

Aus der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. B. Reichart

**Verbesserung der endothelabhängigen koronaren
Flussreserve durch selektive Inhibition der induzierbaren
Stickstoffmonoxidsynthase in endotoxämischen
Rattenherzen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sören Kühnapfel

aus

Saalfeld/Saale

Jahr

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Stephen Wildhirt

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Stefan Linder
Priv. Doz. Dr. Matthias Angstwurm

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Stephen Wildhirt

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	- 5 -
1.1	Sepsis und septischer Schock	- 5 -
1.2	Rolle der Endothelfunktion unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen	- 11 -
1.3	Rolle von NO und der NOS-Isoenzyme unter physiologischen Bedingungen	- 12 -
1.4	Rolle von NO und iNOS im Rahmen systemischer Inflammation und Sepsis	- 15 -
1.5	Bedeutung von Oxidantien und Radikalen.....	- 19 -
1.6	Pharmakologische Beeinflussung der NO-Synthasen durch L-Arginin-Analoga und Guanidine.....	- 20 -
1.7	Ziel der Arbeit.....	- 23 -
2	MATERIAL UND METHODEN.....	- 25 -
2.1	Wahl des Untersuchungsmodells	- 25 -
2.2	Aufbau und Funktionsweise des Langendorff-Apparates	- 27 -
2.3	Perfusion isolierter Rattenherzen nach Langendorff	- 29 -
2.4	Messung von Nitrat/Nitrit im Plasma nach GRIESS.....	- 31 -
2.5	Myokardiale eNOS- und iNOS-Genexpression mittels RT-PCR	- 32 -

2.6	Immunhistochemie	- 34 -
2.8	Statistik.....	- 35 -
3	ERGEBNISSE.....	- 36 -
3.1	Effekte von L-NAME und MEG auf die linksventrikuläre Hämodynamik-	36
	-	
3.2	Effekte von L-NAME und MEG auf Koronarfluss und koronare Flussreserve.....	- 37 -
3.3	Nitrat/Nitrit-Spiegel im Plasma	- 41 -
3.4	Immunhistochemische Analyse von eNOS, iNOS und Nitrotyrosin....	- 41 -
3.5	Myokardiale Genexpression von eNOS und iNOSmit RT-PCR	- 44 -
4	DISKUSSION	- 46 -
4.1	Endothelfunktion	- 46 -
4.2.	Hämodynamik	- 49 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 54 -
6	LITERATURVERZEICHNIS	- 55 -
7	ABBILDUNGEN UND TABELLEN	- 69 -
8	ABKÜRZUNGEN	- 70 -
9	DANKSAGUNG	- 74 -
10	LEBENS LAUF.....	- 75 -

1 Einleitung

1.1 Sepsis und septischer Schock

Sepsis ist definiert als vermutete oder gesicherte Infektion mit systemischer inflammatorischer Reaktion. Eine systemische inflammatorische Reaktion äußert sich klinisch etwa als Fieber, Tachykardie, Tachypnoe und Leukozytose. Ferner unterscheidet man noch die schwere Sepsis und den septischen Schock. Bei der schweren Sepsis treten zusätzlich zur oben genannten systemischen Inflammationsreaktion auch Anzeichen einer Organdysfunktion auf. Diese können z.B. Hypotension, Hypoxämie, Oligurie, metabolische Azidose, Thrombozytopenie und andere sein. Der septische Schock ist eine schwere Sepsis mit persistierender Hypotension, welche trotz ausreichender Volumensubstitution bestehen bleibt (Bone et al., 1992).

Die Sepsis und der septische Schock zählen zu den häufigsten Todesursachen bei intensivmedizinischen Patienten. Die Zahl ist im Steigen begriffen, vor allem bedingt durch eine Zunahme älterer und multimorbider, chronisch kranker Patienten. Es kommen zusätzlich eine immer größer werdende Anzahl immunsupprimierter Patienten (nach Organtransplantation, Chemotherapie, HIV-Infektion) mit häufig atypischer Verlaufsform und Erregerspektrum hinzu.

In Deutschland geht man aktuell von jährlich etwa 79.000 Patienten aus die an einer Sepsis erkranken und ca. 75.000 Patienten die an einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock erkranken. Mit etwa 60.000 Todesfällen stellen die septischen Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache nach akutem Myokardinfarkt. Dementsprechend hoch sind auch die Kosten zur Behandlung septischer Patienten. Ca. 30% des Budgets für Intensivmedizin werden für die Behandlung septischer Patienten aufgewendet (Reinhart et al., 2005).

Sepsis ist Ausdruck einer komplexen Interaktion zwischen dem auslösenden Erreger einerseits und der Immunreaktion des befallenen Individuums andererseits. Die Immunreaktion und der auslösende Mikroorganismus beeinflussen den Verlauf einer septischen Erkrankung. So führt eine inadäquate Immunantwort zu einer schweren Sepsis mit Organdysfunktion. Einen aktuellen Überblick die Pathophysiologie und die Behandlung der Sepsis beim Menschen gibt das Review von Russel, 2006.

Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Viren besitzen für das Immunsystem erkennbare pathogene Moleküle. Bei gram-positiven Bakterien ist das z. B. Peptidoglykan, bei gram-negativen Bakterien Lipopolysaccharid. An der Oberfläche von immunkompetenten Zellen sitzen Rezeptoren die solche Pathogene erkennen und binden können, so genannte toll-like-receptors (TLRs) (Modlin et al., 1999). Lipopolysaccharid von gram-negativen Bakterien zum Beispiel bindet an TLR-4. Bindung an TLR-4 aktiviert die intrazelluläre Signaltransduktion durch Aktivierung von NF- κ B. Diese führt zur Transkription immunmodulatorischer Zytokine (Brown et al., 2004). Solche sind z.B. TNF- α , Interleukin-1 β oder Interleukin-10. TNF- α und Interleukin-1 β sind proinflammatorische Zytokine, Interleukin-10 ist ein antiinflammatorisch wirksames Zytokin. Die proinflammatorischen Zytokine können die Immunantwort verstärken, aber auch eine Schädigung des Wirts zur Folge haben. Dies geschieht durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen in Neutrophilen und Endothelzellen. Obwohl aktivierte Neutrophile Mikroorganismen bekämpfen können, wird durch Freisetzen verschiedener Mediatoren aber auch eine Schädigung des Endothels verursacht. Dies hat eine erhöhte Permeabilität mit Austritt von Flüssigkeit ins Interstitium zur Folge, welche klinisch als Ödeme imponieren. Aktivierte Endothelzellen führen auch zu einer überschießenden Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), einem potenten Vasodilatator. Auch Makrophagen werden durch proinflammatorische Zytokine aktiviert. Diese wiederum

setzen Prostaglandine, Leukotriene, Proteasen und Oxidantien frei, welche neben der toxischen Wirkung auf Mikroorganismen ebenfalls zu einer Schädigung des Endothels und Aktivierung der Gerinnungskaskade beitragen. Ein weiterer Schritt zur Erkennung von Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien ist die Bindung von LPS/LPS-binding-protein an CD14, einem weiteren Oberflächenmolekül immunkompetenter Zellen. Einen graphischen Überblick über die beschriebenen Zusammenhänge zeigt die nachfolgende Abbildung.

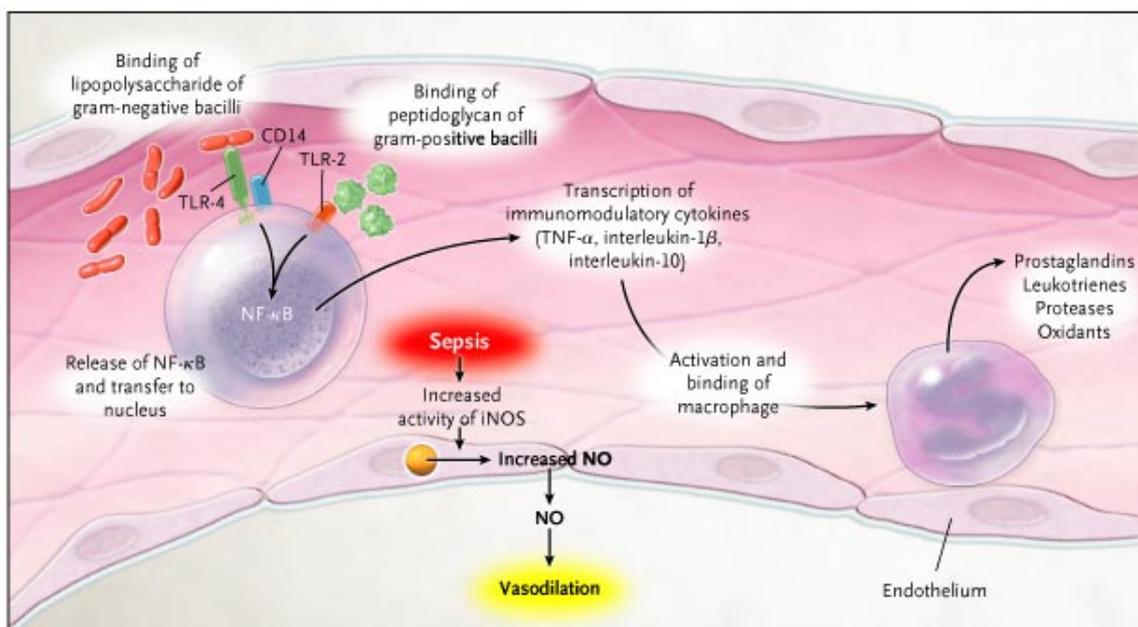


Abbildung 1: Schematische Darstellung der bei Sepsis involvierten Mechanismen. Bindung von LPS an CD 14 führt über den Transkriptionsfaktor NFκB zu Bildung von immunmodulatorischen Zytokinen und erhöhter Aktivität der iNOS. Weitere Einzelheiten siehe Text, (Quelle: Russel, 2006).

Durch Mikroorganismen werden humorale und zellvermittelte Immunreaktionen hervorgerufen, welche auch ineinander greifen. So bilden B-Zellen Antikörper die an Mikroorganismen binden und anderen Zellen des Immunsystems das Ziel der Abwehrreaktion anzeigen. Eine zentrale Rolle spielen auch die T-Helfer-Zellen

(CD4+). Eine Untergruppe, die Typ 1-Helferzellen sezernieren proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α oder Interleukin-1 β), die Typ 2-Helferzellen antiinflammatorische Zytokine (Interleukin-4 oder Interleukin-10) (Abbas et al., 1996). Eine weitere wesentliche Ursache welche zur Organdysfunktion bei Sepsis beiträgt, ist eine Störung der Blutgerinnung. Hierbei kommt es zum Überwiegen des prokoagulatorischen Gerinnungsgleichgewichtes. Prokoagulatorische Gerinnungsfaktoren sind vermehrt vorhanden, antikoagulatorische Gerinnungsfaktoren sind vermindert. Folge sind Mikrothromben mit zunehmender Schädigung von Endorganen. Eine zentrale Rolle spielt hierbei das antikoagulatorisch wirkende Protein C. Im Rahmen der Sepsis sind die Level von Protein C, Protein S und Antithrombin III vermindert (Creasey et al., 2001), auch direkte Wirkungen von LPS und TNF- α auf die Synthese von Thrombomodulin und endothelialen Protein C-Rezeptor sind beschrieben (Liaw et al., 2004). Die Aktivierung von Protein C erfolgt über einen endothelialen Protein C-Rezeptor durch Bindung von Thrombomodulin (Esmon, 2004). Aktiviertes Protein C führt dann über Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa, sowie einer Hemmung der Synthese von Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 zu einer antikoagulatorischen Wirkung. Als Kofaktor dient Protein C noch Protein S. Weitere Wirkungen von aktiviertem Protein C sind eine Hemmung der Apoptose, der Leukozytenadhäsion und der Zytokinproduktion (Joyce et al., 2001, Grinnel et al., 1994, Murakami et al., 1997).

Zum Multiorganversagen bei schwerer, fortgeschrittener Sepsis trägt ein Übergang von der Produktion proinflammatorischer Zytokine, hin zu einem Überwiegen antiinflammatorischer Zytokine bei. Dies geschieht durch eine Entwicklung von Typ 1-Helferzellen, welche proinflammatorische Zytokine produzieren, hin zu Typ 2-Helferzellen, welche antiinflammatorische Zytokine produzieren (Gogos et al., 2000). Ursache hierfür scheint eine vermehrte Apoptose wichtiger Immunzellen,

Epithelzellen und Endothelzellen zu sein. Dies führt zu einer relativen Immunsuppression des Wirts mit deletären Folgen. Die kardiovaskuläre Dysfunktion zeichnet sich durch verminderten peripheren Gefäßwiderstand, Hypovolämie und Beeinträchtigung der myokardialen Kontraktilität aus. Direkt hiermit assoziiert sind erhöhte Konzentrationen von Stickstoffmonoxid, TNF- α , IL-6 und anderen Mediatoren (Herbertson et al., 1997, 1995, Cain et al., 1999). Auch andere Arbeiten konnten unter septischen Bedingungen eine negative Auswirkung auf die myokardiale Kontraktilität nachweisen (Khadour et al., 2002).

Die Therapie der Sepsis ist aufwendig und mannigfaltig. Trotzdem ist die Prognose, insbesondere beim septischen Schock, nicht befriedigend. Es wurden eine Reihe verschiedenster therapeutischer Interventionen in der Vergangenheit untersucht. Allerdings sind nur wenige hiervon mit einem signifikanten Therapieerfolg verbunden. Wichtigster Punkt ist eine möglichst frühzeitige Erkennung und zielgerichtete Therapie. An vorderster Stelle steht hier die schnellstmögliche Infektsanierung (operativ, Drainage, breit-wirkende Antibiotikatherapie). Zusätzlich sollte, wenn erforderlich, eine lungenschonende Ventilation zum Einsatz kommen, ggf. die Gabe von aktiviertem Protein C. In einer randomisierten, kontrollierten Studie an Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock konnte die Mortalität und Hospitalisierungsdauer vermindert werden. (Rivers et al., 2001). Verglichen wurde eine frühe (in den ersten 6 Stunden), nach Protokoll geführte Therapie mit einer Standardtherapie. In der Verum-Gruppe war ein zentralvenöser Katheter zur Messung der zentralvenösen Sättigung und des zentralen Venendruckes obligatorisch. Dieser wurde durch Gabe von Kristalloiden bei 8-12 mmHg gehalten. Zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Perfusionsdruckes (mittlerer arterieller Druck >65 mmHg) wurden wenn nötig auch Katecholamine gegeben. Hierzu kommen in erster Linie Dobutamin, Dopamin und Noradrenalin in Frage. Bei schweren Fällen

wird auch Adrenalin gegeben. Auch die Insertion einer intraaortalen Ballonpumpe kann in Betracht gezogen werden. Die Steuerung der Volumen/Katecholamintherapie wird häufig mittels Swan-Ganz-Katheter durchgeführt. Die Gabe von Hydrocortison in physiologischer Dosierung in Annahme einer relativen Nebennierenrindeninsuffizienz kann zur Verminderung der applizierten Katecholamindosen beitragen, eine Auswirkung auf die Überlebensrate ist aber nicht gesichert (Annane et al. 2001). Ein besseres Outcome ist für die Einstellung des Blutzuckers mittels intensivierter Insulintherapie auf normoglykämie Werte zwischen 80 und 110 mg/dl (Van den Berghe et al., 2001), zumindest bei einem intensivmedizinischem, chirurgischen Krankengut gesichert. Bei einem gemischten internistischen Krankengut mit intensivierter Insulintherapie konnte zwar die Morbidität, nicht aber die Mortalität gesenkt werden (Van den Berghe et al., 2006). Gesichert im Hinblick auf eine signifikant reduzierte Mortalität ist die Therapie mit rekombinanten humanen aktiviertem Protein C (Bernard et al., 2001), eine in der Gerinnungskaskade und auch am Endothel (Hemmung der Zelladhäsion) wirksame Substanz. Supportiv muss bei respiratorischer Insuffizienz maschinell beatmet werden, bei Nierenversagen ein Nierenersatzverfahren wie die chronisch veno-venöse Hämofiltration durchgeführt werden. Ein ausreichender Sauerstofftransport im Blut muss gewährleistet sein und kann gegebenenfalls die Gabe von Erythrozytenkonzentraten erfordern. Eine engmaschige Überwachung der Blutgerinnung bzw. die Substitution von Gerinnungsfaktoren oder Antithrombin III ist notwendig.

