

Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell

Thomas Hartung und Albrecht Wendel

Biochemische Pharmakologie, Universität D-Konstanz

Zusammenfassung

Es wird ein in vitro Modell zur Erfassung von fiebererzeugenden Substanzen auf der Basis von menschlichem Vollblut vorgestellt. Gemessen wird die Freisetzung der von den Leukozyten gebildeten Botenstoffe (endogene Pyrogene), die die Fieberwirkung vermitteln: Tumor Nekrose Faktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Prostaglandin E₂ (PGE₂). Tatsächlich lassen sich bereits durch geringe Pyrogenmengen gut meßbare Mengen dieser Botenstoffe freisetzen. Außer Endotoxinen können auch andere bakterielle Komponenten eine entsprechende Reaktion auslösen. Anhand des fiebersenkenden Stoffes Aspirin wurde im Blut von Freiwilligen ex vivo demonstriert, daß die stimulierte PGE₂-Bildung tatsächlich über mehrere Stunden gehemmt war.

Das Modell weist Vorteile im Vergleich zum Kaninchen-Pyrogentest oder der Endotoxin-Bestimmung mittels Limulus-Assay auf. Es wird vorgeschlagen, das Modell als in vitro Ersatzmethode zur Testung auf Pyrogene zu evaluieren.

Summary: Detection of pyrogens using human whole blood.

The use of human whole blood as an in vitro model for detection of compounds with the potential to induce fever is described. As a readout, mediators (endogenous pyrogens) released from leukocytes such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) and prostaglandin E₂ (PGE₂) are quantitated. In fact, minute concentrations of pyrogens induced the release of mediators in amounts that were easily detectable. Endotoxins as well as other bacterial components induce this reaction. We used the antipyrogenic drug aspirin to show that in blood of volunteers the ex vivo stimulated PGE₂ release was inhibited for several hours. This model seems superior to the rabbit pyrogen test or the Limulus assay for endotoxin. We propose to evaluate this system as an alternative in vitro method for pyrogen testing.

Keywords: pyrogen testing, whole blood model, tumor necrosis factor, interleukin, prostaglandin, endotoxin

1 Einleitung und Fragestellung

Die Problematik der Pyrogentestung ist wohl bekannt: Einerseits besteht das dringende Bedürfnis einer Produktsicherheit bei intravenös anzuwendenden Medikamenten. Andererseits ist eine große Zahl von Einzelprüfungen am Versuchstier notwendig, wobei nur als seltene Ausnahme tatsächlich eine Charge eines Medikamentes als kontaminiert auffällt. Als wichtigste fiebererzeugende Komponente gilt Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) aus der Bakterienwand gramnegativer Keime (Moltz, 1993; Tilders et al., 1994; Rothwell, 1994; Zeisberger und Roth, 1993). Es lag deshalb nahe, den Tierversuch, der im allgemeinen am Kaninchen durchgeführt wird, durch eine direkte Endotoxin-

bestimmung (Limulus-Test, LAL) zu ersetzen. Dieser Ansatz ist naturgemäß beschränkt:

- Es werden nur Endotoxine als potentielle Fieberschäler erfasst; andere Stimulatoren der Leukozyten, die ebenfalls zur Freisetzung von endogenen Pyrogenen führen, entziehen sich der Erfassung.
- Der Test ist sehr störanfällig gegenüber Endotoxin-bindenden Komponenten wie sie z.B. im Blut reichlich vorkommen (Harris et al. 1991, Emancipator et al., 1992; Read et al., 1993); einige dieser Endotoxin-bindenden Komponenten entziehen das LPS der Messung im LAL-Test, während sie im Gegenteil die Reaktion mit Leukozyten, also die eigentliche pyrogene Primärreaktion, verstärken; ge-

rade die Pyrogenbestimmung in Blutprodukten ist jedoch ein häufiger Testfall.

- Der LAL-Test ist so empfindlich, daß es sehr leicht durch Verunreinigungen, die nicht für die Produktqualität relevant sind, zu Fehlbestimmungen kommen kann (Fujiwara et al., 1990).

