

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und operative
Intensivmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. J. Radke)



**Der Einfluss von Hyperthermie auf die intrazelluläre
Expression proinflammatorischer Zytokine in menschlichen
Monozyten**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor med.

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Jasmina Končar-Zeh
geboren am 05.08.1969 in Hamburg

Gutachter: Frau Prof. Dr. med. B. Seliger (Halle)
Herr Prof. Dr. med. I. Radke (Halle)
Herr Prof. Dr. med. M. Baier

Verteidigungsdatum 07.11.05

urn:nbn:de:gbv:3-000009958

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009958>]

За тою татү

Referat und bibliographische Beschreibung

Der Einfluss von Fieber auf Abwehrzellen der frühen nichtadaptiven Immunantwort ist weitgehend unbekannt. Monozyten gelten hierbei als Hauptproduzenten der wichtigen proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF α .

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob Hyperthermie die intrazelluläre Expression von IL-6, IL-8 und TNF α in LPS-stimulierten menschlichen Monozyten beeinflusst. Ein *in vitro*-Modell zur Simulation einer schweren Infektionssituation auf zellulärer Ebene wurde entwickelt. Das Vollblut 12 gesunder Männer (Durchschnittsalter 30 Jahre) wurde nach Stimulation mit LPS (10 ng/ml) bei 37, 39 oder 42°C für 1, 2, 3 oder 6 h inkubiert. Anschliessend erfolgte nach Oberflächenmarkierung der Monozyten und Zytokin-Antikörper-Färbung die Messung der intrazellulären Expression von IL-6, IL-8 und TNF α im Durchflusszytometer. Als Kontrollgruppe diente Vollblut, welches lediglich Temperatur ohne LPS-Stimulation ausgesetzt wurde.

Als wesentliches Untersuchungsergebnis der reproduzierbaren Methodik ist anzusehen, dass Hyperthermie in Monozyten nur in Anwesenheit von LPS die Zytokinexpression moduliert. Insgesamt wurde bei Hyperthermie *in vitro* eine niedrigere Expressionsrate von IL-6, IL-8 und TNF α unter LPS-Stimulation gegenüber Normothermie registriert. Für TNF α und IL-8 lässt sich *in vitro* in Monozyten nach 1 h, für IL-6 nach 2 h Stimulation mit LPS eine Expression nachweisen. Dieser Expressionsbeginn stellte sich als temperaturunabhängig dar. Darüber hinaus war eine differente Beeinflussung der Expression von IL-6, IL-8 und TNF α in LPS-stimulierten Monozyten bei Hyperthermie (39 und 42°C) zu konstatieren. Während die IL-6-Expression proportional zur Stimulationsdauer auch bei Temperaturanstieg zunahm, stagnierte die Expression von IL-8 und TNF α nach 2, beziehungsweise 3 h sowohl bei 39 als auch bei 42°C. Hypothetisch könnte eine persistierende IL-6-Expression der Induktion weiterer Immunkaskaden (Akute Phase-Reaktion) dienen und ein Verhalt der TNF α -Expression direkte zytotoxische Effekte verhindern. Die sich daraus ergebende Frage, ob in der Frühphase einer Sepsis die exogene Temperatursenkung prognoseverbessernd wäre, kann nur durch fortführende Untersuchungen auf zellulärer Ebene geklärt werden.

Končar-Zeh, Jasmina

Halle, Martin-Luther-Universität, Medizinische Fakultät, Dissertation, 60 Seiten, 2005

INHALTSANGABE

1.	Einleitung	S. 1
1.1.	Vorbemerkungen	S. 1
1.2.	Erregeridentifikation und Zytokinsynthese durch Monozyten	S. 2
1.3.	Pathophysiologie des Fiebers	S. 6
2.	Zielstellung	S. 9
3.	Material und Methoden	S. 10
3.1.	Theorie der Methode	S. 10
3.1.1.	Durchflusszytometrie	S. 10
3.1.2.	Stimulation und Aufbereitung der Monozyten	S. 13
3.1.3.	Lebend-Tod-Färbung mit Propidiumjodid	S. 14
3.2.	Durchführung der Methode	S. 15
3.2.1.	Vorbedingungen	S. 15
3.2.2.	Protokoll der „Infektionsgruppe“	S. 16
3.2.3.	Protokoll der Kontrollgruppe	S. 18
3.3.	Statistische Auswertung	S. 19
4.	Ergebnisse	S. 20
4.1.	„Infektionsgruppe“ mit LPS- und Temperaturstimulation	S. 20
4.1.1.	Interleukin-6 (IL-6)	S. 20
4.1.2.	Tumor Nekrose-Faktor α (TNF α)	S. 22
4.1.3.	Interleukin-8 (IL-8)	S. 24
4.1.4.	Lebend-Tod-Detektion mit Propidiumjodid	S. 26
4.2.	Kontrollgruppe mit Temperaturstimulation	S. 27
5.	Diskussion	S. 28
5.1.	Diskussion der Methode	S. 28
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	S. 30

5.2.1	Allgemeine Veränderungen der Zytokinexpression unter dem Einfluss von Temperatur in der „Infektionsgruppe“	S. 30
5.2.2.	Allgemeine Veränderungen der Zytokinexpression unter dem Einfluss von Temperatur in der Kontrollgruppe	S. 33
5.2.3.	Spezielle Betrachtung der Kinetik von IL-6, IL-8 und TNF α	S. 34
6.	Schlussfolgerungen	S. 39
7.	Zusammenfassung	S. 40
8.	Literaturverzeichnis	S. 41
9.	Anlagen	S. 52
9.1.	Tabelle 1: IL-6-Kinetik nach LPS-Stimulation	
	Tabelle 2: Multivarianzanalyse von IL-6	S. 52
9.2.	Tabelle 3: TNF α -Kinetik nach LPS-Stimulation	
	Tabelle 4: Multivarianzanalyse von TNF α	S. 53
9.3.	Tabelle 5: IL-8-Kinetik nach LPS-Stimulation	
	Tabelle 6: Multivarianzanalyse von IL-8	S. 54
9.4.	Tabelle 7: Zytokinexpression nach 1 h LPS-Stimulation	S. 55
9.5.	Tabelle 8: Zytokinexpression nach 2 h LPS-Stimulation	S. 56
9.6.	Tabelle 9: Zytokinexpression nach 3 h LPS-Stimulation	S. 57
9.7.	Tabelle 10: Zytokinexpression nach 6 h LPS-Stimulation	S. 58
9.8.	Tabelle 11: Zytokinexpression ohne LPS-Stimulation	
	Tabelle 12: Zelltoddetecktion mit Propidiumjodid	S. 59
10.	Thesen	S. 60

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

Abb.	Abbildung
ADC	Analog-Daten-Converter
AK	Antikörper
BLP	siehe LBP
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ED	Effektive Dosis
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	et aliter
Fig.	Figur
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward scatter
h	Stunde
Hrsg.	Herausgeber
HSP70	Heat-Shock-Protein 70
IgG _{2aκ}	Immunglobulin G _{2aκ}
IκB	Inhibitor of κB
IKKβ	Inhibitor of κB Kinase β
IL-1α+β	Interleukin-1 alpha und beta
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
i.p.	intraperitoneal
IRAK 1+2	Interleukin 1+2-Receptor-Associated Kinase
Kat.-Nr.	Katalog-Nummer
LAL- Test	Limulus-Amöben-Test
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LBP	Lipopolysaccharid-Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAPKK	mitogenaktivierte Proteinkinase

mCD14	membrangebundener Cluster of differentiation 14
Med	Median
MFI	mean fluorescence index (Produkt aus prozentpositiven Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität (mean)/100)
μl/ml	Mikroliter/Mililiter
Min	Minute
MyD88	Myeloid Differentiation-Factor 88
NFκB	Nuklear Factor-κappa B
ng/ml	Nanogramm/Mililiter
nm	Nanometer
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
P	Proband
p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PE	Phycoerithrin
PGE ₂	Prostaglandine der Klasse E ₂
PI	Propidiumjodid
PMN	polymorphkernige Granulozyten
S.	Seite
SEM	Standard error of the mean
SSC	Side scatter
t	Temperatur
t-T	Student'scher t-Test; Bezug zum vorigen h-Wert
t-T37	Student'scher t-Test; Bezug zum 37°C-Wert
T _c	Körperkerntemperatur
TIRAP	Toll/Interleukin-1-Receptor-domain-containing Adaptor Protein
TLR2/ MD-2	transmembranöser Toll-like-2/Adapterprotein 2-Rezeptorkomplex
TLR4/MD-2	transmembranöser Toll-like-4/Adapterprotein 2-Rezeptorkomplex
TNFα	Tumor Nekrose-Faktor alpha
TOLLIP	Toll-Interacting Protein
TRAF-6	TNF-Receptor-Associated Factor-6
©	Copyright
%	Prozent
®	registered
™	Trade mark

EINLEITUNG

1.1. Vorbemerkungen

Die bis heute gültige Definition von Fieber wurde von C. Liebermeister bereits 1887 formuliert. Demnach stellt Fieber eine regulierte Anhebung der Körperkerntemperatur (T_C) dar, welche über Normothermie hinausgeht. Die Grenzen des normothermen Bereichs sind abhängig von der zu betrachtenden Spezies. Beim Menschen liegen sie zwischen 36,1 und 37,7°C.

Fieber als Abwehrreaktion auf eine Erkrankung entsteht in vielen Arten und scheint für die Beherrschung einer bakteriellen Infektsituation einen wichtigen Stellenwert einzunehmen. Einige Untersucher konnten nach induzierter bakterieller Infektion bei Warm- und Kaltblütern eine verbesserte Überlebenschance feststellen, wenn sie ihnen die Fieberentwicklung ermöglichten (Covert et al., 1977; Yerushalmi et al., 1980). Nach Auffassung dieser Autoren stellt Fieber ein evolutionär erfolgreiches Konzept dar, welches unter hohem Energieverbrauch stattfindet. Einige Vogel- und Säugerarten erfahren während der Anhebung ihrer T_C um 2-3°C über Normothermie eine Zunahme ihres Energieverbrauchs von mehr als 20% (Kluger et al., 1997).

Beim Menschen nimmt Fieber als oft einziges klinisches Zeichen der Frühphase einer Infektion eine wichtige Rolle für die Diagnosestellung ein.

Klinisch unterscheidet man Fieber beim Menschen nach drei Kategorien:

- **Akutes Fieber** als plötzliche T_C -Erhöhung über 37,8°C, zumeist begleitet von Schüttelfrost und assoziiert mit einer Infektion.
- **Chronisches Fieber** als T_C -Erhöhung über 37,8°C für mehr als 3 Wochen, oftmals im Rahmen einer chronischen Erkrankung.
- **Fieber unbekannter Herkunft** (fever of unknown origin) als T_C -Erhöhung über 38,3°C und länger als 3 Wochen, nach erfolgloser Ausschöpfung der Fieberdiagnostik (Henker et al., 1997).

Welchen Einfluss eine Veränderung der T_C auf die Abwehrfunktion von Zellen des Immunsystems ausübt, ist vor allem beim Menschen weitgehend unbekannt. Besonderes

Interesse gilt hierbei einer Gruppe von Abwehrzellen des frühen nichtadaptiven Immunsystems, den Monozyten. Charakteristisch für die frühe nichtadaptive Abwehrphase ist die stereotype Abfolge ohne Ausbildung eines Immungedächtnisses.

1.2. Erregeridentifikation und Zytokinsynthese durch Monozyten

Monozyten entstammen mit den polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle. Beide bilden eine Subgruppe der Leukozytenpopulation, wobei der monozytäre Anteil im zirkulierenden Blut in der Regel 3-8% beträgt. Aufgrund ihrer Differenzierungspotenz sind Monozyten in der Lage, sich in der Phase der frühen nichtadaptiven Immunantwort während ihrer Wanderung (Diapedese) vom Blut zum Ort der Gewebsinfektion in Makrophagen umzuwandeln (Ebnet et al., 1996; Janeway (Herausgeber (Hrsg.)) et al. 1997; Netea et al., 2000). Die Diapedese wird unter anderem durch das monozytär gebildete Zytokin Interleukin(IL)-8 ermöglicht. IL-8 ist als sogenanntes Chemokin vor allem in der Lage, auf PMN chemotaktisch zu wirken und diese zum Ort der Infektion zu dirigieren (Bignold, 1988).

Die Voraussetzung für die Initiation der Fieberkaskade im Rahmen der frühen nichtadaptiven Immunantwort ist die Fähigkeit von Monozyten und anderen Abwehrzellen wie den PMN und Makrophagen, einen pathogenen Keim zu identifizieren.

Die Keimidentifikation durch Monozyten erfolgt beispielsweise durch zirkulierendes Lipopolysaccharid (LPS), welches sich auf der äusseren Hülle gramnegativer Bakterien befindet. LPS lässt sich strukturell in 3 Komponenten unterteilen. Die membranintegrierte Komponente Lipid A bildet nach Penetration des Erregers ins Blut einen Komplex mit dem im Plasma zirkulierenden Akute Phase-Protein Lipopolysaccharid-Binding Protein (LBP). Lipid A und LBP binden sich im Folgenden an den zu 92-95 Prozent (%) monozytenspezifischen Oberflächenrezeptor membrangebundener (m) Cluster of differentiation(CD)14 (Zellner et al., 2002). Der nun entstandene Ligand-Rezeptorkomplex aktiviert im Weiteren die monozytäre Zytokinsynthese (Tanamoto et al., 1984; Joiner et al., 1984; Schütt, 1999; Ingalls, 1999; Bueno et al., 2001).

Die Synthese von Zytokinen erfolgt in der Frühphase einer generalisierten Infektion vornehmlich in Monozyten (Cohen et al., 1974; Balkwill et al., 1989; WHO IUIS, 1992; Havemann JW et al., 1999; Loppnow, 2001). Interleukin(IL)-1 β , IL-6, IL-8 und Tumor Nekrose-Faktor(TNF) α gehören dieser Familie an.

Zytokine sind pleiotrope regulatorisch wirkende Proteine, welche auch von einer Reihe weiterer Zellen gebildet werden. Produktion und Ausschüttung dieser Substanzen ermöglichen die Aktivierung der Fieberkaskade sowie die nachfolgende zentrale T_C-Regulation.

IL-6 stösst unter anderem die Akute Phase-Reaktion an (Gabay et al., 1999; Cartmell et al., 2000; Ostberg et al., 2000). Die Induktion dieser Kaskade stellt die Voraussetzung für das Funktionieren der späten Abwehrphase dar.

TNF α wird als erstes Zytokin nach Infektion mit bakteriellen Erregern in den Abwehrzellen der frühen nichtadaptiven Immunantwort, den Monozyten, gebildet. Es regt nachfolgend die Expression anderer Zytokine wie IL-6 und IL-8 an.

IL-8 stellt als Chemokin einen wichtigen Mediator der frühen nichtadaptiven Immunantwort dar. Wie bereits erwähnt, besteht eine Hauptaufgabe dieses proinflammatorischen Zytokins darin, PMN chemotaktisch zum Ort der Infektion zu geleiten (Zeilhofer et al., 2000). Zudem induziert IL-8 den „oxidative burst“ in PMN, wobei Stickoxid, Sauerstoffradikale und andere Substanzen zur Erregerbekämpfung freigesetzt werden. IL-8 verbessert die Leukozytenadhäsion am Endothel (Baggiolini et al., 1993) und hemmt möglicherweise im Verlauf des septischen Geschehens eine weiter zunehmende PMN-Aktivitätssteigerung (Darbonne et al., 1991).

Entscheidend für einen möglichen Zusammenhang von IL-8 und Fieber ist die Entdeckung Zampronios (1994), dass zentral injiziertes IL-8 in der Lage ist, Fieber eigenständig über einen Prostaglandin(PG)_{E2}-abhängigen Mechanismus zu induzieren.

Die genaue Abfolge der Signaltransduktion in Monozyten nach Infektion mit gramnegativen Erregern ist nicht vollständig bekannt. Ein möglicher Aktivierungsweg wird im Folgenden beschrieben (siehe Seite (S.) 5, Abbildung (Abb.) 1):

- Komplexbildung von LPS und im Plasma gelösten LBP an mCD14 über die Lipid A-Komponente (Kansas et al., 1990; Stelter et al., 1997; Heidenreich, 1999; Opal et al., 1999).

- Ankopplung des mCD14-LPS-LBP-Gebildes an den transmembranösen Toll-like Rezeptor(TLR)4/ Adaptorprotein(MD) 2-Komplex entweder als Ligandenbindung oder über den Einbau in die Plasmamembran des Monozyten (Shimazu et al., 1999; Dobrovolskaja et al., 2002; Erridge et al., 2002).
- Auf der intrazellulären Seite des TLR4 wird im folgenden ein Signal-Komplex aus den dort angelagerten Adaptor-Proteinen MyD88, Toll/IL-1-Rezeptor-domain-containing Adaptor-Protein (TIRAP) und Toll-Interacting Protein (TOLLIP) gebildet. Dieser Komplex leitet die Phosphorylierung der Interleukin-Rezeptor-Assoziierten Kinase(IRAK)-1/2 und des TNF-Rezeptor-Assoziierten Faktor(TRAF)-6 ein.
- Die Aktivierung von IRAK und TRAF-6 führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung des Nuklear Faktor(NF) κ B2/Rel-Protein A-Komplexes (p52/p65) über die Phosphorylierung des Inhibitor of κ B Kinase β (IKK β ; kanonischer Weg). Dieser degradiert rasch den NF κ B-deaktivierenden Inhibitor of κ B (I κ B). Dabei kommt es zu einer Phosphorylierung durch Poly-Ubiquitination von I κ B, welches dem inaktiven NF κ B angelagert ist.
- Die Translokation des nun aktiviertem NF κ B in den Nukleus zieht im Weiteren die Transkription, Translation und posttranslationale Regulation proinflammatorischer und pyrogener Zytokine wie IL-6 und TNF α nach sich (Senfleben et al., 2002).
- Die Synthese von IL-8 nach bakterieller Stimulation erfolgt in Monozyten direkt über die Aktivierung des IL-8-Genes durch bakterielle Endotoxine wie LPS (Wang et al., 2000). Die Einleitung der Synthese ist aber auch indirekt durch eine Bindung von LPS an die membranständigen IL-1 β - und TNF α -Rezeptoren möglich. Hierbei kommt es im weiteren Verlauf laut Hoffmann et al. (2002) zu einer intrazellulären Oligomerization von TRAF-2 (über den IL-1 β -Rezeptor) und TRAF-6 (über den TNF α -Rezeptor). Dieser Schritt führt ebenfalls zu einer Aktivierung von NF κ B und dessen Translokation in den Nukleus.
- Dort kommt es zu einer Anheftung der aktivierten p65-Untereinheit von NF κ B an den IL-8-Promotor. An letzteren gebunden sind die IL-8-Synthese-Regulatorproteine Activating Protein (AP)-1 und NF κ B Repressing Factor (NRF).
- Über noch unverstandene Mechanismen führt die Aktivierung des IL-8-Gen-Promotors schliesslich zu der Transkription von IL-8. Nach Bildung des

Transkriptats soll die mRNA-Stabilisierung in Monozyten durch die Mitogen-Aktivierte Proteinkinase (MAPK) erfolgen, wahrscheinlich hauptsächlich durch die p38 MAPK (Suzuki et al., 2000)

- Weitere Transkriptions- und Regulationsmechanismen von IL-8 in Monozyten sind offenbar von der Art des Stimulans abhängig (Scherle et al., 1998; Warny et al., 2000). So vermuten Dziarski et al. (2000) den Beginn der IL-8-Synthese nach LPS-Stimulation in Monozyten am ehesten über die Aktivierung des transmembranösen TLR2/MD2-Komplexes.

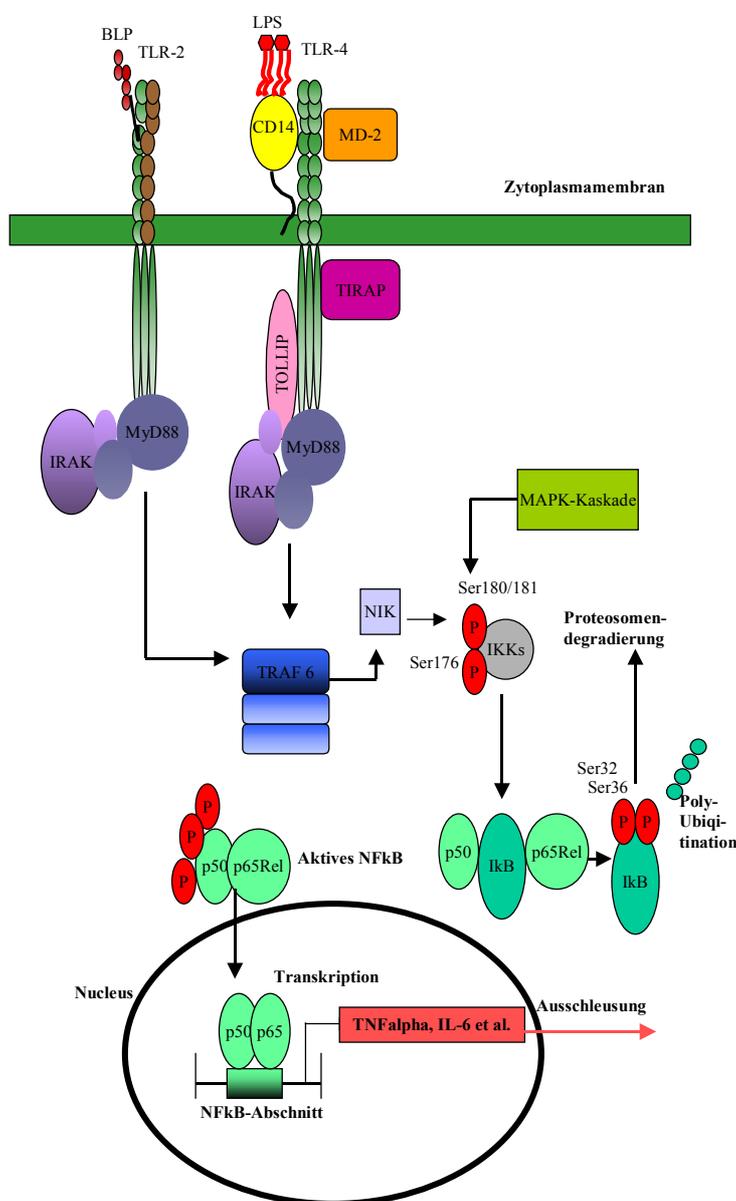


Abb. 1.: Vereinfachte Darstellung der Zytokinsignaltransduktion (modifiziert nach Lien et al., Crit Care Med 30/1 (2002) S. 6, sowie Cell Signal Inf (2004): NFκB signalling pathway)

1.3. Pathophysiologie des Fiebers

Es ist wahrscheinlich, dass die von Liebermann (1887) erstmalig beschriebene T_C -Regulation zentral über den Hypothalamus gesteuert wird. Proinflammatorische Zytokine der frühen nichtadaptiven Immunantwort (IL-1, IL-6, $TNF\alpha$) fungieren dabei als Mediatoren zwischen der Peripherie (lokal oder generalisiert) und dem Zielorgan Hypothalamus (Dinarello, 1999). Um den vom Hypothalamus festgelegten T_C -Regulationspunkt zu erreichen, erhöht sich am Ende dieser Kaskade die periphere Körpertemperatur über verschiedene Mechanismen (Leon, 2002).

$TNF\alpha$ und IL-6 scheinen eine dominante Rolle in der Entwicklung der Pyresis einzunehmen. Von IL-1 α und β ist beim Menschen bekannt, dass sie bereits im Nanogramm (ng)-Bereich Fieber erzeugen können (Dinarello et al., 1999). Allen oben genannten Zytokinen ist gemeinsam, dass sie ohne Zugabe exogener Pyrogene in der Lage sind, eine T_C -Verstellung zu induzieren. Aus diesem Grund werden diese Substanzen als intrinsische Pyrogene bezeichnet (Dinarello, 2004).

Doch nicht nur Zytokinen ist es möglich, aus sich heraus pyrogen zu wirken. Auch LPS selbst scheint sich an der Initiation von Fieber zu beteiligen - offenbar ohne die Notwendigkeit einer Anwesenheit pyrogener Zytokine. Long et al. (1990) und Leon et al. (1999) konnten zeigen, dass IL-6-defiziente Nager nach Applikation von LPS ebenso Fieber entwickelten wie auch nach intravenöser Injektion von anti- $TNF\alpha$.

Neben der im Folgenden beschriebenen Kaskade zur Erzeugung einer zentralen T_C -Veränderung nach systemischer oder lokaler bakterieller Infektion existieren noch weitere Modelle, von denen einige auf S. 8 in Abb. 2 schematisch dargestellt sind.

- Nach Ausschüttung von IL-1 α/β , $TNF\alpha$ und IL-6 durch Monozyten erreichen diese Substanzen via Blutbahn das ZNS, wobei sie durch das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) als Pyrogene erkannt werden (Saper et al., 1994; Dinarello et al., 1991 und 1999).
- Über Bindung an transmembranöse Zytokinrezeptoren auf der Gefässeite der OVLT erfolgt die Induktion von Cyclooxygenase(COX)-2/3.
- Zirkulierende exogene Pyrogene wie LPS sind zudem in der Lage, eigenständig über ebenfalls auf der Gefässeite des OVLT befindliche TLR die COX-2/3-Induktion anzuregen.