Neben der Ausbreitung von einem Fokus (Abszess, Pneumonie u. a.) kommt es bei intensivstationspflichtigen Patienten häufig zu einer Sepsis mit gram-negativen Bakterien in Folge einer Durchwanderung aus der Darmwand. Ebenfalls häufig bei Patienten die eine intensivmedizinische Behandlung benötigen, ist die Ausbreitung der Infektion von beispielsweise intravasalen Verweilkathetern. Hier finden sich vor

allem gram-positive Erreger.

1.2 Rolle der Endothelfunktion unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

Eine herausragende Rolle bei der Vermittlung des Gefäßtonus kommt dem Endothel durch Produktion verschiedener vasoaktiver, dilatorisch oder konstriktorisch wirkender Substanzen zu. Zusätzlich haben diese Substanzen auch Einfluss auf die Vermittlung von lokal inflammatorischen Prozessen oder die Thrombozytenaggregation. Im Rahmen einer Sepsis bilden die Endothelzellen den ersten Kontakt mit zirkulierenden bakteriellen Molekülen. Als Antwort darauf werden von den Endothelzellen verschiedene inflammatorische Mediatoren gebildet (Henneke et al., 2002).

Ist unter physiologischen Bedingungen der transvaskuläre Fluss engmaschig reguliert, kommt es unter septischen Bedingungen zu einer Aufhebung dieser Regulation. Dies führt klinisch zu ausgeprägten Ödemen mit Verschlechterung von Lungen-, Nieren- und Hirnfunktion. Die erhöhte Permeabilität des Endothels konnte in in-vitro-Versuchen mit sepsisassoziierten Molekülen wie TNF- α oder LPS nachgewiesen werden (Blum et al., 1997, Bannermann et al., 1998).

Ein weiterer Mechanismus der zur Endothelzellschädigung beiträgt, ist die Apoptose, der programmierte Zelltod. Verschiedene Arbeiten konnten die Apoptose von Endothelzellen im Zusammenhang mit sepsisassoziierten Molekülen nachweisen (Frey et al., 1998, Robaye et al., 1991).

Eine Reihe von antithrombotischen und antikoagulatorischen Eigenschaften des Endothels sind unter septischen Konditionen gestört bzw. es kommt es zu einer Änderung der Expression der involvierten Faktoren (Levi et al., 2003). Zum Beispiel

wird ein prokoagulatorisches Glykoprotein, „tissue factor“, von Endothelzellen gebildet (Gando et al., 1999), ein Ungleichgewicht zwischen tissue-type plasminogen-Aktivator und Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 führt zu gesteigerter Koagulation und verminderter fibrinolytischer Aktivität (Gando, 2001). Aufgrund des Ungleichgewichts der anti- und prokoagulatorischen Mechanismen mit einem Überwiegen der prokoagulatorischen Seite, kommt es durch Bildung von Mikrothromben zum Verschluss von kleinsten Gefäßen und Kapillaren. Hierdurch besteht ein Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff im perfundierten Gewebe, was wiederum zu einer weiteren Verschlechterung der Organfunktion beiträgt.

Weitere Faktoren die zu einem Schaden des Gefässendothels führen sind die reaktiven Sauerstoffspezies sowie grosse Mengen NO, gebildet von der iNOS.

1.3 Rolle von NO und der NOS-Isoenzyme unter physiologischen Bedingungen

Einer der potentesten vom Endothel gebildeten Vasodilatoren ist Stickstoffmonoxid (NO), bis zur Identifizierung auch „endothelium derived relaxing factor“ (ERDF) genannt. Entdeckt wurde NO von Furchgott und Zawadzki, 1980. Das Substrat ist L-Arginin, es entsteht L-Citrullin und NO. Gebildet wird NO von einem Enzym aus der Familie der NO-Synthasen, von denen drei verschiedene Isoformen unterschieden werden. Die durch NO-Synthasen katalysierte Reaktion zeigt Abbildung 2.

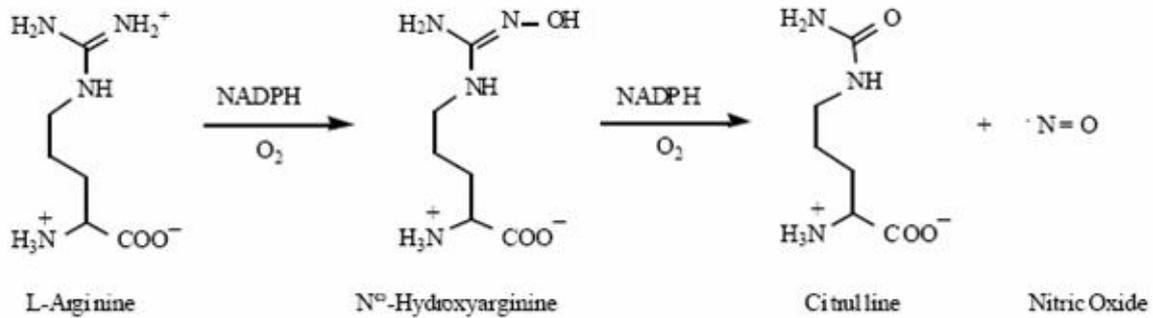


Abbildung 2: Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO katalysiert durch eine NO-Synthase-Isoform, (Quelle: Salerno et al., 2002).

Das unter physiologischen Bedingungen gebildete endotheliale NO entstammt der „endothelialen“ NO-Synthase (eNOS). Diese wurde zuerst in Endothelzellen verschiedener Gewebe nachgewiesen, kommt aber auch z.B. in Neuronen vor. Eine andere konstitutiv exprimierte Isoform ist die „neuronalen“ NO-Synthase (nNOS) welche zuerst in neuronalen Zellen nachgewiesen wurde. Ein weiteres Enzym aus der Familie der NO-Synthasen ist die „induzierbare“ NO-Synthase (iNOS), welche in verschiedenen Zellarten vorkommt, so auch in Herzmuskelzellen oder Zellen des Immunsystems, z. B. Makrophagen. Die Aktivierung von eNOS und nNOS verläuft calciumabhängig, iNOS wird calciumunabhängig via Transkription aktiviert. Alle drei Isoformen enthalten Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Häm, als Cofaktor dient NADPH und molekularer Sauerstoff. Zur genaueren Beschreibung der Wirkungsweise der verschiedenen NO-Synthasen wurden Versuche an „knock out“-Mäusen vorgenommen. Bei Mäusen denen die eNOS fehlt, entwickeln sich Hypertonie, Störung des Remodelling und Proliferation der Gefäßintima (Shesely et al., 1996). Bei „knock out“-Mäusen für iNOS besteht eine gesteigerte Anfälligkeit für Schädigung durch entzündliche Prozesse sowie für Tumorentstehung, allerdings auch größerer Widerstand der Tiere beim septischen Schock (Mashimo et al., 1999).

Hauptstimuli für die eNOS sind Scherkräfte zwischen dem strömenden Blut und der Endothelzelle. Es konnten jedoch noch eine Reihe weiterer Faktoren gefunden werden, welche eine vermehrte bzw. verminderte Expression der eNOS in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe und der Species zeigten. Die Wirkungen des so gebildeten NO bestehen in einer Verminderung des Gefäßtonus, sowie einer Adhäsionshemmung von Leukozyten und Thrombozyten an dem Gefässendothel (Ignarro, 2002). Da die Aktivität der eNOS abhängig ist vom Gehalt an intrazellulären Calcium sowie von Calmodulin, können auch Substanzen welche den intrazellulären Gehalt an Calcium erhöhen, über eine vermehrte NO-Produktion zu einer Vasodilatation beitragen (z.B. Bradykinin). Der eNOS kommt eine wichtige Rolle in der Entstehung arteriosklerotischer Erkrankungen zu.

Stimuli für die Induktion der iNOS sind proinflammatorische Zytokine wie z. B. TNF- α (Heba et al., 2001) und/oder bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharid (LPS). Über ein „LPS binding protein“ (LBP) bindet LPS an einen speziellen Rezeptor, m-CD 14, welcher dann vermutlich über den Transkriptionsfaktor NF- κ B zur Bildung der iNOS führt (Matsuno et al., 1998). Dieser Prozess verläuft im Gegensatz zur NO-Generierung durch die eNOS und nNOS calciumunabhängig. Es werden zudem um ein vielfaches höhere Mengen NO gebildet. Diese führen zu erhöhter vaskulärer Permeabilität und Vasodilatation, ein klinisch relevantes Problem bei septischen Patienten. Weiterhin kommt es durch grosse NO-Mengen zu Gewebs- und Endothelschäden. Diese sind mit verursacht durch die beim NO-Abbau ebenfalls entstehenden „reactive oxygen species“ (ROS). Eine Hemmung der vorwiegend paracrinen NO-Wirkung kann durch einen negativen feedback-Mechanismus durch NO selbst, oder auch durch antiinflammatorische Zytokine oder Glucocorticoide erfolgen. Die verschiedenen Wirkungen von NO sind in Abbildung 3 dargestellt.

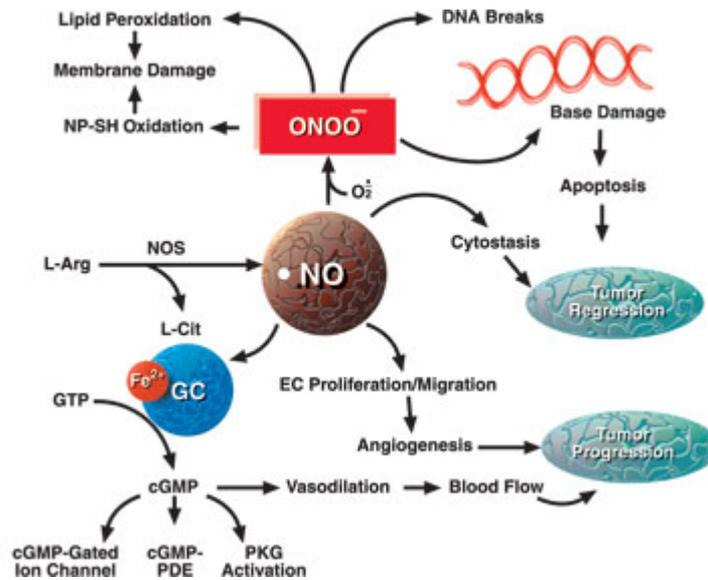


Abbildung 3: Hier sind die verschiedenen Wirkungen von NO dargestellt. Über Erhöhung der cGMP-Konzentration die Vasodilatation mit erhöhtem Blutfluss. Über Angiogenese Tumorprogression, über zytostatische Wirkung aber auch Tumorregression. Über das Abbauprodukt Peroxynitrit entstehen DNA-Schäden und Membranschäden durch Lipidoxidation. (Quelle: http://www.merckbiosciences.co.uk/sharedimages/calbiochem/IS_nitric_oxide_iNOS.jpg)

1.4 Rolle von NO und iNOS im Rahmen systemischer Inflammation und Sepsis

Die von der iNOS im Rahmen von systemischer Inflammation und Sepsis gebildeten Mengen NO sind grösser und werden länger anhaltend produziert als die der eNOS. Das so gebildete NO dient hauptsächlich der Eliminierung von Mikroorganismen. Zusätzlich kommt es auch zur Nitrosylierung von Makromolekülen. Die Beteiligung an schwerer arterieller Hypotension mit mangelndem Ansprechen auf Katecholamine, Lactatazidose und Apoptose im Rahmen des septischen Schocks sind bekannt (Parratt, 1997). Auf die Aktivierung bzw. Deaktivierung verschiedener

an der Signalübertragung beteiligter Moleküle hat die überschüssige NO-Produktion ebenfalls Einfluss. In einem Tiermodell an der Ratte konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung der CRH-abhängigen ACTH-Sekretion mit konsekutiv verminderter Kortikosteroidausschüttung aus der Nebennierenrinde, NO eine Wirkung auf den Hormonhaushalt ausübt (Givalois et al., 2002). Die genauen Mechanismen innerhalb der verschiedenen Stadien von Sepsis, systemischer Inflammation und Multiorganversagen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Bei inflammatorischen Prozessen ebenfalls gesteigert ist die Generierung von Superoxidanion. Durch Reaktion von NO mit Superoxidanion entsteht toxisches Peroxynitrit (Guzik et al., 2002). Die zytotoxischen Effekte von Peroxynitrit beruhen auf Lipidperoxydation, Nitrierung von freien und gebundenen Tyrosinresten, Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen, Hemmung der mitochondrialen Atmungskette, DNA-Strangbrüche, Induktion von Apoptose und andere (Beckman et al., 1996, Ronson et al., 1999, Szabó, 1996).

Ein nachteiliger Effekt der hohen NO-Bildung ist seine seit längerem beschriebene kardiodepressive Wirkung (Balligand et al., 1993 und Schulz et al., 1992). Jedoch vermittelt NO auch eine kardioprotektive Wirkung (Rubbo et al., 1996) und agiert auch als antioxidatives Molekül (Wink et al., 1993). Die Abbildungen 4 und 5 zeigen schematisch die Regulation von eNOS und iNOS.

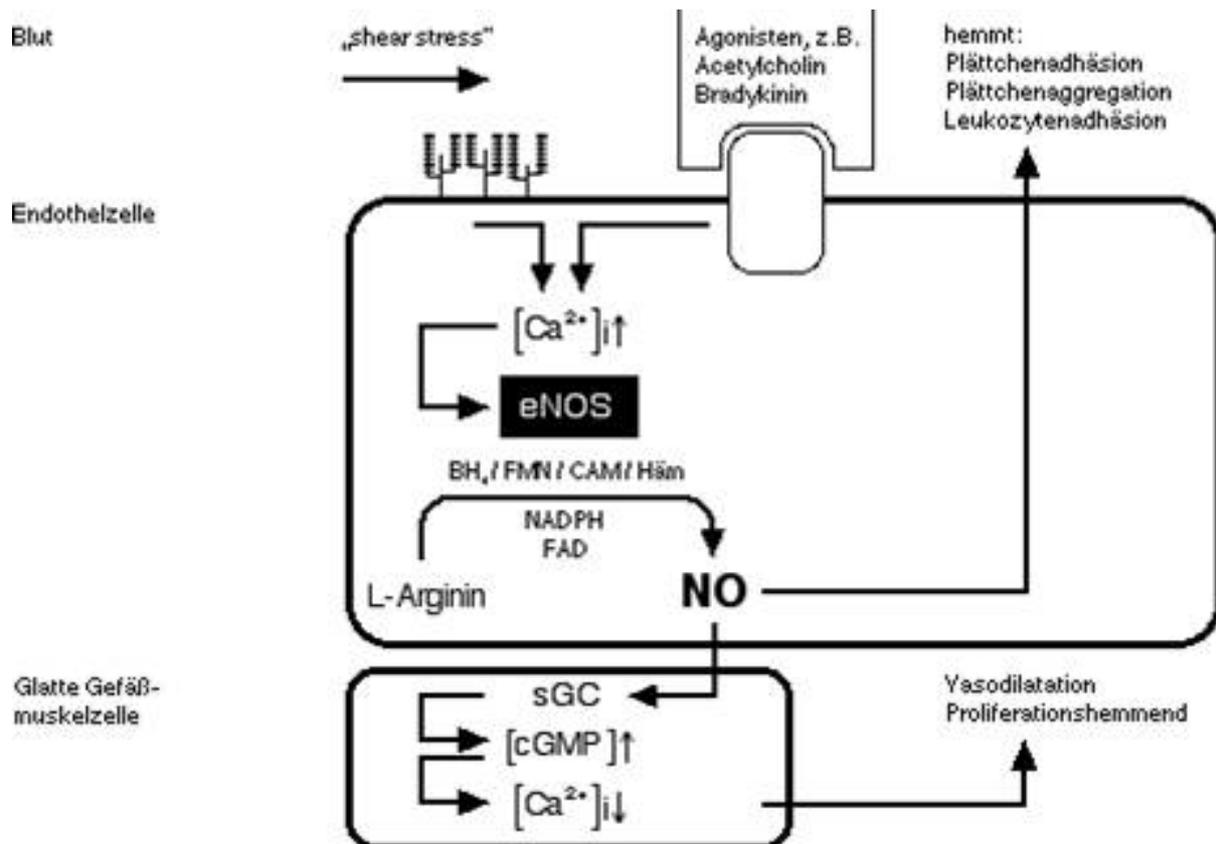


Abbildung 4: Physiologische Regulation und Wirkung der konstitutiv exprimierten NO-Synthase (eNOS). Durch Scherstress oder spezifische Stimuli an Rezeptoren der Endothelzellen, kommt es über eine intrazelluläre Erhöhung der Kalziumkonzentration zur Aktivierung der eNOS mit Bildung von NO. Durch Diffusion in die glatten Muskelzellen erfolgt über Erhöhung von cGMP die vasodilatatorische und proliferationshemmende Wirkung. Durch Diffusion in das Gefäßlumen kommt es unter anderem zur Plättchenaggregationshemmung und Hemmung der Leukozytenadhäsion. Weitere Einzelheiten siehe vorhergehenden Text.