Andererseits ist auch der Kaninchenversuch, abgesehen vom Anliegen des Tierschutzes, nicht unproblematisch. Die Immunantwort (Fieber) auf einen gegebenen Reiz unterscheidet sich von Spezies zu Spezies erheblich. In wie weit das Kaninchen für den Menschen repräsentativ ist, ist durchaus fraglich, da z.B. die Endotoxin-Empfindlichkeit verschiedener Spezies um den Faktor 10.000 variieren kann. Für andere

pyrogene Komponenten gibt es keine vergleichbaren Untersuchungen.

Wünschenswert wäre deshalb ein biologisches System, das auf eine Bandbreite pyrogener Wirkstoffe über deren physiologische Erkennung (Rezeptoren) reagiert. Dazu bieten sich unmittelbar zelluläre Modelle an, die vorzugsweise aus menschlichen Zellen aufgebaut sein sollten, um relevante Aussagen für die Exposition des Menschen zu liefern. Da als immunkompetente Zellen, z.B. Makrophagen als primär für die Reaktion auf bakterielle Pyrogene zuständige Zellen, nur Zelllinien mit eingeschränkter metabolischer Kompetenz verfügbar sind (Taktak et al. 1991), bietet es sich an, frisch gewonnene Blutzellen des Menschen zu verwenden. Als Meßparameter liegen die sogenannten endogenen Pyrogene nahe (Hansen und Christensen, 1990). Dies sind Botenstoffe des Immunsystems, die die Fieberreaktion vermitteln und sozusagen die Übersetzung des Organismus für ‚ich habe ein Pyrogen gesehen‘ darstellen. Die wichtigsten bekannten endogenen Pyrogene sind die Proteine Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und der Tumornekrose-Faktor (TNF) sowie der niedermolekulare Lipidmediator Prostaglandin E₂ (PGE₂).

Es gibt ausreichende Erfahrungen für die Isolierung von Leukozyten aus menschlichem Blut. Die meisten Prozeduren sind jedoch für eine Routinetestung von Substanzen viel zu aufwendig. Unser Ansatz war es deshalb, menschliches Vollblut ohne weitere Trennung von Einzelkomponenten für diesen Zweck zu verwenden. Die Leukozyten liegen so in ihrer natürlichen Zusammensetzung und Umgebung vor. Gleichzeitig sind alle Serumkomponenten anwesend, die auf die Wirkung eines Pyrogens Einfluß haben könnten.

Tatsächlich konnte in diesem Modell die Freisetzung der vier genannten Pyrogene durch verschiedene Bakterienbestandteile von gramnegativen und grampositiven Bakterien gemessen werden (Hartung et al., 1995). Das Modell war gegenüber

Endotoxinen hoch empfindlich (wenige pg/ml führten zu Freisetzung von endogenen Pyrogenen). Gleichzeitig war die Reaktion weitgehend unabhängig vom Blutspender.

Es wird vorgeschlagen, dieses Modell im Vergleich zum Pyrogenitätstest am Kaninchen zu validieren mit dem Ziel, diesen Tierversuch durch ein menschliches Zellmodell zu ersetzen.

2 Material und Methoden

Zitratblut gesunder Spender wurde unmittelbar nach Abnahme mit Zellkulturmedium RPMI 1640 (Biobrom, Berlin) 1:5 verdünnt. Heparin [2 IE/ml als Endkonzentration] (Liquemin[®], Hoffmann LaRoche, Grenzach-Whylen) wurde dem System zugesetzt, um eine Gerinnung durch Rekalzifizierung auszuschließen. Stimuli wurden zeitgleich zugesetzt bzw. bereits mit dem Zellkulturmedium vorgelegt. Im einzelnen wurden folgende Substanzen in den