- COX-2/3 initiiert im Weiteren auf der Gehirnseite des OVLT die Bildung von PGE₂ (Kozak et al., 2000). PGE₂ induziert die Bildung von zyklischem Aminomonophosphat (cAMP) im anterioren Hypothalamus. Dieses leitet als Neurotransmitter in thermosensitiven Neuronen die T_C-Veränderung ein (Laburn et al., 1974; Blatteis et al., 1997).
- Durch zentral gesteuerte Vasokonstriktion in der Peripherie sinkt die Temperatur aufgrund einer mangelnden Zirkulation ab. Dies wird zentral mit einer T_C-Erhöhung beantwortet, welches als Fieber gemessen werden kann (Saper et al., 1998).
- Wie bedeutend die Rolle von IL-8 als Pyrogen im Rahmen einer systemischen bakteriellen Infektion ist, und ob es ebenfalls zu den intrinsisch wirkenden Zytokinen gezählt werden kann, ist noch unklar.

Über die Frage, zu welchem Zeitpunkt einer Erkrankung, bei welcher Temperaturhöhe und in welchem Lebensalter Fieber einen Vorteil für das Überleben des Individuums darstellt, können bislang nur Vermutungen geäußert werden. Fieber scheint nicht in jeder Phase einer Erkrankung positiv auf den Krankheitsverlauf einzuwirken. Wie Hyperthermie auf Monozyten in ihrer Funktion als Zytokinproduzenten der frühen nichtadaptiven Immunantwort einwirkt, ist bislang ebenso unklar.

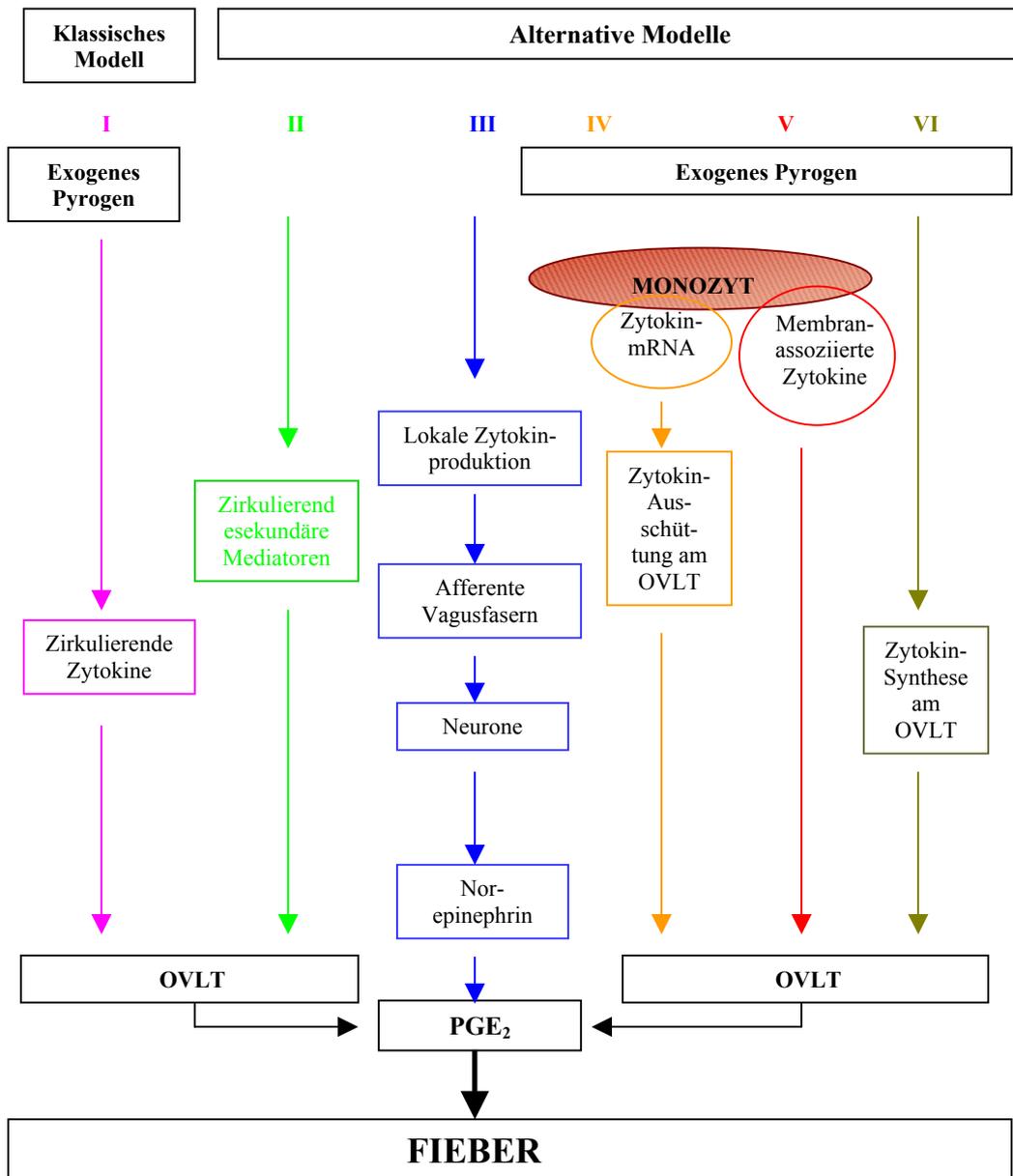


Abb. 2: Modelle zur Fieberkaskade (nach Netea et al, Clin Dis Inf 2000, S.181, Fig. 2; Darstellung modifiziert)

2.

ZIELSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro*-Untersuchung des Einflusses von Hyperthermie auf die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-8, TNF α) in humanen, LPS-stimulierten Monozyten junger männlicher Probanden.

Zu diesem Zweck wurde ein Vollblutmodell entwickelt. Die Monozyten wurden 1, 2, 3 oder 6 Stunden (h) mit LPS stimuliert und bei 37, 39 oder 42°Celsius (°C) inkubiert. Die intrazelluläre Messung der Zytokinexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Folgende Punkte wurden betrachtet:

- Unterscheidet sich die Zytokinkinetik bei Normothermie (37°C) von der unter dem Einfluss von Hyperthermie (39 und 42°C)?
- Findet sich eine Expression von IL-6, IL-8 und TNF α auch bei alleiniger Stimulation durch Temperatur ohne Zugabe von LPS?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Theorie der Methode

3.1.1. Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ist ein Messinstrument, welches Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert. Der hier verwandte Argonlaser (Emissionsspektrum 488 nm) als Lichtquelle ist fest fixiert. Durch Verwendung von Linsen wird das emittierte Licht gebündelt und mit Hilfe von diversen Spiegeln und Filtern nach den verschiedenen Wellenlängenbereichen getrennt. Die Messwerte beruhen auf der gleichzeitigen Gewinnung mehrerer physikalischer und funktioneller Parameter jeder einzelnen fluoreszenzmarkierten Zelle innerhalb einer heterogenen Population.

Die Digitalisierung der Signale erfolgt über den Analog-Digital-Converter (ADC). Dabei werden der Anteil zytokinpositiver Monozyten in Prozent (%) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (mean) ermittelt (Pala et al., 2000). Jede Signalintensität in Volt wird, abhängig von Impulshöhe, Fläche und Länge, einem Kanal (Klasse) zugeteilt. Im Punktwolkendiagramm können verschiedene Populationen im Blut durch Auftragung der Streulichtarten forward und side scatter (FSC, SSC; Abb. 3) oder SSC zu einem spezifischen Parameter (zum Beispiel einem Zelloberflächenmarker) auf Ordinate und Abszisse dargestellt und voneinander differenziert werden (S. 11, Abb.4.). Ein Histogramm wiederum kann die Verteilung der Fluoreszenz verdeutlichen. Diese Einparameterdarstellung enthält auf der Ordinate die Skalierung der 1024 Kanäle, auf der Abszisse die Anzahl der gemessenen Partikel (S. 11, Abb. 5).

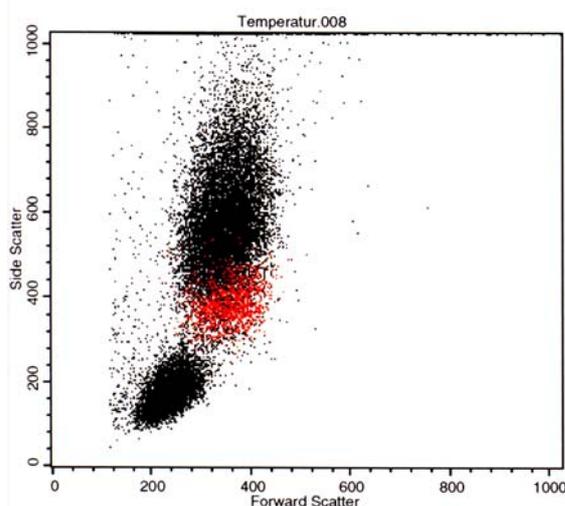


Abb. 3: FSC/SSC-Darstellung der Leukozytenpopulationen (Monozyten rot markiert); dot plot (Zweiparameterdarstellung)

Um im Histogramm die Fluoreszenz einer bestimmten Zielpopulation zeigen zu können, muss diese zunächst charakterisiert werden. Dies geschieht durch „Umkreisen“ (gateing; Abb. 4) der gewünschten Population im dot plot mittels einer Markierung (Radbruch (Hrsg.) et al., 1997).

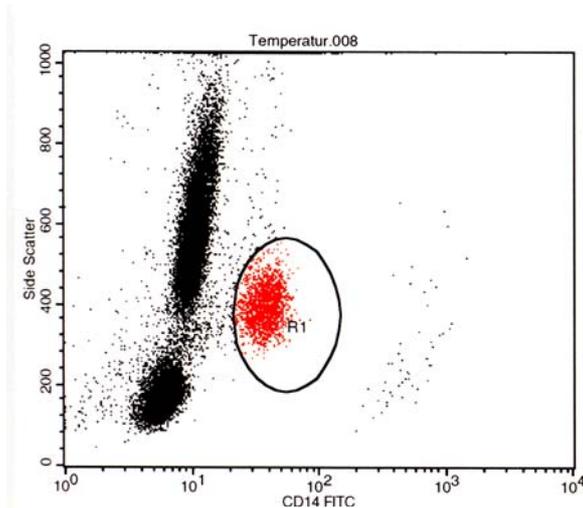


Abb. 4: „Gateing“ der Monozyten (CD14/SSC-Darstellung); Punktwolkendiagramm (Monozyten rot markiert)

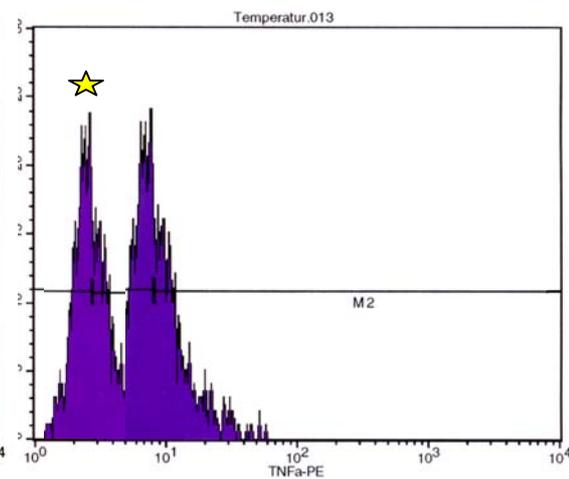


Abb. 5: Isotypkontrolle (gelber Stern) im Histogramm (Einparameterdarstellung) als unspezifische Fluoreszenz (Bereich bis 10^0 - 10^{-1}), und spezifische Zytokinfluoreszenzverteilung nach 2 h LPS-Stimulation bei 37°C .

Streulicht entsteht durch Brechung des Laserlichtes an der Zelle. Die grösste Streuung erfolgt im Kleinwinkelbereich (0-10 Grad). Diese bezeichnet man als FSC. FSC ist proportional zur Zellgrösse.

Um die Granularität der Zelle zu erfassen, wird Licht im 90° -Bereich gemessen und SSC genannt. SSC ist proportional zur Granularität.

Mit Erfassung dieser physikalischen Parameter kann zunächst eine grobe Unterscheidung der einzelnen Leukozytengruppen voneinander innerhalb des Vollblutes vorgenommen werden. Die Probe, welche der Zellbildeinstellung dient, wird als „Leerprobe“ bezeichnet. Abb. 3 auf S. 10 zeigt eine solche Zellbildeinstellung. Die differenziertere Unterscheidung von Monozyten zu anderen Zellpopulationen gelingt durch die spezifische Oberflächenmarkierung mittels fluorochrombehafteten CD14-Antikörpern (AK). Um messbare Fluoreszenzsignale zu erhalten, sollte der Anregungsbereich der genutzten Fluorochrome der Wellenlänge des Lasers entsprechen. Für die Markierung von stark exprimiertem mCD14 wurde Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) verwandt, welches aufgrund der ausgeprägten Präsenz von mCD14 eine geringere Sensitivität aufweisen muss. Das gelegentlich schwächer exprimierte intrazelluläre Zytokinsignal war sicherer mit Phycoerithin(PE)-markiertem AK zu detektieren.

Die Emissionswellen von FITC und PE liegen dicht beieinander und überschneiden sich kaum. Dennoch existiert ein Bereich, in welchem eine gemeinsame Überlappung der Spektren besteht (Abb. 6). Durch eine elektronische Kompensation vor Beginn der eigentlichen Messreihe wird diese Überschneidung herausgerechnet, indem zunächst eine Geräteeinstellung auf beide Farbstoffe einzeln erfolgt (Raffael et al., 1994).

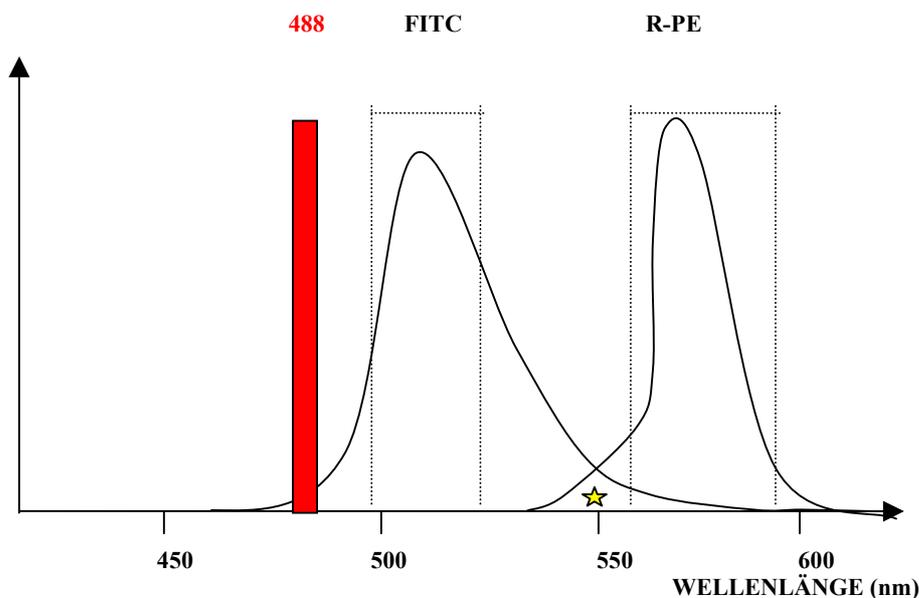


Abb. 6: Fluoreszenzspektren FITC und R-PE (nach Raffael A et al.: Grundlagen der Durchflusszytometrie, 1994, Seite 9, Abb. 2): Der Anregungsbereich für beide Farbstoffe liegt bei 488 nm (rot umrandet), die Messbereiche sind gestrichelt dargestellt, der Stern kennzeichnet den Überlappungsbereich.

Um die spezifische Bindung der Antikörper von der unspezifischen zu unterscheiden, erfolgt vor Messung der Zytokinproben die Untersuchung der „Isotypkontrolle“. Die Monozyten dieser Probe sind oberflächenmarkiert (CD14-FITC) und mit einem unspezifischen Antikörper (hier Maus-Immunglobulin(Ig)₂κ) versehen. Zellen besitzen freistehende Proteinbrücken, welche unspezifisch mit AK interagieren können. Diese müssen zunächst definiert werden, um im Folgenden von der spezifischen AK-Fluoreszenz unterschieden werden zu können. Der Isotyp sollte in der gleichen Menge wie der Zytokin-AK zu den Proben gegeben werden, da er sowohl in seinem Proteingehalt als auch in seinen Fluorochrom-Eigenschaften (PE) letzterem ähnlich ist (Prussin et al., 1995; Koester et al., 2000).

Die Isotypprobe wird auch als „Negativkontrolle“ bezeichnet. Alle Fluoreszenzsignale oberhalb dieses definierten Negativbereiches (in meiner Arbeit ab 10^1 auf der Ordinate der Histogrammdarstellung) gelten im Folgenden als „positiv“.

3.1.2. Stimulation und Aufarbeitung der Monozyten

Um Monozyten zur intrazellulären Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zu animieren, muss dem Vollblut ein geeignetes bakterielles Stimulans zugegeben werden, welches den Zellen eine Infektsituation vorgibt.

In der Literatur sind unterschiedliche *in vitro*-Konzentrationen von LPS zur Stimulation von Monozyten beschrieben worden (Fairchild et al., 1997; Kwak et al., 2000; Zellner et al., 2002). Die für die vorliegende Untersuchung verwandte Konzentration von 10 ng/ml ergibt sich aus einer in unserer Arbeitsgruppe vorab durchgeführten LPS-Dosis-Wirkungskurve (Abb. 7). Es zeigte sich, dass mit Applikation dieser Konzentration die maximale Expression von IL-6, IL-8 und TNF α in Monozyten bereits erreicht werden konnte. Die Konzentration von 10 ng/ml LPS entsprach somit in meinem Modell einer schweren Infektsituation. Da bekannt ist, dass zu hohe LPS-Dosen unter Umständen zu einer Immunparalyse führen können, sollte die Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve vor Untersuchungsbeginn erfolgen (Volk et al., 1996; Schroeder et al., 1999).

In vivo-Untersuchungen beschreiben eine vergleichbare Serumkonzentration bei schwerer Sepsis (Shenep et al., 1988; van Deventer et al., 1988; Opal et al., 1998). Allerdings müssen diese Aussagen unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass der für die Serumdetektion verwandte Limulus-Amöben(LAL)-Test auch Interferenzen mit anderen Serumproteinen aufweist und nicht in der Lage ist, membrangebundenes LPS zu messen (Rensing et al., 2003).

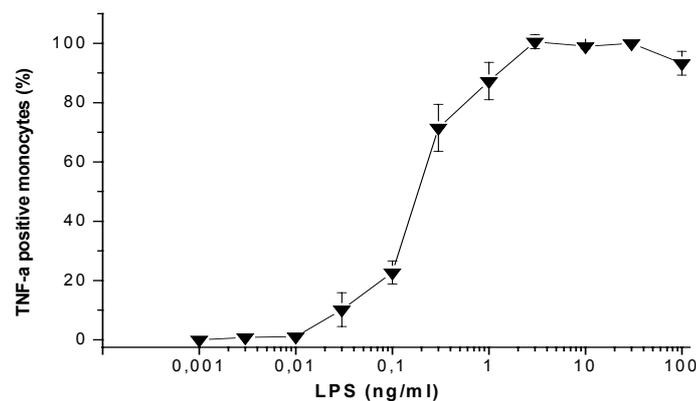


Abb. 7: Dosis-Wirkungskurve von LPS in Bezug zur monozytären TNF α -Ausschüttung bei 37°C nach 3 h Stimulation (nach Röntgen et al., 2004)

Die auf diese Weise produzierten Zytokine müssen für die nachfolgende Intrazellulärfärbung- und Messung im Monozyten verbleiben. Zu diesem Zweck wurde

dem Vollblut gleichzeitig mit LPS der Pilzmetabolit Brefeldin A zugesetzt. Dieses ist in der Lage, die extrazelluläre Sekretion der im Endoplasmatischen Reticulum produzierten und in Golgivesikeln transportierten Zytokine in das Plasma zu verhindern (Ladinsky et al., 1992; Graham et al., 1993; Dinter et al., 1998; Schuerwegh et al., 2001).

Nach Inkubation des Vollblutes erfolgte die Aufarbeitung der Zellen für die Oberflächen- und Intrazellulärfärbung.

Die Fixierung der Monozyten mittels Cytofix/Cytoperm® diente dazu, diese in dem Produktions- und Konfigurationszustand zu halten, den sie kurz zuvor eingenommen hatten. Ein Ausschleusen der Zytokine vor der Fluoreszenzfärbung war somit nicht möglich. Das in Cytofix/Cytoperm® enthaltene Paraformaldehyd gehört zu diesen sogenannten „cross-linking“-Präparate (O'Brien et al., 1995).

Um die Intrazellulärfärbung durchführen zu können, muss zunächst die Zytoplasmamembran für die AK durchlässig gemacht werden. Dies geschah mit Hilfe von Saponin, einem Detergenz enthalten in PermWash®, welches die Zellmembran über Interaktionen mit membrangebundenem Cholesterol permeabilisiert. Elektronenmikroskopischen Untersuchungen zufolge wird die Zellmorphologie in der hier verwandten Saponinkonzentration von 0,1% nicht verändert (Bohn, 1978). Überdies lysiert PermWash® die im Pellet befindlichen Erythrozyten.

Zwischen den Färbeschritten wurden die Zellen mit StainBuffer® behandelt. Dieser Waschpuffer enthält bovines Serumalbumin, welches den Anteil der unspezifischen Bindungen reduziert.

3.1.3. Lebend-Tod-Färbung mit Propidiumjodid

Lebende Zellen besitzen eine intakte Zellmembran, welche für kationische Farbstoffe wie Propidiumjodid (PI) oder Trypanblau nicht durchlässig ist. Im Rahmen des Zellsterbens rupturiert die Zellmembran, so dass PI eindringen und an den doppelsträngigen Kerninhalt (DNA, rRNA) binden kann (Levin et al., 1995; Majno et al., 1995). Das Eindringen von PI kann im Durchflusszytometer gemessen werden.

Entscheidend für die Differenzierung nekrotischer von lebenden Zellen ist die kurze Anfärbedauer von maximal 5-10 min. In dieser Zeit nehmen erstere PI vollständig, lebende Zellen hingegen einen kaum messbaren Anteil auf (Jacobs et al., 1983; Belloc et al., 1994).

Die PI-Färbung zur Untersuchung im Durchflusszytometer erfolgte in diesem Versuch nach der etablierten Methode von Jacobs und Piphó (Jacobs et al., 1983). Aufgrund seiner effizienten Erythrozytenlyse in kürzester Zeit wurde dabei als Waschpuffer Ammoniumchlorid verwandt. Lange oder häufige Waschzeiten wie in den Versuchen zur intrazellulären Zytokinfärbung sollen vermieden werden, da wegen der Viabilitätsprüfung Zellen nicht fixiert werden dürfen (Darzynkiewicz, 1997).

3.2. Durchführung der Methode

3.2.1. Vorbedingungen

- Die Vollblutentnahme von 12 Probanden erfolgte aus einer Armvene. Das Blut wurde in Natrium-Heparin-Monovetten (Na-Heparin/NH 7,5 ml[®]; SARSTEDT, Kat.-Nr. 2184320C) aufgenommen (Marie et al., 1997). Die Aufbereitung erfolgte innerhalb von 30 Minuten nach Entnahme.
- Voraussetzung für die Einbindung als Proband waren ein intakter Immunstatus (Differentialblutbild im Normbereich) und eine „leere“ Anamnese: keine akute oder chronische Infektion, akute oder chronische Erkrankungen, Allergien, Medikamenteneinnahme, kein chronischer Alkohol-, Drogen-, oder Nikotinabusus (Shiratori et al., 1994; Madretsma et al., 1996; Gullestad et al., 1999; Ibs et al., 2000).
- Da Unterschiede der Immunantwort in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht bereits beschrieben worden sind, wurde die Auswahl auf männliche Probanden einer definierten Altersgruppe von 20-38 Jahren (Durchschnittsalter 30,5 Jahre) beschränkt (Fagiolo et al., 1993; Pawelec et al., 1999; Aspinall, 2000; Ershler et al., 2000; Schwarz et al., 2000). Externe Beeinflussungen der Immunantwort und somit die interindividuelle Streuung in der Probandengruppe konnten so deutlich eingeschränkt werden.
- Um eine Vergleichbarkeit der Messwerte zu gewährleisten sowie in Anbetracht der Tatsache, dass die Zytokinproduktion einem zirkadianen Rhythmus

unterliegt, wurden an zwei verschiedenen Tagen die Proben jeweils um 7:00 Uhr morgens entnommen (Liebmann et al., 1998; Petrovski et al., 1998).

- Zur Verminderung der schwer beeinflussbaren intraindividuellen Streuung wurden nur nüchterne Probanden vor Arbeitsbeginn und nach individuell ausreichender Nachtruhe der Blutentnahme unterzogen (von Engelhard Baron J, 2001). Eine Untersuchung der individuell unterschiedlichen Ausprägung der untersuchten Zytokine (homo-, heterozygot) auf dem Genom wurde allerdings nicht durchgeführt (Schraut W et al., 1997; Tang GJ et al., 2000; Heesen M et al., 2003).
- Die verwandten Dosierungen und Konzentrationen der Reagenzien entsprachen den Empfehlungen der Hersteller (Kahan et al., 1997).