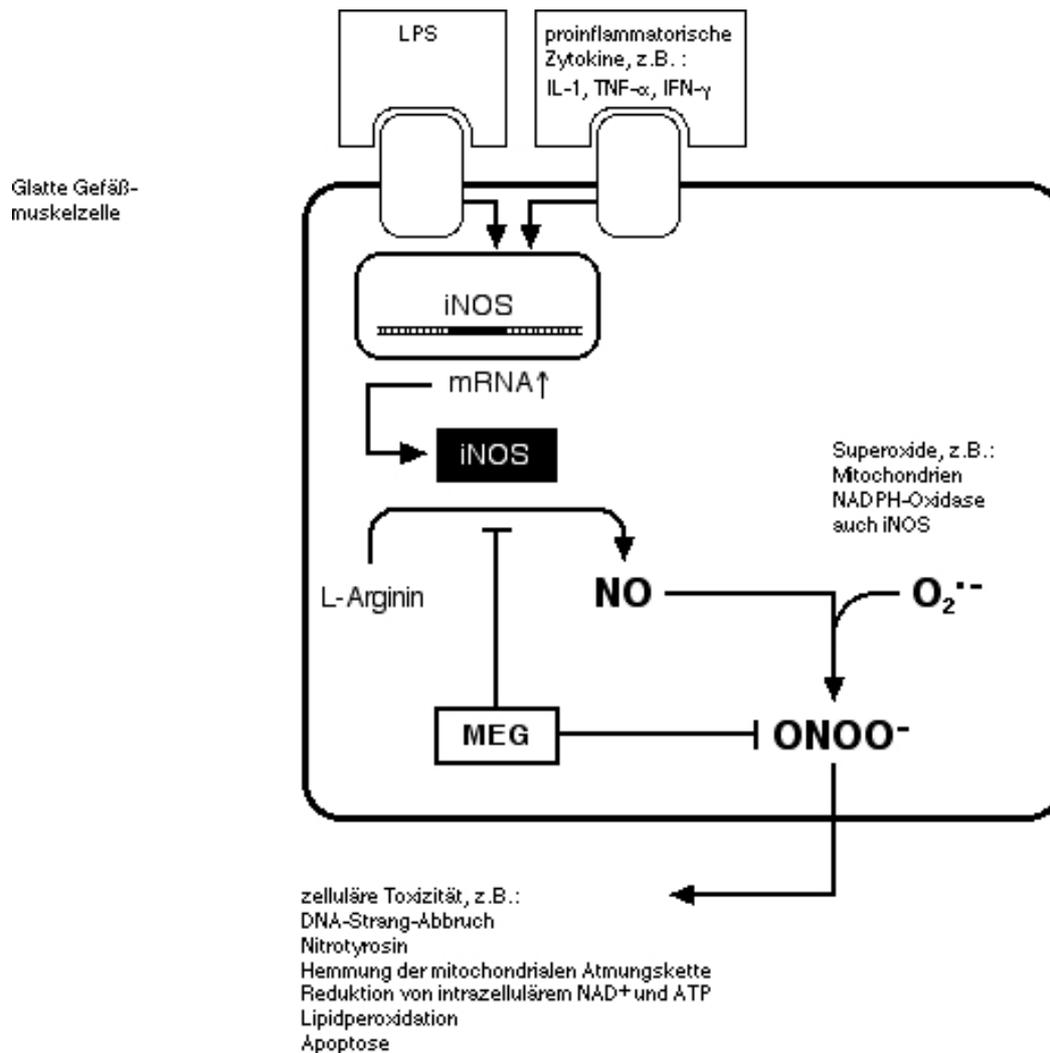


Abbildung 5: Aktivierung der iNOS und Wirkung der überschüssigen NO-Produktion mit Beteiligung von Peroxynitrit. Die Angriffspunkte von MEG (Mercaptoethylguanidin) sind ebenfalls dargestellt.

Es wird vermutet dass Peroxynitrit wesentlich zur Myokarddepression unter septischen Bedingungen beiträgt, zumal die myokardiale Superoxidproduktion in der Sepsis gesteigert ist. Tatsächlich konnte durch Fadi et al., 2002 gezeigt werden, wie eine erhöhte NO- und Superoxidproduktion an endotoxämischen, isoliert perfundierten Rattenherzen zu einer gesteigerten Peroxynitritproduktion führten mit konsekutiver Verschlechterung der myokardialen Funktion.

1.5 Bedeutung von Oxidantien und Radikalen

Im Rahmen der unspezifischen körpereigenen Abwehrfunktionen können in allen aeroben Zellen des Körpers Moleküle gebildet werden welche molekularen Sauerstoff enthalten. Diese Gruppe von Molekülen werden unter dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) zusammengefasst. Wichtige Vertreter der ROS sind Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal, Lipidperoxid, Superoxid, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit. Ihnen kommt eine wichtige regulatorische Funktion im Rahmen inflammatorischer Reaktionen zu. Physiologischerweise tragen sie zur Inaktivierung von Pathogenen bei. Übermäßige Produktion von ROS führt jedoch auch zu einer Oxidation körpereigener Moleküle (mit Schäden an DNA, Lipiden, Proteinen etc.) und somit zu „oxidativem Stress“. Hieraus folgen Endothelschäden mit erhöhter vaskulärer Permeabilität sowie Zelltod (Tiidus, 1998). ROS werden zum Grossteil von der Familie der NAD(P)H-Oxidasen produziert. Proinflammatorische Zytokine steigern ihre Aktivität und Expression. Die so generierten ROS haben Einfluss auf die Regulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothel und inflammatorischen Zellen (Fracicelli et al., 1996). Ebenso führen sie zu einer Steigerung der Chemokin- und Zytokinexpression (Kimura et al., 2003). Durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren kommt ihnen des weiteren eine Rolle als „second messenger“ bei der Vermittlung inflammatorischer Prozesse zu. Für den Redox-Status der Zelle die wichtigste Rolle spielt die Bildung von Superoxid und dessen Abbau zu Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit und Hydroxylradikal. An der Bildung von Superoxid ist die NADPH-Oxidase sowie das Xanthin/Xanthin-Oxidase-System beteiligt. Zum Abbau von Superoxid besitzt der Organismus eigene, antioxidative Systeme. Durch Superoxiddismutase (SOD) wird Superoxid in Wasserstoff und Sauerstoff dismutiert. Der hierbei entstehende, ebenfalls als ROS zu bezeichnende Wasserstoffperoxid wird durch das Enzym Katalase zu Sauerstoff und Wasser hydrolysiert.

Glutathionperoxidase ist in der Lage grössere Mengen Wasserstoffperoxid umzusetzen. Hierbei entsteht neben Wasser die oxidierte Form von Glutathion (GSSG). Eine andere Form des Abbaus von Superoxid ist die Reaktion mit NO, was zu Peroxynitrit (ROS) führt. Diese Reaktion läuft deutlich schneller ab als die Reaktion von Superoxid mit SOD.

Es wurden Versuche unternommen mit Hemmstoffen in dieses System einzugreifen. Apocynin, ein Hemmer der NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung, konnte erfolgreich die inflammatorische Reaktion in einem Tiermodell der rheumatoiden Arthritis hemmen (Lafeber et al., 1999). Ein Inhibitor der Zusammenführung von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten wurde erfolgreich in einem Mausmodell getestet (Rey et al., 2001). In einem anderen Ansatz konnten Tamura et al., 1988 zeigen, wie durch konjugierte SOD (PEG-SOD) in einem Tiermodell vor einem myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden geschützt werden konnte. Arbeiten im eigenen Labor (Egi et al., 2004) konnten einen positiven Effekt auf die koronare Vasomotorik durch exogen zugeführte SOD in einem allogenen Herztransplantationsmodell bei Ratten nachweisen. Mit dem unten näher beschriebenen MEG liegt ein potentieller Peroxynitritfänger vor, welcher in der hier vorliegenden Arbeit einen weiteren Ansatzpunkt in der Regulation des Redoxstatus der Zelle bildet und untersucht werden soll.

1.6 Pharmakologische Beeinflussung der NO-Synthasen durch L-Arginin-Analoga und Guanidine

Aufgrund der Bedeutung von NO und der NO-Synthasen bei verschiedensten pathophysiologischen Prozessen, liegt die Entwicklung von Möglichkeiten zu deren Beeinflussung nahe. Eine Vielzahl von Substanzen verschiedenster Klassen wurden

bereits entwickelt und in vivo und in vitro getestet. Eine umfassende Übersicht hierzu gibt das Review von Salerno et al., 2002. Da vor allem die substratbindenden Anteile der NO-Synthasen sich unterscheiden, liegt hier die bedeutungsvollste Möglichkeit zur selektiven oder nicht-selektiven NO-Synthasehemmung. Zur Hemmung der NO-Synthasen kommen wegen der Struktur und der Substrate im Prinzip drei Möglichkeiten in Betracht. Angriffspunkte sind L-Arginin, die Häm-Einheit und Tetrahydrobiopterin. Zunächst kann man die Substanzklassen in aminosäurebasierende und nicht aminosäurebasierende einteilen. Die aminosäurebasierenden Substanzen wiederum können in L-Arginin-Analoga, konformationsveränderte L-Argininanaloga und Dipeptide unterschieden werden. Die L-Argininanaloga und die konformationsveränderten L-Argininanaloga sind wenig selektiv für eine NO-Synthase-Isoform, die Dipeptide haben eine höhere Selektivität für die bNOS. Zu den Vertretern der L-Argininanaloga zählen z. B. L-NMA, L-NNA oder auch das hier verwendete L-NAME. Mehr Selektivität zeigen die Substanzen der nicht aminosäurebasierenden Gruppe. Diese können wiederum in zwei Gruppen, die Amidinverbindungen und heterozyklische Verbindungen unterteilt werden. Die Amidinverbindungen beinhalten die Guanidine, Isothioharnstoffe und einfache Amidine. Der bekannteste Hemmstoff selektiv für die iNOS aus der Klasse der Guanidine ist Aminoguanidin (Misko et al., 1993). Eine Vielzahl von einfachen Amidinen existieren, sind aber nur wenig selektiv. Die wichtige Gruppe der Isothioharnstoffe beinhaltet z. B. S-Ethylisothioharnstoff oder Aminoalkylisothioharnstoff. Ersterer ist sehr selektiv bezüglich der iNOS, aber schlecht zellgängig und toxisch (Tracey et al., 1995). Bessere Eigenschaften zeigten Aminoalkylisothioharnstoffe bei ebenfalls hoher Selektivität für die iNOS (Southan et al., 1996). Unter physiologischen pH-Wert (7 oder mehr) kommt es zu einer Reaktion von Aminoalkylisothioharnstoff zu Mercaptoalkylguanidin. Andere

Aminoalkylisothioharnstoffe die diese Eigenschaft zur Bildung von Mercaptoalkylguanidin nicht haben, besitzen auch nicht die Eigenschaft zur selektiven Hemmung der iNOS. Der Einfluss von Aminoalkylisothioharnstoff und Mercaptoalkylguanidin auf die Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin ist 20 bis 100mal geringer verglichen mit L-Argininanaloge an bovinen Endothelzellen und blutdrucksteigernden Eigenschaften an narkotisierten Ratten. Entsprechend bildete sich aus Aminoethylisothioharnstoff das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mercaptoethylguanidin (MEG). In der gleichen Arbeit von Southan et al. konnte an endotoxämischen Ratten ein Anstieg des mittleren arteriellen Druckes um bis 80% des Ausgangswert nach Infusion vom MEG gezeigt werden. Mit MEG liegt nun somit ein neuer selektiver Inhibitor der iNOS vor.

In verschiedenen Modellen wurden die Auswirkungen vom MEG untersucht. So konnte gezeigt werden, dass MEG dosisabhängig die Peroxynitrit-induzierte Oxidation von Cytochrome²⁺, Hydroxylation von Benzoat und Nitration von 4-hydroxyphenylacetat inhibiert. In kultivierten Makrophagen wurde durch MEG die Unterdrückung der mitochondrialen Atmungskette und DNA-Einzelstrangbrüche infolge der Wirkung von Peroxynitrit reduziert. Auch der Grad der vaskulären Hyporeaktivität, getestet an mit Peroxynitrit exponierten Aortaringen der Ratte, konnte positiv beeinflusst werden (Szabó et al., 1997). Die Autoren schlossen, dass MEG eine vergleichbare Fähigkeit zur Peroxynitritbeeinflussung hat wie andere bislang bekannte Antioxidantien, z. B. Gluthathion, Cystein oder Penicillamine. Die entscheidende Rolle spielt hierbei die Thiol-Gruppe von MEG. Zingarelli et al., 1997 konnten an einem Rattenmodell mit hämorrhagischen Schock nachweisen, dass durch MEG ein signifikanter Anstieg von Nitrat/Nitrit im Plasma ausblieb. Ein signifikanter Nitrotyrosinnachweis, als Indikator der Peroxynitritbildung, war in der Gruppe der mit MEG behandelten Ratten signifikant vermindert. Unterstützt wurden

diese Ergebnisse durch eine andere Untersuchung, wo ebenfalls eine signifikante Verminderung von Nitrat/Nitrit und Nitrotyrosinbildung in inflammatorischen Gewebe nachweisbar war (Cuzzocrea et al., 1998). Keine Verbesserung von Variablen des oxidativen Stresses durch MEG wurde in einer anderen Arbeit mit endotoxämischen Schweineherzen gezeigt (Ploner, et al., 2001). Hierbei blieb eine Auswirkung auf den Hepatosplanchnikus-Metabolismus und die Gluthathionkonzentration aus.

Eine Arbeit an endotoxämischen Rattenherzen hingegen konnte die Verbesserung der myokardialen Kontraktilität und der Inflammationsreaktion durch Gabe von MEG bestätigen (Lancel et al., 2004). Auch nach traumatischer Hirnverletzung (Rattenmodell) konnte die Gabe von MEG eine Verbesserung einiger physiologischer Variablen, Überleben neuronaler Zellen und das Outcome zeigen (Moochhala et al., 2005).

1.7 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit, welche im Jahr 1998 begonnen wurde, untersucht die Auswirkungen der selektiven Hemmung der iNOS und Neutralisierung von Peroxynitrit durch MEG im Vergleich zur nicht-selektiven Inhibition. Untersucht werden die Auswirkungen auf die koronare Flussreserve und die linksventrikuläre Hämodynamik. Diese Messungen werden mit Hilfe der Langendorff-Apparatur am isolierten, endotoxämischen Herzen der Ratte durchgeführt. Ferner wird der Einfluss auf zellulärer Ebene mittels Immunhistochemie untersucht und auf molekularer Ebene mittels PCR. Als positives Ergebnis wäre eine Verbesserung einer oder mehrerer Parameter zu werten. Die Arbeit soll Fragen im Bereich der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Sepsis beantworten. Bei positiven Ergebnissen wäre die Durchführung klinischer Studien wünschenswert. Möglicherweise ergibt sich hierdurch eine weitere therapeutische Alternative auf dem

Gebiet der Behandlung der Sepsis.

