

# Die Bedeutung der NO-Synthasen im murinen Modell der septischen Hämodynamik

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Jan Ohlig  
aus  
Würselen

Berichter: Herr Privatdozent  
Dr. med. Marc Merx

Herr Universitätsprofessor  
Dr. med. Christian Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 1. März 2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online  
verfügbar.

*Meinen lieben Eltern*

## 1. Einleitung

1.1. Sepsis .....	- 1 -
1.1.1. Definition und Diagnosekriterien.....	- 1 -
1.1.2. Epidemiologie.....	- 4 -
1.1.3. Pathogenese und Pathophysiologie .....	- 5 -
1.2. Stickstoffmonoxid (NO) und die septische Hämodynamik.....	- 14 -
1.2.1. Synthese und Stoffwechsel von NO .....	- 14 -
1.2.2. Beeinflussung der septischen Hämodynamik durch NO .....	- 16 -
1.3. Therapie der Sepsis .....	- 22 -
1.4. Zielsetzung der Arbeit .....	- 25 -

## 2. Material und Methoden

2.2. Versuchstiere .....	- 26 -
2.3. Übersicht des Versuchsablaufes.....	- 26 -
2.3. Blutentnahmen und Applikation der NO-Synthase Inhibitoren .....	- 27 -
2.4. Sepsisinduktion durch Coecum Ligatur und Punktion (CLP) sowie Sham-Operation.....	- 28 -
2.5. Überlebenszeit septischer und nicht-septischer Versuchstiere .....	- 31 -
2.6. Invasive Druck-Volumen Messung mittels Miniaturkatheter .....	- 31 -
2.7. Verwendete Medikamente.....	- 36 -
2.8. Bestimmung der NO <sub>x</sub> -Spiegel im Plasma und im Gewebe.....	- 39 -
2.8.1. Reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz.....	- 39 -
2.8.2. Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) .....	- 41 -
2.9. Probenaufbereitung zur Bestimmung von Nitrit mittels CLD und Nitrat mittels HPLC.....	- 43 -
2.10. iNOS Expressionsbestimmung mittels quantitativer RT-PCR .....	- 44 -
2.11. Histologie .....	- 48 -
2.12. Statistische Auswertung der Messergebnisse.....	- 52 -

### **3. Ergebnisse**

- 3.1. Nachweis einer Bakteriämie durch Anlage von Blutkulturen ..... - 53 -
- 3.2. Überlebenszeit nach Sepsisinduktion..... - 53 -
- 3.3. NO<sub>x</sub>-Spiegel ..... - 55 -
  - 3.3.1. Nitrat und Nitrit Werte im Plasma ..... - 55 -
  - 3.3.2. Nitrat und Nitrit Werte im Herzgewebe ..... - 58 -
- 3.4. Invasive Druck-Volumen Messung mittels Miniaturkatheter ..... - 61 -
  - 3.4.1. Druckwerte des linken Ventrikels ..... - 61 -
  - 3.4.2. Druckwerte nach Applikation von Noradrenalin..... - 63 -
- 3.5. Histologie des Herzgewebes ..... - 67 -
- 3.6. Relative iNOS Genexpressionsraten..... - 72 -

### **4. Diskussion**

- 4.1. Sepsisinduktion durch CLP: Ein klinisch relevantes Modell ..... - 73 -
- 4.2. Neben iNOS und eNOS spielt auch die neuronale NO-Synthese  
eine bedeutende Rolle für die NO<sub>x</sub>-Spiegel während der Sepsis .... - 75 -
- 4.3. Beeinflussung der kardialen Funktion durch NO: Dosis sola facit  
venenum ..... - 78 -
- 4.4. NO als potenter Modulator der inflammatorischen Antwort ..... - 82 -
- 4.5. Sepsis führt in eNOS Knockout Mäusen nicht zu einer  
vermehrten iNOS Expression..... - 85 -
- 4.6. NOS-Inhibition: Ein geeigneter Ansatz zur Senkung der  
Mortalität septischer Patienten? ..... - 86 -