3.2.2. Protokoll der „Infektionsgruppe“

- Zugabe von 200 Mikroliter (μl) Vollblut eines jeden Probanden und 790 μl (beziehungsweise 800 μl in die „Leerprobe“) der Kulturmediums RPMI 1640 mit L-Glutamin (GIBCO, Kat.-Nr. 21875-034) in 6 Probenröhrchen (5 ml Polystyrene round bottom tube®; FALCON, Katalog (Kat.)-Nummer (Nr.) 352054). Jeweils 6 Probenröhrchen entsprachen einem Temperatur- und Zeitschritt (beispielsweise 37°C/1 h).
- In die Proben 1 („Leerprobe“) und 6 („Lebend-Tod-Probe“) wurden zunächst keine weiteren Zusätze pipettiert.
- In die Probe 2 („Isotypkontrolle“) wurde 1 μl (10 ng/ml) Brefeldin A (Golgi-Plug®; PHARMINGEN, Kat.-Nr. 555029) hinzugegeben.
- In die Proben 3-5 („Zytokin-Proben“) kamen 1 μl Brefeldin A und 10 μl (10ng/ml) LPS (LPS von Escherichia coli 055:B5; SIGMA, Kat.-Nr. 42K4044).
- Daran schloss sich die sofortige Inkubation der Proben bei 37, 39 oder 42°C in handelsüblichen, CO₂-haltigen (5%) Wärmeschränken (Zelltodprotektion durch pH-Konstanz) für 1, 2, 3 oder 6 h an.
- Es erfolgte danach das Durchmischen des Vollblutes, die Zugabe von 1ml StainBuffer ® (PHARMINGEN, Kat.-Nr. 554657) in jedes Probenröhrchen, die Zentrifugation der Zellen bei 450g/Minute(min) für 5 min. bei 16°C, das Dekan-

tieren des Überstandes bis auf das Pellet, sowie ein Durchmischen des Zellhaufens.

- Bis auf Probe 1 („Leerprobe“) wurde dann in alle Proben 10µl CD14-FITC gegeben, die Zellen durchmischt und bei Raumtemperatur für 10 min. im Dunklen inkubiert.
- Im Folgenden wurde in alle Röhrchen erneut StainBuffer® pipettiert, die Zellen durchmengt, zentrifugiert, sowie der Überstand dekantiert. Dieser Schritt wurde noch ein zweites Mal durchgeführt.
- Die Proben 1-5 wurden mit 200µl Cytofix/Cytoperm® versehen und für 10 min. bei 4°C im Dunklen inkubiert.

Nach Inkubation der Proben 1-5 wurden diese zwei Mal hintereinander in 1ml PermWash® resuspendiert, durchmischt, zentrifugiert, und der Überstand dekantiert.

- In Probe 6 („Zelltodprobe“) hingegen wurde 1ml (1:10 verdünntes) Ammoniumchlorid (PharMLyse 10x concentrate®; PHARMINGEN; Kat.-Nr. 555899) pipettiert. Daran schloss sich eine Inkubation von 10 min. im Dunklen bei Raumtemperatur an.

Nach der zehnmütigen Ruhezeit wurde Probe 6 vorsichtig durchmischt, dann zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Zellhaufen vorsichtig in StainBuffer® resuspendiert. Nachfolgend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, bis auf das Pellet dekantiert, und in 200 µl StainBuffer® bis zur Messung aufbewahrt.

- Probe 2 („Isotypkontrolle“) wurde nach dem Permeabilisierungsschritt mit 10µl IgG_{2aκ} versehen. In Probe 3 wurde 10µl IL-6-AK (PE-conjugated mouse anti-human IL-6®; PHARMINGEN, Kat.-Nr. 559331), in Probe 4 10µl IL-8-AK (PE-conjugated mouse anti-human IL-8®; PHARMINGEN, Kat.-Nr. 559336), und in Probe 5 10µl TNFα-AK (PE-conjugated mouse anti-human TNFα®; PHARMINGEN, Kat.-Nr. 559321) pipettiert. Daran schloss sich die Inkubation der Zellen für 30 min. bei 4°C im Dunklen an.
- Zuletzt erfolgte eine erneute Zugabe von PermWash® zur nochmaligen Erythrozytenlyse mit Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes.
- Die Proben 1-6 wurden vor der Messung in 200µl StainBuffer® aufgenommen.

- Dem Röhrchen 6 („Lebend-Tod-Probe“) wurde 3-5 min. vor der Messung 10µl (200µg/ml) PI (Propidiumjodid®; SIGMA, Kat.-Nr. P4170) zugegeben.
- Gemessen wurden 20.000 Monozyten/Probe.

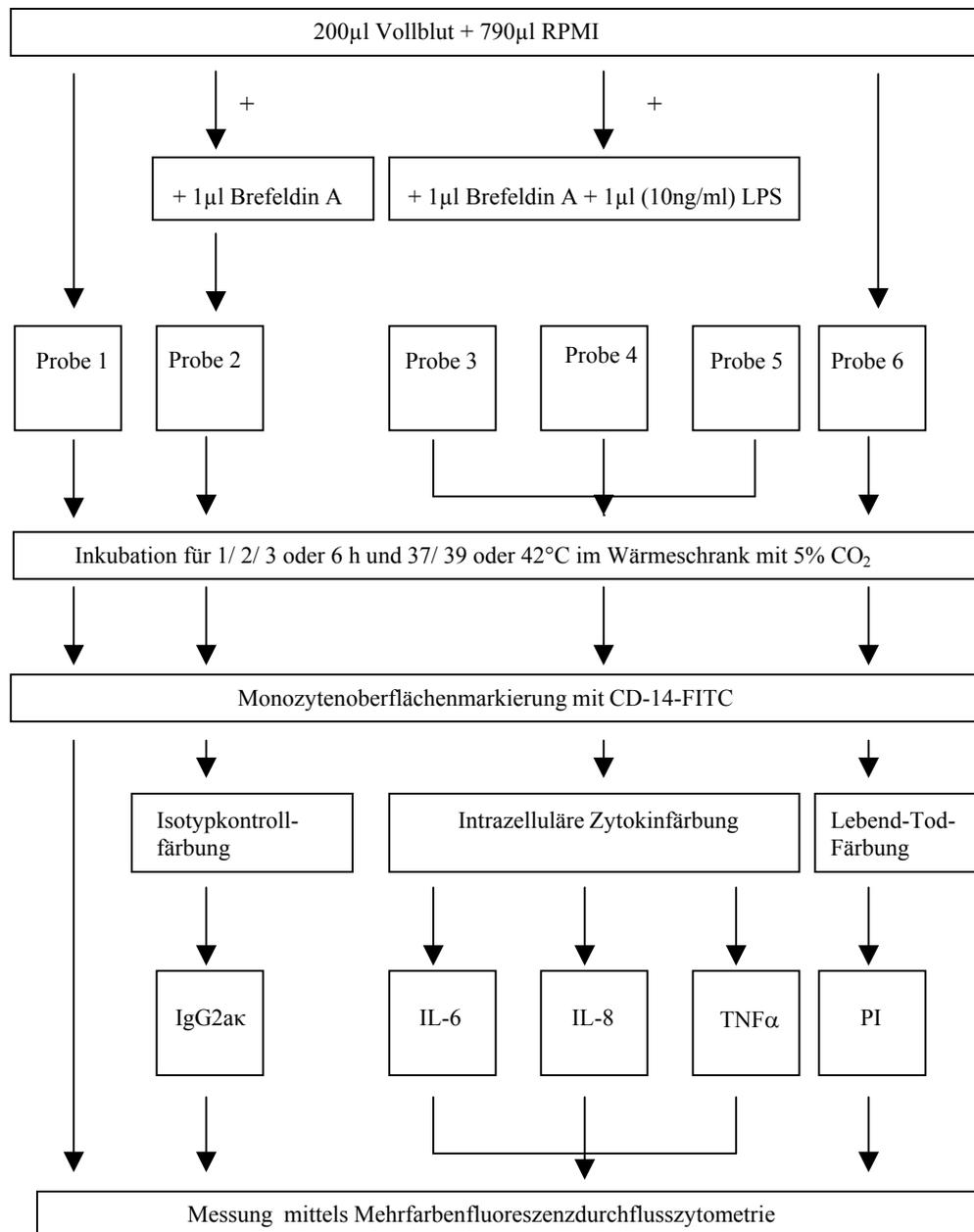


Abb. .9: Schema der Aufbereitung von Vollblut eines Probanden am Beispiel der „Infektionsgruppe“

3.2.3. Protokoll der Kontrollgruppe

Die Verarbeitung von Monozyten der „Kontrollgruppe“ erfolgte in gleicher Weise wie in der „Infektionsgruppe“ mit der Ausnahme, dass den Proben kein LPS zugesetzt wurde und somit lediglich eine Stimulation mit Temperatur durchgeführt wurde.

3.3. Statistische Auswertung

Der Anteil zytokinpositiver Monozyten in Prozent sowie deren mittlere Fluoreszenz (mean), wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst.

Die deskriptive Ergebnisdarstellung erfolgte mittels Median, SEM sowie dem Student'schen t-Test.

Die Berechnung des MFI als Mass für die Expressionsaktivität eines Monozyten ergibt sich aus dem Produkt des Anteils zytokinpositiver Monozyten und der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität (mean), geteilt durch 100 (Hebra et al., 2001).

Semiquantitativ stellt der MFI den Aktivitätszustand jedes Monozyten bezogen auf die Zytokinexpression dar. Als hochsignifikant für die vorliegende Untersuchung galten Werte mit $p \leq 0,0001$, als signifikant Werte $p \leq 0,05$.

Unter Berücksichtigung der Längsschnittanalyse lagen von $n = 12$ Probanden unabhängige Messungen von zwei verschiedenen Tagen vor.

Für die Daten wurde zudem mit Hilfe paarweiser Vergleiche die prozentuale Veränderung stimulierter Zellen in Abhängigkeit von der Temperaturhöhe und der Stimulationsdauer mit einer Varianzanalyse für Messwiederholungen (repeated measures analysis) analysiert. Im Falle der Temperaturabhängigkeit wurden multiple Vergleiche zum Ausgangswert 37°C durchgeführt. Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurde ein Vergleich mit 1h als Ausgangswert vorgenommen. Mittels Varianzanalyse wurde auch der globale Vergleich bestimmt. Als Einflussgrößen für den globalen Vergleich wurden Temperatur und Zeit festgelegt. Das Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni korrigiert. Das multiple Signifikanzniveau betrug hierbei $p < 0,05$.

4. ERGEBNISSE

4.1. „Infektionsgruppe“ mit LPS- und Temperaturstimulation

4.1.1. Interleukin-6 (IL-6)

Abb. 10 und 11 beschreiben die Kinetik des Mittleren Fluoreszenz-Index (MFI) jedes IL-6-positiven Monozyten, sowie Kinetik des Anteils IL-6-positiver Monozyten (%) in Abhängigkeit von der Stimulations- beziehungsweise Inkubationszeit.

Da sich der intrazelluläre Expressionsgehalt von IL-6 unabhängig von der Umgebungstemperatur bis zur zweiten Stimulationsstunde unterhalb der Nachweisgrenze befand, konnte eine Interpretation dieser Messwerte nicht vorgenommen werden.

Bei 37°C findet sich ab der zweiten Stimulationsstunde ein hochsignifikanter Anstieg der IL-6-Expression sowohl im MFI (Abb. 10) als auch im Prozent-Anteil (Abb. 11). Der rote Stern in den Abb. kennzeichnet die Signifikanz.

Bei 39°C nehmen MFI und Prozent-Anteil den gleichen hochsignifikant ansteigenden Verlauf wie die IL-6-Kinetik bei 37°C.

Unter dem Einfluss von 42°C stellt sich sich erst ab der dritten Stimulationsstunde eine hochsignifikante Zunahme der IL-6-Expression dar.

Betrachtet man die Expression von IL-6 in Abhängigkeit von der Temperaturhöhe, so zeigt sich, dass es unter dem Einfluss von Hyperthermie zu einer hochsignifikant geringeren IL-6-Expressionsrate kommt, als bei der „Normkurve“ 37°C. Dieser Verlauf findet sich bei 39°C nach 6 h, bei 42°C bereits ab der dritten Stimulationsstunde im Vergleich zur 37°C-Kinetik. Der blaue Stern in den Abbildungen kennzeichnet die Signifikanz.

Das vollständige Datenmaterial kann in den Tabellen 1 und 2 auf S. 52, sowie in den Tabellen 7-10 auf den Seiten 55-58 eingesehen werden.

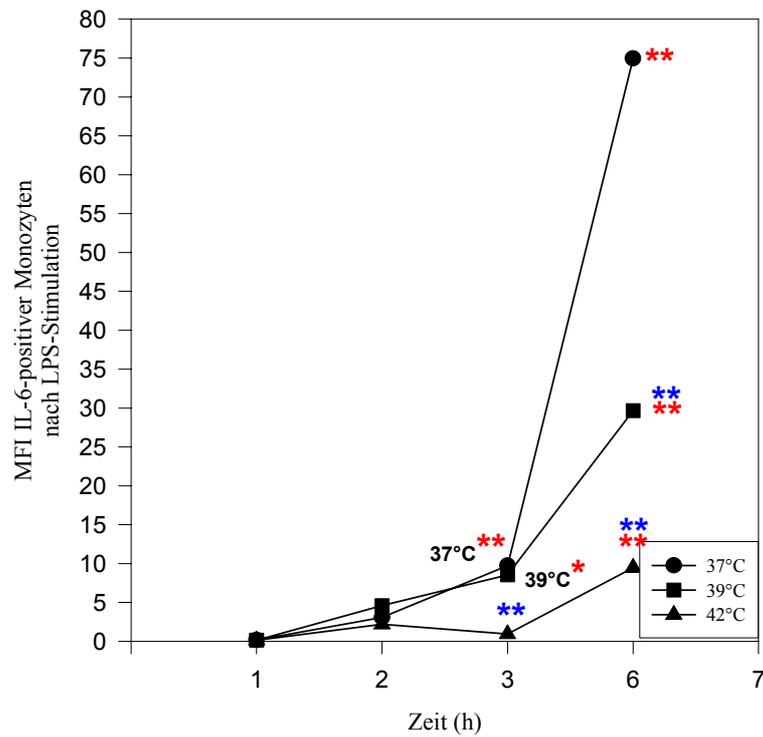


Abb. 10: MFI IL6-positiver Monozyten, 1-6 h LPS-Stimulation, 37-42°C

** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zum vorigen Zeitpunkt

** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zur Kontrollkurve 37°C

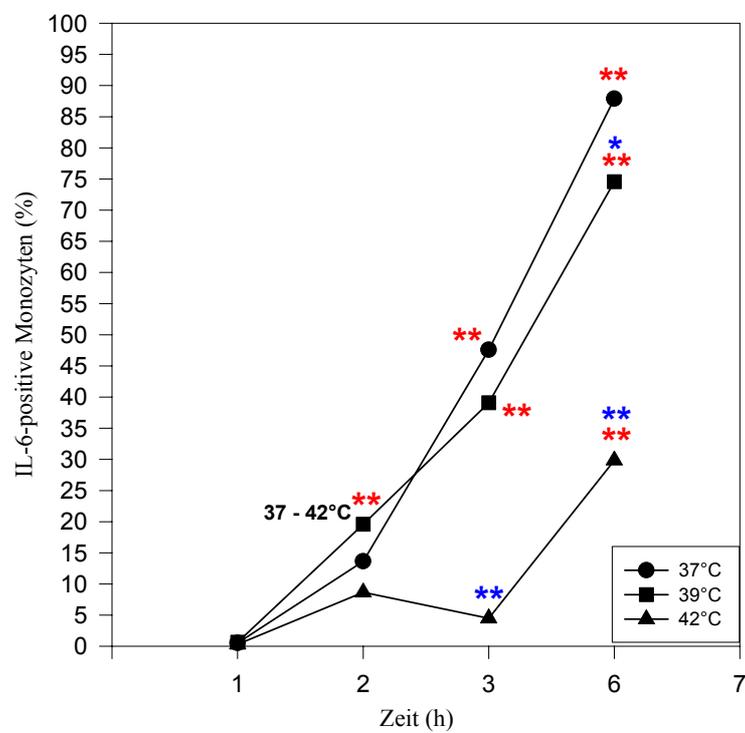


Abb. 11: IL6-positive Monozyten (%), 1-6 h LPS-Stimulation, 37-42°C

** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zum vorigen Zeitpunkt

** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zur Kontrollkurve 37°C

4.1.2. Tumor Nekrose-Faktor α (TNF α)

Abb. 12 und 13 beschreiben die MFI -Kinetik TNF α -positiver Monozyten sowie die Kinetik des Anteils TNF α -positiver Monozyten (%) in Abhängigkeit von der Stimulations-, beziehungsweise Inkubationszeit.

1 h nach Inkubation der Monozyten liegt unabhängig von der Temperaturhöhe eine messbare intrazelluläre TNF α -Expression oberhalb der Nachweisgrenze vor.

Unter dem Einfluss von 37°C steigen sowohl der MFI (Abb. 12) als auch der Prozent-Anteil (Abb. 13) TNF α -positiver Monozyten ab der ersten Stimulationsstunde hochsignifikant an (Signifikanz in Abb. 12 mit rotem Stern vesehen).

Bei 39°C findet sich ein Verhalt der MFI-Expression ab der dritten Stimulationsstunde. Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 13 einen zur 37°C-Kinetik gleichförmig verlaufenden Anstieg des Anteils Prozent-positiver Monozyten.

Nach Inkubation der Monozyten bei 42°C stellt sich sowohl beim MFI als auch beim Prozent-Anteil TNF α -positiver Monozyten ein Verhalt der intrazellulären Expression ab der zweiten Stunde dar.

Bei Betrachtung der TNF α -Expression in Abhängigkeit von der Stimulationstemperatur zeigt sich im Vergleich zur 37°C-„Normkurve“ bei 39°C und 42°C eine signifikant niedrigere Gesamtexpressionsrate von TNF α . Die Signifikanz ist in den Abb. mit einem blauen Stern vesehen.

Das vollständige Datenmaterial findet sich in den Tabellen 3 und 4 auf Seite 53, sowie in den Tabellen 7-10 auf den Seiten 55-58.

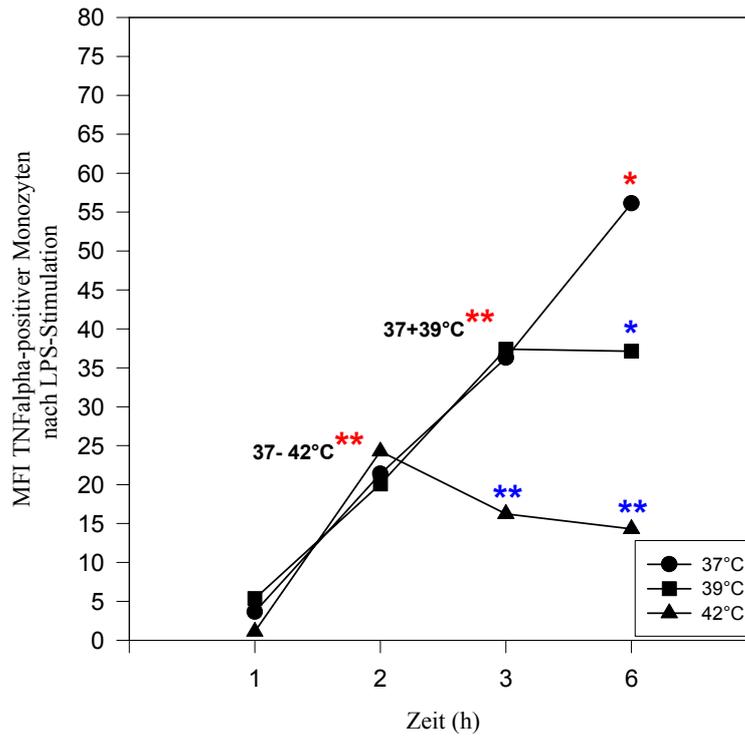


Abb. 12: MFI TNF α -positiver Monozyten, 1-6 h LPS-Stimulation, 37-42°C
 ** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zum vorigen Zeitpunkt
 ** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zur Kontrollkurve 37°C

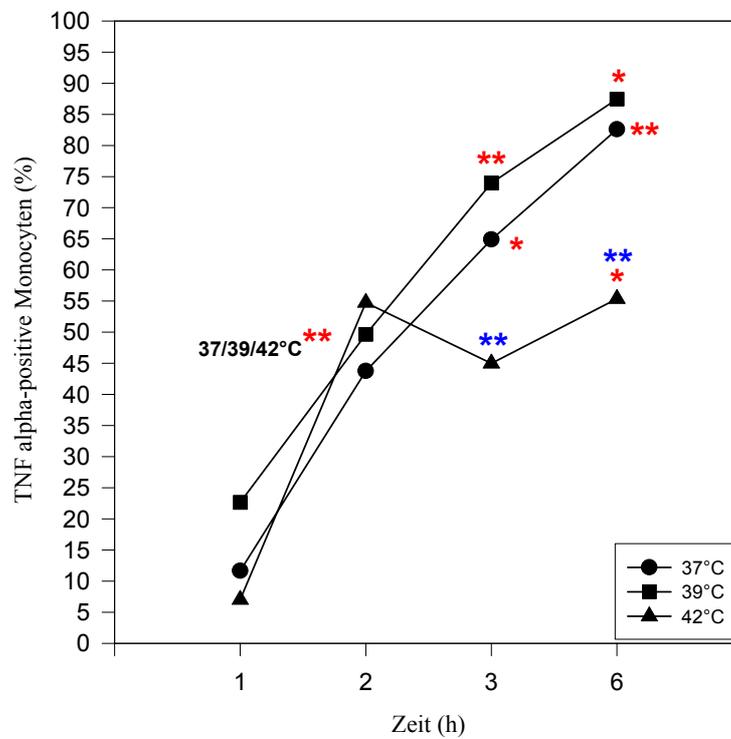


Abb. 13: TNF α -positive Monozyten (%), 1-6 h LPS-Stimulation, 37-42°C
 ** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zum vorigen Zeitpunkt
 ** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zur Kontrollkurve 37°C

4.1.3. Interleukin-8 (IL-8)

Abb. 14 und 15 beschreiben die MFI-Kinetik jedes IL-8-positiven Monozyten, sowie die Kinetik des Anteils IL-8-positiver Monozyten (%) in Abhängigkeit von der Stimulations-, beziehungsweise Inkubationszeit.

Nach 1 h Inkubation wird eine unabhängig von der Temperaturhöhe intrazelluläre IL-8-Expression oberhalb der Nachweisgrenze gemessen.

Bei 37°C weisen sowohl der MFI (Abb. 14), als auch der Anteil IL-8-positiver Monozyten in % (Abb. 15) einen hochsignifikanten Anstieg ab der ersten Stimulationsstunde auf. Die Signifikanz ist in den Abb. mit einem roten Stern gekennzeichnet.

Bei 39 und 42°C kommt es beim MFI zu einem Verlust der intrazellulären IL-8-Expression ab der zweiten Stimulationsstunde. Abweichend davon zeigt Abb. 15 lediglich bei 42°C einen Verlust des Prozent-Anteils IL-8-positiver Monozyten.

Im Vergleich der IL-8-Expression in Abhängigkeit von der Höhe der Inkubationstemperatur findet sich lediglich für 42°C nach 3 h eine hochsignifikant niedrigere Gesamtexpression im Vergleich zur 37°C-„Normkurve“. Die Signifikanz wird ebenfalls mit Hilfe eines blauen Sterns dargestellt. Die Gesamtexpression bei 39°C ist nach 3 h im Vergleich zur „Normkurve“ geringer ausgeprägt. Eine Signifikanz konnte allerdings nicht gezeigt werden.

Das vollständige Datenmaterial findet sich in den Tabellen 5 und 6 auf Seite 54, sowie in den Tabellen 7-10 auf den Seiten 55-58.