2 Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden von der Firma Sigma bezogen. Diäthyläther zur Narkose wurde von der Firma Hoechst, Adenosin (Adrekar®) von der Firma Sanofi Winthrop bezogen. MEG wurde freundlicherweise von Dr. Csaba Szabó zur Verfügung gestellt.

2.1 Wahl des Untersuchungsmodells

Da es nicht möglich ist eine annähernd zuverlässige Messung der Hämodynamik und der koronaren Endothelfunktion in-vivo durchzuführen, entschieden wir uns für die ex-vivo-Untersuchung mit Hilfe des Langendorff-Apparates. Die Methode geht zurück auf den Physiologen Oscar Langendorff (01.02.1953 bis 10.05.1908), welcher 1885 ein Modell zur isolierten Untersuchung des schlagenden Herzens ohne Einfluss des übrigen Organismus entwickelte.

Das Prinzip besteht darin, Blut oder andere zur Erhaltung der Herztätigkeit geeignete, mit Sauerstoff angereicherte Flüssigkeiten, über eine eingebundene Kanüle in die Aorta ascendens zu drücken. Dabei kommt es zum Schluss der Aortenklappe, entsprechend der Diastole in vivo. Nun durchströmt die Flüssigkeit oder das Blut die Koronararterien. Aus dem Sinus coronarius oder dem eröffneten rechten Vorhof kann das Perfusat abfließen. Die Herzhöhlen bleiben dabei leer. Zunächst wurden Untersuchungen zur Kontraktion des Herzens durchgeführt, 1899 wurde von Langendorff auch über den phasischen Koronarfluss mit Beziehung zur rhythmischen Tätigkeit des Herzens berichtet. Um die Jahrhundertwende wurde das Langendorff-Modell rasch allgemein von Physiologen und Pharmakologen akzeptiert und bis heute verschiedene Modifikationen unterzogen. Als „Langendorff-Herz“ bezeichnet man jedoch nur Modelle bei denen die Koronararterien retrograd von der

Aorta her perfundiert werden und sowohl Lungen- als auch Körperkreislauf fehlen.

In der vorliegenden Arbeit wählten wir zur retrograden Perfusion der Koronararterien eine mit Sauerstoff angereicherte, modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung. Prinzipiell ist die Perfusion druck- oder flusskonstant durchführbar. Bei den durchgeführten Experimenten wählten wir einen konstanten Perfusionsdruck von 70 mmHg.

Es wurden männliche Ratten vom Typ Wistar mit einem Gewicht von 250 bis 300g gewählt. 12 Stunden vor dem Versuch wurde einer Gruppe (n=12) LPS 10 mg/kg KG intraperitoneal injiziert, um eine Induktion der iNOS zu bewirken. Die Hälfte der mit LPS behandelten Rattenherzen wurden mit MEG, die andere mit L-NAME perfundiert. Die Kontrollgruppe bestand aus unbehandelten Ratten (n=10).

Einen schematischen Versuchsablauf zeigt Abbildung 6.

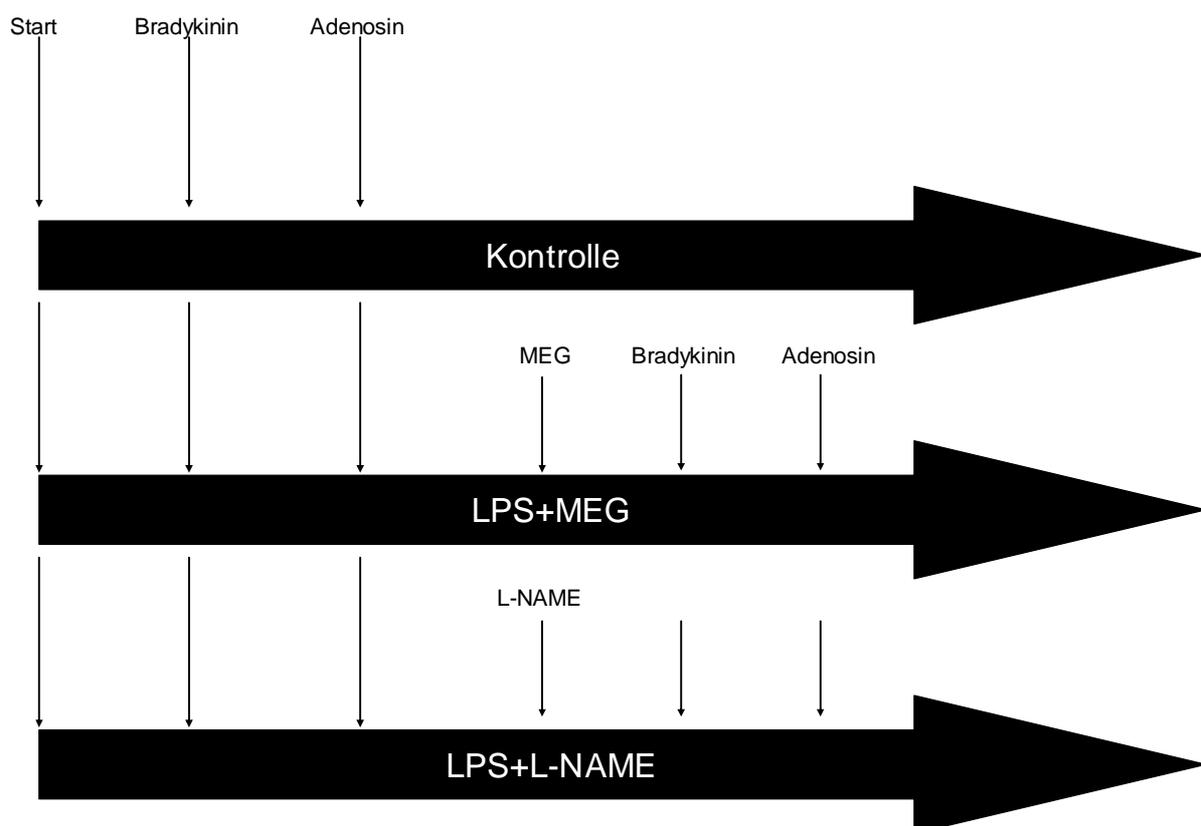
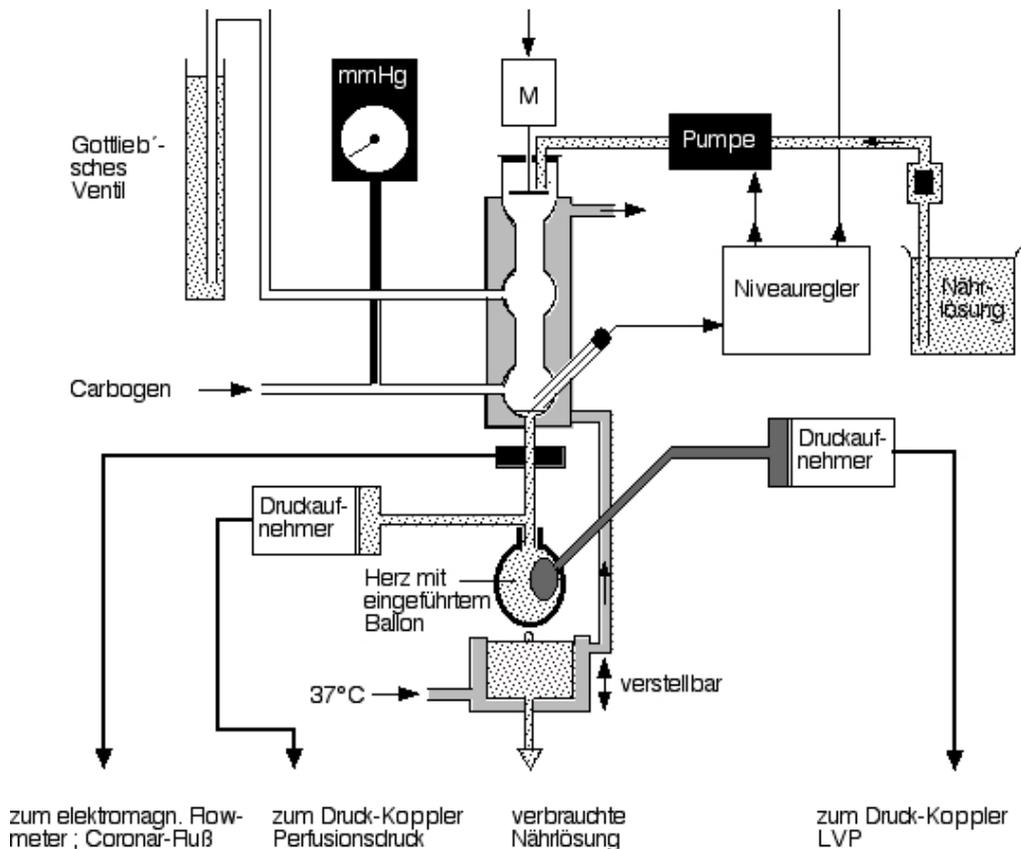


Abbildung 6: Schematische Anordnung des Versuchsablaufs. Zu Beginn 20minütige Stabilisierung. Die Substanzen (L-NAME, MEG sowie Bradykinin und Adenosin) wurden jeweils der Perfusatlösung zugesetzt.

2.2 Aufbau und Funktionsweise des Langendorff-Apparates

Die hier verwendete Apparatur wurde von der Firma Hugo Sachs Elektronik bezogen. Einen schematischen Aufbau zeigt Abbildung 7, die wichtigsten Funktionseinheiten sind im folgenden Text ausführlich beschrieben.



Aufbau der Langendorff-Herz-Apparatur

Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Langendorff-Apparates.

Im Zentrum der Anlage befindet sich der sogenannte Oxygenator. Dieser ist doppelwandig angelegt zur Thermostatisierung der Nährlösung. Die Nährlösung fließt an der Innenseite als dünner Film nach unten und wird dabei mit Sauerstoff gesättigt. Der Sauerstoff wird als Gasmischung Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid) im unteren Teil des Oxygenators zugeführt. Der Einlass für die

Nährlösung in den Oxygenator erfolgt, nach Förderung über die Pumpe, über einen Motor mit Schleuderscheibe. Dadurch kommt es zu einer gleichmäßigen Verteilung der Nährlösung im inneren des Oxygenators. Das Schleuderscheibenprinzip wird auch bei der Herz-Lungen-Maschine angewendet. Funktionell gehört zum Oxygenator ein elektronischer Niveauregler (Liquid Level Controller), welcher mittels Tastelektrode den Flüssigkeitsstand im Oxygenator misst und im Bedarfsfall die Förderpumpe und die Schleuderscheibe einschaltet. Über Kopplung mit einem Flowmeter wird hier der Koronarfluss durch die Förderrate der Nährlösung und die Laufzeit der Pumpe errechnet. Die oxygenierte Nährlösung gelangt über die Aortenkanüle zum Herzen. Das Einstellen des Perfusionsdruckes erfolgt über das Gottlieb'sche Ventil. Durch mehr oder weniger tiefes Eintauchen des Innenrohres kann der Perfusionsdruck variiert werden. Durch einen mit der Aortenkanüle verbundenem Druckaufnehmer (ISOTEC) kann der am Herzen wirksame Perfusionsdruck gemessen werden. Die isovolumetrische Messung des Herzinnendruckes erfolgt über einen Druckaufnehmer (ISOTEC) mit Katheter und Latexballon, einem Dreiwegehahn und einer Spindelspritze. Der Latexballon ist im linken Ventrikel platziert und über den Metallkatheter mit dem Druckaufnehmer verbunden. Die Spindelspitze dient zum Füllen des Messkreises und zur Einstellung des enddiastolischen Druckes. Das Messsystem ist mit einer Mischung aus Alkohol und destilliertem Wasser gefüllt. Der eingestellte enddiastolische Druck liegt in diesen Versuchen bei 12 mmHg (abhängig von der Spezies). Während des Versuches wird das Herz in ein Organbad, ebenfalls aus der Nährlösung bestehend, eingetaucht. Durch das doppelwandige Glasgefäß wird die Temperatur konstant gehalten.

2.3 Perfusion isolierter Rattenherzen nach Langendorff

Die Ratten (männlich, Wistar, 250 bis 300g) wurden mit Diethyläther (Fa. Hoechst) narkotisiert und auf einem Seziertisch fixiert. Anschließend wurde die Bauchhöhle eröffnet. Es erfolgte die Gabe von 2000 IE/kg KG unfraktioniertem Heparin (Fa. Braun) in die Vena cava inferior. Nach vorsichtiger Durchtrennung des Diaphragmas konnte der Thorax eröffnet werden. Aus dem rechten Vorhof wurde eine Blutprobe für spätere Untersuchungen entnommen. Das Herz wurde nun rasch explantiert und sofort in 4°C kalte modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung gelegt. Die chemische Zusammensetzung zeigt Tabelle 1.

Substanz	mM
Natriumchlorid	118
Kaliumchlorid	4,7
Calciumchlorid	2,52
Magnesiumsulfat	1,64
Natriumhydrogencarbonat	24,88
Kaliumdihydrogenphosphat	1,18
Glukose	5,55
Natriumpyruvat	2

Tabelle 1: modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung

Die Aorta wurde in eine Kanüle eingebunden und anschließend das Herz an einem Langendorff-Apparat perfundiert. Das Zeitfenster von der Organexplantation bis zur Perfusion am Langendorff-Apparat betrug ca. 1,5 min. Das Perfusat mit einer Temperatur von 37°C und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen, durchströmte

retrograd mit einem konstanten Druck von 70 mmHg die Aorta und von dort aus die Koronararterien. Das Perfusat wurde zuvor durch einen Filter (80 µm Porengröße) geleitet. Die Herzen begannen sofort spontan zu schlagen. Mit einem Schnitt in den linken Vorhof konnte ein kleiner Latexballon in den linken Ventrikel vorgeschoben werden und entsprechend der am Monitor angezeigten Druckkurve platziert werden. Verbunden mit dem Druckabnehmer konnte so nach 20minütiger Stabilisierung die Herzfrequenz, der linksventrikuläre Druck, der linksventrikuläre enddiastolische Druck sowie der linksventrikulär entwickelte Druck und max. +/- dP/dt gemessen werden. Die Daten wurden kontinuierlich aufgezeichnet und zur späteren Auswertung gespeichert. Das Volumen des Ballons wurde auf einen initialen enddiastolischen Druck von 12 mmHg eingestellt. Das Herz wurde dann in ein mit Krebs-Henseleit-Lösung gefülltes, 37°C warmes, von einem Wassermantel umgebenes Organbad eingetaucht. Über ein Flowmeter konnte der Koronarfluss gemessen werden. Diese Werte wurden ebenfalls kontinuierlich aufgezeichnet und abgespeichert.

Die endothelabhängige koronare Flussreserve wurde durch Infusion von Bradykinin (1 µM, 1,5 min) bestimmt. Zur Blockierung der Cyclooxygenase wurde Indomethacin, ein nicht-selektiver Hemmstoff der Cyclooxygenase 1 und 2, in einer Konzentration von 10 µM 10 min vor Infusion von Bradykinin verabreicht und auch der Bradykininlösung beigelegt. Nach Messung, Aufzeichnung der Daten sowie Auswaschung und Equibrillation wurde Adenosin (10 µM, 4 min) zur Bestimmung der endothelunabhängigen koronaren Flussreserve zugeführt.

Nach neuerlichem Auswaschen und Stabilisierung wurden die mit LPS behandelten Herzen entweder mit MEG (165 µM) oder L-NAME (100 µM) über eine Zeit von 10 min kontinuierlich perfundiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben eine erneute Messung der hämodynamischen Parameter und der koronaren Flussreserve

mit Bradykinin und Adenosin durchgeführt.

Am Ende des Versuchs wurden der linke Ventrikel der Herzen in 2 mm dicke Ringe geschnitten, umgehend in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C für weitere Untersuchungen gelagert.

