R147-R150

Ehmer B. (1996). *Chirurgie* Schattauer Verlag, Stuttgart

Ek M., Kurosowa M., Lundeberg T. & Ericsson A. (1998). Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 $\beta$ : role of endogenous prostaglandins. *J. Neurosci.* **18**, 9471-9479

Elin R. J. & Wolff S. M. (1974). The role of iron in nonspecific resistance to infection induced by endotoxin. *J. Immunol.* **112**, 737-745

Enayati P. & Fong Y. (1994). Cytokine neutralizing Strategies in experimental sepsis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **388**, 295-306

Eskandari M.K., Nguyen D.T., Kunkel S.L. & Remick D. G. (1990). WEHI 164 subclone 13 assay for TNF: sensitivity, specificity and reliability. *Immunol. Invest.* **19**, 69-79.

Espevik T. & Nissen-Meyer (1986). A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Methods* **95**, 99-105

Evans, T. J., Moyes D., Carpenter, A., Martin, R., Loetscher, H., Lesslauer, W. & Cohen, J. (1994). Potetive effect of 55- but not 75 kDa soluble tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin G fusion proteins in an animal model for gram-negative sepsis. *J. Exp. Med.*, **180**, 2173-2179

- Feldberg W. & Gupta K. P. (1973). Pyrogen fever and prostaglandin activity in cerebrospinal fluid. *J. Physiol.* **228**, 41-53
- Feldberg W., Gupta K. P., Milton A. S. & Wendlandt S. (1973). Effect of pyrogen and antipyresis on prostaglandin activity in cisternal CSF of unanaesthetized cats. *J. Physiol.* **234**, 279-303
- Ferreira S. H., Lorenzetti B. B., Britow A. F. & Poole S. (1988). Interleukin 1 $\beta$  as a potent hyperalgesic agent antagonized by tripeptide analogue. *Nature* **334**, 698-700
- Fiers W. (1991). Tumor necrosis factor: characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Letters* **285**, 199-212
- Fleshner M., Goehler L. E., Schwartz B. A., McGorry M., Martin D., Maier S.F. & Watkins L. R. (1998). Thermogenic and corticosterone responses to intravenous cytokines (IL-1 beta and TNF-alpha) are attenuated by subdiaphragmatic vagotomy. *J. Neuroimmunol.* **86**, 134-141
- Foster L.B. & Dunn R.T. (1974). Single antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum of plasma. *Clin. Chem.* **20**, 365-368
- Freudenberg M.A., Galanos C. (1990) Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanism of action. *Intern Rev Immunol* **6**, 207 – 221
- Fukuoka H., Kawtani M., Hisamitsu T. & Takeshige C. (1994). Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 $\beta$  in the rat. *Brain Res.* **657**,133-140
- Gaykema R. P. A., Dijkstra I. & Tilders F. J. H. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology* **136**, 4717-4720
- Gaykema R. P. A., Goehler L. E., Tilders F. J. H., Bol J. G. J. M., McGorry M., Fleschner M., Maier S. F. & Watkins L. R. (1998). Bacterial endotoxin induces Fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. *Neuroimmunomodulation* **5**, 234-240
- Gearing A.J.H., Cartwright J.E. & Wadhwa M. (1994). 25. Biological and immunological assays for cytokines. In: ed. Thomson A.W. *The Cytokine Handbook*, 2nd edn. Academic Press Ltd., London 507-524
- Gery I. & Waksman B. H. (1972). Potentiation of the T-Lymphocyte response to mitogenes II. The cellular source of potentiating mediators. *J. Exptl. Med.* **136**, 143-155
- Goehler L. E., Busch C. R., Tartaglia N., Relton J., Sisk D., Maier S. F. & Watkins L. R. (1995). Blockade of cytokine induced conditioned taste aversion by subdiaphragmatic vagotomy: Further evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci. Lett.* **185**, 163-166
- Goehler L. E., Relton J. K., Dripps D., Kiechle R., Tartaglia N. Maier S. F. & Watkins L. R. (1997). Vagal paraganglia bind biotinylated Interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain Res. Bull.* **43**, 357-364