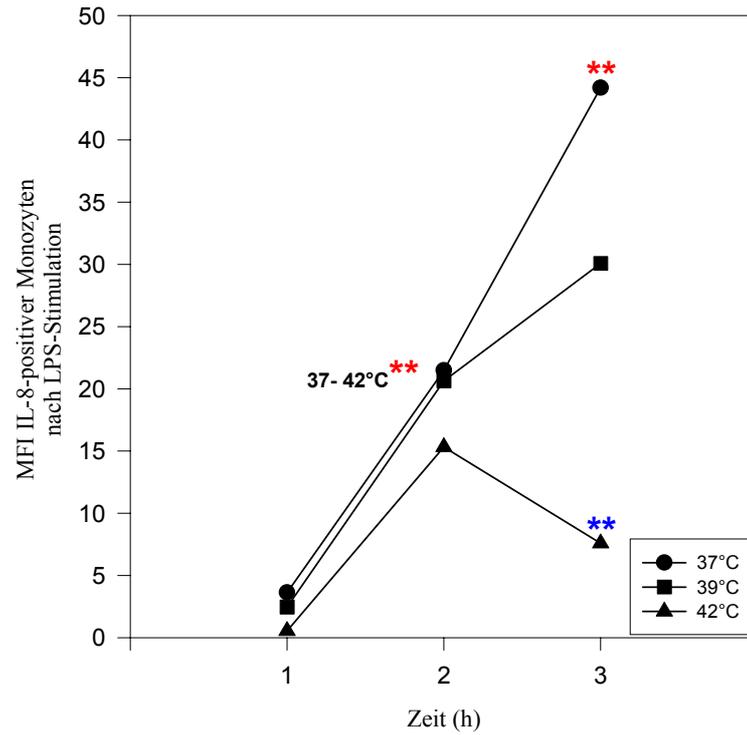


Abb. 14: MFI IL8-positiver Monozyten, 1-6 h LPS-Stimulation, 37-42°C

** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zum vorigen Zeitpunkt

** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zur Kontrollkurve 37°C

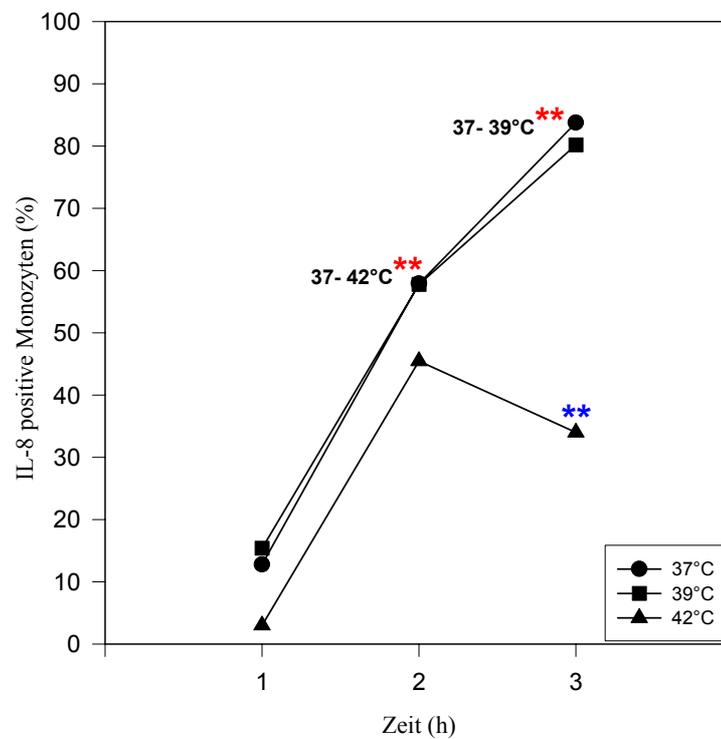


Abb. 15: IL8-positve Monozyten (%), 1-6 h LPS-Stimulation, 37-42°C

** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zum vorigen Zeitpunkt

** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$; Bezug zur Kontrollkurve 37°C

4.1.4. Lebend-Tod-Detektion mit Propidiumjodid

Wie in Abb. 16 dargestellt, konnte keine signifikante Zunahme des Anteils PI-positiver Monozyten (%) bei 42°C im Vergleich zu 37°C unter gleichzeitiger LPS-Stimulation festgestellt werden (S. 59, Tabelle 12).

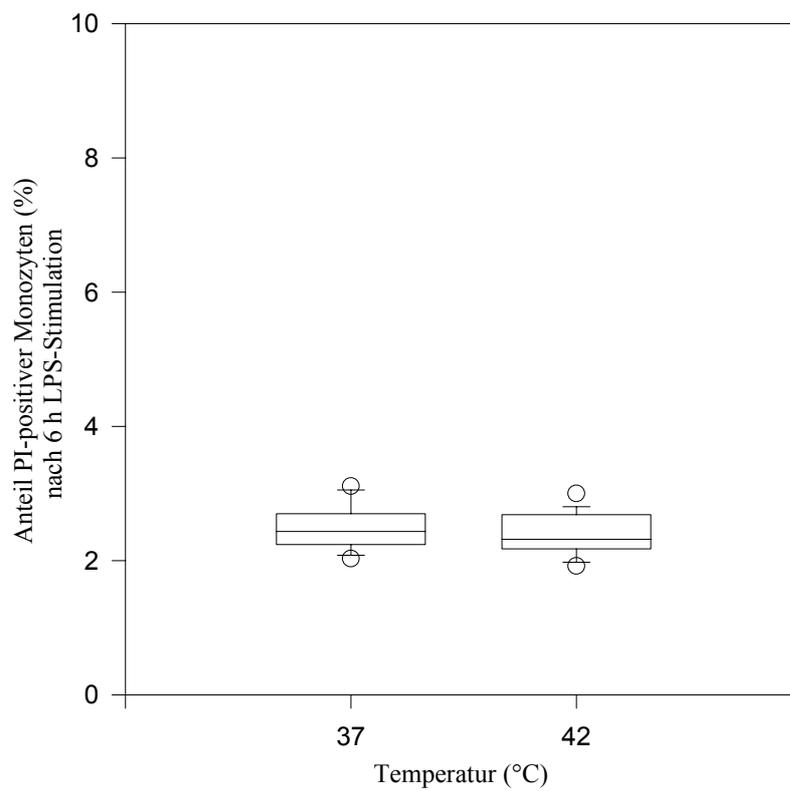


Abb. 16: PI- positive Monozyten (%), 6 h LPS-Stimulation, 37 und 42°C

4.2. Kontrollgruppe mit Temperaturstimulation

Mit Abb. 17 wird am Beispiel IL-6-positiver Monozyten dargestellt, dass unabhängig von Inkubationstemperatur und –Dauer ohne gleichzeitige LPS-Stimulation eine Induktion intrazellulärer Zytokine oberhalb der Nachweisgrenze nicht festgestellt werden konnte (S. 59, Tabelle 11).

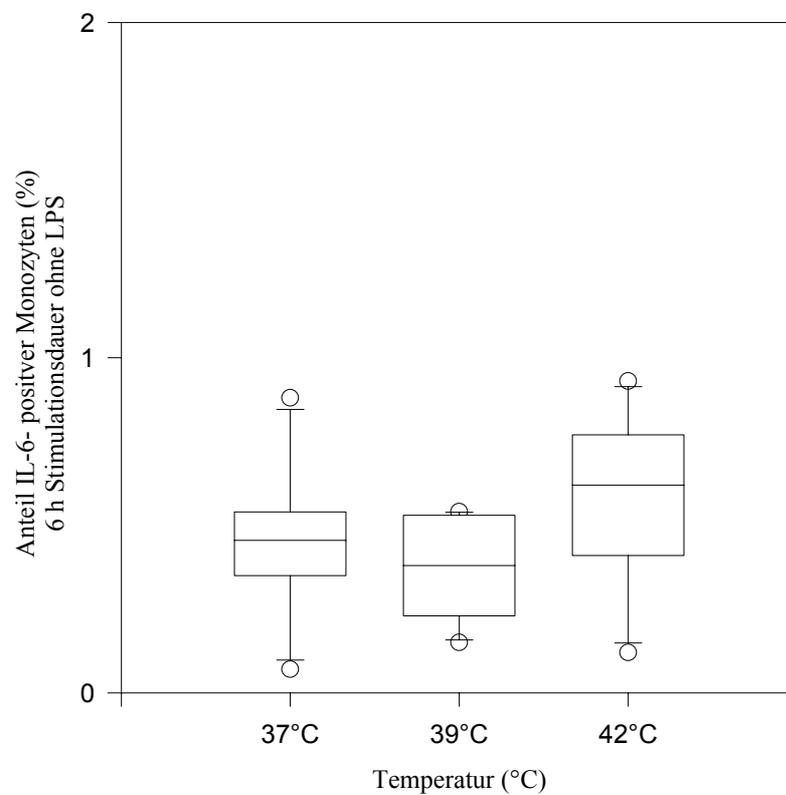


Abb. 17: IL-6-positiv Monozyten (%), ohne LPS-Stimulation, 6 h Inkubation

5. DISKUSSION

5.1. Diskussion der Methode

Das am häufigsten angewandte Verfahren zum quantitativen Nachweis von Zytokinen stellt sowohl im klinischen als auch im experimentellen Bereich der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Methode dar. Das Prinzip des ELISA beruht auf dem Entstehen einer Bindung zwischen einem spezifischen Antigen mit einem entsprechenden Antikörper, wobei eines der beiden an eine feste Phase gebunden ist. Als Marker wird ein Enzym, welches in der Regel an ein kolorimetrisches, fluorimetrisches oder luminometrisches Substrat gebunden ist, verwandt. Die Bindung an ein solches Substrat ermöglicht unter Verwendung eines Photometers die Detektion von enzymmarkiertem Antigen in ng/ml im Überstand.

Neben dem kostengünstigen Aspekt dieses Verfahrens zeichnet sich ELISA als schnelle und einfache Nachweismethode aus, da auf Trennmethode zur Separierung freier und gebundener Antigene verzichtet werden kann (Engvall et al., 1971).

Die ELISA-Technik bietet insbesondere für die Untersuchung von Serum den Vorteil, mehrere verschiedene Antigene oder AK nachweisen zu können. Deshalb bietet sich diese Nachweisform für Screening-Untersuchungen auch im Rahmen der Sepsisdetektion an. Mit Hilfe von ELISA ist eine Momentaufnahme des laborchemischen Gesamtzustandes eines Patienten möglich.

Demgegenüber ermöglicht die Durchflusszytometrie eine gleichzeitige Analyse verschiedener physikalischer und funktioneller Parameter von Zellen.

Ein wesentlicher Unterschied zur ELISA-Technik besteht darüber hinaus darin, dass die Zytokinexpression intrazellulär gemessen werden kann.

Da in der vorliegenden Arbeit die Betrachtung der intrazellulären Zytokinexpression einer Zellgruppe unter definierten Umständen im Vordergrund stand, wurde die Durchflusszytometrie als Messmethode gewählt.

Im Unterschied zum ELISA ist mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Untersuchung einer Zellgruppe in Flüssigkeiten, welche wie das Vollblut heterogene Populationen beinhalten, realisierbar. Dieser Vorteil beruht auf der technischen Voraussetzung zur

gleichzeitigen Unterscheidung der einzelnen Zellarten bezüglich Grösse und Granularität, aber auch mit Hilfe einer spezifischen Oberflächenmarkierung. Somit können auf Zellen Stress ausübende und das Messergebnis möglicherweise beeinflussende Verfahren entfallen, welche für eine Isolierung der zu untersuchenden Zellgruppe erforderlich wären (Bernardo et al., 1997; Dinter et al., 1998; Schuerwegh et al., 2001). Zudem kann parallel zur Messreihe eine Lebend-Tod-Analyse durchgeführt werden.

Durch Belassen der untersuchten Monozyten im natürlichen Milieu während der Inkubationszeit bleiben zudem die Wechselwirkungen mit den anderen Zellgruppen erhalten. Da dieser Aspekt einen wichtigen Bestandteil des in *vitro-Modells* darstellt, war auch in diesem Punkt die Durchflusszytometrie der ELISA-Technik überlegen.

Anhand der Möglichkeit, mittels spezieller Färbe- und Aufarbeitungsmethoden im Durchflusszytometer nicht nur die Zielzellen, sondern auch die Herkunft exprimierter Zytokine reproduzierbar darstellen zu können, ergibt sich ein weiterer Vorteil gegenüber ELISA. ELISA ist als extrazelluläres Verfahren zwar in der Lage, im Überstand exprimiertes Zytokin zu messen. Allerdings ist diese Nachweisform mit Nachteilen behaftet. Die Herkunft der Zytokine ist zum einen nicht eruierbar, wenn der Untersucher auf die Verwendung einer bereits homogenisierten Zellgruppe verzichten möchte. Zum anderen bietet die Durchflusszytometrie gegenüber ELISA den Vorteil, Zytokine in stabilerem Konfigurationszustand als im Serum nachweisen zu können. Koopmanns et al. (1994), Flick et al. (1986) und Frauenberger (2001), konnten in diesem Zusammenhang darstellen, dass die Halbwertszeit vieler Zytokine im Plasma oft sehr kurz ist. So beträgt diese im Falle von TNF α maximal 10,5 min. Aus diesem Grund gestalten sich Zytokinuntersuchungen im Plasma zur Sepsisprädiktion in der klinischen Routine problematisch und haben den Nachteil einer eingeschränkten Beurteilbarkeit (Oberhofer et al., 1999; Takala et al., 1999; Brauner et al., 2000; Rodriguez-Gaspar et al., 2001).

Insbesondere die Frage, ob eine auftretende Verminderung des gemessenen Zytokingehaltes im Überstand auf eine verminderte Expression der Zellen oder auf ein erhöhtes Zellsterben zurückzuführen ist, kann mit ELISA nicht beantwortet werden. Da dieser Aspekt gerade im Rahmen von Untersuchungen unter hyperthermen Umständen wichtig ist, wurde auch hier der Durchflusszytometrie der Vorrang gegeben.

Der Nachteil der Durchflusszytometrie beruht vor allem auf der kostenintensiven Beschaffung des Gerätes und der benötigten Antikörper. Inzwischen wurden Möglichkeiten erarbeitet, die qualitativ erhobenen Messwerte semiquantitativ (durch Berechnung des MFI) oder quantitativ (durch Verwendung von Microbead-gelabelten Probenröhrchen, beispielsweise von BECTON DICKINSON™) darzustellen, so dass die Analysemöglichkeiten nicht mehr als minderwertig gegenüber rein quantitativen Methoden zu werten sind.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Allgemeine Veränderungen der Zytokinexpression unter dem Einfluss von Temperatur in der „Infektionsgruppe“

Die Beobachtung, dass TNF α und IL-8 unter dem Einfluss von LPS immer nach 1 h, und IL-6 nach 2 h Stimulation oberhalb der Nachweisgrenze exprimiert werden, wurde für normotherme Bedingungen bereits von verschiedenen Autoren gemacht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten allerdings zeigen, dass auch unter dem Einfluss von Hyperthermie in Monozyten die Abfolge der Expression stereotyp in derselben Reihenfolge abläuft wie bei 37°C.

Rosenberg et al. (1999) gehören zu denjenigen Autoren, welche diese „Choreographie“ der Zytokinsynthese unter normothermen Bedingungen bereits beschrieben haben. Sie stellten dar, dass TNF α und IL-8 nach bakterieller Stimulation signifikant bereits nach 1 h, IL-6 hingegen erst nach 2 h auftraten.

De Bont et al. (1996) beobachteten mittels Durchflusszytometrie unter dem Einfluss von 37°C die gleiche, Röntgen et al. (2004) eine ähnliche Abfolge der Zytokinaktivierung in Monozyten nach LPS-Stimulation (LPS 10ng/ml). Der Beginn der TNF α -Expression wurde von Röntgen et al. (2004) bereits nach 45 min. festgestellt.

Bezogen auf die Ergebnisse von de Bont (1996) muss allerdings erwähnt werden, dass lediglich 3 Probanden ohne Angaben zu Alter und Geschlecht untersucht wurden.

Im Gegensatz zu den erwähnten Resultaten beschrieben Kwak et al. (2000) unter Verwendung der Durchflusszytometrie unter normothermen Bedingungen eine andere Zytokinkinetik. Demnach traten in LPS-stimulierten menschlichen Monozyten IL-6, IL-8 und TNF α intrazellulär simultan auf. Die Autoren konnten zudem einen gemeinsamen

intrazellulären Abfall von IL-6, IL-8 und TNF α nach 4 h beobachten. Diese Ergebnisse müssen meiner Auffassung nach unter folgenden Gesichtspunkten kritisch betrachtet werden: Neben der niedrigen Probandenzahl (6 Freiwillige) ohne Angabe von Alter und Geschlecht, sowie der Verwendung einer hohen LPS-Konzentration (1 μ g LPS/ml) stützte sich diese Arbeitsgruppe in ihren Aussagen ausschliesslich auf das qualitative Ergebnis (Anteil zytokinpositiver Monozyten in %). Signifikanzen wurden nicht angegeben. Ausserdem zeigt der Vergleich zwischen MFI und Prozent-positivem Anteil in den Ergebnissen in der vorgelegten Untersuchung Differenzen im Verlauf der Kinetik, wie beispielsweise die Analyse von TNF α ergab (S. 22, Abb. 12 und 13). Der MFI ermöglicht somit eine differenziertere Betrachtung der Zytokinexpression.

Auch im Hinblick auf die Aktivität von LPS-stimulierten Monozyten hinsichtlich der intrazellulären Zytokinexpression in Abhängigkeit von der Temperaturhöhe konnten anhand der ermittelten Ergebnisse neue Erkenntnisse gewonnen werden. Im Vergleich zur 37°C-„Normkinetik“ zeigte sich unter dem Einfluss von Hyperthermie für alle untersuchten Zytokine nach frühestens 2 h eine Abnahme der Expression.

Ein vermehrtes Monozytensterben als Grund für diese verminderte monozytäre Aktivität infolge einer onkotisch-thermisch bedingten Nekrose konnte ausgeschlossen werden. Die Anzahl PI-positiver Monozyten lag unabhängig von Temperaturhöhe und Inkubationsdauer zwischen 2 und 3% .

Klostergaard et al. (1989) bestätigten die Beobachtung, dass humane, LPS-stimulierte Monozyten Hyperthermie gut tolerieren. Erst bei 43°C konnten die Autoren eine komplette Blockade der TNF α -Synthese feststellen.

Eine thermisch bedingte Konfigurationsänderung der Proteinstruktur von Zytokinen, welche eine Verminderung der Expression unter Hyperthermie bedingen könnte, kommt laut Narhi et al. (1996) und Zampronio et al. (1995) für die hier untersuchten Temperaturen (39 und 42°C) als Ursache nicht in Frage.

Aufgrund der geringen Zahl der publizierten Ergebnisse kann nur hypothetisch angenommen werden, dass der stereotype Beginn der frühen nichtadaptiven Immunantwort für den Monozyten auch unter Hyperthermie im Zusammenhang mit einer schweren Infektion erhalten bleiben muss, um nachfolgende Abwehrkaskaden in Gang zu setzen. Monozyten gelten bezüglich ihrer Syntheseleistung zudem als

besonders resistent gegenüber hohen Temperaturen. Diese Fähigkeit scheint den Erhalt der Induktionsreihenfolge von $\text{TNF}\alpha$, IL-8 und IL-6 zu gewährleisten. Die schnelle Induktion der $\text{TNF}\alpha$ -Synthese nach Stimulation der Monozyten durch LPS könnte vor allem die Initiation der IL-8- und IL-6-Produktion zum Ziel haben.

Es ist allerdings zur Diskussion zu stellen, auf welche Weise diese zeitversetzte Induktion der Zytokine in dem hier zugrunde liegenden *in vitro*-Modell erfolgen kann. Die Gabe von Brefeldin A verhindert normalerweise eine Ausschleusung von $\text{TNF}\alpha$ ins Serum. Die extrazelluläre Aktivierung der IL-6- und IL-8-Signaltransduktionskette durch $\text{TNF}\alpha$ über ihre bei Monozyten transmembranös gelagerten spezifischen Rezeptoren ist somit nicht möglich. Auch die Aktivierung dieser Rezeptoren durch aus den anderen Leukozytengruppen freigesetzten Zytokine ist nicht möglich, da auch diese durch Brefeldin A an der Ausschleusung dieser Substanzen gehindert werden (Bueno et al., 2001).

Allerdings ist inzwischen bekannt, dass bestimmte Wege der Zytokin-Signaltransduktionskette in verschiedenen Zellarten gemeinsam benutzt werden. Hoffmann et al. (2000) und Li et al. (1998) konnten bereits zeigen, dass eine Aktivierung der verschiedenen Zytokin-Signaltransduktionsketten auch intrazellulär möglich ist. Unter Umständen könnte die in der vorgelegten Untersuchung beobachtete zeitversetzte Synthese von intrazellulärem IL-8 und IL-6 so interpretiert werden, dass die Aktivierung einer solchen intrazellulären Querverbindung durch die bereits induzierte $\text{TNF}\alpha$ -Signaltransduktion eingeleitet wird.

Trotz einer erhaltenen Choreographie der Zytokinaktivierung auch unter hyperthermen Bedingungen konnte ich eine verminderte Aktivität der Zytokinexpression im Vergleich zu normothermen Verhältnissen beobachten. Diese Reduktion der Expression könnte vielfältige Ursachen haben.

Der durch Hyperthermie bedingte intensivierete Zellstoffwechsel mit erhöhtem energetischen Aufwand könnte zur Folge haben, dass essentielle Substanzen zur Durchführung der Zytokinsynthese verbraucht werden. Demgegenüber könnten auch Hemmmechanismen, welche eine zu starke Produktion von Pyrogenen wie $\text{TNF}\alpha$ unter bereits hyperthermen Bedingungen eindämmen und damit eine weitere Erhöhung der Umgebungstemperatur verhindern sollen, als Ursachen für die geringer ausgeprägte Zytokin-Expression von Monozyten in Frage kommen.

5.2.2. Allgemeine Veränderungen der Zytokinexpression unter dem Einfluss von Temperatur in der Kontrollgruppe

Mit Hilfe des *in vitro-Modells* konnte gezeigt werden, dass Monozyten ohne LPS-Stimulation unter dem Einfluss von Temperatur keine intrazelluläre Expression von IL-6, IL-8 oder TNF α oberhalb der Nachweisgrenze aufweisen.

Dieser Sachverhalt wurde bereits von mehreren Untersuchern publiziert (Kappel et al., 1995; Chung et al., 1999). Chung et al. (1991) beispielsweise setzten Probanden einem Hitzestress-Test in Kombination mit körperlichen Übungen aus. Sie fanden im nachfolgend untersuchten Plasma keine Veränderung der Zytokinkonzentration im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Auch Ostberg et al. (2000) konnten nach Erwärmung von Nagern auf eine T_C von 39,8°C in deren Serum keine Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine nachweisen.

Natürlich bedeuten diese Beobachtungen nicht, dass Hyperthermie keinerlei Einfluss auf die Immunfunktion ausübt. Über einen solchen Einfluss wurde in zahlreichen Arbeiten zum Thema lokale- oder Ganzkörperhyperthermie berichtet. Manjili et al. (2002) beschrieben die vielfältigen Einsatzgebiete von Hyperthermie in der Krebstherapie. Allerdings scheinen hierbei vornehmlich Makrophagen an der Immunabwehr beteiligt zu sein. Auch Overgaard et al. (1972) und Dickinson et al. (1982) konnten eine erhöhte Infiltration von Makrophagen in iatrogen erhitzte Tumoren nachweisen.

Allerdings darf meines Erachtens in der Diskussion über den Einfluss von exogen applizierter Hyper- oder Hypothermie (Beilin et al., 1998) auf die Immunantwort nicht vergessen werden, dass dabei immer Zustände vorliegen, welche eine Immunantwort *à priori* notwendig machen, wie perioperative Zustände oder chronische Erkrankungen. Mitteilungen über eine Beeinflussung von Monozyten durch Temperatur ohne entsprechende Begleitumstände waren bislang in der Literatur nicht zu finden. Somit kann man konstatieren, dass Temperatur erst in Verbindung mit LPS in der Lage ist, die monozytäre Zytokinproduktion zu modulieren.

5.2.3. Spezielle Betrachtung der Kinetik von IL-6, IL-8 und TNF α

Die Modulation der intrazellulären Kinetik von IL-6, IL-8 und TNF α in humanen Monozyten durch LPS und Temperatur erfolgt meinen Untersuchungen zufolge different. Intrazellulär exprimiertes IL-6 steigt ab der dritten Stimulationsstunde sowohl unter normo- als auch hyperthermen Bedingungen signifikant an. In Gegensatz dazu erfahren IL-8 und TNF α unter dem Einfluss von Hyperthermie ab der zweiten, beziehungsweise dritten Stunde einen Verhalt ihrer Expression.

Mehrere Publikationen bestätigen diese Ergebnisse, allerdings nur für 37°C. Bislang findet sich in der Literatur keine Darstellung einer monozytären Zytokinkinetik unter hyperthermen Bedingungen. Bezogen auf den nun folgenden Publikationsvergleich muss einschränkend angemerkt werden, dass die Autoren vornehmlich tierische Makrophagen mit stark voneinander variierenden LPS-Konzentrationen zur Stimulation verwandt haben. Eines intrazellulären Messverfahrens bedienten sich ebenfalls nur wenige Arbeitsgruppen. Einige der Autoren untersuchten zudem Zytokine anhand eines *in vivo*-Modells. Eine vergleichende Gegenüberstellung zu meinen Ergebnissen kann daher nur eingeschränkt erfolgen.

Van Zee et al. (1991) zeigten mit Hilfe eines *in vivo*-Experiments, dass im Plasma Escherichia coli- infizierter Schimpansen (Effektive Dosis(ED)_{50/100}) nach 7 h der IL-6-Konzentrationspeak erreicht wurde. Hingegen fiel die IL-8-Konzentration nach peak-Bildung bei 3 h bereits 1 h später wieder signifikant ab. Eine begleitende T_C-Messung wurde nicht vorgenommen, so dass über die Temperaturverhältnisse zum Zeitpunkt der Zytokinausschüttung nichts bekannt ist. Auch Krabbe et al. (2001) stellten nach intravenöser(i.v.) Applikation von LPS in Probanden fest, dass es, 3 h nach Applikation und einer erreichten T_C von 39°C im Plasma, zu einem IL-8-Konzentrationspeak kam. Diesem Maximalanstieg folgte kurz darauf ein signifikanter Abfall.

Die Arbeitsgruppe um Ensor et al. (1994) ermittelte in menschlichen LPS-stimulierten Makrophagen, dass die mRNA-Halbwertszeit von TNF α bei 40°C Umgebungstemperatur 7 min. kürzer war als bei 37°C. Die mRNA-Halbwertszeit von IL-6 hingegen blieb unaffektiert. Allerdings konnte mit dieser Methode keine Aussage über das tatsächliche Expressionsverhalten der Makrophagen getroffen werden.

Rudolph et al. (1998) stellten im Plasma LPS-infizierter Mäuse fest, dass bei einer T_C von 42°C nach LPS-Injektion die Plasmakonzentration von $\text{TNF}\alpha$ nach 2 h und von IL-6 nach 6 h auf ein Maximum anstieg. Nachteilig bei dieser Untersuchung war, wie bei van Zee und Krabbe auch, dass aufgrund der Verwendung von ELISA die exprimierende Zellgruppe nicht identifiziert werden konnte.