2.4 Messung von Nitrat/Nitrit im Plasma nach GRIESS

Die zuvor aus dem rechten Vorhof entnommenen Blutproben wurden sofort nach Entnahme für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und bei -20°C gefroren aufbewahrt. Der Nitrat/Nitrit-Gehalt wurde mit der GRIESS-Reaktion bestimmt. Durchgeführt wurde die Messung auf einer Mikrotiterplatte. Hier wurde zunächst der Nitratgehalt der Plasmaprobe mit Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. Dazu inkubierte man Proben von 100 µl mit 0,1 U/ml Nitratreduktase in 2,5 mM Phosphatpuffer bei einem Endvolumen von 150 µl bei 37°C für 30 min. Der Phosphatpuffer enthielt 0,001 % FAD und 0,013 % NADPH. Durch anschließende Zugabe von 50 µl eines Reaktionsgemisches bestehend aus LDH (4 µg/ml) und Pyruvat (45,5 mM) und Inkubation für 5 min bei 37°C wurde das NADPH oxidiert. Schließlich gab man noch 50 µl GRIESS-Reagenz (siehe Tabelle 2) hinzu gefolgt von 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 50 µl kalter TCA (8,0 M) wurde die Reaktion gestoppt. Nun konnte nach spektrophotometrischer Analyse bei 540 nm der Nitritgehalt der Proben anhand einer linearen Standardkurve berechnet werden.

Substanz	mM
Phosphorsäure	220
Sulfanilamid	557
N-(1-naphthyl)- ethyldiamindihydrochlorid	38

Tabelle 2: GRIESS-Reagenz

2.5 Myokardiale eNOS- und iNOS-Genexpression mittels RT-PCR

Die Proben wurden zunächst in 600 µl Lysis-Puffer mittels einem OMNI 2000-Homogenisierer homogenisiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 10000 g für 3 min von dem Lysat getrennt. Von dem Überstand konnte die komplette RNA durch Verwendung des RNeasy-Kit extrahiert werden. Die RNA wurde durch optische Dichtemessung bei A_{260} quantifiziert. Die cDNA wurde gewonnen aus 0,5 µg der kompletten RNA, inkubiert in 30 µl reverse Transkriptase-Puffer (Gibco BRL, angereichert mit jeweils 0,5 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, New England Biolabs, Germany), 32 U RNase-Inhibitor (Boehringer, Germany), 400 U Moloney murine leukaemia virus reverse Transkriptase (MMLV-RT, Gibco BRL), 10 mM Dithiothreitol und 1,5 µM p(dT)₁₅-Primer (Boehringer) bei 37°C für 60 min. Schließlich wurde die Reaktion durch Hitze (95°C für 10 min) gestoppt. Eine Teilprobe von 3 µl cDNA wurde mittels PCR durch Verwendung eines DANN-thermal cyclers (Robocycler, Stratagene, Netherlands) erweitert. Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 50 µl PCR-Puffer bestehend aus 10 mM TRIS-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, jeweils 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, jeweils 400 nM 3'- und 5'-Primer und 1 U Taq DNA-Polymerase (Boehringer) durchgeführt. Die Oligonucleotid-Primer wurden von einem DANN-Synthesizer (Applied Biosystems,

USA) hergestellt und aufbereitet unter Verwendung von Sephadex-Säulen (NAP 5, Pharmacia, Germany). Die Primer wurden so angefertigt, dass nur die erwarteten Produkte der cDNA erkannt wurden, nicht der genetischen DANN. Das Glyceraldehyde-3-phosphatdehydrogenase-Transkript wurde als interner Kontrollator der prozessierten RNA verwendet. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3 dargestellt.

Primer		Sequence (5' to 3')	Product size (bp)
GAPDH	sense	TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA	309
	antisense	AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT	
iNOS	sense	CAC AAG GCC ACA TCG GAT TTC	741
	antisense	TGC ATA CCA CTT CAA CCC GAG	
ecNOS	sense	GAA GAG GAA GGA GTC CAG TAA CAC	451
	antisense	GGT GGC CCT CGT GGA CTT GCT G	

Tabelle 3: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer

Das PCR-Reaktionsgemisch wurde in 50 µl leichtes Mineralöl (Sigma Chemie, Deutschland) gehüllt. Nach 1 min pre-Denaturierung bei 94°C, wurde die PCR nach folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung bei 94°C für 45 sec, Fixierung bei 50°C für 45 sec und Erweiterung bei 72°C für 1 min. Um sicherzustellen dass auch geringe RNA-Mengen detektiert wurden, führte man die Amplifikationszyklen wie folgt durch: GAPDH 26 Zyklen, iNOS 30 Zyklen, eNOS Zyklen. Mit einer Probe (10 µl) von jedem amplifizierten Produkt wurde eine Elektrophorese in 1 %

Agarosegel (Promega, USA) durchgeführt. Gefärbt wurde mit Ethidiumbromid und anschließend eine Visualisierung durch UV-Illumination durchgeführt. Semiquantitative Analysen wurden mit Hilfe der Dichtemessung durchgeführt.

2.6 Immunhistochemie

Hierfür wurden die ca. 2 mm dicken Scheiben des linken Ventrikels, welche bei -80°C lagerten, verwendet. Mit einem Kryostaten (Reichert-Jung) wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt und für einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden dann mit Chloroform für 30 min fixiert und anschließend mit TRIS pH 7,5 gewaschen. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die primären Antikörper wurden in Antikörperverdünnung (Dako) verdünnt.

Zum immunhistochemischen Nachweis von eNOS wurde die Peroxidasetechnik des LSABII-Kit (Dako) verwendet. Um endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte mit 7,5 % H₂O₂ in Aqua dest. für 10 min inkubiert und dann mit Wasser und TRIS-Puffer pH 7,5 ausgewaschen. Nach Blockierung nicht spezifischer Bindungsstellen wurde nun mit dem primären monoklonalen Antikörper (Verdünnung 1:100, Transduction Laboratories) für 60 min inkubiert. Die Färbung erfolgte mit den Peroxidasesubstraten Streptavidine/AEC (Vector Laboratories), die Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun.

Zum Nachweis von iNOS und Nitrotyrosine wurde der Envision-HRP-Kit (Dako) verwendet. Die Schnitte wurden mit dem primären Antikörper für 60 min inkubiert (iNOS: Verdünnung 1:600, Nitrotyrosine: Verdünnung 1:150, beide Upstate/Biotol). Die Färbung erfolgte mit dem Substrat AEC, die anschließende Gegenfärbung mit Mayer's Hämalum-Lösung. Die Kontrollen wurden mit Ausnahme der Antikörper identisch durchgeführt.

2.8 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Der Student's *t*-test wurde verwendet um die Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen bezüglich der Hämodynamik und des Koronarflusses bzw. der koronaren Flussreserve herauszustellen. ANOVA (analysis of variance) und Bonferoni's post-hoc-Analyse wurden verwendet, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen. Korrelationen wurden durch einfache Regressionsanalyse bestimmt. Dabei wurde ein Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von L-NAME und MEG auf die linksventrikuläre Hämodynamik

Die Behandlung mit LPS führte nicht zu einer signifikanten Einschränkung der linksventrikulären systolischen und diastolischen Funktion, gemessen als LVDP und $\max./\min. \pm dP/dt$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch war die Herzfrequenz gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Der Infusion von L-NAME in mit LPS behandelte Rattenherzen resultierte eine signifikante Reduktion der Herzfrequenz und eine leichte, aber statistisch nicht signifikante, Reduktion von $\max./\min. dP/dt$ und LVDP. Die Infusion von MEG senkte die Herzfrequenz etwa gleich stark wie bei der Infusion von L-NAME. Trotz eines leichten, aber nicht signifikanten Anstieges der linksventrikulären systolischen Funktion, konnte eine signifikante Verbesserung der myokardialen diastolischen Funktion, gemessen als $dP/dt \min$, nach Infusion von MEG nachgewiesen werden. Die Werte sind in Tabelle 4 dargestellt.

	HR f/min	LVDP mmHg	dP/dt max mmHg/s	dP/dt min mmHg/s
Kontrolle	272 ± 15	73 ± 4	1903 ± 101	-1236 ± 72
LPS	325 ± 5	72 ± 9	2151 ± 233	-1393 ± 155
+ MEG	291 ± 8	74 ± 9	2232 ± 240	-1568 ± 119
LPS	330 ± 9	70 ± 5	2234 ± 151	-1292 ± 94
+ L-NAME	294 ± 8	68 ± 4	2146 ± 114	-1234 ± 75

Tabelle 4: Ergebnisse der linksventrikulären Hämodynamik. Die Herzfrequenz der LPS-Gruppe ist signifikant höher, L-NAME und MEG senken die Herzfrequenz etwa gleich stark, nach MEG-Gabe resultiert eine verbesserte diastolische Myokardfunktion (dP/dt min).

3.2 Effekte von L-NAME und MEG auf Koronarfluss und koronare Flussreserve

Die Gabe von LPS führte zu einem signifikanten Anstieg des CF verglichen mit den Kontrolltieren (LPS: 20,9 ± 0,8 ml/min, Kontrolle: 13,2 ± 0,7 ml/min, p<0,0001). Die CFR in Antwort auf die endothelabhängige Stimulation mit Bradykinin war signifikant schlechter bei den mit LPS behandelten Herzen (LPS-Bradykinin: 4,8 ± 1,1 ml/min, Kontrolle-Bradykinin: 13,8 ± 0,8 ml/min, p<0,0001). Bei der endothelunabhängigen Stimulation mit Adenosin war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (LPS-Adenosin: 13,9 ± 1,5 ml/min, Kontrolle-Adenosin: 16,1 ± 1,1 ml/min, p=n.s.).

Die Infusion von L-NAME bei LPS-behandelten Tieren reduzierte den CF auf Werte vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe (LPS-L-NAME: $10,5 \pm 0,3$ ml/min, $p=0,001$ vs Kontrolle, $p=0,093$ vs LPS). Der Anstieg der koronaren Flussreserve ist nach Gabe von Bradykinin nicht signifikant (LPS-L-NAME: $9,2 \pm 1,0$ ml/min). Die CFR nach Gabe von L-NAME bleibt signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe ($p=0,001$).

Nach Infusion von MEG resultierte eine statistisch signifikante Abnahme des CF (LPS-MEG: $11,0 \pm 0,6$ ml/min, $p=0,016$ vs Kontrolle, $p=0,001$ vs LPS). Jedoch führte die Anwendung von MEG zu einer deutlichen Verbesserung der endothelabhängigen Vasomotorfunktion getestet mit Bradykinin (LPS-MEG: $12,7 \pm 1,2$ ml/min), welche signifikant höher war verglichen mit den Werten der CFR nach L-NAME-Behandlung ($p=0,049$). Sowohl L-NAME als auch MEG führten zu keinen signifikanten Effekten bei Testung der endothelunabhängigen Vasomotorfunktion mit Adenosin (LPS-L-NAME-Adenosin: $16,2 \pm 0,9$ ml/min, $p=n.s.$ vs LPS; LPS-MEG-Adenosin: $15,1 \pm 1,5$ ml/min, $p=n.s.$ vs LPS). Die Ergebnisse sind in einer Übersicht in Tabelle 5 dargestellt. Die unterschiedlichen Signifikanzen zeigte Abbildung 8.

	CF ml/min	CFR (Bradykinin) ml/min	CFR (Adenosin) ml/min
Kontrolle	13,2 ± 0,7	13,8 ± 0,8	16,1 ± 1,1
LPS	20,9 ± 0,8	4,8 ± 1,1	12,2 ± 1,3
+ MEG	11,0 ± 0,6	12,7 ± 1,2	15,1 ± 1,5
LPS	22,0 ± 1,0	5,8 ± 1,3	13,9 ± 1,5
+ L-NAME	10,5 ± 0,3	9,2 ± 1,0	16,2 ± 0,9

Tabelle 5: Effekte von MEG und L-NAME auf die koronare Flussreserve. Höherer Koronafloss (CF) in der LPS-Gruppe, Verbesserung der endothelabhängigen koronaren Flussreserve (Bradykinin) nach MEG-Infusion.

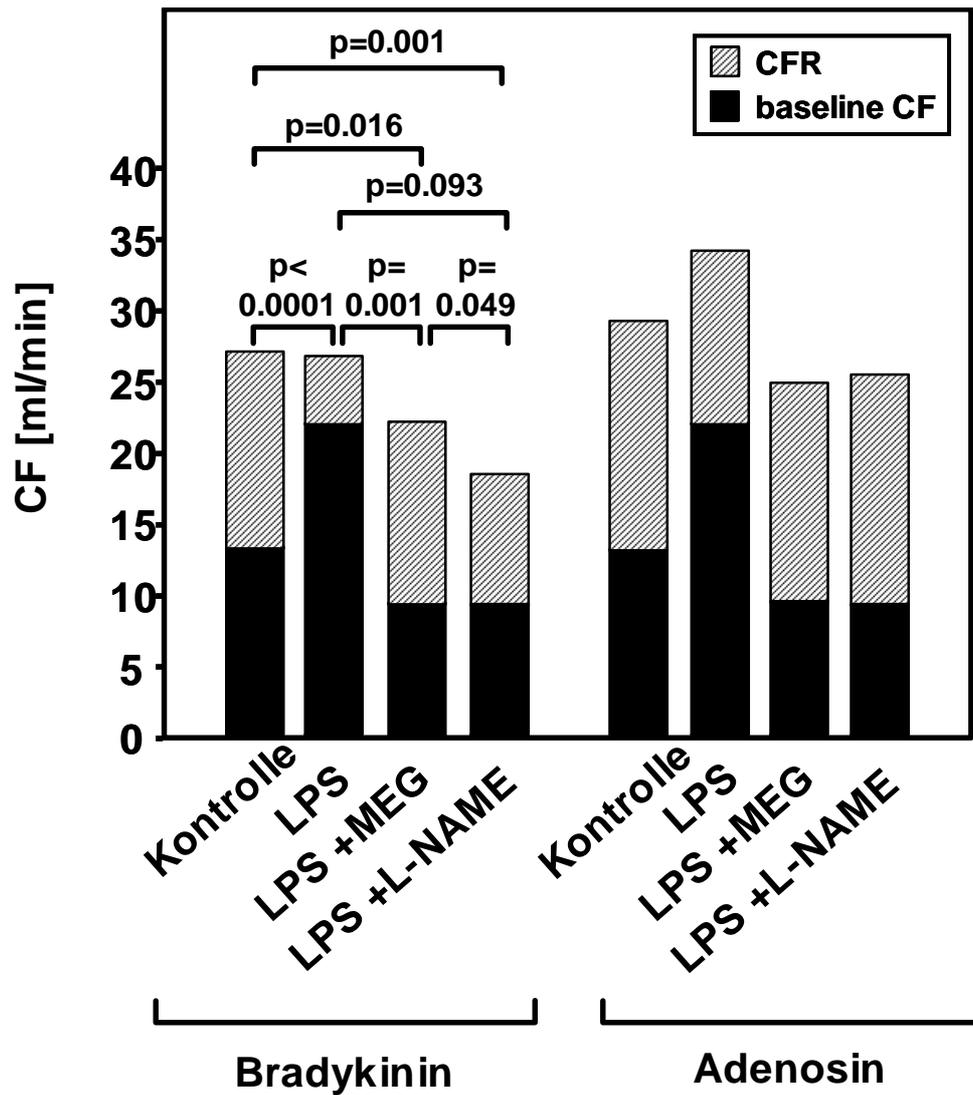


Abbildung 8: Statistische Signifikanzen des Koronarflusses und der koronaren Flussreserve. Dargestellt sind die Kontrollgruppe sowie die Wirkung von MEG und L-NAME in der LPS-Gruppe.

3.3 Nitrat/Nitrit-Spiegel im Plasma

Alle mit LPS behandelten Ratten hatten signifikant höhere Nitritspiegel als unbehandelte Tiere der Kontrollgruppe ($117,9 \pm 5,0$ vs $28,0 \pm 2,4 \mu\text{M}$; $p < 0,0001$), siehe Abbildung 9.