- Goehler L. E., Gaykema R. P. A., Hammack S. E., Maier S. F. & Watkins L. R. (1998). Interleukin-1 induces c-Fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. *Brain Res.* **804**, 306-310
- Goldbach J. M., Roth J., Störr B. & Zeisberger E. (1997a). Influence of pentoxifylline on fevers induced by bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in guinea pigs. *Eur. J. Pharmacology* **319**, 273-278
- Goldbach J. M., Roth J. & Zeisberger E. (1997b). Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. *Am. J. Physiol.* **272**, R675-R681
- Gourine A. V. (1995). Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. *Gen. Pharmacol.* **26**, 835-841
- Hansen M. K. & Krueger J. M. (1997). Subdiaphragmatic vagotomy blocks the sleep- and fever-promoting effects of interleukin-1 $\beta$ . *Am. J. Physiol.* **273**, R1246-R1253
- Hansen M. K., Taishi P., Chen Z. & Krueger J. M. (1998). Vagotomy blocks the induction of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1 $\beta$ . *J. Neurosci.* **18**, 2247-2253
- Hellerstein M. K., Meydani S. N., Meydani M. & Dinarello C. A. (1989). Interleukin-1-induced anorexia in rat. *J. Clin. Invest.* **84**, 228
- Hensel H. (1979). Temperaturregulation. In: *Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie* (Herausgeber Wolf D. Keidl). 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Kapitel 9.6.1-9.6.2.
- Horn K. D. (1998). Evolving strategies in the treatment of sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Q. J. Med.* **91**, 265-277
- Ibelgaufts H. (1995). *Dictionary of cytokines*. VCH Verlag, Weinheim 537-538
- Ignarro L. & Murad F. (1995). NITRIC OXIDE Biochemistry, Molecular Biology And Therapeutic Implications. *Adv. in Pharmacology* **34**, 113-152
- IUPS (The Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences; Chairman Simon E.) (1987). Glossary of terms for thermal physiology. *Pflügers Arch* **410**, 567-587
- Jansky L., Vybiral S., Pospisilova D., Roth J., Dornand J., Zeisberger E. & Kaminkova J. (1995). Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. *Neuroendocrinol.* **62**, 55-61.
- Kajecar R., Moore P. K. & Brain S. D. (1995). Essential role for nitric oxide in neurogenic inflammation in rat cutaneous microcirculation. Evidence for an endothelium-independent mechanism. *Circ. Res.* **76**, 441-447
- Kampschmidt R. F. (1978). Leukocytic endogenous mediator. *J. Reticuloendothel. Soc.* **23**, 287-297
- Kluger M. J., Ringler H. D., Anver M. R. (1975). Fever and Survival. *Science*, **188**, 166-168

- Kluger M. J. (1977). Fever in the Frog *Hyla cinerea*. *J. Thermal Biology* **2**, 79-81
- Kluger M. J. (1991). Fever: Role of Pyrogens and Cryogens. *Physiol. Reviews* **71**, 93-127
- Kluger M. J. (1998a). Fever and antipyresis. IN: Sharma & Westman (Editors) *Progress in Brain Research* **115**, 465-475
- Kluger M. J., Bartfai T. & Dinarello C. A. (Editors) (1998b). *Molecular mechanisms of fever*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **586**, 1-308
- Kovacs G. L., Baars A.M. & Wied D. D. (1992). Antipyretic effect of central arginine-vasopressin treatment: V1 receptors specifically involved? *Life Sci.* **50**, 1625-1630
- Kozak W., Conn C. A., Klir J. J., Wong G. H. C. & Kluger M. J. (1995). TNF soluble receptor and antiserum against TNF enhance lipopolysaccharide fever in mice. *Am. J. Physiol.* **269**, R23-29
- Krueger J. M. (1990). Somnogenic activity of muramyl peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 122-126
- Krueger J. M., Toth L. A., & Floyd R. (1994). Sleep, microbes and cytokines. *Neuroimmunomodulation* **1**, 100
- Kuhnen G. (1996). The response of golden hamster to LPS is influenced by the housing conditions. *Pflugers Arch.* **431** [Suppl.], R153
- Lacroix S. & Rivest S. (1998). Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *J. Neurochem.* **70**, 452-466
- Layé S., Bluthé R. M., Kent S., Combe C., Mediana C., Parnet P., Kelley K. & Dantzer R. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 $\beta$  mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am. J. Physiol.* **268**, R1327-R1331
- Leon L. R., Kozak W., Peschon J. & Kluger M. J. (1997). Exacerbated febrile responses to LPS, but not to turpentine, in TNF knockout mice. *Am. J. Physiol.* **272**, R563-569
- Levin J. & Bang F. B. (1964). The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **115**, 265
- Levin J. & Bang F. B. (1968). Coaguable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **19**, 186-197
- Li S., Holers V. M., Boackle S. A. & Blatteis C. M. (2000). Complement fragment 5 (C5) modulates the febrile response of mice to intraperitoneally (ip) administered endotoxin. *FASEB J.* **14**, A86
- Liebermeister C. (1875). *Theorie des Fiebers*. In: Vogel F. C. W. (editor) *Handbuch der Pathologie und Therapie des Fiebers*. Leipzig, 277-384
- Long N. J., Kunkel S. L., Vander A.J. & Kluger M. J. (1990). Antiserum against tumor necrosis factor enhances lipopolysaccharide fever in rats. *Am. J. Physiol.* **258**, R332-R337