Eine Untersuchung neueren Datums von Singh et al. (2000) zeigte in Maus-Makrophagen mittels Western Blot eine zunehmende Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -Transkription, welche in Anwesenheit von Hyperthermie und LPS nach 2 h begann und nach 4 h komplett ausgebildet war. Trotz der Verwendung von Makrophagen kann eine Parallele zu den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit gezogen werden.

Die Gründe für den ähnlichen Verlauf sowie den frühen Verlauf der IL-8- und $\text{TNF}\alpha$ -Kinetik im Gegensatz zu der persistierenden IL-6-Expression können vielfältig sein. Über die Faktoren und ihre Angriffspunkte auf die Zytokinsynthese existieren noch wenige fundierte Ergebnisse. Vor allem auf welche Art und Weise die temperaturabhängige Modulation der Synthese hervorgerufen wird, erlaubt zur Zeit nur Mutmassungen.

Dieser ähnliche Verlauf der Kinetik von $\text{TNF}\alpha$ und IL-8 kann mit der Überlegung begründet werden, dass das Ausmass der IL-8-Expression auch von der bereits erfolgten $\text{TNF}\alpha$ -Expression abhängt. Hoffmann et al. (2000) und auch Li et al. (1998) konnten die Induktion der IL-8-Signaltransduktionskette durch $\text{TNF}\alpha$ zeigen. Hoffmann (2000) machte in LPS-stimulierten Monozyten die Aktivierung von TRAF-6 für die Auslösung der IL-8-Synthese verantwortlich. Li (1998) hingegen beobachtete in Alveolarepithelzellen eine Einflussnahme über p38MAPK auf die Initiation der IL-8-Signaltransduktionskette.

Hersh et al. (1998) wiesen in LPS-stimulierten Makrophagen nach, dass es zu einer dominanten Triggerung der IL-8-Synthese durch exprimiertes $\text{TNF}\alpha$ kommt.

Da in den vorgelegten Ergebnissen nicht nur ein zeitlich ähnlicher Beginn, sondern auch ein nahezu zeitgleicher Abfall der $\text{TNF}\alpha$ - und IL-8-Expression zu beobachten ist, kann nach Betrachtung oben genannter Publikationen zur Diskussion gestellt werden, ob eine Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -Expression im Rahmen von Hyperthermie in LPS-stimulierten Monozyten auch den Verlauf der IL-8-Expression bedingt. Ob und in welchem Masse auch LPS zum untersuchten Zeitpunkt eine direkte Stimulation monozytärer IL-8-

Rezeptoren bewirkt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen – genauso wie die Frage, ob noch andere Inhibitoren der IL-8-Expression existieren.

Unabhängig von der Frage, wodurch induziert oder inhibiert wird, scheint es wichtig zu sein, eine überbordende Expression von IL-8 im Rahmen der frühen nichtadaptiven Immunantwort rasch wieder einzudämmen. Es hat sich im Laufe der Zeit herausgestellt, dass IL-8 nicht nur ein stark wirkendes Pyrogen ist, sondern offenbar dasjenige proinflammatorische Zytokin darstellt, welches während der frühen nichtadaptiven Immunantwort das am stärksten aktivierte Zytokin-Gen in Monozyten darstellt. Wang et al. (2000) fanden in humanen Monozyten, welche sowohl mit Material grampositiver als auch gramnegativer Keime stimuliert wurden, diese ausserordentlich starke Präsenz des Chemokins.

IL-8 hat vor allem die Aufgabe, zu Beginn der Infektion die Chemotaxis für PMN und die Anheftung von Monozyten an das Epithel vor Beginn ihrer Diapedese vorzubereiten. Eine prolongierte oder exazerbierte IL-8-Expression könnte eine noch stärkere Aktivierung beispielsweise der PMN mit zelltoxischen Folgen bewirken. Mit Blick auf die Klinik scheint die Vermutung gerechtfertigt, dass die Intensität der IL-8-Expression eine bedeutende Rolle im Rahmen eines schweren infektiösen Geschehens spielt. Hamano et al. (1998) zeigten, dass septisch erkrankte Patienten einer signifikant höheren Letalität unterlagen, wenn hohe Plasmaspiegel von IL-8 nachweisbar waren. Septiker mit vergleichsweise geringen Konzentrationen von IL-8 wiesen eine bessere Überlebensquote auf.

Zelltoxische Folgen können auch aufgrund einer unkontrollierten TNF α -Expression auftreten. TNF α führt auf zellulärer Ebene zu einer protrahierten Gefässpermeabilisierung, einer Aktivierung diverser zytotoxischer Substanzen sowie zu einer direkten Schädigung von Monozyten (Kornbluth et al., 1986). Der gesamte Organismus kann infolge der überschüssigen TNF α -Expression einen Septischen Schock erleiden (Janeway et al., 1997). Die permanente Anregung der Produktion anderer proinflammatorischer und pyrogener Zytokine wie IL-6 und IL-8 infolge der ausufernden TNF α -Ausschüttung zieht im Verlauf der schweren bakteriellen Infektion eine „Ermüdung“ des Immunsystems nach sich. Patienten in diesem Stadium der Immundekompensation weisen eine schlechte Überlebensprognose auf, wie unter

anderem Cabioglu et al. (2002) zeigen konnten. Der von mir beobachtete frühe Verlauf der monozytären TNF α -Expression dient möglicherweise der Vermeidung zytotoxischer Effekte infolge einer zu stark ausgeprägten Präsenz dieses Pyrogens.

Welche Hemmmechanismen für diesen Expressionsverhalt in LPS- und Hyperthermie-stimulierten Monozyten verantwortlich sind, ist bislang noch weitgehend ungeklärt. Einer dieser Inhibitoren könnte das Heat Shock-Protein(HSP)70 darstellen, welches zu 80-90% in Monozyten exprimiert wird (Oehler et al., 2001). Es hat als Chaperon die Fähigkeit zur Umfaltung von Zellproteinen und tritt bei erhöhter Umgebungstemperatur vermehrt auf (Oehler et al., 2001). Somit können Zellen vor schädlichen Einflüssen wie Hitze bewahrt werden (Asea et al., 2000; Kregel et al., 2002). HSP70 spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Zellapoptose (Malhotra et al., 2002). Vor allen Dingen konnte nachgewiesen werden, dass HSP70 in mononukleären Zellen von Sepsispatienten sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* verstärkt präsent war (Bruemmer-Smith et al., 2001). Yoo et al. (2000) beschrieben für Epithelzellen eine Hemmung der Expression proinflammatorischer Zytokine durch Hemmung der NF κ B-Kaskade infolge einer Einwirkung von HSP. Singh et al. (2000) stellten mit Hilfe der Polymerase Chain-Reaction und Western Blot fest, dass es in LPS-stimulierten menschlichen Makrophagen infolge einer Überexpression des HSP70-induzierenden Heat Shock-Factors-1 zu einer Hemmung des TNF α -Promotors kam.

Dieser Überlegung stehen die Untersuchungen von Asea et al. (2000) gegenüber. Er beobachtete eine CD14-abhängige Induktion proinflammatorischer Zytokine in Monozyten nach Gabe von HSP70. Jiang et al. (1999) und Zellner et al. (2002) fanden sowohl in Nagern, als auch in Probanden eine erhöhte Zytokinantwort, wenn diese vor LPS-Gabe eine exogene T_C-Erhöhung erfuhren.

Da sich die bisher publizierten Arbeiten zu HSP70 und Infektion zumeist nicht auf Monozyten beziehen oder unter normothermen Bedingungen durchgeführt wurden, kann über den möglichen Einfluss von HSP70 auf die TNF α -Antwort in LPS- und Hyperthermie-stimulierten Monozyten nur spekuliert werden. Es ist allerdings nicht unwahrscheinlich, dass HSP70 in Monozyten eine der Hemmsubstanzen von TNF α unter Hyperthermie- und Infektbedingungen darstellt.

PGE₂ könnte ebenfalls als Inhibitor der TNF α -Expression in LPS- und Hyperthermie-stimulierten Monozyten in Frage kommen. Zumindest für Makrophagen ist bekannt,

dass eine LPS-induzierte Synthese von $\text{TNF}\alpha$ bereits 1 h nach Exposition durch intrazellulär gebildetes, COX-1-abhängiges PGE verringert wird (Rouzer et al., 2004). Eine Induktion der PGE_2 -Synthese als Antwort auf den Reiz infolge gramnegativer Erreger und Hyperthermie wurde in Monozyten ebenfalls beschrieben (Hessle et al., 2003; Chen et al., 1987).

Im Gegensatz zur Synthese vorgenannter Zytokine, nimmt die Kinetik von IL-6 einen anderen Verlauf. Dieses schwache Pyrogen hat im Rahmen einer schweren bakteriellen Infektion vor allem auch die Aufgabe, weiterführende Immunkaskaden (Akute Phase-Reaktion) anzustossen, welche das Überleben des Individuums sichern sollen (Dinarello et al., 2004). Vor allem auch unter hyperthermen Bedingungen scheint meiner Auffassung nach eine Fortführung der Expression während der frühen nichtadaptiven Immunantwort erforderlich. Zetterstrom et al. (1998) konnten bereits die protektive Rolle von IL-6 zu Beginn einer schweren bakteriellen Infektion beschreiben – allerdings standen die Zellen dabei unter dem Einfluss von Normothermie.

HSP70, welches möglicherweise eine Hemmfunktion auf $\text{TNF}\alpha$ ausübt und bei Erwärmung oder bakterieller Stimulation von Abwehrzellen stark exprimiert wird, scheint auf die Synthese von IL-6 keinerlei Einfluss zu nehmen. Xie et al. (2002) bewiesen, dass in Monozyten eine Aktivierung der Akuten Phase unter gleichzeitiger HSP70-Transkription ablaufen konnte.

PGE_2 , unter Umständen ebenfalls ein Hemmer der $\text{TNF}\alpha$ -Expression, scheint seinerseits in der Lage zu sein, in Monozyten die IL-6-Synthese zu steigern (Williams et al., 2000; Knoferl et al., 2001). Es kann somit diskutiert werden, ob dieser mögliche Inhibitor von $\text{TNF}\alpha$ unter Umständen gleichzeitig der Induktor von IL-6 in Monozyten sein könnte.

Die Induktion der IL-6-Synthese durch mögliche Inhibitoren der $\text{TNF}\alpha$ -Synthese könnte der Grund für die Steigerung der IL-6-Kinetik auch bei 39 und 42°C unter gleichzeitigem Verhalt der $\text{TNF}\alpha$ - und IL-8-Expression sein. Sollten die angestellten Überlegungen den tatsächlichen Gründen für die unterschiedliche Beeinflussung proinflammatorischer Zytokine entsprechen, so kann konstatiert werden, dass Hyperthermie im Rahmen der frühen nichtadaptiven Immunantwort eine positiv ausgerichtete Modulation auf die Immunantwort in LPS-stimulierten Monozyten junger Probanden ausübt.

6.

SCHLUSSFOLGERUNG

Entwicklungsgeschichtlich betrachtet stellt die frühe nichtadaptive Immunreaktion mit ihrem stereotypen Ablauf ein erfolgreiches Konzept als Antwort auf Infektion und Fieber dar. Es ist deshalb intensiv zu diskutieren und durch experimentelle und klinische Arbeiten zu untermauern, ob iatrogen gesenktes Fieber zur Prognoseverbesserung bei schweren bakteriellen Infektionen eingesetzt werden kann.

Aufgrund der hier vorgelegten Ergebnisse und in Zusammenschau mit der Literatur kann spekuliert werden, dass Hyperthermie Einfluss auf die Regulation der Synthese proinflammatorischer Zytokine in Monozyten junger Probanden nimmt.

Die durch Hyperthermie in bezug auf die Zytokine different modulierte Immunantwort von Monozyten *in vitro* könnte auf eine Systematik dieser Einflussnahme hinweisen. Die inter- und intrazellulären Mechanismen, welche zu dieser Regulation führen, konnten aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

Aus der hier vorgelegten Untersuchung kann ferner nicht auf die Wertigkeit von Hyperthermie im Gesamtkonzept der Immunantwort des menschlichen Organismus geschlossen werden. Es existieren allerdings bereits *in vivo*-Vergleiche und klinische Untersuchungen (Ryan et al., 2003) mit septischen Patienten, welche ebenfalls Zweifel an dem prognoseverbessernden Effekt iatrogenen Temperatursenkung im Rahmen der frühen Phase einer Sepsis aufkommen lassen.

Die Erarbeitung eines detaillierteren Verständnisses der Wechselwirkungen zwischen Temperatur und Infektion setzt meiner Auffassung nach vor allem die Analyse der Angriffspunkte von Temperatur innerhalb der Zytokin-Signaltransduktionskette voraus. Die Analyse sollte vor allem auch unter dem Aspekt des Alters erfolgen. Es ist bekannt, dass die Überlebenschance von älteren Patienten im Rahmen einer schweren bakteriellen Infektion deutlich reduziert ist und Ältere ein anderes Muster der Fieberentwicklung aufweisen. Eine mangelhaft ausgeprägte Regulation der Zytokinsynthese kann ein möglicher Grund für die höhere Sterblichkeitsrate innerhalb dieser Altersgruppe sein.

Die Kenntnis über Fieberregulationsmechanismen auf zellulärer Ebene könnte somit auch eine hinsichtlich des Alters differenzierte therapeutische Temperatursenkung nach sich ziehen und möglicherweise die Überlebensprognose der Erkrankten beeinflussen.

7.

ZUSAMMENFASSUNG

Welchen Einfluss Fieber auf die frühe nichtadaptive Immunantwort zu Beginn einer schweren bakteriellen Infektion ausübt, ist noch weitgehend unverstanden. Insbesondere die Wirkung auf Abwehrzellen wie Monozyten, ist bislang nur wenig untersucht. Monozyten nehmen als Hauptproduzenten proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF α eine wichtige Rolle der Abwehr ein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob Temperatur die intrazelluläre Expression von IL-6, IL-8 und TNF α in LPS-stimulierten menschlichen Monozyten beeinflusst.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde ein *in vitro*-Vollblutmodell zur Simulation einer schweren Infektsituation entwickelt. Monozyten 12 männlicher gesunder Probanden (Durchschnittsalter 30 Jahre) wurden dabei mit LPS (10ng/ml) stimuliert und für 1, 2, 3 oder 6 h bei 37, 39 oder 42°C inkubiert. Die intrazelluläre Messung der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF α wurde nach Antikörper-Markierung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

Es konnte festgestellt werden, dass Temperatur nur in Anwesenheit von LPS die Zytokinexpression in Monozyten modulieren konnte. Eine Stimulation mit Temperatur ohne Anwesenheit von LPS ergab keine Expression oberhalb der Nachweisgrenze. Hyperthermie (39 und 42°C) führte in LPS-stimulierten Monozyten zu einer insgesamt niedrigeren Expressionsrate der untersuchten Zytokine im Vergleich zur 37°C-„Normkinetik“. Ein vermehrtes Zellsterben konnte hier nicht verantwortlich gemacht werden. Die Zelltodrate lag temperaturunabhängig zwischen 2 und 3%. Unter dem Einfluss von Hyperthermie zeigte sich für IL-8 und TNF α nach 2, beziehungsweise 3 h bereits ein Verhalt der Expression. Die IL-6-Kinetik hingegen bot auch unter hyperthermen Bedingungen einen ansteigenden Verlauf.

Hyperthermie wirkt unterschiedlich regulierend auf die Expression proinflammatorischer Zytokine in LPS-stimulierten Monozyten junger Probanden ein. Die IL-6-Expression wird wahrscheinlich zugunsten der Fortführung weiterer Immunkaskaden (Akute Phase-Reaktion) auch bei hohen Temperaturen positiv moduliert. Das bei Überexpression zytotoxisch wirkende TNF α und IL-8, für das eine negative Korrelation zwischen hohen Plasmawerten und der Überlebensprognose septisch Erkrankter bekannt ist, werden durch Hyperthermie und LPS hingegen negativ beeinflusst.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA et al.: HSP 70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6/4 (2000) 435-442
2. Aspinall R: Longevity and the immune response. *Biogerontol* 2000, 1 S. 273-278
3. Baggiolini M, Dewald B, Moser B: Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. *Adv Immunol* 55 (1993) 97-179
4. Balkwill FR, Burke F: The cytokine network. *Immunol Today* 10 (1989) 299-304
5. Belloc F, Dumain P, Boisseau MR et al.: A flow cytometric method using Hoechst 3342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17 (1994): 59-65
6. Beilin B, Shavit Y, Razumovsky J et al.: Effects of mild perioperative hypothermia on cellular immune response. *Anesthesiology* 89/5 (1998) 1133-1140
7. Bernardo J, Billingslea AM, Ortiz MF et al.: Adherence-dependent calcium signalling in monocytes: induction of a CD14-high phenotype, stimulus-responsive subpopulation. *J Immunol Meth* 209/2 (1997), 165-175
8. Bignold LP: Kinetics of chemo-attraction of polymorphonuclear leukocytes towards N-formyl peptide studied with a novel polycarbonate (Nucleopore) membrane in the Boyden chamber. *Experientia* 44 (1988) 518-521
9. Blatteis CM, Sehic E: Fever: how many circulating pyrogens signal the brain?. *News Physiol Sci* 12 (1997) 1-9
10. Bohn W: A fixation method for improved antibody penetration in electron microscopical immunoperoxidase studies. *J Histochem Cytochem* 26 (1978) 293-297
11. Brauner JS, Rohde LE, Clausell N: Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock. *Int Care Med* 26/3 (2000) 305-313
12. Bueno C, Almeida J, Alguero MC et al.: Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. *Cytometry* 46(1) (2001) 33-40

13. Cabioglu N, Bilgic S, Deniz G et al.: Decreased cytokine expression in peripheral blood leukocytes of patients with severe sepsis. *Arch Surg* 137/9 (2002) 1037-1043
14. Cartmell T, Poole S, Turnbull AV et al.: Circulating interleukine-6 mediates the febrile response to localized inflammation in rats. *J Physiol* 526/3 (2000) 653-661
15. Chen BD, Sapareto SA, Chou TH: Induction of prostaglandin production by hyperthermia in murine peritoneal exudate macrophages. *Cancer Res.* 47/1 (1987)11-5
16. Christians ES, Yan LJ, Benjamin IJ: Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med* 30/1 (2002) S43-S50
17. Chung NK, Shabbir M, Lim CL: Cytokine levels in patients with previous heatstroke under heat stress. *Mil Med* 164/4 (1999), 306-310
18. Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T: Similarities of T-cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol* 12 (1974) 150-159
19. Covert JB, Reynolds WW: Survival value of fever in fish. *Nature* 267/5607 (1977), 43-45
20. Darbonne WC: Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest* 88/4 (1991) 1362-1369
21. Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J et al.: Analysis of cell death by flow cytometry. In: *Cell growth and apoptosis. A practical approach.* Studzinski GP (Hrsg). IRL Press, Oxford, UK (1995) 143-167
22. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X: Cytometry in Cell Necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27 (1997) 1-20
23. de Bont ESJM, Niemarkt AE, Tamminga RYJ et al.: Lipopolysaccharide-induced cytokine production in peripheral blood mononuclear cells: intracellular localization of tumor necrosis factor α and interleukin 1 β detected with a three-color immunofluorescence technique. *Histochem Cell Biol* 106 (1996) 593-598
24. de Forge LE, Kenney JS, Jones ML et al.: Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood. Separation of LPS-and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL1 antibodies. *J Immunol* 148/7 (1992) 2133-2141

25. Dickinson JA, Shah SA: Hyperthermia: the immune response and tumor metastasis. *Natl Cancer Inst Monogr* 61 (1982) 183-192
26. Dinarello CA, Cannon JG, Mancillia J et al: Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E₂ in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res* 562 (1991) 199-206
27. Dinarello CA: Cytokines as endogenous pyrogens. *J Inf Dis* 179/Suppl 2 (1999) 294-304
28. Dinarello CA, Gatti S, Bartfai T: Fever: links with an ancient receptor. *Curr Biol* 9 (1999) R147-150
29. Dinarello CA: Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotox Res* 10/4 (2004) 201-222
30. Dinter A, Berger EG: review: Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* 109; 5/6 (1998) 571-590
31. Dobrovolskaia MA, Vogel SN: Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Mic Inf* 4 (2002) 903-914
32. Dziarski R, Gupta D: Role of MD-2 in TLR2- and TLR4- mediated recognition of gram-negative and gram-positive bacteria and activation of chemokine genes. *J Endotoxin Res* 6/5 (2000) 401-405
33. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO et al.: Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol* 14 (1996) 155-177
34. Engvall E, Perlmann P : Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8 (1971) 871-874
35. Ensor JE, Wiener SM, MCCrea KA et al.: Differential effects of hyperthermia on macrophage interleukin- 6 and tumor necrosis factor- alpha expression. *A J Physiol* 266/4 (1994) C967-C974
36. Ershler WB, Keller ET: Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, frailty. *Annu Rev Med* 51 (2000) 245-270
37. Erridge C, Bennet-Guerrero E, Poxton IR: Structure and function of lipopolysaccharides. *Micr Inf* 4 (2002) 837-851
38. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E et al.: Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 23 (1993) 2375-2378

39. Fairchild KD, Viscardi RM, Hester L et al.: Effects of hypothermia and hyperthermia on cytokine production by cultured human mononuclear phagocytes from adults and newborns. *J Interferon Cytokine Res* 20 (2000) 1049-1055
40. Flick DA, Gifford GE: Pharmacokinetics of murine tumor necrosis factor. *J of Immunopharmacol* 8/1 (1986) 89-97
41. Frauenberger P, Walli AK, Seidel D et al.: Zytokinanalytik. Was ist machbar, was ist sinnvoll? *Internist* 42 (2001) 35-46
42. Fujishima S, Nakamura H, Waki Y et al.: Cell-associated IL-8 in human blood monocytes: analysis by flow cytometry. *Cytometry* 24/4 (1996) 382-389
43. Gabay C, Kushner I: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammations. *N Engl J Med* 340 (1999) 448-454
44. Graham TR, Scott PA, Emr SD: Brefeldin A reversibly blocks early but not late protein transport steps in the yeast secretory pathway. *EMBO J* 12 (1993) 869-877
45. Gullestad L, Aukrust P, Ueland T et al.: Effect of high- versus low-dose angiotensin converting enzyme inhibition on cytokine levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 34/7 (1999) 2061-2067
46. Hamano K, Gohra H, Noda H et al.: increased serum interleukin-8: correlation with poor prognosis in patients with postoperative multi organ failure. *World J Surg* 22 (1998) 1077-1081
47. Havemann JW, Müller-Kobold AC, Cohen-Tervaert JW et al.: The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med* 55 (1999) 132-141
48. Hebra A, Strange P, Egbert JM et al.: Intracellular cytokine production by fetal and adult monocytes. *J Pediat Surg* 36/9 (2001) 1321-1326
49. Heesen M, Bloemeke B, Heussen N et al.: Can the interleukin-6 response to endotoxin be predicted? Studies of the influence of a promotor polymorphism of the interleukin-6 gene, gender, the density of the endotoxin receptor CD14, and inflammatory cytokines. *Crit Care Med* 30/3 (2002) 644-649
50. Heesle CC, Andersson B, Wold AE: Gram-negative, but not gram-positive bacteria elicit strong PGE₂ production in human monocytes. *Inflammation* 27/6 (2003) 329-332

51. Heidenreich S: Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides. *J Leukoc Biol* 65/6 (1999) 737-43
52. Henker R et al.: Fever. *AACN Clin Issues* 8/3 (1997) 851-887
53. Hersh D, Weiss J, Zychlinsky A : How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. *Curr Opin Microbiol* 1 (1998) 43-48
54. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H et al.: Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72 (2002) 874-855
55. Ibs K-H, Rink R: Das Immunsystem im Alter. *Z Gerontol Geriat* 34 (2001) 480-485
56. Ingalls RR, Heine H, Lien E et al.: Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipoolysaccharide receptor. *Infect Dis Clin North Am* 13/2 (1999) 341-353
57. Jacobs DB, Pipho C: Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure antibody-mediated cytotoxicity. Resolution of complement-sensitive and resistant cells. *J Immunol Meth* 62 (1983) 101-110
58. Janeway CA, Travers P: Immunologie. 2.Aufl (1997) Springer-Verlag, Heidelberg- Berlin- Oxford, Kap I, II, IX
59. Jiang Q, De Tolla L, van Rooijen N et al.: Febrile-range temperature modifies early systemic tumor necrosis factor alpha expression in mice challenged with bacterial endotoxin. *Inf Immun* 67/4 (1999) 1539-1546
60. Joiner KA, Schmetz MA, Goldmann RC et al.: Mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing: inserted C5b-9 correlates with killing for Escherichia coli O111B4 varying in O-antigen capsule and O-polysaccharide coverage of lipid A core oligosaccharide. *Infect Immun* 45 (1984) 113-117
61. Kahan M: Detecting intracellular cytokines in activated monocytes. *BD Res Life Sci Res Appl Note* 1 (1997) 1-11
62. Kansas GS, Muirhead MJ, Dailey MO: Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood* 76 (1990) 2488
63. Kappel M, Tvede N, Hansen MB et al.: Cytokine production ex vivo: effect of raised body temperature. *Int J Hyperthermia* 11/3 (1995) 329-335
64. Kluger MJ, Rudolph K, Soszynski D et al.: Effect of heat-stress in LPS-induced fever and tumor-necrosis-factor. *Am J Physiol Reg Integ Comp Physiol* 273 (1997) R858-R863