angegebenen maximalen Konzentrationen verwendet: LPS von *Salmonella abortus equi* [10µg/ml], Enterotoxin A (SEA) und B (SEB) von *Staphylococcus aureus* [1µg/ml], Lipoteichonsäure (LTA) von *S. aureus* [10µg/ml], hitze-getötete *S. aureus* [0.001% Zellen v/v], Streptolysin O (SLO) von *Streptococcus pyogenes* [2.5 Einheiten/ml], Muramyldipeptid (MDP) [10µg/ml], Phytohämagglutinin M (PHA) [15µg/ml] und Phorbol ester (PMA) [100nM]. Alle Stimuli außer MDP (Bachem, Heidelberg) wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Inkubationen wurden in offenen Polypropylen-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) bei 37°C und 5% CO₂ für standardmäßig 24h durchgeführt (Wilson et al., 1991). Die zellfreien Überstände wurden nach Zentrifugation (3000g, 1min) abgenommen und bei -80°C bis zur Zytokin- bzw. Prostaglandinmessung aufbewahrt.

Die freigesetzten Mediatoren wurden mit kommerziellen ELISAs gemessen: IL-1, IL-6 und TNF wurden

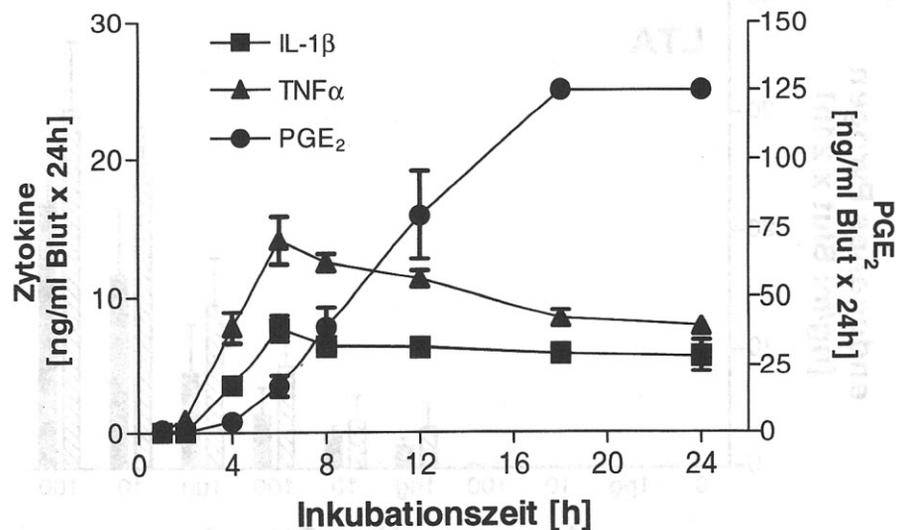


Abbildung 1: Zeitverlauf der Endotoxin-induzierten Bildung endogener Pyrogene im Vollblut

Blut von sieben gesunden Spendern wurde mit Zellkulturmedium 1:5 verdünnt und mit 10µg/ml LPS stimuliert. Die Inkubation wurde für die angegebenen Zeiten bei 37°C durchgeführt. Die Bestimmung der Freisetzung endogener Pyrogene erfolgte im ELISA. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM.

mit Assays von R und D Systems (H. Biermann, Bad Nauheim) bestimmt, während für PGE_2 ein Assay von Cayman (SPI-Bio Europe, Frankreich) verwendet wurde.

Die Wirkung von Aspirin auf die Freisetzung von Pyrogenen wurde im Selbstversuch nach Einnahme ei-

ner 500mg Aspirin-tablette (Bayer, Leverkusen) ermittelt, indem drei Freiwilligen zu verschiedenen Zeiten (0h, 10min, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h und 8h) relativ zur Medikamentengabe Blut entnommen und einer Standardstimulation mit $10\mu\text{g/ml}$ LPS unterzogen wurde.