- Luheshi G.N. (1998). Cytokines and fever: mechanisms and sites of action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **856**, 83-89
- Maier S. F., Wiertelak E. P., Martin D. & Watkins L. R. (1993). Interleukin-1 mediates the behavioral hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. *Brain Res.* **623**, 321-324
- Maness L. M., Kastin A. J. & Banks W. A. (1998). Relative contributions of a CVO and the microvascular bed to delivery of blood-borne IL-1 alpha to the brain. *Am. J. Physiol.* **275**, E207-E212
- Martin S. M., Malkinson T. J., Veale W. I. & Pittmann Q.L. (1990). Depletion of brain alpha-MSH alters prostaglandin and interleukin fever in rats. *Brain Res.* **526**, 351-354
- Martin L. W. & Lipton J. M. (1990). Acute phase response to endotoxin: rise in plasma alpha-MSH injection. *Am. J. Physiol.* **259**, R768-R772
- Meager A. & Gaines-Das R.E. (1994). International collaborative study of the candidate international standards for human tumor necrosis factor alpha (hTNF $\alpha$ ) and beta (hTNF $\beta$ ) and for murine tumor necrosis factor alpha (mTNF $\alpha$ ). *J. Immunol. Meth.* **170**, 1-13
- Michie H. R., Spriggs D. R., Kanogue K. R., Sherman M. L., Revhaug A., O'Dwyer S., Arthur K., Dinarello C. A., Cerami A., Wolff S. M., Kufed D. W. & Wilmore W. (1988). Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* **104**, 280-286
- Miller A. J., Luheshi G. N., Rothwell N. J. & Hopkins S. J. (1997a). Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to febrile response. *Am. J. Physiol.* **272**, R857-R861
- Miller A. J., Hopkins S. J. & Luheshi G. N. (1997b). Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* **120**, 1274-1279
- Milton A. S. & Wendlandt S. (1971). Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J. Physiol.* **218**, 325-336
- Milton A. S. (1998). Prostaglandins and fever. IN: Sharma H. S., Westman J. (Editors), *Progress in Brain Research 115: Brain Function in Hot Environment*. Elsevier, Amsterdam, 129-139
- Minano F. J., Fernandez-Alonso A., Benanamar K., Myers R. K., Sancibrian M., Ruiz R.M. & Armengol J. A. (1996). Macrophage inflammatory protein-1beta (MIP-1beta) produced endogenously in brain during E. coli fever in rats. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 424-428
- Mire-Sluis A. R., Gaines-Das R. & Thorpe R. (1995). Immunoassays for detecting cytokines: what are they really measuring? *J. Immunol. Meth.* **186**, 157-160
- Moncada S., Palmer R. M. & Higgs E. A. (1991). Nitric oxide, physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142
- Mosmann T. (1983). Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55-63