65. Klostergaard J, Barta M, Tomasovic SP: Hyperthermic modulation of tumor necrosis factor-dependent monocyte/macrophage tumor cytotoxicity in vitro. *J Biol Response Mod* 8/3 (1989) 262-277
66. Knoferl MW, Diodato MD, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Cyclooxygenase-2-mediated regulation of Kupffer cell interleukin-6 production following trauma-hemorrhage and subsequent sepsis. *Shock* 16/6 (2001) 479-483
67. Koester SK, Bolton WE: Intracellular markers. *J Immun Meth* 243 (2000) 99-106
68. Koopmans R, Hoeck FJ, van Deventer SJ et al.: Model of whole body production of tumor necrosis-factor-alpha in experimental endotoxaemia in healthy subjects. *Clin Sci (Lond.)* 87/4 (1994) 459-465
69. Kornbluth RS, Eddington TS: Tumor necrosis factor production by human monocytes is a regulated event: induction of TNF α -mediated cellular cytotoxicity by endotoxin. *J Immunol* 8 (1986) 2585-2591
70. Kozak W, Kluger MJ, Tesfaigzi J et al.: Molecular mechanisms of fever and endogenous antipyresis. *Ann N Y Acad Sci* 917 (2000) 121-134
71. Krabbe KS, Bruunsgaard H, Hansen CM et al.: Ageing is associated with a prolonged fever response in human endotoxemia. *Clin Diagn Lab Immunol* 8/2 (2001) 333-338
72. Kregel KC: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92/5 (2002), 2177-2186
73. Kwak DJ, Augustine NH, Borges WG et al.: Intracellular and extracellular cytokine production by human mixed mononuclear cells in response to group B streptococci. *Infect Immun* 68/1 (2000) 320-327
74. Laburn HP, Rosendorff C, Willies G et al.: a role for noradrenalin al cyclic AMP in Prostaglandin E₁ fever. *J Physiol (Lond)* 240 (1974) 49P-50P
75. Ladinsky MS, Howell KE: The trans-Golgi network can be dissected structurally and functionally from the cisternae of the Golgi-complex by brefeldin A. *Eur J Cell Biol* 59 (1992) 92-105
76. Levin S : Commentary: a toxicologic pathologist's view of apoptosis or I used to call it necrobiosis, but now I'm singing the apoptosis blues. *Toxicol Path* 23(1995) 533-539

77. Leon LR: Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J Appl Physiol* 92/6 (2002) 2648-2655
78. Li J, Kartha S, Iasvovskaia S et al.: Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283 (2002) L690-L699
79. Liebermeister C: Vorlesungen. Über Spezielle Pathologie und Therapie Verlag Vogel, Leipzig, 1887
80. Liebmann PM, Reibnegger G, Lehofer M et al.: Circadian rhythm of the soluble p75 tumor necrosis factor (sTNF-R75) receptor in humans--a possible explanation for the circadian kinetics of TNF- α effects. *Int Immunol*. 10/9 (1998) 1393-1396
81. Long NC, Kunkel SL, Vander AJ et al.: Antiserum against TNF enhances LPS fever in the rat. *Am J Physiol* 258 (1990) R591-595
82. Loppnow H: Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Internist* 1(2001) 13-27
83. Malhotra V, Wong HR: Interactions between the heat shock response and the nuclear factor- κ B signalling pathway. *Crit Care Med* 30/1 (2002) S89-S95
84. Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146 (1995) 3-16
85. Madretsma S, Wolters LM, van Dijk JP et al.: In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8/10 (1996) 1017-1020
86. Manjili MH, Wang XY, Parl J et al.: Cancer Immunotherapy: stress proteins and hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 18/6 (2002) 506-520
87. Narhi LO, Philo JS, Li T et al.: Induction of α -helix in the β -sheet protein tumor necrosis factor- α : thermal- and trifluoroethanol- induced denaturation at neutral pH. *Biochemistry* 35 (1996) 11447-11453
88. Netea MG, Kullberg BJ, van der Meer JW: Circulating cytokines as mediators of fever. *Clin Infect Dis* 31/Suppl 5 (2000) 178-84
89. O'Brien MC, Bolton WE: Comparison of cell viability probes compatible with fixation and permeabilisation for combined surface and intracellular staining in flow cytometry. *Cytometry* 19 (1995) 243

90. Oberhofer M, Vogelsang H, Russwurm S et al.. Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med* 37/3 (1999) 363-368
91. Oehler R, Pusch E, Zellner M et al.: Cell type-specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by feverlike whole body hyperthermia. *Cell Stress Chaperones* (2001) 6/4 306-315
92. Opal SM, Scannon PJ, Vincent J-L et al.: Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 180 (1999) 1584-1589
93. Ostberg, JR, Taylor SL, Baumann H et al.: Regulatory effects of fever-range whole-body hyperthermia on the LPS-induced acute inflammatory response. *J Leukoc Biol* 68/6 (2000) 815-820
94. Overgaard K, Overgaard J: Investigations on the possibility of a thermic tumor therapy. I. Short wave treatment of a transplanted isologous mouse mammaria carcinoma. *Eur J Cancer* 8 (1972) 65-78
95. Pala P, Hussel T, Openshaw PJM: Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immun Meth* 243 (2000) 107-124
96. Pawelec G: Immunosenescence: impact in the young as well as the old? *Mech Ageing Dev* 108 (1999) 1-7
97. Petrovsky N, Mc Nair P, Harrison LC: Diurnal rhythms of proinflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine* 10/4 (1998) 33307-312
98. Prussin C, Metcalfe DD: Detection of intracytoplasmatic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anticytokine antibodies. *J Immunol Meth* 188 (1995) 117
99. Radbruch A (Hrsg.): In: *Flow cytometry and Cell Sorting*. Springer Verlag Berlin- Heidelberg-New York. 1.Aufl , 1997, Kap.I, S.7-27
100. Raffael A, Nebe CTh, Valet G: Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: Schmitz G, Rothe G (Ed): In: *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schattauer Verlag Stuttgart, New York 1.Auflge, 1994, Kap III, S. 3-37
101. Rensing H: Endotoxin. Pathogenetische Bedeutung bei der Sepsis. *Anästhesist* 52/Suppl 1 (2003) S7-S13

102. Rodriguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-Lopez A et al. : Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine* 15/4 (2001) 232-236
103. Röntgen P, Sablotzki A, Simm A et al.: Effect of catecholamines on intracellular cytokine synthesis in human monocytes. *Eur Cytokine Net* 15/1 (2004) 14-23
104. Rosenberg HF, Gallin JI: Inflammation. In: W.E. Paul (Ed): *Fundamental Immunology*, Lippincott-Ravon, Philadelphia, 1999, 1. Auflage, Kapitel IV, S. 1051-1066
105. Rouzer CA, Kingsley PJ, Wang H et al. Cyclooxygenase-1-dependent prostaglandin synthesis modulates tumor necrosis factor-alpha secretion in lipopolysaccharide-challenged murine resident peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 279/33 (2004) 34256-34268
106. Rudolph K, Gourine AV, Korsack AS et al: Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha during fever induced by bacterial infection. *Ann N Y Acad Sci* Sep29/856 (1998), 300-303
107. Ryan M, Levy MM: Clinical review: fever in intensive care unit patients. *Crit Care* 7/3 (2003) 221-225
108. Saper CB, Breder CD: The neurologic basis of fever. *N Engl J Med* 330 (1994) 1880-1886
109. Saper CB: Neurobiological bases of fever. *Ann NY Acad Sci* 856 (1998) 90-94
110. Scherle PA, Jones EA, Favata MF et al.: Inhibition of MAP Kinase prevents Cytokine and Prostaglandin E₂ production in Lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J Immunol* 161(1998) 5681-5686
111. Senftleben U, Karin M: The IKK/NFκB pathway. *Crit Care Med* 30/1 (2002)S18-S26
112. Schraut W, Wendeglass P, Calzada-Wack JC et al.: The gene expression in monocytes of low and high responder individuals. *Cytokine* 9 (1997) 206-211
113. Schroeder S, Bischoff J, Lehmann LE et al.: Endotoxin inhibits heat shock protein 70 (HSP70) expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with severe sepsis. *Int Care Med* 25/1 (1999)
114. Schuerwegh AJ, Stevens WJ, Bridts CH et al.: Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor- alpha in monocytes. *Cytometry* 15/46 (2001) 172-176
115. Schütt C: CD 14. *Int J Biochem Cell Biol* 31/5 (1999) 545-549

116. Schwarz E, Schafer C, Bode JC et al.: Influence of the menstrual cycle on the LPS-induced cytokine response of monocytes. *Cytokine* 12/4 (2000) 413-416
117. Shenep JL, Flynn PM, Barrett FF et al.: Serial quantitation of endotoxemia and bacteriemia during therapy for gram-negative bacterial sepsis. *J Infect Dis* 157 (1988) 565- 568
118. Shimazu R, Akashi S, Ogata H et al.: MD-2, a molecule that converts lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189 (1999) 1777-1782
119. Shiratori Y, Takada H, Hai K et al. : Effect of anti-allergic agents on chemotaxis of neutrophils by stimulation of chemotactic factor released from hepatocytes exposed to ethanol. *Dig Dis Sci* 39/7 (1994) 1569-1575
120. Singh IS, Viscardi R, Kalvakolanu M et al: Inhibition of tumor necrosis factor- α transcription in macrophages exposed to febrile range temperature. *J Biol Chem* 271 (2000) 9841-9848
121. Stelter F, Bernheiden M, Menzel R et al.: Mutation of amino acids 39-44 abrogates binding of lipopolysaccharide and *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 243 (1997) 100-109
122. Suzuki M, Tetsuka T, Yoshida S et al.: The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and production from the TNF-alpha- or IL-1 beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett* 465 (2000) 23-27
123. Takala A, Jousela I, Jansson S-E et al.: Markers of systemic inflammation predictiong organ failure in community-acquired septic shock. *Clin Sci* 97 (1999) 529-538
124. Tanamoto U, Zahringer GR, Mckenzie C et al.: biological activities of synthetic lipid A analogues: pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity and induction of gelation of limulus amoebocyte lysate. *Infect Immun* 44 (1984) 421-426
125. Tang GJ, Huang SL, Yien HW et al: Tumor necrosis gene polymorphism and septic shock in surgical infection. *Crit Care Med* 28/8 (2000) 2733-2736
126. The WHO IUIS: Nomenclature for secreted regulatory proteins of the immune system (interleukins). *Immunol Today* 13 (1992) 118
127. van Deventer SJ, Buller HR, ten Cate JW et al.: Endotoxaemia: an early predictor of septicaemia in febrile patients. *Lancet* 1 (1988) 605-609

128. van Zee KJ, De Forge LE, Fischer E et al.: IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol* 146/10 (1991) 3478-3482
129. Volk HD, Reinke P, Krausch D et al.: Monocyte deactivation: rationale for a new therapeutic strategy in Sepsis. *Int Care Med* 22 (1996) 474-481
130. Wang Z-M, Liu C, Dziarski R: Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *J Biol Chem* 275/27 (2000) 20260-20267
131. Warny M, Kentes AC, Keates S et al.: p38 MAP kinase activation by clostridium difficile toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest* 105 (2000) 1147-1156
132. Williams JA, Pontzer CH, Shacter E: Regulation of macrophage interleukin-6 (IL-6) and IL-10 expression by prostaglandin E₂: the role of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* 20/3 (2000) 291-298
133. Xie Y, Changmin C, Stevenson MA et al.: NF-IL6 and HSF1 have mutually antagonistic effects on transcription in monocytic cells. *Biochem Biophys Res Com* 291 (2002), 1071-1080
134. Xing Z, Gauldie G, Cox H et al: IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatoria responses. *J Clin Investig* 101 (1998), 311-320
135. Yoo C-G, Lee S, Lee C-T et al.: Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization on I κ B α through preventing I κ B Kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Immunol* 164 (2000) 5416-5423
136. Yerushalmi A, Lwoff A: Treatment of infectious coryza and persistent allergic rhinitis with thermotherapy. *C R Seances Acad Sci* 291/12 (1980) 957-959
137. Zampronio AR, Souza GE, Silva CA et al.: Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. *Am J Physiol* 266/5Pt2 (1994) R1670-1674
138. Zampronio AR, Silva CA, Cunha FQ et al.: Indomethacin blocks the febrile response induced by interleukin-8 in rabbits. *Am J Physiol* 269/6Pt2 (1995) R1469-R1474
139. Zeilhofer HU, Schorr W: Role of interleukin-8 in neutrophil signalling. *Curr Opin Hematol* 7/3 (2000) 178-182
140. Zellner M, Hergovics N, Roth E et al.: Human monocyte stimulation by experimental whole body hyperthermia. *Wien Klin Wochenschr* 114/3 (2002) 102-107

Tabelle 1: IL-6-Kinetik nach Stimulation mit LPS (10 ng/ml)

37°C												39°C												42°C														
	1h	2h	3h	6h	mean 1h	mean 2h	mean 3h	mean 6h	MFI 1h	MFI 2h	MFI 3h	MFI 6h		1h	2h	3h	6h	mean 1h	mean 2h	mean 3h	mean 6h	MFI 1h	MFI 2h	MFI 3h	MFI 6h		1h	2h	3h	6h	mean 1h	mean 2h	mean 3h	mean 6h	MFI 1h	MFI 2h	MFI 3h	MFI 6h
P 1	0,38	2,73	20,66	92,02	12,76	24,56	17,78	90,10	0,05	0,67	3,67	82,91	P 1	0,89	2,42	5,58	95,86	13,22	20,37	28,11	87,14	0,12	0,49	1,57	83,53	P 1	0,24	5,15	0,88	68,26	45,82	23,09	19,57	69,40	0,11	1,19	0,17	47,37
P 2	0,59	4,37	19,83	91,95	35,33	19,06	19,12	95,40	0,21	0,83	3,79	87,72	P 2	0,84	2,35	4,56	95,88	96,95	22,41	25,93	80,10	0,81	0,53	1,18	76,80	P 2	0,57	11,96	0,55	60,13	36,91	22,19	26,37	60,98	0,21	2,65	0,15	36,67
P 3	0,13	3,07	20,94	95,63	7,20	28,28	13,87	100,10	0,01	0,87	2,90	95,73	P 3	0,44	11,96	0,90	93,54	12,57	20,86	30,39	15,31	0,06	2,49	0,27	14,32	P 3	0,26	9,18	0,46	37,80	7,30	28,33	31,94	48,09	0,02	2,60	0,15	18,18
P 4	0,30	13,82	22,29	87,32	9,18	24,13	12,98	100,18	0,03	3,33	2,89	87,48	P 4	0,72	11,85	0,89	92,83	5,82	25,01	64,68	13,55	0,04	2,96	0,58	12,58	P 4	0,08	7,63	1,65	18,52	7,43	18,97	13,31	42,18	0,01	1,45	0,22	7,81
P 5	2,16	28,54	32,15	94,56	10,51	16,95	13,88	82,81	0,23	4,84	4,46	78,31	P 5	0,98	23,34	0,46	72,62	10,65	23,21	37,32	79,39	0,10	5,42	0,17	57,65	P 5	0,64	34,72	0,17	13,76	18,24	17,21	12,38	27,56	0,12	5,98	0,02	3,79
P 6	0,15	9,16	18,50	96,77	11,10	18,62	14,16	80,26	0,02	1,71	2,62	77,67	P 6	0,36	16,99	0,86	92,73	7,40	22,77	29,25	92,20	0,03	3,87	0,25	85,50	P 6	0,16	16,89	0,24	13,02	11,10	31,00	12,34	26,59	0,02	5,24	0,03	3,46
P 7	0,52	11,03	41,51	85,11	46,62	19,17	13,18	100,44	0,24	2,11	5,47	85,48	P 7	0,45	22,77	39,38	76,47	16,71	22,38	12,02	98,34	0,08	5,10	4,73	75,20	P 7	0,34	6,34	1,01	60,81	54,70	23,79	19,18	59,30	0,19	1,51	0,19	36,06
P 8	0,37	6,68	25,43	85,86	42,69	22,09	11,44	100,40	0,16	1,48	2,91	86,20	P 8	0,47	19,14	33,64	61,84	17,17	21,11	12,10	86,10	0,08	4,04	4,07	53,24	P 8	0,62	5,48	12,67	28,25	59,26	25,11	17,99	37,35	0,37	1,38	2,28	10,55
P 9	0,30	35,35	32,18	76,75	9,18	18,82	10,58	66,78	0,03	6,65	3,40	51,25	P 9	2,82	26,25	31,12	46,71	16,76	18,63	12,51	25,38	0,47	4,89	3,89	11,85	P 9	0,10	4,51	1,02	20,54	7,43	19,50	12,57	24,01	0,01	0,88	0,13	4,93
P 10	0,00	26,68	57,51	71,43	8,13	19,27	13,12	72,00	0,00	5,14	7,55	51,43	P 10	0,35	25,63	40,15	58,53	19,04	17,70	13,56	52,12	0,07	4,54	5,44	30,51	P 10	0,08	1,41	2,41	27,12	7,43	31,32	10,86	33,11	0,01	0,44	0,26	8,98
P 11	0,69	24,71	30,67	81,02	22,25	26,11	20,16	89,11	0,15	6,45	6,18	72,20	P 11	0,73	32,90	44,70	71,45	48,03	27,47	21,84	17,23	0,35	9,04	9,76	12,31	P 11	0,99	12,03	1,14	20,07	52,27	22,09	21,72	35,27	0,52	2,66	0,25	7,08
P 12	0,45	26,44	75,31	69,29	37,88	30,98	48,32	89,13	0,17	8,19	36,39	61,76	P 12	0,62	25,89	53,23	60,03	43,11	26,00	28,24	16,34	0,27	6,73	15,03	9,81	P 12	0,26	11,56	1,30	19,43	59,75	19,96	19,85	29,32	0,16	2,31	0,26	5,70
Med	0,50	12,08	59,81	81,13	35,26	17,47	19,89	65,04	0,18	2,11	11,90	52,77	Med	0,31	26,78	34,36	81,64	39,13	25,13	21,21	31,64	0,12	6,73	7,29	25,83	Med	0,20	44,46	35,07	10,79	39,04	19,82	27,16	62,34	0,08	8,81	9,53	6,73
SEM	0,96	15,39	84,05	67,98	73,68	21,85	0,00	63,25	0,71	3,36	0,00	43,00	SEM	2,01	14,12	63,54	56,80	17,74	28,94	62,66	37,97	0,36	4,09	39,81	21,57	SEM	0,61	11,02	47,31	28,53	46,96	20,03	34,47	26,83	0,29	2,21	16,31	7,65
t-T	0,67	19,46	48,74	63,80	37,74	33,36	56,25	56,00	0,25	6,49	27,42	35,73	t-T	0,39	24,68	29,12	59,14	30,19	24,69	17,25	41,40	0,12	6,09	5,02	24,48	t-T	0,26	12,05	6,59	2,68	54,11	26,12	20,95	52,04	0,14	3,15	1,38	1,39
t-T-1h	0,77	28,55	46,39	70,20	30,07	25,12	73,83	59,98	0,23	7,17	34,25	42,11	t-T-1h	0,22	29,71	38,75	65,91	35,19	29,22	70,05	46,17	0,08	8,68	27,14	30,43	t-T-1h	0,56	14,37	7,25	40,84	57,23	27,14	22,33	55,87	0,32	3,90	1,62	22,82
	0,11	4,65	81,55	81,79	56,12	32,38	35,50	100,54	0,06	1,51	28,95	82,23		0,52	4,05	81,99	69,73	31,61	30,98	33,84	42,97	0,16	1,25	27,75	29,96		0,29	4,75	17,38	20,28	27,82	32,19	23,70	49,11	0,08	1,53	4,12	9,96
	0,61	29,45	79,57	90,52	53,28	20,93	69,46	100,54	0,33	6,16	55,27	91,01		0,68	55,49	66,57	60,77	41,09	26,35	53,57	39,45	0,28	14,62	35,66	23,97		0,33	1,86	10,89	32,20	23,66	31,66	53,80	34,25	0,08	5,99	5,86	11,03
	2,29	24,68	62,46	94,64	59,98	23,90	19,56	100,95	1,37	5,90	12,22	95,54		2,08	5,82	60,54	93,24	56,11	23,98	19,60	85,31	1,17	1,40	11,87	79,54		0,38	7,95	23,67	45,02	66,17	35,28	35,54	31,20	0,25	2,80	8,41	14,05
	0,91	4,03	82,82	93,23	66,21	22,01	80,27	58,96	0,60	0,89	66,48	54,97		1,04	3,75	57,38	71,46	90,53	28,06	28,83	41,08	0,94	1,05	16,54	29,36		0,68	10,08	63,01	41,07	61,60	20,34	54,73	30,10	0,42	2,05	34,49	12,36
	0,77	9,99	79,13	90,96	11,15	19,30	24,95	57,83	0,09	1,93	19,74	52,60		0,50	17,17	60,70	80,44	10,78	26,95	25,07	79,73	0,05	4,63	15,22	64,13		0,86	3,22	1,54	42,78	59,56	27,72	30,91	8,92	0,51	0,89	0,48	3,82
	0,33	13,46	81,90	96,34	35,54	21,73	47,07	58,88	0,12	2,92	38,55	56,72		0,29	36,23	69,84	88,73	49,62	25,78	35,89	13,73	0,14	9,34	25,07	12,18		0,13	10,03	14,91	31,15	53,93	21,52	45,48	8,76	0,07	2,16	6,78	2,73
	0,45	11,66	77,43	90,65	46,71	24,12	53,50	78,11	0,21	2,81	41,43	70,81		1,11	19,01	69,80	91,54	59,27	23,56	61,51	41,39	0,66	4,48	42,93	37,89		0,35	4,06	8,51	65,84	68,84	25,67	49,80	30,54	0,24	1,04	4,24	20,11
	0,98	14,08	43,35	88,43	87,45	22,78	66,25	88,21	0,86	3,21	28,72	78,00		0,89	19,99	36,94	81,69	60,67	25,67	33,25	33,15	0,54	5,13	12,28	27,08		0,10	8,12	30,38	69,83	64,36	30,11	29,84	29,20	0,06	2,44	9,07	20,39
Med	0,51	13,64	47,57	87,88	35,44	22,05	19,73	85,51	0,17	3,07	9,72	74,93	Med	0,65	19,57	39,07	74,55	30,90	24,85	28,54	41,40	0,13	4,58	8,53	29,66	Med	0,31	8,65	4,50	29,84	49,62	24,45	23,02	33,68	0,13	2,18	0,93	9,47
SEM	0,21	1,98	4,89	2,02	4,61	0,91	4,75	3,38	0,06	0,47	3,76	3,69	SEM	0,13	2,47	5,10	2,99	5,01	0,67	3,50	5,67	0,06	0,65	2,64	5,17	SEM	0,05	1,96	3,34	3,88	4,33	1,01	2,62	3,21	0,03	0,38	1,53	2,39
t-T	0,00	0,00	0,00	0,02	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	t-T	0,00	0,00	0,00	0,06	0,04	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	t-T	0,00	0,74	0,00	0,00	0,50	0,01	0,00	0,24	0,00	0,24	0,00	0,00
t-T-1h	0,00	0,00	0,00	0,02	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	t-T-1h	0,00	0,00	0,00	0,06	0,74	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	t-T-1h	0,74	0,00	0,00	0,00	0,01	0,56	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00

Tabelle 2: Multivariananalyse IL-6

Globale Effekte	IL-6	Paarweiser Vergleich: Effekt Zeit			Paarweiser Vergleich: Effekt Temperatur			
		Effekt	Zeit A	Zeit B	p-Wert	Effekt	Zeit A	p-Wert
Wiederholung	0,8209	Zeit	1	2	0,5343	T*Zeit	1	0,9994
Temperatur	<0,0001	Zeit	1	3	<0,0001	T*Zeit	2	0,7805
Zeit	<0,0001	Zeit	1	6	<0,0001	T*Zeit	3	0,0002
T*Zeit	<0,0001	Zeit	2	3	0,0002	T*Zeit	6	<0,0001
		Zeit	2	6	<0,0001			
		Zeit	3	6	<0,0001			

Tabelle 3: TNFa-Kinetik nach Stimulation mit LPS (10 ng/ml)