3 Ergebnisse

Zunächst wurde die Kinetik der Freisetzung von IL-1, TNF und PGE_2 bei Stimulation von Vollblut mit einer hohen LPS-Konzentration [$10\mu\text{g/ml}$] ermittelt (Abb.1). Alle Faktoren waren mit kommerziellen ELISAs nach dieser Inkubation nachweisbar, während unstimuliertes Blut diese Faktoren nicht freisetzte. Die gefundene IL-1 β -Menge erreichte nach ca. 6h ein Plateau. PGE_2 nahm bis 24h Inkubationszeit kontinuierlich zu. Ebenso stieg die induzierbare IL-6-Menge (gemessen nach 4, 10 und 24h) stets an (Daten nicht gezeigt). Hingegen zeigt die TNF-Freisetzung nach LPS-Stimulation ein Maximum bei ca. 12h. Da jedoch auch zum Zeitpunkt 24h noch der größte Teil der TNF-Menge vorhanden war, wurde dies als Standardinkubationszeit gewählt.

Um die Empfindlichkeit des Systems gegenüber LPS zu testen, wurde eine Konzentrations/Wirkungskurve für die Freisetzung von IL-1 und TNF ermittelt (Abb. 2). Tatsächlich führte bereits die kleinste eingesetzte LPS-Menge von 1pg/ml zu einer signifikanten Bildung dieser endogenen Pyrogene, während der Zusatz des LPS-Lösungsmittels ohne Effekt war. Es wird daraus geschlossen, daß menschliches Vollblut sehr empfindlich und konzentrationsabhängig auf LPS reagiert.

Es sollte nun festgestellt werden, ob auch andere Immunstimulatoren als Freisetzer von endogenen Pyrogenen in dem Modell erfaßt werden können. Tatsächlich führten auch hitzegetöte grampositive Bakterien (*Staphylococcus aureus*) oder deren Bestandteile (Muropeptid, Lipoteichonsäure, Enterotoxine, Streptolysin O) zu einer ähnlichen Reaktion (Abb. 3). Interessanterweise ähnelt sich das induzierte Muster der verschiedenen endogenen Pyrogene durch die verwendeten Stimuli. Auch andere Immunstimulatoren wie das von Pflanzen gewonnene Phytohämagglutinin oder Phorbol-ester lösten eine entsprechende Mediatorfreisetzung aus. Die Konzentrations-