- Nagashima T., Ohinata H. & Kuroshima A. (1994). Involvement of nitric oxide in noradrenaline-induced increase in blood flow through brown adipose tissue. *Life Sciences* **54**, 17-25
- Nathan C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064
- Neumann H. & Wekerle H. (1998). Neuronal control of immune response in the central nervous system: Linking brain immunity to neurodegeneration. *Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 1-9
- Niijima A. (1996). The afferent discharges from sensors for interleukin 1  $\beta$  in the hepatoportal system in the anesthetized rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* **61**, 287-291
- Novick D., Engelmann H., Wallach D. and Rubenstein M. (1989). Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.*, **170**, 1409-1414
- Oers M., Van der Heyden A. & Aarden L. (1988). Interleukin-6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol.* **71**, 312-318
- Pan W. H., Zadina J.E., Harian R. E., Weber J. T., Banks W. A. & Kastin A. J. (1997). Tumor necrosis factor alpha: a neuromodulator in the CNS. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 603-613
- Paterson S., Zheng Y., Smith P. F. & Darlington C.L. (2000). The effects of L-NAME on vestibular compensation and NOS activity in the vestibular nucleus, cerebellum and cortex of the guinea pig. *Brain Res.* **879**, 148-155
- Perkins M. N. & Kelly D. (1994). Interleukin-1 beta induce Arg9-bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology* **33**, 657-660
- Perotti C. A. A., Nogueira M. S., Antunes-Rodrigues J. & Cárnio E. C. (1999). Effects of neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 1381-1387
- Plotkin S. R., Banks W. A. & Kastin A. J. (1996). Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 alpha across the blood-brain-barrier. *J. Neuroimmunol.* **67**, 41-47
- Pollmächer T., Schreiber W., Gudewill S., Kedeler H., Fassbender K., Wiedeman K. Trachsel L., Galanos L. & Holsboer F. (1993). Influence of endotoxin on nocturnal sleep in humans. *Am. J. Physiol.* **264**, R 1077- R 1083
- Porter M. H., Hrupka B. J. Langhans W. & Schwartz G. J. (1998). Vagal and splanchnic afferents are not necessary for the anorexia produced by peripheral IL-1 beta, LPS and MDP. *Am. J. Physiol.* **275**, R384-389
- Püschel G. P., Hespeling U., Oppermann M. & Dieter P. (1993). Increased prostanoid formation in rat liver macrophages (Kupffer cells) by human anaphylatoxin C3a. *Hepatology* **18**, 1516-1521



- Raetz R. H. Ch., Ulevitch J. R., Wright D. S., Sibley H. C., Aihao D. & Nathan F. C. (1991). Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.* **5**, 2652-2660
- Reimers J. I., Bjerre U., Mandrup-Poulsen T. & Nerup J. (1994). Interleukin 1 beta induces diabetes and fever in normal rats by nitric oxide via induction of different nitric oxide synthases. *Cytokine* **6**, 512-520
- Reynolds W. W., Casterlin M. E. & Covert J. B. (1976). Behavioural fever in teleost fishes. *Nature* **259**, 41-42
- Richardson R.P., Rhyne C. D., Fong Y., Hesse D. G., Tracey K. J., Marano M. A., Lowry S. F., Antonacci A. C., Calvano S. E. (1989). Peripheral blood leukocyte kinetics following in vivo lipopolysaccharide (LPS) administration in normal human subjects. *Ann. Surg* **210**, 239-245
- Rietschel E.T., Kirikae T., Schade U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zähringer U., Seydel U., Di Pavdova F., Schreier M. & Brade H. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**, 217 – 225
- River C. & Shen G. (1994). In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 $\beta$ , vasopressin, and oxytocin. *J. Neurosci.* **14**, 1985-1993
- Roitt M. I., Brostoff J. & Male K. D. (1995). *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York.
- Romanowsky A. A., Simons C. T. Szekely M. & Kulchitsky V. A. (1997). The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. *Am. J. Physiol.* **273**, R407-R413
- Romanowsky A. A., Ivanov A. I. & Karman E. K. (1999). Blood-borne, albumin-bound prostaglandin E<sub>2</sub> may be involved in fever. *Am. J. Physiol.* **276**, R1840-R1844
- Roth J., Conn C.A., Kluger M.J. & Zeisberger E. (1993). Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. *Am. J. Physiol.* **265**, R 653-R 658
- Roth J., McClellan J. L., Kluger M.J. & Zeisberger E. (1994). Attenuation of fever and systemic release of cytokines after repeated injections of bacterial lipopolysaccharide in guinea pigs. *J. Physiol.* **477**, 177-185
- Roth J. (1996). *Mechanismen der Fieberentstehung und der endogenen Antipyrese – ein Experimentalmodell zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Immun- und Nervensystem*. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Roth J., Aslan T., Störr B. & Zeisberger E. (1997). Lack of cross tolerance between LPS and muramyl dipeptide in induction of circulating TNF-alpha and IL-6 in guinea pigs. *Am. J. Physiol.* **273**, R1529-R1533
- Roth J. (1998a). Immunological and neuroendocrine modulation of fever in stress. *J. Prog. Brain Res.* **115**, 177–192