37°C	mean												39°C	mean												42°C	mean											
	1h	2h	3h	6h	1h	2h	mean 3h	mean 6h	1h	2h	3h	6h		1h	mean 2h	3h	6h	1h	2h	3h	6h	1h	2h	3h	6h		1h	2h	3h	6h								
P 1	54,52	29,90	57,14	94,79	30,59	48,03	83,29	74,62	16,68	14,36	47,59	70,73	61,12	36,27	73,41	94,29	32,15	37,49	73,41	28,02	19,65	13,60	53,89	26,42	28,78	62,46	54,63	96,27	47,15	72,93	39,27	29,93	13,57	45,55	21,45	28,81		
	11,57	46,98	63,09	94,54	26,05	45,49	98,94	92,40	3,01	21,37	62,42	87,35	4,35	30,92	83,77	94,50	27,67	36,99	83,77	24,41	1,20	11,44	70,17	23,07	2,75	56,65	41,91	91,65	40,10	42,28	28,95	17,34	1,10	23,95	12,13	15,89		
P 2	5,05	34,90	30,72	94,48	8,29	25,02	19,85	54,70	0,42	8,73	6,10	51,68	5,94	29,80	44,53	87,77	21,51	29,03	44,53	17,02	1,28	8,65	19,83	14,94	3,62	33,70	13,61	88,26	8,58	42,87	43,66	14,41	0,31	14,45	5,94	12,72		
	4,90	38,35	31,80	94,45	7,84	43,11	16,92	52,32	0,38	16,53	5,38	49,42	28,82	51,86	31,87	87,22	21,13	22,11	31,87	17,69	6,09	11,47	10,16	15,43	5,94	10,13	9,22	38,05	8,48	26,18	43,97	7,52	0,50	2,65	4,05	2,86		
P 3	66,95	79,11	25,20	76,84	19,59	42,08	16,92	38,54	13,12	33,29	4,26	29,61	76,48	42,73	41,32	68,47	22,40	30,26	41,32	28,90	17,13	12,93	17,07	19,79	7,87	63,58	31,37	47,65	13,15	58,56	15,99	20,77	1,03	37,23	5,02	9,90		
	56,97	33,50	46,74	82,74	22,04	25,41	20,23	37,17	12,56	8,51	9,46	30,75	51,56	29,72	52,34	85,80	28,12	26,71	52,34	17,44	14,50	7,94	27,39	14,96	0,35	50,17	6,57	47,34	16,87	43,29	14,08	6,08	0,06	21,72	0,93	2,88		
P 4	48,92	33,50	54,83	84,38	74,83	30,48	17,33	11,34	36,61	10,21	9,50	9,57	45,62	55,49	73,66	91,70	61,94	36,71	73,66	10,83	28,26	20,37	54,26	9,93	3,65	37,02	23,58	75,38	25,08	26,74	12,33	11,48	0,92	9,90	2,91	8,65		
	10,80	30,20	58,24	83,00	61,30	48,46	16,24	43,15	6,62	14,63	9,46	35,81	17,26	62,89	60,33	84,93	21,48	72,35	60,33	38,46	3,71	45,50	36,40	32,66	5,75	60,55	58,72	47,91	19,36	69,06	11,74	17,89	1,11	41,82	6,89	8,57		
P 5	3,87	75,49	65,66	64,25	8,04	65,71	19,47	91,50	0,31	49,60	12,78	58,79	59,43	68,43	88,61	56,91	70,12	38,05	88,61	97,16	41,67	26,04	78,52	55,29	1,24	71,70	21,23	47,12	42,12	51,62	14,69	89,15	0,52	37,01	3,12	42,01		
	2,19	48,34	69,90	65,77	10,04	25,41	23,23	68,01	0,22	12,28	16,24	44,73	3,23	64,63	74,25	85,74	72,85	38,29	74,25	70,80	2,35	24,75	55,13	60,70	2,28	34,17	42,24	50,05	17,89	24,34	11,73	90,03	0,41	8,32	4,95	45,06		
P 6	17,47	50,20	40,57	75,10	30,93	56,11	67,00	38,01	5,40	28,17	27,18	28,55	18,12	37,39	71,37	87,99	25,39	35,14	71,37	30,87	4,60	13,14	50,94	27,16	6,16	12,13	69,97	16,82	52,96	28,59	52,00	57,72	4,54	3,47	36,38	9,71	2,40	
	11,71	44,25	39,40	76,93	36,43	55,90	72,81	38,77	4,27	24,74	28,69	29,83	15,01	38,43	69,58	91,81	29,51	38,71	69,58	31,23	4,43	14,88	48,41	28,67	20,33	62,95	14,96	72,61	29,28	34,34	43,06	17,11	5,95	21,62	6,44	12,42		
P 7	2,00	53,74	74,97	82,42	25,96	74,62	40,06	64,83	0,52	40,10	30,03	53,43	16,12	42,59	80,20	87,66	18,55	51,51	80,20	44,83	2,99	21,94	64,32	39,30	7,14	14,15	71,17	79,00	47,55	32,64	59,97	31,55	14,92	4,62	42,68	24,92	7,09	
	3,82	13,84	74,98	96,98	31,90	22,19	100,13	87,78	1,22	3,07	75,08	85,13	4,78	29,63	89,38	60,28	19,29	24,64	89,38	77,37	0,92	7,30	79,89	46,64	3,04	32,98	62,32	36,31	28,32	29,23	35,48	45,46	0,86	9,64	22,11	16,51		
P 8	0,84	50,73	34,29	69,40	34,76	71,12	17,69	95,33	0,29	36,08	6,07	66,16	20,12	71,50	65,41	67,92	30,53	48,12	65,41	82,93	6,14	34,41	42,78	56,33	12,65	63,91	47,69	30,91	24,03	48,26	42,66	30,91	3,04	30,84	20,34	9,55		
	0,66	75,74	64,08	69,84	30,11	72,11	102,02	93,12	0,20	54,62	65,37	65,04	27,45	50,17	61,45	86,98	29,18	42,23	61,45	90,11	8,01	21,19	37,76	78,38	8,09	55,73	38,93	29,73	25,00	74,04	57,89	77,32	2,02	41,26	22,54	22,99		
P 9	28,23	30,75	92,78	59,57	19,57	39,92	75,84	50,86	5,52	12,28	70,36	30,30	44,22	44,11	92,94	67,97	24,36	38,38	92,94	22,13	10,77	16,93	86,38	15,04	4,09	35,33	76,78	39,53	17,64	44,13	75,15	13,84	0,72	15,59	57,70	5,47		
	29,88	77,14	78,22	54,41	24,87	40,15	93,23	59,60	7,43	30,97	72,92	32,43	18,42	87,63	75,99	68,75	22,68	52,59	75,99	50,85	4,18	46,08	57,74	34,96	9,72	54,39	51,06	57,73	32,56	46,43	76,19	40,19	3,16	25,25	38,90	23,20		
P 10	66,95	71,04	86,68	96,16	25,65	68,25	53,35	86,92	17,17	48,48	46,24	83,58	76,48	57,42	93,22	97,18	26,54	45,04	93,22	87,54	20,30	25,86	86,90	85,07	24,84	32,33	70,22	64,09	20,29	50,43	33,64	69,11	5,04	16,30	23,62	44,29		
	36,17	50,17	94,81	89,66	20,24	54,22	63,40	100,91	7,32	27,20	60,11	90,48	28,26	76,10	64,36	91,78	21,57	47,80	64,36	90,63	6,10	36,38	41,42	83,18	3,16	86,86	96,23	82,12	33,43	70,03	41,23	86,94	1,06	60,83	39,68	71,40		
P 11	1,31	32,28	85,01	80,03	12,07	28,21	50,00	100,34	0,16	9,11	42,51	80,30	18,84	56,99	85,62	88,65	17,42	46,41	85,62	80,41	3,28	26,45	73,31	71,28	6,16	51,96	12,66	87,17	7,06	30,76	38,64	17,65	0,43	15,98	4,89	15,39		
	14,75	38,78	84,96	81,92	18,90	27,26	68,70	100,65	2,79	10,57	58,37	82,45	12,71	36,85	82,05	85,79	18,11	26,83	82,05	56,27	2,30	9,89	67,32	48,27	10,98	39,77	54,30	82,70	25,85	31,15	38,36	15,95	2,84	12,39	20,83	13,19		
P 12	5,92	40,05	95,96	92,45	16,67	53,45	73,44	100,54	0,99	21,41	70,47	92,95	25,15	49,11	96,74	95,05	17,93	40,18	96,74	89,34	4,51	19,73	93,59	84,92	18,29	55,09	80,79	93,07	17,73	44,65	41,55	72,72	3,24	24,60	33,57	67,68		
	23,86	43,22	73,85	90,26	19,89	54,19	100,67	100,62	4,75	23,42	74,34	90,82	32,20	50,43	76,47	89,88	21,16	45,23	76,47	63,12	6,81	22,81	58,48	56,73	15,99	54,20	71,12	97,89	17,13	47,02	60,03	25,36	2,74	25,48	42,69	24,82		
Med	11,64	43,74	64,87	82,58	23,46	46,76	58,38	71,32	3,64	21,39	36,27	56,11	22,64	49,64	73,96	87,44	23,52	38,34	73,96	47,84	5,35	20,05	54,69	37,13	7,02	54,74	44,97	55,35	24,52	45,54	38,96	19,33	1,11	24,27	16,24	14,29		
SEM	4,44	3,51	4,35	2,48	3,13	3,30	6,48	5,39	1,67	2,88	5,35	5,06	4,38	3,18	3,40	2,32	3,15	2,18	3,40	5,85	1,98	2,20	4,56	4,95	1,53	3,42	5,25	4,52	2,11	3,00	3,74	5,81	0,58	2,88	3,07	3,87		
t-T	0,00	0,01	0,00	0,00	0,28	0,08	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,27	0,02	0,00	0,09	0,67	0,00	0,08	0,52				
t-T-1h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

Tabelle 4: Multivariananalyse TNFalpha

Globale Effekte	TNFa	Paarweiser Vergleich: Effekt Zeit			p-Wert	Paarweiser Vergleich: Effekt Temperatur		
		Effekt	Zeit A	Zeit B		Effekt	Zeit A	p-Wert
Wiederholung	0,5956	Zeit	1	2	<0,0001	T*Zeit	1	0,3293
Temperatur	<0,0001	Zeit	1	3	<0,0001	T*Zeit	2	0,5246
Zeit	<0,0001	Zeit	1	6	<0,0001	T*Zeit	3	<0,0001
T*Zeit	<0,0001	Zeit	2	3	<0,0001	T*Zeit	6	<0,0001
		Zeit	2	6	<0,0001			
		Zeit	3	6	0,4774			

Tabelle 5: IL-8 Kinetik nach LPS-Stimulation (10ng/ml)

37°C	1h	2h	3h	mean 1h	mean 2h	mean 3h	MFI 1h	MFI 2h	MFI 3h	39°C	1h	2h	3h	mean 1h	mean 2h	mean 3h	MFI 1h	MFI 2h	MFI 3h	42°C	1h	2h	3h	mean 1h	mean 2h	mean 3h	MFI 1h	MFI 2h	MFI 3h
P 1	27,51	38,21	57,36	23,77	42,67	56,73	6,54	16,30	32,54	P 1	28,43	33,15	44,38	26,98	35,42	39,14	7,67	11,74	17,37	P 1	0,75	24,46	8,48	24,05	22,21	12,35	0,18	5,43	1,05
	21,82	28,55	60,36	35,59	36,58	67,35	7,77	10,44	40,65		10,09	19,81	55,64	12,72	29,14	37,19	1,28	5,77	20,69		4,11	27,50	18,45	25,41	21,53	18,23	1,04	5,92	3,36
P 2	11,45	53,58	68,97	27,95	37,24	19,68	3,20	19,95	13,57	P 2	10,72	75,43	77,78	7,26	20,17	26,12	0,78	15,21	20,32	P 2	1,55	66,27	22,89	9,01	29,00	16,19	0,14	19,22	3,71
	11,61	64,20	73,67	27,85	58,06	19,23	3,23	37,27	14,17		18,90	73,30	79,38	18,01	29,17	22,93	3,40	21,38	18,20		0,08	62,51	31,94	15,82	46,00	15,30	0,01	28,75	4,89
P 3	21,78	27,61	81,40	13,24	29,59	21,39	2,88	8,17	17,41	P 3	23,25	43,81	76,72	1,88	36,05	26,91	0,44	15,79	20,65	P 3	0,00	58,30	1,02	0,00	26,91	14,30	0,00	15,69	0,15
	10,00	29,96	84,73	13,05	48,45	24,99	1,31	14,52	21,17		16,04	24,56	50,65	5,87	33,34	48,22	0,94	8,19	24,42		0,74	28,39	3,39	18,24	35,95	12,17	0,13	10,21	0,41
P 4	30,18	65,82	81,57	36,39	37,47	20,94	10,98	24,66	17,08	P 4	14,92	86,94	71,71	31,13	65,65	40,80	4,64	57,08	29,26	P 4	3,53	67,41	14,86	21,67	34,65	11,18	0,76	23,36	1,66
	17,75	86,71	67,69	28,59	74,85	17,08	5,07	64,90	11,56		19,03	85,85	76,03	19,69	95,64	20,57	3,75	82,11	15,64		3,80	85,39	44,97	43,72	79,24	10,31	1,66	67,66	4,64
P 5	9,33	63,06	71,31	8,43	32,14	16,40	0,79	20,27	11,69	P 5	49,57	77,11	70,95	24,26	49,46	29,48	12,03	38,14	20,92	P 5	6,61	68,54	18,06	7,93	32,54	14,69	0,52	22,30	2,65
	10,20	71,03	75,16	14,25	31,68	16,84	1,45	22,50	12,66		19,95	63,67	78,39	11,98	40,02	22,64	2,39	25,48	17,75		11,79	43,47	13,13	8,10	29,85	12,55	0,95	12,98	1,65
P 6	12,53	85,77	62,09	33,36	46,12	26,38	4,18	39,56	16,38	P 6	15,84	31,69	61,01	17,43	36,20	29,25	2,76	11,47	17,85	P 6	1,63	35,04	27,44	24,96	42,05	25,00	0,41	14,73	6,86
	10,52	86,82	81,14	50,22	59,76	58,80	5,28	51,88	47,71		10,92	85,85	88,57	18,93	55,64	24,37	2,07	47,77	21,58		0,63	30,93	32,46	14,68	40,57	25,63	0,09	12,55	8,32
P 7	11,02	72,08	82,75	40,99	34,67	91,94	4,52	24,99	76,08	P 7	17,45	73,75	75,00	20,89	84,67	40,95	3,65	62,44	30,71	P 7	0,61	80,90	67,23	18,11	38,80	50,14	0,11	31,39	37,74
	12,75	50,75	90,68	31,93	35,36	84,94	4,07	17,95	77,02		14,32	54,08	90,04	16,43	38,36	50,11	2,35	20,75	45,12		0,87	49,64	40,93	23,48	30,12	42,34	0,20	14,95	17,33
P 8	14,06	45,42	90,41	24,15	45,02	43,84	3,40	20,45	39,64	P 8	14,01	59,37	86,22	18,12	40,10	43,65	2,54	23,81	37,64	P 8	1,24	31,38	54,39	24,18	40,14	33,87	0,30	12,60	18,42
	15,77	75,80	93,93	25,11	59,38	99,82	3,96	45,01	93,76		13,76	48,29	88,72	15,87	30,38	33,17	2,18	14,67	29,43		2,07	77,64	63,86	27,76	82,44	63,68	0,57	64,01	40,67
P 9	16,77	65,49	93,97	27,65	37,22	81,21	4,64	24,38	76,31	P 9	10,33	74,29	91,58	18,47	47,22	53,50	1,91	35,08	49,00	P 9	3,73	25,20	45,23	22,31	42,05	34,35	0,83	10,60	15,54
	12,75	35,35	90,64	21,45	42,47	97,16	2,73	15,01	88,07		12,82	63,58	84,98	22,16	31,26	53,41	2,84	19,88	45,39		2,44	30,62	56,60	23,88	30,38	57,09	0,58	9,30	32,31
P 10	21,78	59,67	91,62	27,68	50,52	53,48	6,03	30,15	49,00	P 10	23,25	44,12	90,87	20,84	37,31	52,69	4,85	16,46	47,88	P 10	17,76	29,38	55,39	22,54	60,20	64,11	4,00	17,69	35,51
	15,44	66,75	94,04	22,19	49,53	92,96	3,43	33,06	87,42		19,49	45,94	92,03	24,04	38,90	95,27	4,69	17,87	87,68		11,11	56,19	78,58	23,47	42,96	66,06	2,61	24,14	51,91
P 11	10,77	20,82	97,60	18,93	27,71	85,67	2,04	5,77	83,61	P 11	10,81	43,77	97,02	7,61	54,82	74,57	0,82	23,99	72,35	P 11	8,25	14,95	35,49	6,41	38,60	25,44	0,53	5,77	9,03
	10,98	23,70	97,11	32,42	29,52	81,83	3,56	7,00	79,47		10,85	44,84	93,51	16,21	33,94	60,85	1,76	15,22	56,90		11,38	18,62	20,21	19,07	28,87	27,71	2,17	5,38	5,60
P 12	19,35	56,12	89,18	19,09	40,11	88,12	3,69	22,51	78,59	P 12	12,52	60,13	80,95	15,83	34,13	70,69	1,98	20,52	57,22	P 12	18,56	50,01	61,24	18,07	46,12	61,62	3,35	23,06	37,74
	12,52	52,76	86,30	22,23	38,23	91,14	2,78	20,17	78,65		21,41	56,13	83,91	18,93	37,11	70,71	4,05	20,83	59,33		20,26	47,44	74,51	20,41	41,23	70,09	4,14	19,56	52,22
Med	12,75	57,90	83,74	26,38	39,17	57,77	3,63	21,48	44,18	Med	15,38	57,75	80,17	18,07	37,21	40,88	2,46	20,63	29,34	Med	2,99	45,46	33,98	21,04	38,70	25,54	0,55	15,32	7,59
SEM	5,30	5,14	10,23	0,54	1,57	12,17	1,33	1,37	16,30	SEM	2,48	8,12	13,98	2,85	0,60	11,16	1,28	3,21	14,84	SEM	6,90	8,12	23,35	1,29	6,72	20,41	1,40	4,99	18,09
t-T	0,00	0,00		0,00	0,05		0,00	0,00		t-T	0,00	0,00		0,00	0,80		0,00	0,09		t-T	0,00	0,16		0,00	0,17		0,00	0,45	
t-T-1h	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00		t-T-1h	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00		t-T-1h	0,00	0,00		0,00	0,01		0,00	0,00	

Tabelle 6: Multivarianzanalyse IL-8

Globale Effekte	IL-8	Paarweiser Vergleich: Effekt Zeit			Paarweiser Vergleich: Effekt Temperatur			
		Effekt	Zeit A	Zeit B	p-Wert	Effekt	Zeit A	p-Wert
Wiederholung	0,1952	Zeit	1	2	<0,0001	T*Zeit	1	0,8012
Temperatur	<0,0001	Zeit	1	3	<0,0001	T*Zeit	2	0,2620
Zeit	<0,0001	Zeit	2	3	0,0016	T*Zeit	3	<0,0001
T*Zeit	0,0001							

Tabelle 7: Zytokinexpression nach 1 h LPS-Stimulation

IL-6	37	39	42	mean 37	mean 39	mean 42	MFI 37	MFI 39	MFI 42	TNF α	37	39	42	mean 37	mean 39	mean 42	MFI 37	MFI 39	MFI 42	IL-8	37°C	39°C	42°C	mean 37	mean 39	mean 42	MFI 37	MFI 39	MFI 42
P1	0,38	0,89	0,24	12,76	13,22	45,82	0,05	0,12	0,11	P1	54,52	61,12	28,78	30,59	32,15	47,15	16,68	19,65	13,57	P1	27,51	28,43	0,75	23,77	26,98	24,05	6,54	7,67	0,18
	0,59	0,84	0,57	35,33	96,95	36,91	0,21	0,81	0,21		11,57	4,35	2,75	26,05	27,67	40,10	3,01	1,20	1,10		21,82	10,09	4,11	35,59	12,72	25,41	7,77	1,28	1,04
P2	0,13	0,44	0,26	7,20	12,57	7,30	0,01	0,06	0,02	P2	5,05	5,94	3,62	8,29	21,51	8,58	0,42	1,28	0,31	P2	11,45	10,72	1,55	27,95	7,26	9,01	3,20	0,78	0,14
	0,30	0,72	0,08	9,18	5,82	7,43	0,03	0,04	0,01		4,90	28,82	5,94	7,84	21,13	8,48	0,38	6,09	0,50		11,61	18,90	0,08	27,85	18,01	15,82	3,23	3,40	0,01
P3	2,16	0,98	0,64	10,51	10,65	18,24	0,23	0,10	0,12	P3	66,95	76,48	7,87	19,59	22,40	13,15	13,12	17,13	1,03	P3	21,78	23,25	0,00	13,24	1,88	0,00	2,88	0,44	0,00
	0,15	0,36	0,16	11,10	7,40	11,10	0,02	0,03	0,02		56,97	51,56	0,35	22,04	28,12	16,87	12,56	14,50	0,06		10,00	16,04	0,74	13,05	5,87	18,24	1,31	0,94	0,13
P4	0,52	0,45	0,34	46,62	16,71	54,70	0,24	0,08	0,19	P4	48,92	45,62	3,65	74,83	61,94	25,08	36,61	28,26	0,92	P4	30,18	14,92	3,53	36,39	31,13	21,67	10,98	4,64	0,76
	0,37	0,47	0,62	42,69	17,17	59,26	0,16	0,08	0,37		10,80	17,26	5,75	61,30	21,48	19,36	6,62	3,71	1,11		17,75	19,03	3,80	28,59	19,69	43,72	5,07	3,75	1,66
P5	0,30	2,82	0,10	9,18	16,76	7,43	0,03	0,47	0,01	P5	3,87	59,43	1,24	8,04	70,12	42,12	0,31	41,67	0,52	P5	9,33	49,57	6,61	8,43	24,26	7,93	0,79	12,03	0,52
	0,00	0,35	0,08	8,13	19,04	7,43	0,00	0,07	0,01		2,19	3,23	2,28	10,04	72,85	17,89	0,22	2,35	0,41		10,20	19,95	11,79	14,25	11,98	8,10	1,45	2,39	0,95
P6	0,69	0,73	0,99	22,25	48,03	52,27	0,15	0,35	0,52	P6	17,47	18,12	12,13	30,93	25,39	28,59	5,40	4,60	3,47	P6	12,53	15,84	1,63	33,36	17,43	24,96	4,18	2,76	0,41
	0,45	0,62	0,26	37,88	43,11	59,75	0,17	0,27	0,16		11,71	15,01	20,33	36,43	29,51	29,28	4,27	4,43	5,95		10,52	10,92	0,63	50,22	18,93	14,68	5,28	2,07	0,09
P7	0,50	0,31	0,20	35,26	39,13	39,04	0,18	0,12	0,08	P7	2,00	16,12	14,15	25,96	18,55	32,64	0,52	2,99	4,62	P7	11,02	17,45	0,61	40,99	20,89	18,11	4,52	3,65	0,11
	0,96	2,01	0,61	73,68	17,74	46,96	0,71	0,36	0,29		3,82	4,78	3,04	31,90	19,29	28,32	1,22	0,92	0,86		12,75	14,32	0,87	31,93	16,43	23,48	4,07	2,35	0,20
P8	0,67	0,39	0,26	37,74	30,19	54,11	0,25	0,12	0,14	P8	0,84	20,12	12,65	34,76	30,53	24,03	0,29	6,14	3,04	P8	14,06	14,01	1,24	24,15	18,12	24,18	3,40	2,54	0,30
	0,77	0,22	0,56	30,07	35,19	57,23	0,23	0,08	0,32		0,66	27,45	8,09	30,11	29,18	25,00	0,20	8,01	2,02		15,77	13,76	2,07	25,11	15,87	27,76	3,96	2,18	0,57
P9	0,11	0,52	0,29	56,12	31,61	27,82	0,06	0,16	0,08	P9	28,23	44,22	4,09	19,57	24,36	17,64	5,52	10,77	0,72	P9	16,77	10,33	3,73	27,65	18,47	22,31	4,64	1,91	0,83
	0,61	0,68	0,33	53,28	41,09	23,66	0,33	0,28	0,08		29,88	18,42	9,72	24,87	22,68	32,56	7,43	4,18	3,16		12,75	12,82	2,44	21,45	22,16	23,88	2,73	2,84	0,58
P10	2,29	2,08	0,38	59,98	56,11	66,17	1,37	1,17	0,25	P10	66,95	76,48	24,84	25,65	26,54	20,29	17,17	20,30	5,04	P10	21,78	23,25	17,76	27,68	20,84	22,54	6,03	4,85	4,00
	0,91	1,04	0,68	66,21	90,53	61,60	0,60	0,94	0,42		36,17	28,26	3,16	20,24	21,57	33,43	7,32	6,10	1,06		15,44	19,49	11,11	22,19	24,04	23,47	3,43	4,69	2,61
P11	0,77	0,50	0,86	11,15	10,78	59,56	0,09	0,05	0,51	P11	1,31	18,84	6,16	12,07	17,42	7,06	0,16	3,28	0,43	P11	10,77	10,81	8,25	18,93	7,61	6,41	2,04	0,82	0,53
	0,33	0,29	0,13	35,54	49,62	53,93	0,12	0,14	0,07		14,75	12,71	10,98	18,90	18,11	25,85	2,79	2,30	2,84		10,98	10,85	11,38	32,42	16,21	19,07	3,56	1,76	2,17
P12	0,45	1,11	0,35	46,71	59,27	68,84	0,21	0,66	0,24	P12	5,92	25,15	18,29	16,67	17,93	17,73	0,99	4,51	3,24	P12	19,35	12,52	18,56	19,09	15,83	18,07	3,69	1,98	3,35
	0,98	0,89	0,10	87,45	60,67	64,36	0,86	0,54	0,06		23,86	32,20	15,99	19,89	21,16	17,13	4,75	6,81	2,74		12,52	21,41	20,26	22,23	18,93	20,41	2,78	4,05	4,14
Med	0,51	0,65	0,31	35,44	30,90	49,62	0,17	0,13	0,13	Med	11,64	22,64	7,02	23,46	23,52	24,52	3,64	5,35	1,11	Med	12,75	15,38	2,99	26,38	18,07	21,04	3,63	2,46	0,55
SEM	0,21	0,13	0,05	4,61	5,01	4,33	0,06	0,06	0,03	SEM	4,44	4,38	1,53	3,13	3,15	2,11	1,67	1,98	0,58	SEM	5,30	2,48	6,90	0,54	2,85	1,29	1,33	1,28	1,40
t-T	0,30	0,00			0,92	0,33		0,72		t-T	0,19	0,00		0,44	0,19		0,27	0,00		t-T	0,32	0,00		0,00	0,35		0,19	0,00	