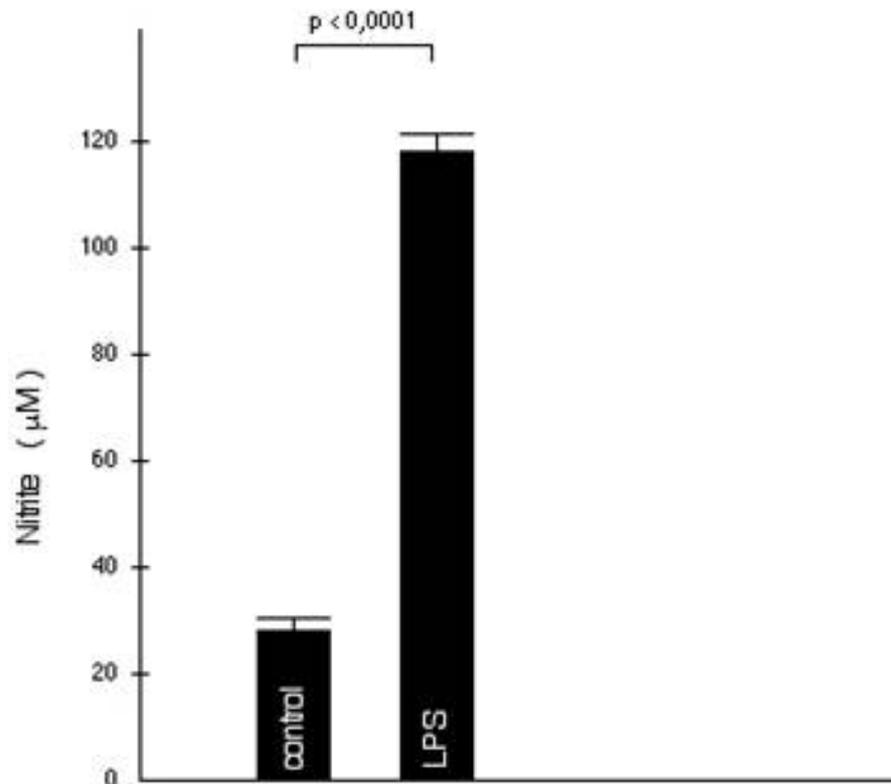


Abbildung 9: Nitritspiegel im Plasma. Signifikante Erhöhung der Nitritkonzentration spricht für größere Mengen NO in der LPS-Gruppe.

3.4 Immunhistochemische Analyse von eNOS, iNOS und Nitrotyrosin

Abbildung 10 (nächste Seite) zeigt die immunhistologischen Ergebnisse, Kontrollherzen A bis C, LPS-Herzen D bis G). Die Färbungen wurden mit der Peroxidase-Methode durchgeführt (braune Färbung) und mit Hämalaun

gegengefärbt.

In beiden Gruppen (LPS und Kontrolle) konnten spezifische eNOS-Immunreaktionen nachgewiesen werden. Dies zeigte sich an Endothelzellen von Arterien, Venen, Arteriolen und Venulen. Die Intensität der Färbung war in beiden Gruppen vergleichbar (Abbildung 10 A und D).

In keiner Färbung von Herzen der Kontrollgruppe konnte iNOS nachgewiesen werden (B). In den mit LPS behandelten Herzen ließ sich eine spezifische Reaktivität für iNOS in infiltrierenden inflammatorischen Zellen als auch im Sarkoplasma von vaskulären Myozyten zeigen (hellbraune Färbung, E). Die Färbung der Myozyten war allerdings schwächer als die der inflammatorischen Zellen (E).

Nitrotyrosin wurde in LPS-behandelten Herzen exprimiert, in den unbehandelten Herzen der Kontrolle war keine spezifische Färbung zu erkennen. Nitrotyrosin ließ sich vorwiegend in Endothelzellen von Arteriolen und Venulen anfärben (F und G). Die Verbreitung war vergleichbar mit der Immunfärbung für die iNOS. In den nicht behandelten Kontrollgruppen konnte dies nicht gezeigt werden (C). Vergrößerung (A, D, E) 200fach, (B, C, F) 100fach und (G) 400fach.

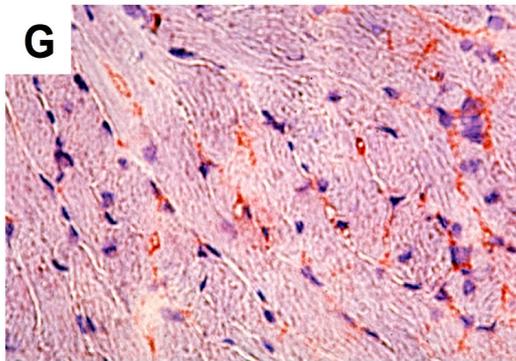
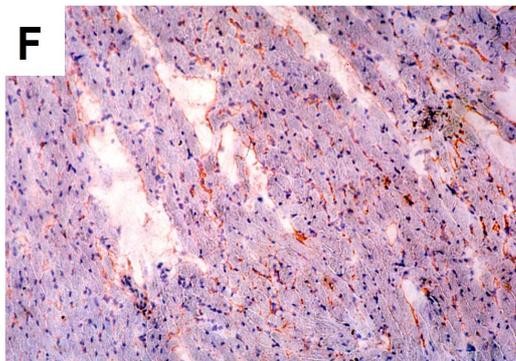
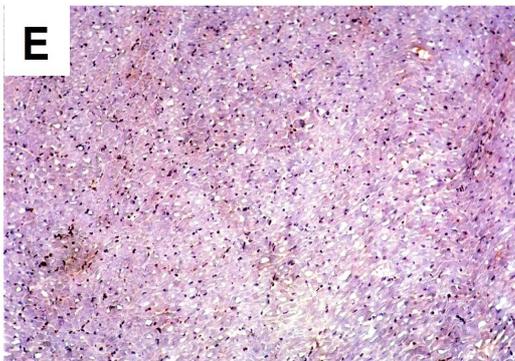
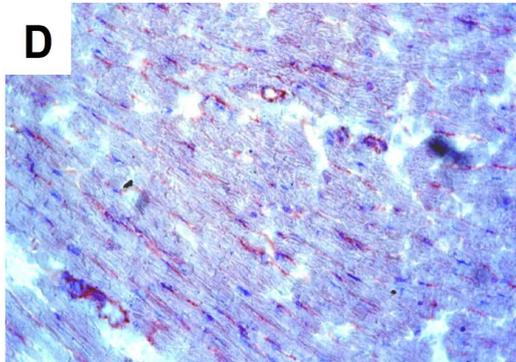
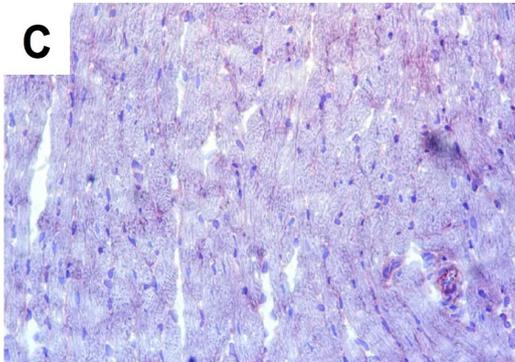
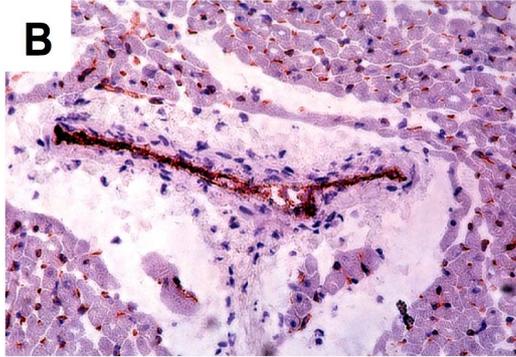
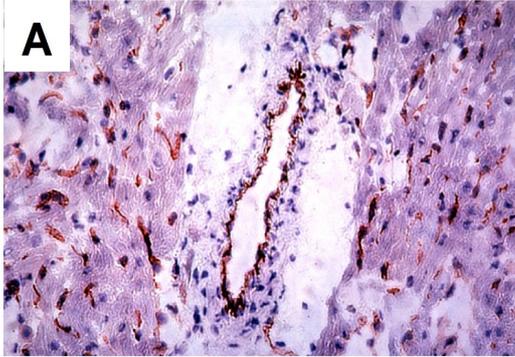


Abbildung 10, vorherige Seite: Immunhistochemische Analyse von eNOS, iNOS und Nitrotyrosin. Kontrollgruppe Bild A, B und C, LPS-Gruppe Bild D, E, F und G. eNOS-Nachweis in Endothelzellen von Venen, Arterien, Venen und Venulen ohne Unterschiede in beiden Gruppen (A und D). Kein iNOS-Nachweis in der Kontrolle (B), aber in der LPS-Gruppe (E, hellbraun, infiltrierende inflammatorischen Zellen, Sarkoplasma ventrikulärer Myozyten). Die Färbung im Sarkoplasma ist schwächer als in inflammatorischen Zellen.

Nachweis von Nitrotyrosin (hauptsächlich in Endothelzellen von Arteriolen und Venulen) in Bild F und G, nicht in der Kontrolle (Bild C).

A, D und E 200fache Vergrößerung, B, C und F 100fache Vergrößerung, G 400fach vergrößert.

3.5 Myokardiale Genexpression von eNOS und iNOS mit RT-PCR

Abbildung 11 zeigt die intramyokardialen mRNA-Transkriptionslevel für eNOS und iNOS. Die Gabe von LPS 12 h vor der Untersuchung ergab einen signifikanten Anstieg der iNOS-mRNA ($0,63 \pm 0,08$ vs $0,13 \pm 0,06$; $p=0,001$). Bezüglich der eNOS-Expression gab es zwischen beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschied ($0,49 \pm 0,10$ vs $0,25 \pm 0,14$; $p=0,12$). Repräsentative PCR-Transkripte sind in Abbildung 12 dargestellt.

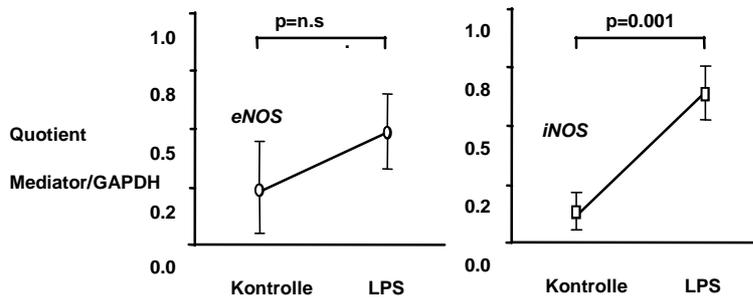


Abbildung 11: Intramyokardiale mRNA-Transkriptionslevel für eNOS und iNOS. Signifikante erhöhte mRNA für iNOS im Vgl. zur Kontrolle (rechte Seite). Die mRNA für eNOS ist bei der LPS-Gruppe nicht signifikant erhöht im Vgl. zur Kontrolle (linke Seite).

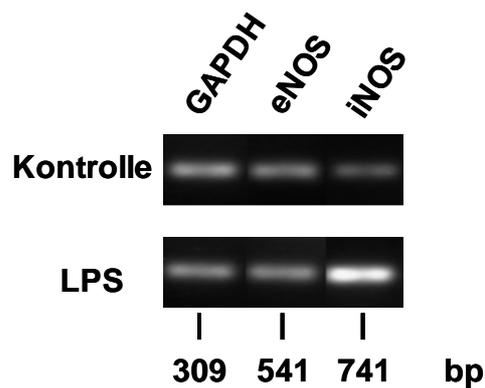


Abbildung 12: Repräsentative PCR-Transkripte.

4 Diskussion

4.1 Endothelfunktion

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle der zwei Isoformen der NO-Synthase eNOS und iNOS im Hinblick auf die endothelabhängige bzw. die endothelunabhängige Funktion der Koronararterien sowie die linksventrikuläre Hämodynamik an endotoxämischen Rattenherzen. Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Versuche seien nachfolgend genannt. Die selektive Inhibition der iNOS mit MEG führt zu einer signifikant verbesserten endothelabhängigen Koronarfunktion bei endotoxämischen Rattenherzen. Der entscheidende Regulator des koronaren Gefäßwiderstandes ist die eNOS, aber nicht die Aktivierung der iNOS. Durch Hemmung der eNOS mit L-NAME kam es zu einer Verschlechterung der endothelabhängigen koronaren Flussreserve, wohingegen mit selektiver Hemmung der iNOS mittels MEG es zu einer verbesserten endothelabhängigen koronaren Flussreserve mit gleichzeitig verbesserter linksventrikulärer Relaxation kam. Die hier durchgeführten Versuche beschreiben die koronarspezifischen und linksventrikulären Effekte der selektiven iNOS-Hemmung (Szabó et al., 1994). Die systemischen Wirkungen wurden aufgrund des gewählten Modells mit isolierten Rattenherzen dabei nicht erfasst. Die Daten zeigen, dass es unter dem Einfluss von LPS zu einer Aktivierung der iNOS gekommen ist. Zu sehen ist dies an den hohen gemessenen Werten von Nitrit bei den mit LPS-behandelten Tieren. Die stark erhöhte NO-Produktion führte dann zu einem deutlich erhöhten Koronarfluss mit reduzierter koronarer Flussreserve. Die selektive Hemmung der iNOS mit MEG hingegen führte zu einer signifikanten Reduktion des Koronarflusses und verbesserte die endothelabhängige koronare Flussreserve in Antwort auf Bradykinin. Im Gegensatz dazu kam es bei nicht-selektiver Hemmung mit L-NAME zu keiner Verbesserung der

endothelabhängigen koronaren Flussreserve. Eine Erklärung dafür ist, dass für die Endothelfunktion eine basale Produktion von NO durch die eNOS unter endotoxämischen Bedingungen essentiell ist.