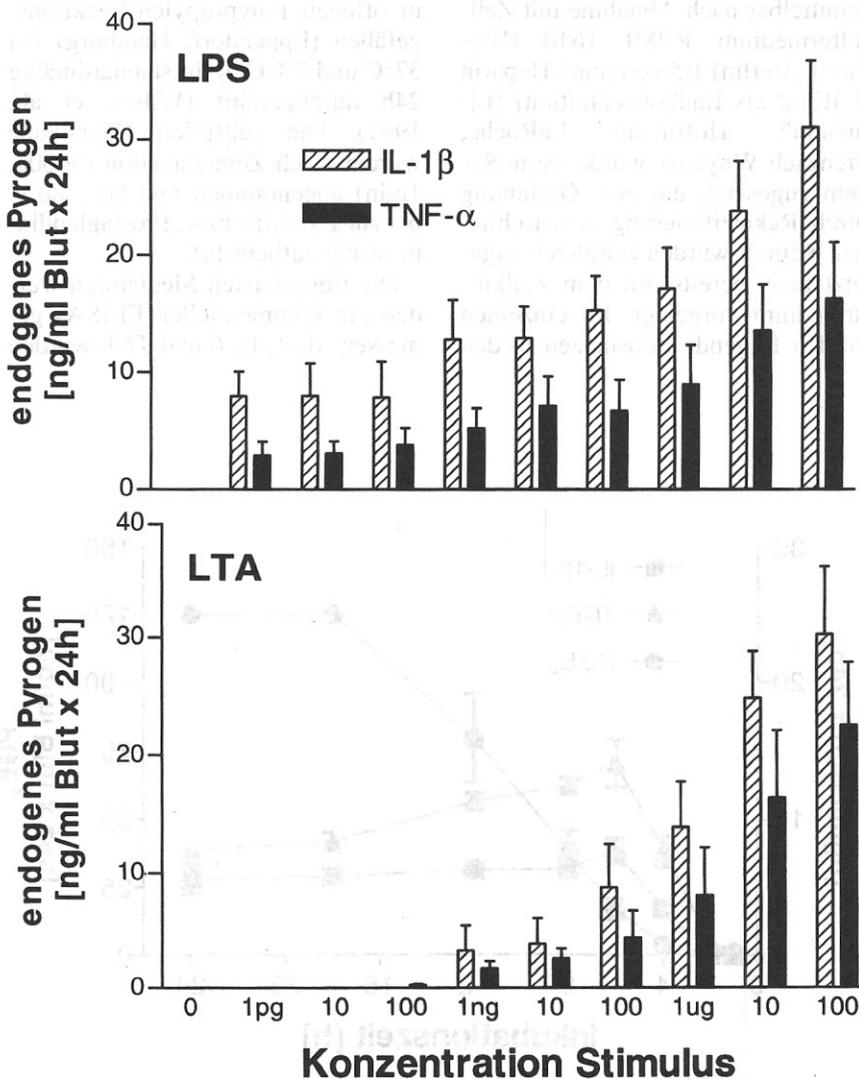


Abbildung 2: Konzentrationsabhängigkeit der Endotoxin- und Lipoteichonsäure-induzierten Bildung endogener Pyrogene in Vollblut. Blut von fünf gesunden Spendern wurde 1:5 verdünnt und für 24h in Gegenwart der angegebenen Endotoxin- bzw. Lipoteichonsäure-Konzentration inkubiert. Die Zytokin-Bestimmung erfolgte im ELISA. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM.

abhängigkeit der Bildung von IL-1 und TNF von Lipoteichonsäure (*S. aureus*) ist in Abb. 2b dargestellt. Es wird geschlossen, daß das Modell weit mehr als nur Endotoxine erkennt und durch die Freisetzung von endogenen Pyrogenen beantwortet.

Schließlich interessierte uns als Testfall am Menschen, ob auch die Auswirkung einer fiebersenkenden Therapie in dem Modell nachvollzogen werden kann. Drei gesunde Probanden erhielten deshalb je eine Tablette Aspirin (500 mg), und es wurde Blut unmittelbar vorher sowie zu verschiedenen Zeiten danach abgenommen. Tatsächlich nahm die LPS-induzierbare PGE₂-Menge in Folge der Einnahme des Medikamentes rasch ab (Abb. 4) und erholte sich erst nach einigen Stunden. Die Freisetzung von TNF war im Blut dieser Probanden unverändert.

4 Diskussion

Die Messung pygener Wirkungen ist eine wichtige Frage der Qualitätssicherung und Produktsicherheit bei der Herstellung von Medikamenten, die injiziert werden sollen. Durch die übliche Produktion nach den Richtlinien der *Good Manufacturing Practice* (GMP) kommt es jedoch nur sehr selten zu relevanten Verunreinigungen der Medikamente. Umso unbefriedigender muß es sein, daß eine große Anzahl von Versuchstieren für diese Routineuntersuchung mit im allgemeinen negativem Ergebnis verwendet wird.

Die Verwendung des Limulus-Testes als Ersatzmethode ist dadurch limitiert, daß nur Endotoxine erfaßt werden (Schlievert, 1993). Diese Komponente hat zwar eine besondere Bedeutung, da sie hitzestabil ist, aber für Endotoxine gibt es längst andere wirkungsvolle Eliminationsmethoden. Gleichzeitig wird der Limulus-Test durch verschiedene Substanzen, insbesondere Blutkomponenten, gestört.

Das hier vorgestellte Modell weist verschiedene Vorzüge für die Bestimmung von Pyrogenen auf:

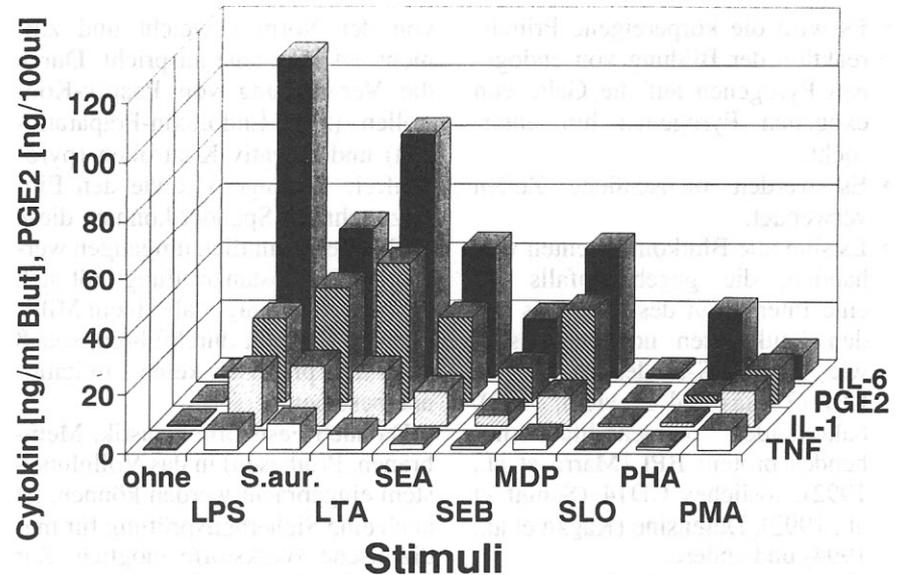


Abbildung 3: Freisetzung von endogenen Pyrogenen in Vollblut durch diverse Stimuli in 24h

Blut von fünf gesunden Spendern wurde für 24h in Gegenwart der verschiedenen Stimuli inkubiert (Konzentrationen s. Material und Methoden). Die endogenen Pyrogene wurden im ELISA bestimmt. LPS = Endotoxin, *S. aur.* = hitzegetöteter *Staph. aureus*, LTA = Lipoteichonsäure, SEA/SEB = Staphylokokken Enterotoxin A/B, MPD = Muramyl-dipeptid, SLO = Streptolysin O, PHA = Phytohämagglutinin, PMA = Phorbol-ester, TNF = Tumornekrosefaktor, PGE₂ = Prostaglandin E2, IL-1/IL-6 = Interleukin-1/6

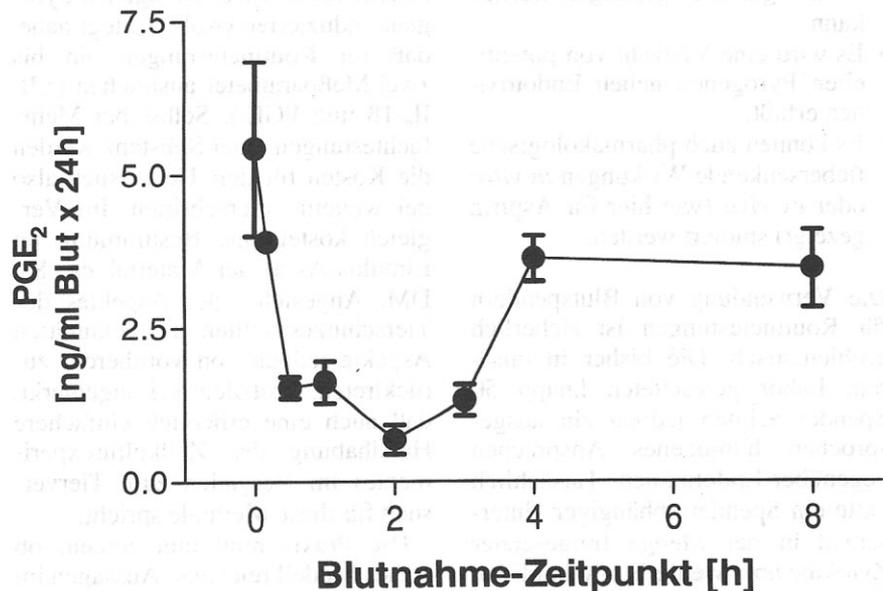


Abbildung 4: Endotoxin-induzierbare PGE₂-Freisetzung in Vollblut nach Aspirin-Gabe p.o.

Drei gesunde Freiwillige erhielten zum Zeitpunkt 0 (8.00 Uhr morgens) je eine Tablette Aspirin 500 mg. Blut wurde unmittelbar vorher und zu den angegebenen Zeiten danach abgenommen und die innerhalb von 4h Inkubation durch 10 µg/ml Endotoxin freisetzbare Menge an PGE₂ durch EIA bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM.