Tabelle 8: Zytokinexpression nach 2 h Stimulation

IL-6	37°C	39°C	42°C	mean 37	mean 39	mean 42	MFI 37	MFI 39	MFI 42	TNFalpha	37°C	39°C	42°C	mean 37	mean 39	mean 42	MFI 37	MFI 39	MFI 42	IL-8	37°C	39°C	42°C	mean 37	mean 39	mean 42	MFI 37	MFI 39	MFI 42
P 1	2,73	2,42	5,15	24,56	20,37	23,09	0,67	0,49	1,19	P 1	29,90	36,27	62,46	48,03	37,49	72,93	14,36	13,60	45,55	P 1	38,21	33,15	24,46	42,67	35,42	22,21	16,30	11,74	5,43
	4,37	2,35	11,96	19,06	22,41	22,19	0,83	0,53	2,65		46,98	30,92	56,65	45,49	36,99	42,28	21,37	11,44	23,95		28,55	19,81	27,50	36,58	29,14	21,53	10,44	5,77	5,92
P 2	3,07	11,96	9,18	28,28	20,86	28,33	0,87	2,49	2,60	P 2	34,90	29,80	33,70	25,02	29,03	42,87	8,73	8,65	14,45	P 2	53,58	75,43	66,27	37,24	20,17	29,00	19,95	15,21	19,22
	13,82	11,85	7,63	24,13	25,01	18,97	3,33	2,96	1,45		38,35	51,86	10,13	43,11	22,11	26,18	16,53	11,47	2,65		64,20	73,30	62,51	58,06	29,17	46,00	37,27	21,38	28,75
P 3	28,54	23,34	34,72	16,95	23,21	17,21	4,84	5,42	5,98	P 3	79,11	42,73	63,58	42,08	30,26	58,56	33,29	12,93	37,23	P 3	27,61	43,81	58,30	29,59	36,05	26,91	8,17	15,79	15,69
	9,16	16,99	16,89	18,62	22,77	31,00	1,71	3,87	5,24		33,50	29,72	50,17	25,41	26,71	43,29	8,51	7,94	21,72		29,96	24,56	28,39	48,45	33,34	35,95	14,52	8,19	10,21
P 4	11,03	22,77	6,34	19,17	22,38	23,79	2,11	5,10	1,51	P 4	33,50	55,49	37,02	30,48	36,71	26,74	10,21	20,37	9,90	P 4	65,82	86,94	67,41	37,47	65,65	34,65	24,66	57,08	23,36
	6,68	19,14	5,48	22,09	21,11	25,11	1,48	4,04	1,38		30,20	62,89	60,55	48,46	72,35	69,06	14,63	45,50	41,82		86,71	85,85	85,39	74,85	95,64	79,24	64,90	82,11	67,66
P 5	35,35	26,25	4,51	18,82	18,63	19,50	6,65	4,89	0,88	P 5	75,49	68,43	71,70	65,71	38,05	51,62	49,60	26,04	37,01	P 5	63,06	77,11	68,54	32,14	49,46	32,54	20,27	38,14	22,30
	26,68	25,63	1,41	19,27	17,70	31,32	5,14	4,54	0,44		48,34	64,63	34,17	25,41	38,29	24,34	12,28	24,75	8,32		71,03	63,67	43,47	31,68	40,02	29,85	22,50	25,48	12,98
P 6	24,71	32,90	12,03	26,11	27,47	22,09	6,45	9,04	2,66	P 6	50,20	37,39	69,97	56,11	35,14	52,00	28,17	13,14	36,38	P 6	85,77	31,69	35,04	46,12	36,20	42,05	39,56	11,47	14,73
	26,44	25,89	11,56	30,98	26,00	19,96	8,19	6,73	2,31		44,25	38,43	62,95	55,90	38,71	34,34	24,74	14,88	21,62		86,82	85,85	30,93	59,76	55,64	40,57	51,88	47,77	12,55
P 7	12,08	26,78	44,46	17,47	25,13	19,82	2,11	6,73	8,81	P 7	53,74	42,59	71,17	74,62	51,51	59,97	40,10	21,94	42,68	P 7	72,08	73,75	80,90	34,67	84,67	38,80	24,99	62,44	31,39
	15,39	14,12	11,02	21,85	28,94	20,03	3,36	4,09	2,21		13,84	29,63	32,98	22,19	24,64	29,23	3,07	7,30	9,64		50,75	54,08	49,64	35,36	38,36	30,12	17,95	20,75	14,95
P 8	19,46	24,68	12,05	33,36	24,69	26,12	6,49	6,09	3,15	P 8	50,73	71,50	63,91	71,12	48,12	48,26	36,08	34,41	30,84	P 8	45,42	59,37	31,38	45,02	40,10	40,14	20,45	23,81	12,60
	28,55	29,71	14,37	25,12	29,22	27,14	7,17	8,68	3,90		75,74	50,17	55,73	72,11	42,23	74,04	54,62	21,19	41,26		75,80	48,29	77,64	59,38	30,38	82,44	45,01	14,67	64,01
P 9	4,65	4,05	4,75	32,38	30,98	32,19	1,51	1,25	1,53	P 9	30,75	44,11	35,33	39,92	38,38	44,13	12,28	16,93	15,59	P 9	65,49	74,29	25,20	37,22	47,22	42,05	24,38	35,08	10,60
	29,45	55,49	1,86	20,93	26,35	31,66	6,16	14,62	0,59		77,14	87,63	54,39	40,15	52,59	46,43	30,97	46,08	25,25		35,35	63,58	30,62	42,47	31,26	30,38	15,01	19,88	9,30
P 10	24,68	5,82	7,95	23,90	23,98	35,28	5,90	1,40	2,80	P 10	71,04	57,42	32,33	68,25	45,04	50,43	48,48	25,86	16,30	P 10	59,67	44,12	29,38	50,52	37,31	60,20	30,15	16,46	17,69
	4,03	3,75	10,08	22,01	28,06	20,34	0,89	1,05	2,05		50,17	76,10	86,86	54,22	47,80	70,03	27,20	36,38	60,83		66,75	45,94	56,19	49,53	38,90	42,96	33,06	17,87	24,14
P 11	9,99	17,17	3,22	19,30	26,95	27,72	1,93	4,63	0,89	P 11	32,28	56,99	51,96	28,21	46,41	30,76	9,11	26,45	15,98	P 11	20,82	43,77	14,95	27,71	54,82	38,60	5,77	23,99	5,77
	13,46	36,23	10,03	21,73	25,78	21,52	2,92	9,34	2,16		38,78	36,85	39,77	27,26	26,83	31,15	10,57	9,89	12,39		23,70	44,84	18,62	29,52	33,94	28,87	7,00	15,22	5,38
P 12	11,66	19,01	4,06	24,12	23,56	25,67	2,81	4,48	1,04	P 12	40,05	49,11	55,09	53,45	40,18	44,65	21,41	19,73	24,60	P 12	56,12	60,13	50,01	40,11	34,13	46,12	22,51	20,52	23,06
	14,08	19,99	8,12	22,78	25,67	30,11	3,21	5,13	2,44		43,22	50,43	54,20	54,19	45,23	47,02	23,42	22,81	25,48		52,76	56,13	47,44	38,23	37,11	41,23	20,17	20,83	19,56
Med	13,64	19,57	8,65	22,05	24,85	24,45	3,07	4,58	2,18	Med	43,74	49,64	54,74	46,76	38,34	45,54	21,39	20,05	24,27	Med	57,90	57,75	45,46	39,17	37,21	38,70	21,48	20,63	15,32
SEM	1,98	2,47	1,96	0,91	0,67	1,01	0,47	0,65	0,38	SEM	3,51	3,18	3,42	3,30	2,18	3,00	2,88	2,20	2,88	SEM	5,14	8,12	8,12	1,57	0,60	6,72	1,37	3,21	4,99
t-T		0,21	0,01		0,22	0,67		0,13	0,00	t-T		0,50	0,69		0,09	0,07		0,50	0,18	t-T		0,75	0,07		0,53	0,00		0,80	0,20

Tabelle 10: Zytokinexpression nach 6 h Stimulation

IL6	37	39	42	mean 37	mean 39	mean 42	MFI 37	MFI 39	MFI 42	TNFa	37	39	42	mean 37	mean 39	mean 42	MFI 37	MFI 39	MFI 42
P1	92,02	95,86	68,26	90,10	87,14	69,40	82,91	83,53	47,37	P1	94,79	94,29	96,27	74,62	28,02	29,93	70,73	26,42	28,81
	91,95	95,88	60,13	95,40	80,10	60,98	87,72	76,80	36,67		94,54	94,50	91,65	92,40	24,41	17,34	87,35	23,07	15,89
P2	95,63	93,54	37,80	100,10	15,31	48,09	95,73	14,32	18,18	P2	94,48	87,77	88,26	54,70	17,02	14,41	51,68	14,94	12,72
	87,32	92,83	18,52	100,18	13,55	42,18	87,48	12,58	7,81		94,45	87,22	38,05	52,32	17,69	7,52	49,42	15,43	2,86
P3	94,56	72,62	13,76	82,81	79,39	27,56	78,31	57,65	3,79	P3	76,84	68,47	47,65	38,54	28,90	20,77	29,61	19,79	9,90
	96,77	92,73	13,02	80,26	92,20	26,59	77,67	85,50	3,46		82,74	85,80	47,34	37,17	17,44	6,08	30,75	14,96	2,88
P4	85,11	76,47	60,81	100,44	98,34	59,30	85,48	75,20	36,06	P4	84,38	91,70	75,38	11,34	10,83	11,48	9,57	9,93	8,65
	85,86	61,84	28,25	100,40	86,10	37,35	86,20	53,24	10,55		83,00	84,93	47,91	43,15	38,46	17,89	35,81	32,66	8,57
P5	76,75	46,71	20,54	66,78	25,38	24,01	51,25	11,85	4,93	P5	64,25	56,91	47,12	91,50	97,16	89,15	58,79	55,29	42,01
	71,43	58,53	27,12	72,00	52,12	33,11	51,43	30,51	8,98		65,77	85,74	50,05	68,01	70,80	90,03	44,73	60,70	45,06
P6	81,02	71,45	20,07	89,11	17,23	35,27	72,20	12,31	7,08	P6	75,10	87,99	52,96	38,01	30,87	4,54	28,55	27,16	2,40
	69,29	60,03	19,43	89,13	16,34	29,32	61,76	9,81	5,70		76,93	91,81	72,61	38,77	31,23	17,11	29,83	28,67	12,42
P7	81,13	81,64	10,79	65,04	31,64	62,34	52,77	25,83	6,73	P7	82,42	87,66	47,55	64,83	44,83	14,92	53,43	39,30	7,09
	67,98	56,80	28,53	63,25	37,97	26,83	43,00	21,57	7,65		96,98	60,28	36,31	87,78	77,37	45,46	85,13	46,64	16,51
P8	63,80	59,14	2,68	56,00	41,40	52,04	35,73	24,48	1,39	P8	69,40	67,92	30,91	95,33	82,93	30,91	66,16	56,33	9,55
	70,20	65,91	40,84	59,98	46,17	55,87	42,11	30,43	22,82		69,84	86,98	29,73	93,12	90,11	77,32	65,04	78,38	22,99
P9	81,79	69,73	20,28	100,54	42,97	49,11	82,23	29,96	9,96	P9	59,57	67,97	39,53	50,86	22,13	13,84	30,30	15,04	5,47
	90,52	60,77	32,20	100,54	39,45	34,25	91,01	23,97	11,03		54,41	68,75	57,73	59,60	50,85	40,19	32,43	34,96	23,20
P10	94,64	93,24	45,02	100,95	85,31	31,20	95,54	79,54	14,05	P10	96,16	97,18	64,09	86,92	87,54	69,11	83,58	85,07	44,29
	93,23	71,46	41,07	58,96	41,08	30,10	54,97	29,36	12,36		89,66	91,78	82,12	100,91	90,63	86,94	90,48	83,18	71,40
P11	90,96	80,44	42,78	57,83	79,73	8,92	52,60	64,13	3,82	P11	80,03	88,65	87,17	100,34	80,41	17,65	80,30	71,28	15,39
	96,34	88,73	31,15	58,88	13,73	8,76	56,72	12,18	2,73		81,92	85,79	82,70	100,65	56,27	15,95	82,45	48,27	13,19
P12	90,65	91,54	65,84	78,11	41,39	30,54	70,81	37,89	20,11	P12	92,45	95,05	93,07	100,54	89,34	72,72	92,95	84,92	67,68
	88,43	81,69	69,83	88,21	33,15	29,20	78,00	27,08	20,39		90,26	89,88	97,89	100,62	63,12	25,36	90,82	56,73	24,82
Med	87,88	74,55	29,84	85,51	41,40	33,68	74,93	29,66	9,47	Med	82,58	87,44	55,35	71,32	47,84	19,33	56,11	37,13	14,29
SEM	2,02	2,99	3,88	3,38	5,67	3,21	1,73	19,96	9,54	SEM	2,48	2,32	4,52	5,39	5,85	5,81	5,06	4,95	3,87
t-T		0,02	0,00		0,00	0,08		0,00	0,00	t-T		0,51	0,00		0,03	0,05		0,05	0,00

Tabelle 11: Zytokinkinetik ohne LPS- Stimulation

IL6/1h	37°C	39°C	42°C	IL8/ 1h	37°C	39°C	42°C	TNFalpha/ 1h	37°C	39°C	42°C
P 1	0,24	1,10	0,78	P 1	0,75	1,19	0,47	P 1	2,12	3,98	0,30
P 2	0,93	0,83	1,24	P 2	0,40	0,54	0,88	P 2	0,72	0,65	1,21
P 3	0,16	0,14	0,08	P 3	0,37	0,86	0,50	P 3	0,17	1,00	0,22
P 4	0,83	0,49	0,96	P 4	0,22	1,09	0,77	P 4	0,97	0,44	0,74
P 5	0,28	0,59	0,39	P 5	0,23	0,11	0,76	P 5	0,33	0,69	0,28
P 6	0,78	0,11	0,85	P 6	0,64	0,54	0,18	P 6	1,11	0,43	0,64
Med	0,53	0,54	0,82	Med	0,39	0,70	0,63	Med	0,85	0,67	0,47
SEM	0,19	0,35	0,02	SEM	0,04	0,23	0,10	SEM	0,36	1,26	0,12
t-T		0,98	0,47	t-T		0,17	0,53	t-T		0,65	0,32
<hr/>											
IL6/ 2h	37°C	39°C	42°C	IL8/ 2h	37°C	39°C	42°C	TNFalpha/ 2h	37°C	39°C	42°C
P 1	0,35	0,35	0,78	P 1	0,35	0,35	0,78	P 1	0,35	0,35	0,78
P 2	1,37	1,15	0,91	P 2	1,37	1,15	0,91	P 2	1,37	1,15	0,91
P 3	0,34	0,12	0,34	P 3	0,34	0,12	0,34	P 3	0,34	0,12	0,34
P 4	0,66	0,43	0,44	P 4	0,66	0,43	0,44	P 4	0,66	0,43	0,44
P 5	1,11	0,86	0,34	P 5	1,11	0,86	0,34	P 5	1,11	0,86	0,34
P 6	0,95	0,66	0,67	P 6	0,95	0,66	0,67	P 6	0,95	0,66	0,67
Med	0,66	0,43	0,44	Med	0,66	0,43	0,44	Med	0,66	0,43	0,44
SEM	0,21	0,11	0,04	SEM	0,21	0,11	0,04	SEM	0,21	0,11	0,04
t-T		0,53	0,92	t-T		0,53	0,92	t-T		0,53	0,92
<hr/>											
IL6/ 3h	37°C	39°C	42°C	IL8/ 3h	37°C	39°C	42°C	TNFalpha/ 3h	37°C	39°C	42°C
P 1	0,97	0,37	0,65	P 1	1,29	0,89	0,94	P 1	1,55	0,72	0,76
P 2	1,10	0,89	0,97	P 2	1,51	0,98	0,34	P 2	0,80	0,79	0,76
P 3	0,35	0,22	0,42	P 3	0,43	0,54	0,21	P 3	1,07	0,87	0,56
P 4	0,95	1,23	0,76	P 4	0,65	1,37	0,96	P 4	1,11	0,89	1,17
P 5	0,39	0,75	0,57	P 5	1,97	0,23	0,58	P 5	1,23	2,11	0,46
P 6	0,72	0,82	0,82	P 6	0,54	0,64	0,28	P 6	1,01	1,00	0,92
Med	0,84	0,79	0,71	Med	0,97	0,77	0,46	Med	1,09	0,88	0,76
SEM	0,09	0,16	0,06	SEM	0,27	0,09	0,23	SEM	0,19	0,10	0,06
t-T		0,81	0,93	t-T		0,32	0,45	t-T		0,80	0,29
<hr/>											
IL6/ 6h	37°C	39°C	42°C	IL8/ 6h	37°C	39°C	42°C	TNFalpha/ 6h	37°C	39°C	42°C
P 1	0,07	0,23	0,59	P 1	1,26	2,54	5,52	P 1	0,42	0,54	0,61
P 2	0,54	0,53	0,41	P 2	1,99	0,86	0,74	P 2	0,47	0,78	0,69
P 3	0,45	0,15	0,77	P 3	0,68	0,39	0,69	P 3	0,69	0,82	0,23
P 4	0,46	0,54	0,12	P 4	2,13	2,22	1,98	P 4	0,42	0,65	0,95
P 5	0,35	0,47	0,65	P 5	1,00	0,92	0,95	P 5	0,07	0,14	0,74
P 6	0,88	0,29	0,93	P 6	2,46	2,33	1,99	P 6	0,55	0,38	0,84
Med	0,46	0,38	0,62	Med	1,63	1,57	1,47	Med	0,45	0,60	0,72
SEM	0,29	0,02	0,12	SEM	0,42	0,07	1,25	SEM	0,05	0,06	0,08
t-T		0,50	0,16	t-T		0,93	0,62	t-T		0,41	0,41

Tabelle 12: Zelltoddetektion mit PI nach Stimulation mit LPS (10 ng/

	3h	37°C	42°C	6h	37°C	42°C
P 1	2,65	2,15		P 1	2,32	2,43
P 2	3,11	2,72		P 2	2,76	3,02
P 3	2,31	2,33		P 3	2,72	2,84
P 4	2,75	3,00		P 4	2,12	2,00
P 5	2,10	2,31		P 5	2,34	2,21
P 6	2,17	1,92		P 6	2,58	2,60
P 7	2,31	2,45		P 7	2,37	2,49
P 8	2,03	2,00		P 8	2,14	2,45
P 9	2,56	2,68		P 9	2,52	2,26
P 10	2,40	2,31		P 10	2,34	2,41
P 11	3,03	2,69		P 11	3,02	2,91
P 12	2,47	2,20		P 12	2,62	2,60
Median	2,44	2,32		Median	2,45	2,47
SEM	0,06	0,02		SEM	0,11	0,06
t-T		0,22		t-T		0,54

THESEN

1. Der Einfluss von Fieber auf die komplexe frühe nichtadaptive Immunantwort ist nahezu ungeklärt.
2. Monozyten besitzen als Hauptproduzenten der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF α einen wichtigen Stellenwert in der frühen nichtadaptiven Immunantwort.
3. Das entwickelte *in vitro*-Vollblutmodell erfüllt die Voraussetzung für valide Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit der Zytokinproduktion von Monozyten.
4. Die Durchflusszytometrie stellt mit hoher Exaktheit und Reproduzierbarkeit eine Methode zur intrazellulären Zytokindetektion dar.
5. Temperatur moduliert *in vitro* die intrazelluläre Expression der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF α im Monozyten unter LPS-Stimulation.
6. Hyperthermie ohne LPS-Stimulation führt zu keiner messbaren intrazellulären Zytokinexpression oberhalb der Nachweisgrenze.
7. Insgesamt wurde bei Hyperthermie *in vitro* eine niedrigere Expressionsrate von IL-6, IL-8 und TNF α unter LPS-Stimulation gegenüber Normothermie registriert.
8. TNF α und IL-8 lassen sich *in vitro* in Monozyten nach 1 h, IL-6 nach 2 h Stimulation mit LPS nachweisen. Dieser Expressionsbeginn stellt sich als temperaturunabhängig dar.
9. Hyperthermie (39 und 42°C) beeinflusst die intrazelluläre Expression von IL-6, IL-8 und TNF α in LPS-stimulierten Monozyten different.
10. Die IL-6-Expression nimmt mit der Stimulationsdauer auch bei Temperaturanstieg zu. Die Expression von IL-8 und TNF α stagniert nach 2, beziehungsweise 3 h sowohl bei 39 als auch bei 42°C.

LEBENS LAUF

Name: Jasmina Končar-Zeh, geborene Končar-Djurdjević
Geburtstag 05.08.1969
Geburtsort Hamburg/Hamburg

Curriculum vitae

- Seit 08/04** Leitung der Arbeitsgruppe „Fieber und Infektion“ in der Abteilung für Experimentelle Anästhesie (PD Dr. med. St. Grond).
- Seit 11/02** Erhalt einer Fördermassnahme (HWP 0038IF) für das Projekt „Der Einfluss von Hyperthermie und Infektion auf menschliche Monozyten“ gemäss dem Hochschul-Wissenschaftsprogramm „Förderung innovativer Forschungsstrukturen in den neuen Ländern und Berlin“ des Kultusministeriums Sachsen-Anhalt in Kooperation mit dem Bund.
In diesem Zusammenhang Förderung der vorliegenden Promotion.
- Seit 01.04.00** Weiterbildungsassistentin an der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale (Prof. Dr. med. J. Radke).
- 01.08.99 – 31.03.00** Freiberufliche Notarzttätigkeit (Deutsches Rotes Kreuz, Büdingen/Hessen; Arbeiter-Samariter Bund, Friedberg/Hessen; Johanniter-Unfallhilfe, Lich/Hessen, Johanniter-Unfallhilfe, Grünberg/Hessen; “Björn Steiger Stiftung“/Helikopter-Service-Dienst, Darmstadt/Hessen)
- 02/98 – 08/99** Weiterbildungsassistenz an der Klinik für Neurochirurgie und neurochirurgische Intensivmedizin, Johan-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main (Prof. Dr.h.c. mult. R. Lorenz)
- 27.02.98** Vollapprobation (Landesärztekammer Ärztekammer Hessen)
- 04/96 - 02/98** Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Unfallchirurgie des Kreiskrankenhauses Bad Homburg von der Höhe/Hessen (PD Dr. med. C.D.Wilde), sowie an der Klinik für Neurochirurgie

- und neurochirurgische Intensivmedizin, Johan-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main (Prof. Dr. h.c. mult. R. Lorenz)
- 29.04.96** Erteilung der Erlaubnis zur Tätigkeit als Ärztin im Praktikum
- 22.04.96** Drittes Staatsexamen
- 05/95 - 03/96** Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Bad Homburg von der Höhe/Hessen (drittes Tertial in der Urologie)
- 10/88 - 05/95** Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Giessen/Hessen
- 21.06.88** Abitur am Gymnasium Laubach-Kolleg der Evangelischen Kirchen in Hessen und Nassau, Laubach/Hessen
- 1985-1988** Gymnasiale Oberstufe am Laubach-Kolleg der Evangelischen Kirchen in Hessen und Nassau, Laubach/Hessen
- 1984-1985** 6th Form College Mount St. Mary`s College, London-Twickenham/Grossbritannien
- 1982-1984** Gymnasiale Unterstufe an der Gesamtschule Laubach/Hessen
- 1980-1982** Besuch der Scuola Medica Unica (Liceo Linguistico „A. Manzoni“) Mailand/Italien
- 1980-1983** „A. Manzoni“) Mailand/Italien
- 1975** Einschulung in die Grundschule Nikola Tesla, Novi Sad, Serbien (ehemals Sozialistische Föderation der Republik Jugoslawien, SFRJ)

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

PUBLIKATIONSHINWEISE VON ERGEBNISSEN

1. **Deutscher Anästhesiekongress (DAK) 2002, Nürnberg**
Postervortrag „Hyperthermie als möglicher Immunmodulator: Einfluß auf die intrazelluläre Expression von IL-8 in Monozyten“

2. **Deutscher Interdisziplinärer Kongress für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI) 2002, Hamburg**
Postervortrag „Hyperthermie – Benefit im Rahmen der Sepsis? Der Einfluss von Hyperthermie auf die intrazelluläre Expression von TNF α in Monozyten“
Veröffentlichung in der Zeitschrift „Intensivmedizin und Notfallmedizin 39/1“

3. **Deutscher Anästhesiekongress (DAK) 2003, München**
Postervortrag „Fieber als positiv immunmodulierender Faktor auf die intrazelluläre IL-8- und TNF α -Produktion in menschlichen Monozyten?“
Veröffentlichung in der Zeitschrift „ains“ (Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie) 38/4

4. **1. International Congress Deutsche Sepsisgesellschaft e.V. (sepsis and multiorgan dysfunction)**
Postervortrag „Is there a modulating effect of hyperthermia on the production of IL-6 and IL-8? Flow cytometrical investigation on human monocytes“
Veröffentlichung in der Zeitschrift „Infection“ 8/03

DANKSAGUNG

Svetom Stefanu.

Meinem Mann Dr. med. A. Zeh, Dino und Flatti.

Mojom tatu.

Herrn PD Dr. med. OA A. Sablotzki, Herrn PD Dr. rer. nat. A. Simm, Frau OÄ Dr. med. E. Czeslick und Frau A. Struppert.