### **5. Zusammenfassung und Ausblick - 89 -**

### **6. Literaturverzeichnis - 92 -**

<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>- 118 -</b>
<b>8. Materialienliste</b>	<b>- 122 -</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>- 126 -</b>
<b>10. Erklärung zur Datenaufbewahrung</b>	<b>- 127 -</b>
<b>11. Curriculum vitae</b>	<b>- 128 -</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Sepsis

### 1.1.1. Definition und Diagnosekriterien

Sepsis ist definiert als eine systemische Reaktion des Körpers auf eine mikrobielle Infektion von normalerweise sterilen Teilen des Körpers<sup>1</sup>.

Der Begriff der Sepsis hat sich jedoch im zeitlichen Verlauf gewandelt. Zum ersten Mal wurde das Wort Sepsis von Hippokrates ca. 400 v. Chr. geprägt und leitet sich vom griechischen Wort σήπω („faul machen“) ab. Hippokrates beschrieb eine Erkrankung, die 7 Tage nach der Verwundung als Fieber beginnt, „...das verursacht wird durch eine Materie, die fault“ und häufig mit dem Tode endet.

Eine erste, heute noch weitgehend aktuelle infektiologisch-klinische Definition verfasste Schottmüller 1914, für den eine Sepsis dann vorlag, „...wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“<sup>2</sup>.

1989 prägten Bone et al. den Begriff des septischen Syndroms anhand klinischer Symptome bei Nachweis eines bakteriellen Infektionsherdes<sup>3</sup>. Es zeigte sich jedoch, dass diese, dem septischen Syndrom zugrundeliegenden klinischen Symptome auch bei Patienten ohne nachweisbaren Infektionsherd vorkommen, so zum Beispiel bei akuter Pankreatitis, Trauma oder Verbrennung<sup>4</sup>.

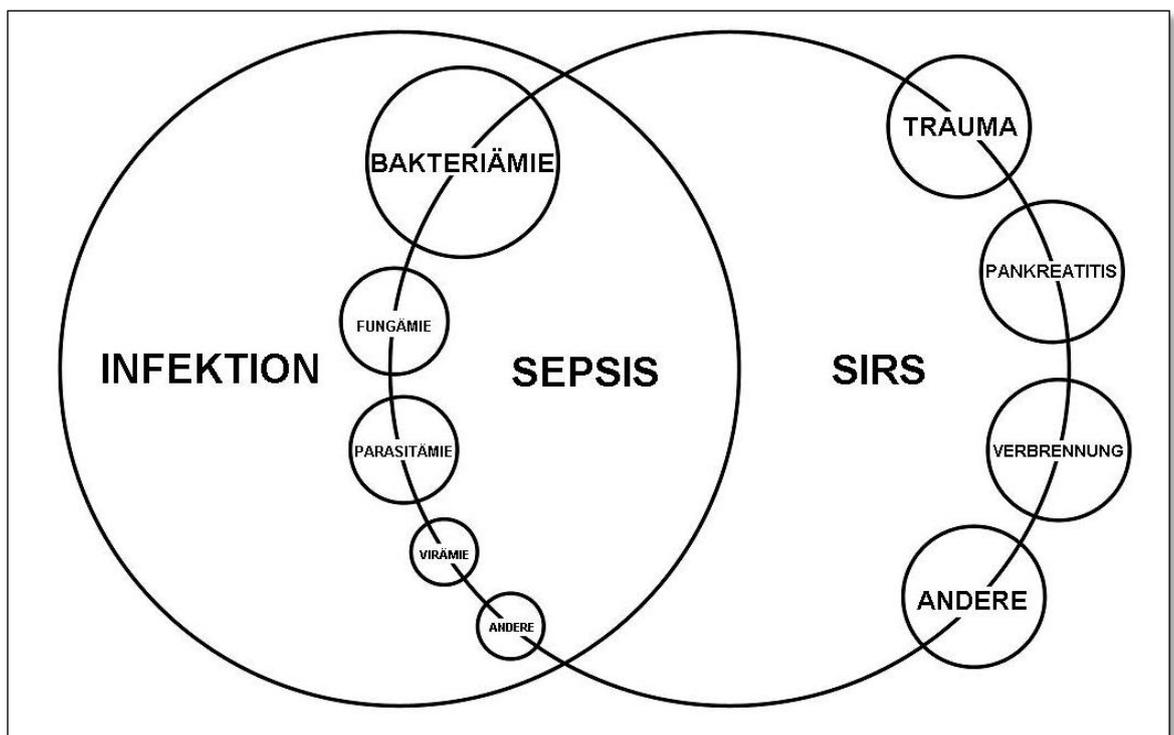
Um diese Lücke zu schließen und standardisierte Diagnostik, Behandlung und Forschung betreiben zu können, wurde im August 1991 auf der gemeinsamen Consensus Conference von ACCP (American College of Chest Physicians) und SCCM (Society of Critical Care Medicine) eine einheitliche Nomenklatur eingeführt<sup>4</sup>. Definiert wurden: Infektion, Bakteriämie, Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock (siehe Tabelle 1.1).