Es konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, dass es bei exzessiver Bildung von NO während Endotoxämie, zu einer vermehrten Entstehung von Peroxynitrit aus NO und Superoxid kommt (Szabó et al., 1995). Die Autoren konnten weiterhin immunhistochemisch die Akkumulation von Nitrotyrosin in glatten Muskelzellen von den mit LPS behandelten Herzen nachweisen. Auch in der vorliegenden Arbeit kam es zu einer Anhäufung von Nitrotyrosin in mit LPS behandelten Herzen, welches immunhistochemisch gezeigt werden konnte. Es ist somit anzunehmen dass durch die iNOS generiertes NO, zumindest zum Teil, zu einem peroxynitritvermittelten Gewebsschaden und Störung der koronaren Zirkulation beitragen. MEG, dem selektiven Inhibitor der iNOS, kommt eine weitere Rolle als potenter Peroxynitritfänger zu (Szabó et al., 1997). Dies könnte die günstigen Auswirkungen von MEG auf die Endothelfunktion erklären, unabhängig von der selektiven Hemmung der iNOS. In einer Studie mit arteriosklerotisch veränderten Aorten konnte in den geschädigten Regionen vermehrt iNOS und Nitrotyrosin nachgewiesen werden, in normalen Aorten dagegen nicht (Buttery et al., 1996). Hieraus wurde geschlossen, dass die Hochregulierung der iNOS die Lipidperoxydation fördert und somit zur Progression des arteriosklerotischen Prozesses beiträgt. In einem Rattenherz-Transplantationsmodell kam es bei chronischer Abstossungsreaktion und Progression der Allograft-Vaskulopathie zum Nachweis erhöhter iNOS-Aktivität (Russel et al., 1995). Eine andere Erklärung für die verbesserte koronarvasomotorische Antwort nach selektiver iNOS-Inhibition könnte in der verminderten Eliminierung von eNOS-produziertem NO durch Superoxid liegen. Es zeigte sich in der Tat eine verbesserte koronare Flussreserve in Antwort auf

Bradykinin nach Gabe von MEG und somit erhaltener endothelialer NO-Produktion, im Gegensatz zur Hemmung von eNOS und iNOS, wobei die endothelabhängige koronare Flussreserve deutlich eingeschränkt war. Dies deutet darauf hin, dass von eNOS gebildetes NO der dominierende Faktor in der Regulation der koronaren Widerstandsgefäße unter diesen Bedingungen ist. Unter diesen pathologischen Bedingungen produziert die NOS-Isoform iNOS unphysiologisch hohe Mengen an NO. Die Reaktion von Superoxid mit NO um Peroxynitrit zu bilden läuft um ein vielfaches schneller ab als die Bindung von NO an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylatzyklase. Es resultiert eine verminderte Bildung von cGMP durch lösliche Guanylatzyklase bei gleichzeitig gesteigerter Peroxynitritbildung. Mit 1400 W, einem anderen selektiven iNOS-Inhibitor, konnte ein signifikanter Anstieg des Koronarflusses bei isolierten, mit Vollblut perfundierten Kaninchenherzen gezeigt werden (Parrino et al., 1998). Änderungen der cGMP konnten die Autoren nicht nachweisen, jedoch aber eine signifikante Reduktion der Myeloperoxidaseaktivität, welche eine Verbesserung der koronarvaskulären Funktion auf Grund der Verminderung von inflammatorischer Zellaktivierung durch selektive iNOS-Hemmung vermuten lässt. Egi et al., 2004 untersuchten die Wirkung von iNOS generiertem NO und Superoxide auf Metalloproteinase-9-Aktivität und dessen Wirkungen auf die vasomotorische Funktion der Koronarien an einem Modell mit transplantierten Rattenherzen. Der selektive iNOS-Inhibitor 1400W und/oder Superoxiddismutase verbesserten sowohl die endothelabhängige wie endothelunabhängige koronare Flussreserve und inhibierten die gesteigerte MMP-9-Aktivität. Die begleitende Reduktion von Nitrotyrosin und Superoxid bestätigt den Anteil der Oxidantien die zur Dysfunktion der Koronarien beitragen. Eine weitere, sehr interessante Arbeit hierzu wurde von Cuzzocrea et al., 2006 vorgelegt. Es wurde die Rolle von Peroxynitrit an endotoxämischen Ratten untersucht. Den Ratten wurde i.v. 4 mg/kg LPS injiziert und

es konnte ein Abfall des mittleren arteriellen Druckes gemessen, sowie Organschäden in Leber, Nieren und Pankreas nachgewiesen werden. Wurde vor LPS-Gabe der selektive iNOS-Inhibitor 1400W verabreicht, verzögerte sich der Blutdruckabfall, das Überleben der Tiere blieb unbeeinflusst. Wurde stattdessen FeTTPs, ein Katalysator von Peroxynitrit, gegeben, besserte sich dosisabhängig die Hypotension und die Morbidität wurde verbessert. Zur Beurteilung der Endothelfunktion wurden von den LPS-behandelten Tieren und den zusätzlich mit FeTTPs-behandelten Tieren die Aorta isoliert. Die kontraktile Funktion wurde mit Phenylephrin, die endothelabhängige Relaxation mit Acetylcholin getestet. Durch Gabe von FeTTPs 1 h vor LPS-Gabe, konnte die LPS-induzierte kontraktile und endotheliale Dysfunktion verhindert werden. Dies zeigt übereinstimmend zu unserer Arbeit die Bedeutung von NO-generierten Peroxynitrit. Die Gabe eines selektiven iNOS-Inhibitors allein hat nur geringe positive Effekte. Die Kombination mit einem Peroxynitritfänger wie MEG, scheint die deletären Effekte bei septischen Ratten, deutlicher abzuwenden. Die Neutralisierung von Peroxynitrit ist demnach mindestens ebenso bedeutungsvoll, wie die iNOS-Inhibition allein. Die zitierte Arbeit bestätigt auch die Notwendigkeit einer basalen NO-Produktion für eine adäquate Organfunktion.

4.2. Hämodynamik

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Effekte von LPS auf die myokardiale Hämodynamik konnte auch in anderen Arbeiten bestätigt werden. So war bei Wistar-Ratten nach Vorbehandlung mit LPS (10 mg/kg) gezeigt worden, dass es nach 48 h zu einer Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion, Vergrößerung des linken Ventrikels, Erhöhung des cardiac-output, erhöhtem Sauerstoffverbrauch und

koronarer Hypoperfusion kam (Chagnon et al., 2006). Durch Gabe von Kolloiden konnten zum Teil signifikante Verbesserungen erreicht werden. Dies entspricht auch dem klinischen Vorgehen bei Sepsis (Volumengabe). In einer Versuchsreihe mit endotoxämischen Ratten zur ANP-Produktion (atrial natriuretic peptide), konnte nach Gabe von LPS (1,5 mg/kg i.v.) ebenfalls eine signifikant erhöhte Herzfrequenz, bei gesenktem arteriellen Mitteldruck nachgewiesen werden (Stabile et al., 2007). Die Vorbehandlung mit Aminoguanidin (selektiver iNOS-Inhibitor) bremste den Abfall des mittleren arteriellen Druckes und den Anstieg der Herzfrequenz. Aminoguanidin-behandelte Tiere wiesen erhöhte ANP-Konzentrationen im Plasma auf.

Wie die selektive Inhibition der iNOS zur Verbesserung der linksventrikulären Relaxation beiträgt bleibt ungeklärt. Der Einfluss des iNOS/NO-Stoffwechsels auf Hämodynamik und Herzmuskelfunktion wurde von mehreren Arbeitsgruppen dokumentiert (Gardiner et al., 1995, Hirono et al., 1997, Wildhirt et al., 1997, Schulz et al., 1997 und Fadi et al., 2002). Die Arbeit von Vona Davis et al., 2002 zeigte an einem Modell mit endotoxämischen Rattenherzen (4 mg/kg LPS) und Perfusion am Langendorff-Apparat eine signifikante Reduktion des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP). An isolierten Kardiomyozyten dieser Herzen war eine reduzierte Fähigkeit zur Kontraktion nachweisbar. Eine Applikation von Aminoguanidin (selektiver iNOS-Inhibitor, 100 mg/kg) konnte bei diesem Modell allerdings keine Verbesserung der Kontraktionsfähigkeit zeigen. Die Produktion von Nitrat/Nitrit war nach selektiver Inhibition deutlich erniedrigt, was auf eine suffiziente Hemmung der iNOS schließen lässt.

Für die Wirkung auf Hämodynamik und Herzmuskelfunktion kommen weder ein gesteigerter Preload noch Änderungen des Afterload für eine Erklärung in Frage, da diese Größen konstant gehalten wurden. Da die Verteilung der verschiedenen Isoformen der NO-Synthasen innerhalb des Herzens variieren und die Wirkung von

NO sehr schnell und vielseitig ist, hat dies auch eine weite Breite unterschiedlicher kardialer Effekte, je nach Verteilung der einzelnen NOS-Isoformen. Das bedeutet, dass auch endokardial oder vom vaskulären Endothel freigesetztes NO, die Myokardfunktion beeinflusst (Mohan et al., 1995). Bestätigt wurden diese Vermutungen in klinischen Studien, wo nach der Gabe von Substanz P, einem Liberator von endotheliale NO, eine Verbesserung der myokardialen Funktion zeigte (Paulus et al., 1994). Die Beobachtungen dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung der Aufrechterhaltung der endothelialen NO-Produktion als Regulator koronaren Blutflusses und der Myokardfunktion. Auch eine relevante Beteiligung der Adventitiazellen am NO-Stoffwechsel an septischen Rattenherzen in vivo konnte gezeigt werden (Jia et al., 2006). Eine deutlich schlechtere Hämodynamik wurde hierbei durch einen reduzierten linksventrikulär entwickelten maximalen und minimalen Druck sowie einen erhöhten enddiastolischen linksventrikulären Druck angezeigt. Die iNOS-mRNA war 6-fach erhöht. Eine andere Arbeit zeigte, dass von der bNOS in Nervenfasern des Herzens gebildetes NO, eine Kontrolle auf die Freisetzung von Norepinephrin ausübt (Schwarz et al., 1995). Im Gegensatz zu eNOS und bNOS ist die Expression und Aktivierung der iNOS im Herzen auf eine de-novo-Synthese in Antwort auf Zytokine zurückzuführen. Die hohen Mengen von NO sind maßgeblich an den negativ inotropen Effekten der iNOS beteiligt. Große Mengen NO führten zu einer Beeinträchtigung der β -adrenergen Stimulierbarkeit bei linksventrikulärer Dysfunktion (Hare et al., 1998). Durch selektive iNOS-Hemmung konnte die β -adrenerge Stimulierbarkeit jedoch wieder verbessert werden (Drexler et al., 1998). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der durch iNOS vermittelte Anstieg von cGMP mit darauf folgender Hemmung spannungsabhängiger, sarkolemmaler L-Type-Kalziumkanäle, verantwortlich für die negativ inotropen Effekte von NO sein könnte (Mery et al., 1991). In unserem Labor konnte zudem

gezeigt werden, dass durch Gabe von Aminoguanidin, einem selektiven iNOS-Hemmstoff, die Antwort auf Isoproterenol nach myokardialer Ischämie und Reperfusion bei Kaninchen deutlich verbessert war (Wildhirt et al., 1999). Eine signifikante Korrelation zwischen eNOS und iNOS-mRNA wurde bei Menschen mit linksventrikulärer Dysfunktion beschrieben (Heymes et al., 1999). Eine erhöhte Genexpression von eNOS und iNOS war mit einem erhöhten linksventrikulärem Schlagvolumen und Schlagarbeit verbunden. Seitdem jedoch bekannt ist, dass eine erhöhte linksventrikuläre Dehnung die myokardiale iNOS-Expression vermindert, bleibt unklar ob eine Reduktion der iNOS-mRNA die linksventrikuläre Funktion beeinträchtigt. In einer Untersuchung bezüglich der mitochondrialen Beteiligung in einem Modell mit septischen Rattenherzen am Langendorff-Apparat (Tatsumi et al., 2004) waren zunächst übereinstimmend ein erniedrigter LVDP und erhöhte Nitrat/Nitrit-Level nachweisbar. Durch Aminoguanidin konnten die hämodynamischen sowie die morphologischen und funktionellen Veränderungen an den Mitochondrien signifikant gebessert werden.

Cheng et al., 2003 untersuchten die Wirkung selektiver und nicht selektiver Inhibition der NOS im Stadium des späten septischen Schocks. Untersucht wurde an Ratten in vivo mit LPS-Gabe (10 mg/kg i.v.), als selektiver iNOS-Inhibitor diente 1400W, als nicht-selektiver NOS-Inhibitor wurde L-NNA (N(G)-nitro-L-arginine) eingesetzt. Nach 2,5 h und 4 h war der Blutfluss und mittlere arterielle Druck vor allem in Herz und Nieren vermindert, der periphere Widerstand war erhöht. Nach Gabe von 1400W konnte der Abfall des mittleren arteriellen Druckes in der Spätphase vermindert werden. Durch nicht-selektive Hemmung mit L-NNA konnte ein Abfall des mittleren arteriellen Druckes nicht verhindert werden. Diese Arbeit von Cheng et al. zeigt die nachteiligen Effekte einer nicht-selektiven Hemmung der NO-Synthase in der späten Phase des septischen Schocks.

Eine Untersuchung mit zwei Peroxynitritfängern (MEG und FeTPPS) an endotoxämischen Rattenherzen konnte jeweils eine Verbesserung der durch Inflammation induzierten myokardialen Kontraktilitätsstörung zeigen. Die Nitrotyrosinfärbung lässt auf eine Hemmung der Peroxynitritgeneration durch MEG bzw. FeTPPS schließen. Einhergehend war eine Verminderung von TNF- α im Plasma und verminderte Endothelzell/Leukozytenaktivierung (Lancel et al., 2004).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Auswirkungen der selektiven NO-Synthasehemmung durch MEG an endotoxämischen Rattenherzen. Hämodynamische Parameter und die Endothelfunktion wurden mit Hilfe des Langendorff-Modells gemessen. Die Messung der NO-Produktion erfolgte durch die Reaktion nach GRIESS. Der Nachweis von eNOS, iNOS und Peroxynitrit im Gewebe gelang mittels Immunhistochemie. Die myokardiale Genexpression von eNOS und iNOS wurde durch RT-PCR bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass durch selektive Hemmung der iNOS, im Vergleich zur nicht-selektiven Inhibition mit L-NAME, es zu einer signifikanten Verbesserung der endothelabhängigen koronaren Flussreserve und einer verbesserten linksventrikulären enddiastolischen Funktion kam. Unter endotoxämischen Bedingungen war ein signifikanter Anstieg von NO bei den endotoxämischen Rattenherzen nachweisbar. Durch die Immunhistochemie konnte eine Färbung von iNOS und Peroxynitrit nur im Gewebe von endotoxämischen Rattenherzen gezeigt werden. Die RT-PCR erbrachte den Nachweis einer signifikanten iNOS-mRNA-Expression in den Herzen endotoxämischer Ratten.

Die vorliegende Arbeit unterstützt die These, dass durch eine selektive pharmakologische Hemmung der iNOS, zumindest im tierexperimentellen Versuch, eine Verbesserung o. g. Parameter unter septischen Bedingungen erreicht werden kann. Diese experimentell viel versprechende pharmakologische Intervention benötigt weitere Studien die die Wirksamkeit unter klinischen Bedingungen zeigt. Auch der optimale Zeitpunkt einer solchen Therapieform muss noch weiter durch Studien belegt werden.

6 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, 787-93.

Anname D. (2001) Corticosteroids for septic shock. *Crit Care Med*, 29, Suppl:S117-S120.

Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al. (2001) Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med*, 345, 1359-67.

Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, Smith TW. (1993) Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest*, 91, 2314-2319.

Bannerman DD, Fitzpatrick MJ, Anderson DY et al. (1998) Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction. *Infect Immun*, 66, 1400-1407.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1620-1624.

Beckman JS, Koppenol WH. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol* 271, C1424-1437.

Bernard GR, Vincent J-L, Laterre P-F, et al. (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344, 699-709.

Blum MS, Toninelli E, Anderson JM et al. (1997) Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol*, 273, H286-294.

Bone RC, Balk RA Cerra FB, et al. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101, 1644-55.

Brown MA, Jones WK. (2004) NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Front Biosci*, 9, 1201-1217.

Buttery L, Springhall D, Chester A, Evans T, Stanfield N, Parums D, Yacoub M, Polak J. (1996) Inducible nitric oxide synthase is present with human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest*, 75, 77-85.

Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, et al. (1999) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med*, 27, 1309-1318.

Chagnon F, Bentourkia M, Lecomte R, Lessard M, Lesur O. (2006) Endotoxin-induced heart dysfunction in rats: assessment of myocardial perfusion and permeability and the role of fluid resuscitation. *Crit Care Med*, 34, 127-133.

Cheng X, Leung SW, Lo LS, Pang CC. (2003) Selective versus non-selective suppression of nitric oxide synthase on regional hemodynamics in rats with or without LPS-induced endotoxemia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 367, 372-379.

Creasey AA, Reinhart K. (2001) Tissue factor pathway inhibitory activity in severe sepsis. *Crit Care Med*, 29, S126-S129.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Matuschak GM, Salvemini D. (2006) A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J Pharmacol Exp Ther*, 319, 73-81.

Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL, Szabó C. (1998) Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med*, 24, 450-459.

Drexler H, Kästner S, Strobel A, Studer R, Brodde O, Hasenfuß G. (1998) Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase. *JACC*, 32, 955-63.

Egi K, Conrad NE, Kwan J, Schulze C, Schulz R, Wildhirt SM. (2004) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and superoxide production reduces matrix metalloproteinase-9 activity and restores coronary vasomotor function in rat cardiac allografts. *Eur J Cardiothorac Surg*. 26, 262-269.

Esmon CT. (2004) Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. Crit Care Med. 32, S298-S301.

Fadi KH, Donna P, Péter F, Schulze C, Tamás C, Manoj LM, Wildhirt SM, Schulz R. (2002) Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 283, H1108-H1115.

Faticelli A, Serrano CV, Bochner BS, et al. (1996) Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. Biochem Biophys Acta, 1310, 251-259.

Frey EA, Finlay BB. (1998) Lipopolysaccharide induces apoptosis in a bovine endothelial cell line via a soluble CD14 dependent pathway. Microb Pathog, 24, 101-109.

Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, 288, 373-376.

Gando S. (2001) Disseminated intravascular coagulation in trauma patients. Semin Thromb Hemost, 27, 585-592.

Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, Kobayashi S, Kemmotsu O. (1999) Systemic activation of tissue-factor dependent coagulation pathway in evolving acute respiratory distress syndrome in patients with trauma and sepsis. J Trauma, 47, 719-723.

Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. (1995) Cardiac and regional effects of NOS inhibitors in conscious, endotoxemic rats. *Br J Pharmacol*, 116, 2005-16.

Givalois L, Li S, Pelletier G. (2002) Central nitric oxide regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adults male rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 102, 1-8.

Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. (2000) Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*, 181, 176-180.

Grinnel BW, Hermann RB, Yan SB. (1994) Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiology*, 4, 221-225.

Guzik TJ, West N, Pillai R, et al. (2002) Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension*, 39, 1088-1094.

Hare J, Givertz M, Ma C, Colucci W. (1998) Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition on patients with heart failure. *Circulation*, 97, 161-66.

Heba G, Krzeminski T, Porc M, et al. (2001) Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *J Physiol Pharmacol*, 52, 39-52.

Henneke P, Golenbock DT. (2002) Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med*, 30, S207-213.

Herbertson MJ, Werner HA, Walley KR. (1996) Nitric oxide synthase inhibition partially prevents decreased LV contractility during endotoxemia. *Am J Physiol*, 270, H1979-H1984.

Herbertson MJ, Werner HA, Goddard CM, et al. (1995) Anti-tumor necrosis factor-alpha prevents decreased ventricular contractility in endotoxemic pigs. *Am J Respir Crit Care Med*, 152, 480-488.

Heymes C, Vanderheyden M, Bronzwear J, Shah A, Paulus W. (1999) Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 99, 3009-16.

Hirono S, Islam M, Nakazawa M, Yoshida Y, Kodama M, Shibata A, Izumi T, Imai S. (1997) Expression of inducible nitric oxide synthase in rat experimental autoimmune myocarditis with special reference to changes in cardiac hemodynamics. *Circ Res*, 80, 11-20.

Ignarro LJ. (2002) Nitric oxide as a unique signalling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*, 53, 503-514.

Jia YX, Pan CS, Yang JH, Liu XH, Yuan WJ, Zhao J, Tang CS, Qi YF. (2006) Altered L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the vascular adventitia of rats

with sepsis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33, 1202-1208.

Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, De-Hoff B, Grinnel BW. (2001) Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 11199-11203.

Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, Wildhirt SM, Schulz R. (2002) Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H1108-15.

Kimura T, Iwase M, Kondo G, et al. (2003) Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils. *Int Immunopharmacol*, 3, 1519-1528.

Lafeber FP, Beukelman CJ, van den Worm E, et al. (1999) Apocynin, a plant derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 38, 1088-1093.

Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R. (2004) Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol*, 43, 2348-2358.

Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. (2003) Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res*, 60, 26-39.

Liaw PC, Esmon CT, Kahn moui K, et al. (2004) Patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate activated protein C. *Blood*, 104, 3958-3964.

Marshall, JC, Cook, DJ, Christou, NV, et al. (1995) Multiple organ dysfunction score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. Crit Care Med, 23, 1638.

Mashimo H, Goyal RK. (1999) Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. Am J Physiol, 277, G745-G750.

Matsuno R, Aramaki Y, Arima H, et al. (1998) Contribution of CR3 to nitric oxide production from macrophages stimulated with high-dose of LPS. Biochem Biophys Res Commun, 244, 115-119

Mery P, Lohmann S, Walter U, Fischmeister R. (1991) Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. PNAS, 88, 1197-1201.

Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG. (1993) Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. Eur J Pharmacol, 233, 119-125.

Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ. (1999) The toll of innate immunity on microbial pathogens. N Engl J Med, 340, 1834-1835.

Mohan P, Brutsaert D, Sys S. (1995) Myocardial performance is modulated by interaction of cardiac endothelium derived nitric oxide and prostaglandins. Cardiovasc Res, 29, 637-640.

Moochhala SM, Lu J, Xing MC, Anuar F, Ng KC, Yang KL, Whiteman M, Atan S. (2005) Mercaptoethylguanidine inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions induced in rats after fluid-percussion brain injury. *J Trauma*, 59, 450-457.

Murakami K, Okajima K, Uchiba M, et al. (1997) Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. *Am J Physiol*, 272, L197-L202.

Parratt JR. (1997) Nitric oxide. A key mediator in sepsis and endotoxemia? *J Physiol Pharmacol*, 48, 493-506.

Parrino PE, Laubach VE, Gaughen JR, Shockey KS, Wattsman T-A, King RC, Tribble CG, Kron IL. (1998) Inhibition of inducible nitric oxid synthase after myocardial ischemia increases coronary flow. *Ann Thorac Surg*. 66, 733-39.

Paulus W, Vantrimpont P, Shah A. (1994) Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. *Circulation*, 89, 2070-78.

Ploner F, Radermacher P, Theisen M, Tugtekin IF, Matejovic M, Stehr A, Szabó C, Southan GJ, Georgieff M, Bruckner UB, Trager K. (2001) Effects of combined selective iNOS inhibition and peroxynitrite blockade during endotoxemia in pigs. *Shock*, 16, 130-136.

Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone H-G, Gerlach H, Gründling, M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stüber F, Weiler N, Welte T, Werdan K. (2005) Diagnose und Therapie der Sepsis. S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). (www.sepsis-gesellschaft.de).

Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, et al. (2001) Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(⁻) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res*, 89, 408-414.

Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. (2001) Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 345, 1368-77.

Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. (1991) Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol*, 138, 447-453.

Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J. (1999) The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc Res*, 44, 47-59.

Rubbo H, Darely-Usmar V, Freeman BA. (1996) Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol*, 9, 809-820.

Russel JA. (2006) Management of Sepsis. *N Engl J Med*, 355, 1699-1713.

Russel M, Wallace A, Wyner L, Newell J, Karnovsky M. (1995) Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant arteriosclerosis. *Circulation*, 92, 457-64.

Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G, Siracusa MA. (2002) Progress in the Development of Selective Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors. *Curr Pharm Des*, 8, 177-200.

Schulz R, Dodge KL, Lopaschuk GD, Clanachan AS. (1997) Peroxynitrite impairs cardiac contractile function by decreasing cardiac efficiency. *Am Physiol Soc*, H1212-H1219.

Schulz R, Nava E, Moncada S. (1992) Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol*, 105, 575-580.

Schwarz P, Diem R, Dun N, Foerstermann U. (1995) Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. *Circ Res*, 77, 841-48.

Shesely EG, Maeda N, Kim HS, et al. (1996) Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 13176-13181.

Southan GJ, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL, Szabó C. (1996) Spontaneous rearrangement of aminoalkylisothioureas into mercaptoalkylguanidines, a novel class of nitric oxide synthase inhibitors with selectivity towards the inducible isoform. *Br J Pharmacol*, 117, 619-632.

Stabile AM, Moreto V, Antunes-Rodrigues J, Carnio EC. (2007) Participation of the inducible nitric oxide synthase on atrial natriuretic peptide plasma concentration during endotoxemic shock. *Regul Pept*, 140, 136-141.

Szabó C. (2006) The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 6, 79-88.

Szabó C, Ferrer-Sueta G, Zingarelli B, Southan GJ, Salzmänn AL, Radi R. (1997) Mercaptoethylguanidin and Guanidin inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrit and protect against peroxynitrit-induced oxidative damage. *J Biol Chem*, 272, 9030-36.

Szabó C, Salzmänn AL, Ischiropoulos H. (1995) Peroxynitrit-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS lett*, 372, 229-32.

Szabó C, Southan G, Thiemermann C. (1994) Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *PNAS*, 91, 12472-76.

Tamura Y, Chi LG, Driscoll EM, Hoff PT, Freeman BA, Gallagher KP, Lucchesi BR. (1988) Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol provides sustained protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in canine heart. *Circ Res*, 63, 944-959.

Tatsumi T, Akashi K, Keira N, Matoba S, Mano A, Shiraishi J, Yamanaka S, Kobara M, Hibino N, Hosokawa S, Asayama J, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M, Matsubara H. (2004) Cytokine-induced nitric oxide inhibits mitochondrial energy production and induces myocardial dysfunction in endotoxin-treated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 37, 775-784.

Thomson L, Trujillo N, Telleri R, Radi R. (1995) Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxid measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys*, 319, 491-497.

Tiidus PM. (1998) Radical species in inflammation and overtraining. *Can J Physiol Pharmacol*, 76, 533-538.

Tracey WR, Nakane M, Basha F, Carter G. (1995) In vivo pharmacological evaluation of two novel type II (inducible) nitric oxide synthase inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol*, 73, 665-669.

Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van Wijngaerden E, Bobbaers H, Bouillon R. (2006) Intensive Insulin Therapy in the Medical ICU. *N Engl J Med*, 354, 449-61.

Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive Insulin Therapy in Critically Ill Patients. *N Engl J Med*, 345, 1359-1367.

Vona-Davis L, Wearden P, Hill J, Hill R. (2002) Cardiac response to nitric oxide synthase inhibition using aminoguanidine in a rat model of endotoxemia. *Shock*, 17, 404-410.

Wildhirt SM, Suzuki H, Horstmann D, Weismüller S, Dudek RR, Akayama K, Reichart B. (1997) Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isoenzyme in myocardial infarction. *Circulation*, 96, 1616-23.

Wildhirt SM, Weismüller S, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, Reichart B. (1999) Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia and reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size-evidence for a late phase of nitric oxide mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res*,

Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. (1993) Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 9813-9817.

Zingarelli B, Ischiropoulos H, Salzman AL, Szabó C. (1997) Amelioration by mercaptoethylguanidine of the vascular and energetic failure in haemorrhagic shock in the anesthetised rat. *Eur J Pharmacol*, 338, 55-65.

7 Abbildungen und Tabellen

- Abbildung 1 Schematische Darstellung der bei Sepsis involvierten Mechanismen, (Quelle: Russel, 2006).
- Abbildung 2 Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO katalysiert durch eine NO-Synthase-Isoform, (Quelle: Salerno et al., 2002).
- Abbildung 3 Unterschiedliche Wirkungen von NO, (Quelle: http://www.merckbiosciences.co.uk/sharedimages/calbiochem/IS_nitric_oxide_iNOS.jpg).
- Abbildung 4 Physiologische Regulation und Wirkung der eNOS.
- Abbildung 5 Aktivierung und Wirkung von NO durch iNOS.
- Abbildung 6 Schematische Anordnung des Versuchablaufes.
- Abbildung 7 Schematischer Aufbau des Langendorff-Apparates.
- Abbildung 8 Statistische Signifikanzen des Koronarflusses und der koronaren Flussreserve.
- Abbildung 9 Nitritspiegel im Plasma.
- Abbildung 10 Immunhistochemie.
- Abbildung 11 Intramyokardiale mRNA-Transkriptionslevel für eNOS und iNOS.
- Abbildung 12 Repräsentative PCR-Transkripte.
- Tabelle 1 Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung.
- Tabelle 2 GRIESS-Reagenz.
- Tabelle 3 Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer.
- Tabelle 4 Ergebnisse der linksventrikulären Hämodynamik.
- Tabelle 5 Effekte von MEG und L-NAME auf die koronare Flussreserve.

8 Abkürzungen

%	Massenprozent
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
A.	Arteria, Arterie
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ANOVA	„one-way analysis of variance“, einfaktorielle Varianzanalyse
ARDS	„adult respiratory distress syndrom“
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
bpm	„beats per minute“, Schläge pro Minute, Herzfrequenz
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CD	„cluster of differentiation“
CF	Koronarfluss
CFR	koronare Flussreserve
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
-dP/dt	maximal negatives dP/dt
+dP/dt	maximal positives dP/dt
E. coli	Escherichia coli
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase

EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ET	Endothelin
Fa.	Firma
FeTPPS	5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)-porphyrinat-Eisen (III)
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidierte Form von Glutathion
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	„human immunodeficiency virus“
HR	„heart rate“, Herzfrequenz
i.v.	intravenös
IL-1 β	Interleukin-1beta
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
kDa	kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KH	Krebs-Henseleit-Puffer
L-Arg	L-Arginin
LBP	“LPS binding protein”
L-NAME	L-NG-Nitroargininmethylester
LLC	„liquid level controler“
LPS	Lipopolysaccharid
LVDP	linksventrikulär entwickelter Druck
LVP	linksventrikulärer Druck

mA	Milliampère
MEG	Mercaptoethylguanidin
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	„multiple organ dysfunction syndrome“
mRNA	“messenger ribonucleic acid”
n.s.	nicht signifikant
NADP(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert/reduziert)
NF- κ B	nukleärer Faktor kappaB
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
OH•	Hydroxylradikal
ONOO-	Peroxynitrit
PCR	„polymerase chain reaction“
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
ROS	„reactive oxygen species“
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	„reverse transcriptase polymerase chain reaction“
s.c.	subkutan
s.o.	siehe oben
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SIRS	„systemic inflammatory response syndrom“

SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TLRs	toll-like receptors
U	„units“, Einheiten
V	Volt
V.	Vena, Vene
vs	„versus“, im Vergleich zu
Vv.	Venae, Venen

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich einen ganz herzlichen Dank an meinen Betreuer und Doktorvater PD Dr. Stephen Wildhirt aussprechen. Dieser gilt insbesondere für die Hilfe bei der Wahl des Themas, als auch für die während der Arbeit notwendige Unterstützung, bis hin zur geduldigen Betreuung bis zum Abschluss der Dissertation. Maßgeblich durch sein Engagement gelang es ein Labor samt apparativer und personeller Ausstattung aufzubauen, in welchem meine Dissertation durchgeführt werden konnte. In diesem Labor bestand durchweg eine freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Für all dies nochmals herzlichen Dank.

Weiter Danken möchte ich der Leiterin des Labors, Dr. Nicole Conrad. Durch Ihre Anleitung in die täglichen Arbeitsabläufe und Grundlagenkenntnisse der Laborarbeit, konnte diese Arbeit erst entstehen. Für alltägliche und nicht alltägliche Fragen hatte sie immer ein offenes Ohr und stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Nicht zu vergessen war der gemeinsame Aufbau eines komplett neuen Labors von „null“, eine tolle Erfahrung.

Danken möchte ich ebenfalls dem gesamten Team des Labors der herzchirurgischen Klinik im Klinikum Großhadern. Nennen möchte ich hier insbesondere Haluk Akdemir und Christina Höpp, von beiden konnte ich durch die, bei Ihren eigenen Arbeiten angewandten Methoden (Immunhistochemie und PCR), profitieren. Gedankt sei auch unserem Zivildienstleistenden Fabian Tinhof für seine zuverlässige Unterstützung und Verbreitung guter Laune.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für Ihre langjährige Unterstützung und meiner Schwester Tina. Meiner Tochter Hannah, welche für einen hervorragenden Ausgleich gesorgt hat. Letztlich danke ich meiner Ehefrau Anette Gerber für Ihre geduldige Unterstützung auf den „letzten Metern“.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sören Kühnapfel
Geburtsdatum	07. November 1973
Geburtsort	Saalfeld/Saale
Eltern	Peter und Monika Kühnapfel
Familienstand	verheiratet
Kinder	Hannah Wichert, 9 Jahre

Schulbildung

1980 bis 1989	Oberschule III in Saalfeld
1989 bis 1990	Städtische Realschule Wesel-Mitte
1990 bis 1993	Abitur an den Berufsbildenden Schulen des Kreises Wesel in Wesel

Zivildienst

1993 bis 1994	Feuer- und Rettungswache Wesel mit Ausbildung zum Rettungshelfer
---------------	--

Hochschulausbildung

1995 bis 2001	Studium Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
ab 1998	Dissertation, Thema: Verbesserung der endothelabhängigen koronaren Flussreserve durch selektive Inhibition der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase in endotoxämischen Rattenherzen

Berufliche Tätigkeiten

seit 2002	Arzt im Praktikum und Assistenzarzt an der Klinik Augustinum in München
-----------	---