- Roth J., Martin D., Störr B. & Zeisberger E. (1998b). Neutralization of pyrogen-induced tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea-pigs: effects on fever and interleukin-6 release. *J. Physiol.*, **509**, 267-275
- Roth J., Störr B., Voigt K. & Zeisberger E. (1998c). Inhibition of nitric oxide synthase attenuates lipopolysaccharide-induced fever without reduction of circulating cytokines in guinea-pigs. *Pflügers Arch.* **436**, 858-862
- Roth J., Störr B., Voigt K. & Zeisberger E. (1998d). Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin-1 beta-induced fever in rats. *Life Sci.* **62**, PL345-PL350
- Roth J., Störr B., Dave M., Voigt K., Zeisberger E. (2000). The role of local induction of tumor necrosis factor by LPS within a subcutaneous air pouch in the development of a febrile response in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation* **7**, 169-176
- Rotondo D., Abul H. T., Milton A. S. & Davidson J. (1988). Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E<sub>2</sub> in the blood simultaneously with onset of fever. *Eur. J. Pharmacol.* **154**, 145-152
- Sakata Y., Morimoto A., Long N. C. & Murakami N. (1991). Fever and acute-phase response induced in rabbits by intravenous and intracerebroventricular injection of interleukin 6. *Cytokine* **3**, 199-203
- Salvemini D., Seibert K., Masferrer J. L., Misko T. P., Currie M. G. & Needleman P. (1994). Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *J. Clin. Invest.* **93**, 1940-1947
- Scammell T. E., Elmquist J. K. & Saper C. B. (1996). Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. *Am. J. Physiol.* **271**, R333-338
- Schmid H. A., Riedel W. & Simon E. (1998). Role of nitric oxide in temperature regulation. IN: Sharma, H. S., Westman J. (Eds.), *Progress in Brain Research* **115**: Brain Function in Hot Environment. Elsevier, Amsterdam, 87-110
- Schmidt W., Schmidt H., Bauer H., Gebhard M.M. & Martin E. (1997). Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Anesthesiology* **87**, 617-624
- Schöbitz B., Pezeshki G., Pohl T., Hemmann U., Heinrich P. C., Holsboer F. & Reul J. M. H. M. (1995). Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB J.* **9**, 659-664
- Schotanus K., Tilders F. J. H. & Beckenbosch F. (1993). Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist prevents adrenocorticotropin, but not interleukin-6 responses to bacterial endotoxin in rats. *Endocrinology* **133**, 2461-2468
- Sehic E., Székely M., Ungar A. L., Oladehin A. & Blatteis C. M. (1996a). Hypothalamic prostaglandin E<sub>2</sub> during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res. Bull.* **39**, 391-399
- Sehic E. & Blatteis C. M. (1996b). Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Res.* **726**, 160-166