Im Dezember 2001 wurde die International Sepsis Definition Conference einberufen, um vor dem Hintergrund neuer diagnostischer Verfahren und

## 1. Einleitung

Marker die bestehenden Definitionen zu überarbeiten. Es wurden jedoch keine ausreichenden Evidenzen gefunden, die dies rechtfertigt hätten, jedoch das PIRO Staging System eingeführt<sup>5</sup>. Dies ermöglicht, in Analogie zum etablierten TNM System bei Tumoren, die Patienten nach **P**rädisposition (Grunderkrankung), **I**nfektion, **R**esponse (Immunantwort) und **O**rgandysfunktion zu klassifizieren um den Schweregrad der Erkrankung und das Outcome zu bestimmen.

Die Schwierigkeit einer klaren Diagnosestellung liegt im kontinuierlichen Übergang der Stadien, sowie in der hohen Heterogenität des Krankheitsbildes und der Symptome begründet. Diese werden beeinflusst von diversen Faktoren einschließlich der Art, Virulenz und Gesamtzahl des Pathogens, dessen Eintrittspforte sowie dem übrigen Zustand des Patienten<sup>1</sup>.



**Abbildung 1.1: Der Zusammenhang zwischen SIRS, Sepsis und Infektion** (modifiziert nach Bone R.C.<sup>4</sup>)

## 1. Einleitung

**Tabelle 1.1: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock** (nach Reinhart K.<sup>6</sup>)

<b>I Nachweis der Infektion</b> Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien
<b>II Severe inflammatory host response (SIRS) (mind. 2 Kriterien)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fieber (<math>\geq 38^{\circ}\text{C}</math>) oder Hypothermie (<math>\geq 36^{\circ}\text{C}</math>) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder -vesikale Messung</li><li>• Tachykardie: Herzfrequenz <math>\geq 90</math> /min</li><li>• Tachypnoe (Frequenz <math>\geq 20</math>/min) o. Hyperventilation (<math>\text{PaCO}_2 \leq 4.3 \text{ kPa} / \leq 33 \text{ mmHg}</math>)</li><li>• Leukozytose (<math>\geq 12000/\text{mm}^3</math>) oder Leukopenie (<math>\leq 4000/\text{mm}^3</math>) oder <math>\geq 10\%</math> unreife Neutrophile im Differentialblutbild</li></ul>
<b>III Akute Organdysfunktion (mind. 1 Kriterium)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium.</li><li>• Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl <math>\leq 100.000/\text{mm}^3</math>. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein.</li><li>• Arterielle Hypoxämie: <math>\text{PaO}_2 \leq 10 \text{ kPa}</math> (=75 mmHg) unter Raumluft oder ein <math>\text{PaO}_2/\text{FiO}_2</math>-Verhältnis von <math>\leq 33 \text{ kPa}</math> (<math>\leq 250 \text{ mmHg}</math>) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.</li><li>• Renale Dysfunktion: Eine Diurese von <math>\leq 0.5 \text{ ml/kg/h}</math> für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins <math>&gt; 2\text{x}</math> oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.</li><li>• Metabolische Azidose: Base Excess <math>\leq 5 \text{ mmol/l}</math> oder eine Laktatkonzentration <math>&gt; 1,5\text{x}</math> oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.</li></ul>
<b>Sepsis:</b> Kriterien I und II, <b>Schwere Sepsis:</b> Kriterien I, II und III <b>Septischer Schock:</b> Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90 \text{ mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65 \text{ mmHg}$ oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90 \text{ mmHg}$ oder den arteriellen Mitteldruck $\geq 65\text{mmHg}$ zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