- Es wird die körpereigene Primärreaktion der Bildung von endogenen Pyrogenen auf die Gabe von exogenen Pyrogenen hin untersucht.
- Es werden menschliche Zellen verwendet.
- Es sind alle Blutkomponenten vorhanden, die gegebenenfalls für eine Interaktion des Pyrogens mit den Leukozyten notwendig sind wie z.B. LPS-bindendes Protein LBP (Tobias und Ulevitch, 1993), bakterizides permeabilitäts-erhöhendes protein BPI (Marra et al., 1992), lösliches CD14 (Schutt et al., 1992), Defensine (Kagan et al., 1994) und andere.
- Die Zellen liegen in ihrer natürlichen Mischung und Umgebung vor; es sind gegebenenfalls Interaktionen möglich.
- Es entstehen kaum Präparationsartefakte wie bei isolierten Leukozyten und Dedifferenzierungen wie bei Zell-Linien.
- Das Modell ist sehr sensitiv (pg-Mengen von LPS); es bleibt zu zeigen, ob diese Sensitivität durch Verwendung von unverdünntem Blut und hochsensitiven ELISAs nicht sogar noch gesteigert werden kann.
- Es wird eine Vielzahl von potentiellen Pyrogenen neben Endotoxinen erfaßt.
- Es können auch pharmakologische fiebersenkende Wirkungen *in vitro* oder *ex vivo* (wie hier für Aspirin gezeigt) studiert werden.

Die Verwendung von Blutspendern für Routinetestungen ist sicherlich problematisch. Die bisher in unserem Labor getesteten knapp 50 Spender zeigten jedoch ein ausgesprochen homogenes Ansprechen gegenüber Endotoxinen. Tatsächlich hätte ein Spender-abhängiger Unterschied in der Menge freigesetzter Zytokine aber wenig Einfluß auf den Test, da allein die qualitative Information ‚es sind Auslöser einer Freisetzung endogener Pyrogene in der Probe enthalten‘ gewertet wird. Trotzdem kann nie ausgeschlossen werden, daß ein Spender deutlich

von der Norm abweicht und z.B. nicht auf Pyrogene anspricht. Durch die Verwendung von Positiv-Kontrollen (z.B. Endotoxin-Präparationen) und Negativ-Kontrollen (pyrogenfreie Lösungen) sowie den Einsatz mehrerer Spender könnten diese Probleme vermutlich umgangen werden. Eine Substanzprüfung läßt sich sinnvoll mit weniger als einem Milliliter Spenderblut durchführen, sodaß auch hier praktisch keine Limitationen bestehen.

Da auch Feststoffe (Plastik, Membranen, Prothesen) in das Vollblutssystem eingebracht werden können, ist auch eine Sicherheitsprüfung für medizinische Werkstoffe möglich. Zur Zeit wird dazu in Kooperation mit der Firma ANAWA (München) ein entsprechendes Prüfsystem nach den Standards der *Good Laboratory Practice* (GLP) aufgebaut.

Ein wichtiger Aspekt ist die Kostenfrage: Eine ELISA-Bestimmung mit kommerziellen Testkits kostet zwischen 5,- und 12,- DM. Bei selbst aufgebauten ELISAs lassen sich diese Kosten um ca. 90% senken. Die Beobachtung, daß die verschiedenen Stimuli ein ähnliches Muster für alle vier endogenen Pyrogene induzierten (Abb. 3), legt nahe, daß für Routinetestungen ein bis zwei Meßparameter ausreichen (z.B. IL-1 β und PGE₂). Selbst bei Mehrfachtestungen einer Substanz werden die Kosten für den Tierversuch also bei weitem unterschritten. Im Vergleich kostet eine Bestimmung im Limulus-Assay an Material ca. 8,- DM. Angesichts des Aspektes des Tierschutzes sollten die pekuniären Aspekte jedoch von vornherein zurücktreten. Trotzdem sei angemerkt, daß auch eine erheblich einfachere Handhabung des Zellkulturexperimentes im Vergleich zum Tierversuch für diese Methode spricht.