- Shalaby M. R., Waage A., Aarden L. & Espevick T. (1989). Endotoxin, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1 induce interleukin-6 production in vivo. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **53**, 448-498
- Shrader R. E. & Everson G. J. (1968). Intravenous injection and blood sampling using cannulated guinea pigs. *Lab. Anim. Care.* **18**, 214-219
- Shih S. T., Khorram O., Lipton J. M. & Mc Cann S. M. (1986). Central administration of alpha-MSH antiserum augments fever in the rabbit. *Am. J. Physiol.* **250**, R803-R806
- Sinclair R., Eriksson A.S., Gretzer C., Cassuto J., Thomson P. (1993). Inhibitory effects of amide local anesthetics on stimulus induced human leukocyte metabolic activation, LTB<sub>4</sub> release and IL-1 secretion. *Acta Anesthesiol. Scand.* **37**, 159-65
- Solorzano C. C., Kibara A., Hess J. P., Edwards D. P., Ksontini R., Abouhamze A., McDainiel S., Frazier J., Trujillo D., Kieft G., Seely J., Kohno T., Cosenza M., Clare-Salzler M., MacKay S. L. D., Martin S. W., Moldawer L. L. & Edwards III C. K. (1998). Pharmacokinetics, immunogenicity, and efficacy of dimeric TNFR binding proteins in healthy and bacteremic baboon. *J. Appl. Physiol.* **84**, 1119-1130
- Solum N.O. (1970). Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **23**, 170
- Solum N.O. (1973). The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. *Thromb. Res.* **2**, 55
- Szelényi Z., Székely M. & Balaskó M. (1997). Role of substance P (SP) in the mediation of endotoxin (LPS) fever in rats. IN: Blateis C. M. (Editor) *Thermoregulation*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **813**, 316-323
- Traystman R. J., Moore L. E., Helfaer M. A., Davis S., Banasiak K., Williams M. & Hurn P. D. (1995). Nitro-L-arginine analogues. Dose- and time-related nitric oxide synthetase inhibition in brain. *Stroke* **26**, 864-869
- Ulevitch J. Richard & Tobias S. Peter 1994. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 125-130
- Unger M. (1992). Der Einfluß noradrenerger Afferenzen zu hypothalamischen Nucleus paraventricularis auf die Fieberreaktion beim Meerschweinchen (*Cavia aperea porcellus*). Inaugural-Dissertation zur Erlangung eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Ushikubi F., Segi E., Sugimoto Y., Murato T., Matsuoka T., Kobayashi T., Hizaki H., Tuboi K., Katsuyama M., Ichikawa A., Tanaka T., Yoshida N. & Narumiya S. (1998). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP 3. *Nature* **395**, 281-284
- Van der Gulden W. J. I., van Hooijdonk C.L., De Jong P. & Kremer A. K. (1975). *Versuchstiere und Versuchstiertechnik*. Gesellschaft für Versuchstierkunde, Basel
- Van Zee K.J., De Forge L. E., Fischer E., Marano M. A., Kenney J. S., Remick D. G., Lowry S. F. & Moldawer L. L. (1991). IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J. Immunol.* **146**, 3478-3482

- Vane J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* **23**, 232-235
- Vane J. R. & Botting R. M. (1998). Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int. J. Tissue React.* **20**, 3-15
- Vaughn K. L., Bernheim H.A., Kluger M.J. (1974). Fever in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Nature* **252**, 473-474
- Vukajlovich S. W. (1992). Interactions of LPS with serum complement. IN: Ryan J. L., Morrison J. M. (Eds.) *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*, vol. II. CRC, Boca Raton, 213-235
- Wan W., Wetmore L., Sorensen C. M., Greenberg A. H. & Nance D. M. (1994). Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. *Brain Res. Bull.* **34**, 7-14
- Watkins L. R. Wiertelak E.P., Goehler L. E., Mooney-Heiberger K., Martinez J., Furness L., Smith K. P. & Maier S. F. (1994a). Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Res.* **639**, 283-299
- Watkins L. R., Wiertelak E. P., Goehler L. E., Smith K. P., Martin D. & Maier S. F. (1994b). Characterization of cytokine induced hyperalgesia. *Brain Res.* **654**, 15-26
- Watkins L. R., Goehler L. E., Relton J. K., Tartaglia N., Silbert L., Martin D. & Maier S. F. (1995a). Blockade interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: Evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci. Lett.* **183**, 27-31
- Watkins L. R., Goehler L. E., Relton J., Brewer M. T. & Maier S. F. (1995b). Mechanisms of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) hyperalgesia. *Brain Res.* **692**, 244-250
- Weihrauch D. & Riedel W. (1997). Nitric oxide (NO) and oxygen radicals, but not prostaglandins, modulate fever. *Ann. NY Acad. Sci.* **813**, 373-382
- Wilk W. (1988). Familie Meerschweinchen (*Cavia*) In: ed. Wiesner E. *Kompendium der Heimtierkrankheiten*, Bd. 1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 30-37.
- Wulf H., Petry A., Gödicke J. (1993). Die Potentialabhängigkeit der Wirkung von Bupivacain und Ropivacain am Herzen. *Anaesthesist* **42**, 516-520
- Yamamoto T., Kimura T., Ota K., Sholi M., Inoue M., Otha M., Sato K., Funyu T. & Abe K. (1994). Effects of nitric oxide synthase inhibition on vasopressin and atrial natriuretic hormone release, thermogenesis and cardiovascular functions in response to interleukin-1 $\beta$  in rats. *Tokoku J. Exp. Med.* **174**, 59-69
- Young N. S., Levin J. & Prendergast R. A. (1972). An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. *J. Clin. Invest.* **51**, 1790
- Zampronio A. R., Souza G. E. P., Silva C. A. A., Cunha F. Q. & Ferreira S. H. (1994a). Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. *Am. J. Physiol.* **266**, R1670-R1674

Zampronio A. R., Melo M. C. C., Silva C. A. A., Pelá I. R., Hopkins S. J. & Souza G. E. P. (1994b). A pre-formed pyrogenic factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. *Mediators Inflamm.* **3**, 365-373

Zeisberger E. & Roth J. (1998). Tolerance to pyrogens In: Kluger M. J., Bartfai T., Dinarello C. A. (Editors), *Molecular Mechanisms of Fever*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **856**, 116-131

Zeisberger E. (2000). From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J. Thermal. Biol.* **00**, 1-40 (Review)

Zetterström M., Sundgren-Andersson A. K., Östlund P. & Bartfai T. (1998). Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in Fever induction. In: Kluger M. J., Bartfai T., Dinarello C. A. (Editors), *Molecular Mechanisms of Fever*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **856**, 48-52

## DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt dem „Team Zeisberger“, denn ohne die umfangreiche Unterstützung wäre diese vorgelegte Arbeit nicht entstanden, beziehungsweise es hätte unheimlich viele Mühen mehr gekostet. In jeder Phase der Arbeit habe ich eine außerordentlich intensive und vorbildliche Betreuung erfahren. In diesem Team herrschte immer eine sehr angenehme Atmosphäre, in welcher auch die nicht ganz so wissenschaftlichen Dinge des Lebens einen wichtigen Stellenwert hatten.

Bei Herrn Prof. Dr. Eugen Zeisberger möchte ich mich für die Aufnahme in dieses Team und für die Themenstellung und bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. Joachim Roth für die exzellente Einarbeitung in die Thematik bedanken. Darüber hinaus stand mir Joachim immer mit Rat und Tat zur Seite und sorgte wie ein Leuchtturm dafür, dass man die „Untiefen der Thermoregulation“ umschiffte und auf Kurs blieb. Wesentlich zum Gelingen der Arbeit hat auch Frau Birgit Störr beigetragen. Sie hat mich fachkundig und jederzeit hilfsbereit in die Methodik eingearbeitet und mir bei manchen praktischen und computerbedingten Problemen „Erste-Hilfe“ geleistet. Bei meinem Betreuer im Fachbereich der Veterinärmedizin, Herrn Prof. Dr. Martin Diener, möchte ich mich für die Vertretung der Arbeit im Fachbereich bedanken. Den oben genannten Personen bin ich desweiteren für die unerschrockene und kritische Durchsicht des Manuskriptes sehr dankbar.

Allen anderen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der JLU-Gießen, einschließlich den Tierpflegern, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und der Werkstatt, voran Herrn Günter Schade, für die prompte Anfertigung der benötigten Verweilkatheter, subkutanen Kammern usw..

Meiner Freundin Karen möchte ich insbesondere für ihre Geduld und liebevolle Betreuung vor allem in der Abschlussphase dieser Arbeit danken. „Last but not least“ gilt meinen Eltern meine tiefe und innige Dankbarkeit, die nicht nur durch ihre finanzielle Unterstützung, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.