Die Praxis muß nun zeigen, ob dieses Modell relevante Aussagen im Vergleich zum Tierversuch machen kann. Zur Zeit werden Kooperationspartner für eine vergleichende Prävalidierung gesucht. Damit wird sich herausstellen, ob ein solches System eine wichtige Lücke zwischen Tier-

versuch und Limulus-Test schließen kann.

Danksagung

Die Autoren danken Prof. Dr. H. Spielmann (ZEBET, Berlin) und PD Dr. F. P. Gruber (FFVFF, Zürich) für wertvolle Anregungen und Diskussionen. Ebenso danken wir Dipl. Biol. A. Sauer für tatkräftige Hilfe sowie Frau S. Otte und Frau A. Gerth für ausgezeichnete technische Unterstützung.

Literatur

- Emancipator, K., Csako, G. und Elin, R. J. (1992). In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect. Immun.* 60, 596–601.
- Fujiwara, H., Ishida, S., Shimazaki, Y., Naito, S., Tsuchiya, M. und Matsuura S. (1990). Measurement of endotoxin in blood products using an endotoxin-specific Limulus test reagent and its relation to pyrogenic activities in rabbit. *Yakugaku Zasshi* 110, 332–340.
- Hansen, E. W. und Christensen, J. D. (1990). Comparison of cultured human mononuclear cells, Limulus amoebocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens. *J. Clin. Pharm. Ther.* 15, 425–433.
- Harris, H. W., Eichbaum, E. B., Kane, J. P. und Rapp, J. H. (1991). Detection of endotoxin in triglyceride-rich lipoproteins in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 118, 186–193.
- Hartung, T., Döcke, W-D., Gantner, F., Krieger, G., Sauer, A., Stevens, P., Volk, H-D. und Wendel, A. (1995). Effect of G-CSF treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood*, in press.
- Kagan, B. L., Ganz, T. und Lehrer, R. I. (1994). Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* 87, 131–149.
- Marra, M. N., Wilde, C. G., Collins, M. S., Snable, J. L., Thornton, M. B. und Scott, R. W. (1992). The role of bactericidal/permeability-increasing

- protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *J. Immunol.* 148, 532-537.
- Moltz, H. (1993). Fever: causes and consequences. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 237-269.
- Read, T. E., Harris, H. W., Grunfeld, C., Feingold, K. R., Kane, J. P. und Rapp, J. II. (1993). The protective effect of serum lipoproteins against bacterial lipopolysaccharide. *Eur. Heart J.* 14, 125-129.
- Rothwell, N. J. (1994). CNS regulation of thermogenesis. *Crit. Rev. Neurobiol.* 8, 1-10.
- Schlievert, P. M. (1993). Role of superantigens in human disease. *J. Infect. Dis.* 167, 997-1002.
- Schutt, C., Schilling, T., Grunwald, U., Schonfeld, W. und Kruger, C. (1992). Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14. *Res. Immunol.* 143, 71-78.
- Taktak, Y. S., Selkirk, S., Bristow, A. F., Carpenter, A., Ball, C., Rafferty, B. und Poole, S. (1991). Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 578-582.
- Tilders, F. J., De Rijk, R. H., van Dam, A. M., Vincent, V. A., Schotanus, K. und Persoons, J. H. (1994). Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* 19, 209-232.
- Tobias, P. S., und Ulevitch, R. J. (1993). Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. *Immunobiology* 187, 227-232.
- Wilson, B. M. G., Severn, A., Rapson, N. T., Chana, J. und Hopkins, P. (1991). A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumor necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol. Meth.* 139, 233-240.
- Zeisberger, E. und Roth, J. (1993). Neurobiological concepts of fever generation and suppression. *Neuropsychobiology* 28, 106-109.

Kontaktadresse

Albrecht Wendel
 Universität Konstanz
 Biochemische Pharmakologie
 Postfach 5560
 D-78434 Konstanz