Als geeigneter Biomarker für eine Sepsis hat sich, neben den allgemeinen Entzündungsparametern Leukozytenanzahl und CRP, das Procalcitonin (PCT) bewährt. Es hat die größere Spezifität und Sensitivität und hilft so zwischen Sepsis induzierter systemischer Entzündung und nicht infektiöser Entzündung zu unterscheiden. Es spiegelt die Effektivität einer Therapie zeitnah wieder und zudem hat es einen prädiktiven Wert für das Outcome der Patienten<sup>7,8</sup>.

### 1.1.2. Epidemiologie

Sepsis stellt eine der größten Herausforderungen für die moderne Medizin dar. Die Mortalitätsrate ist sehr hoch, die Inzidenz steigt weltweit an und die Kosten für das Gesundheitswesen sind immens.

Martin et al. untersuchten die Epidemiologie der Sepsis in den USA von 1979-2000. Aufgedeckt wurde ein alarmierender Anstieg der Inzidenz um durchschnittlich 8,7% jährlich von 82,7/100.000 auf 240,4/100.000 Fälle. Trotz einer Senkung der jährlichen Mortalitätsrate um 2,9% auf zuletzt 17,9% stieg die Gesamtzahl der Todesfälle von 21,9 auf 43,9/100.000 an<sup>9</sup>.

Nach einer aktuellen Studie des deutschen Kompetenznetzwerkes Sepsis (SeptNet) liegt die Inzidenz für Sepsis bei 116/100.000 erwachsenen Einwohnern der Bundesrepublik und für schwere Sepsis bei 110/100.000, was einer deutschlandweiten Prävalenz von 12,4 respektive 11% aller auf Intensivstation behandelten Patienten entspricht. Die Krankenhaussterblichkeitsrate bei schwer Sepsis inklusive septischem Schock liegt trotz fortschreitender medizinischer Entwicklung immer noch bei 55,2%<sup>10</sup>. Mit ca. 60.000 Todesfällen rangieren septische Erkrankungen damit auf Platz drei der häufigsten Todesursache in Deutschland, nach KHK und akutem Myokardinfarkt, jedoch noch vor der Herzinsuffizienz<sup>11</sup>.

Bei einer durchschnittlichen Liegezeit von 16,6 Tagen entstehen pro Patient direkte Kosten in Höhe von 23.297 Euro<sup>12</sup>. Damit belaufen sich die Gesamtaufwendungen für die intensivmedizinische Behandlung septische Patienten auf 1,77 Milliarden Euro – 30% des Budgets der Intensivmedizin<sup>11</sup>. Ergänzt man die indirekten Kosten z.B. durch Krankheitsausfall werden die jährlich durch Sepsis entstehenden Kosten für die Gesellschaft sogar auf 3,6 bis 7,8 Milliarden Euro geschätzt<sup>13</sup>.

Die demographische Entwicklung, die zunehmende Anzahl invasiver Maßnahmen, der vermehrte Gebrauch potenterer Immunsuppressiva und Chemotherapeutika, steigende Transplantationszahlen und der Anstieg resistenter mikrobieller Erreger lassen einen Rückgang der Inzidenz septischer Krankheitsbilder nicht erwarten<sup>9</sup>.

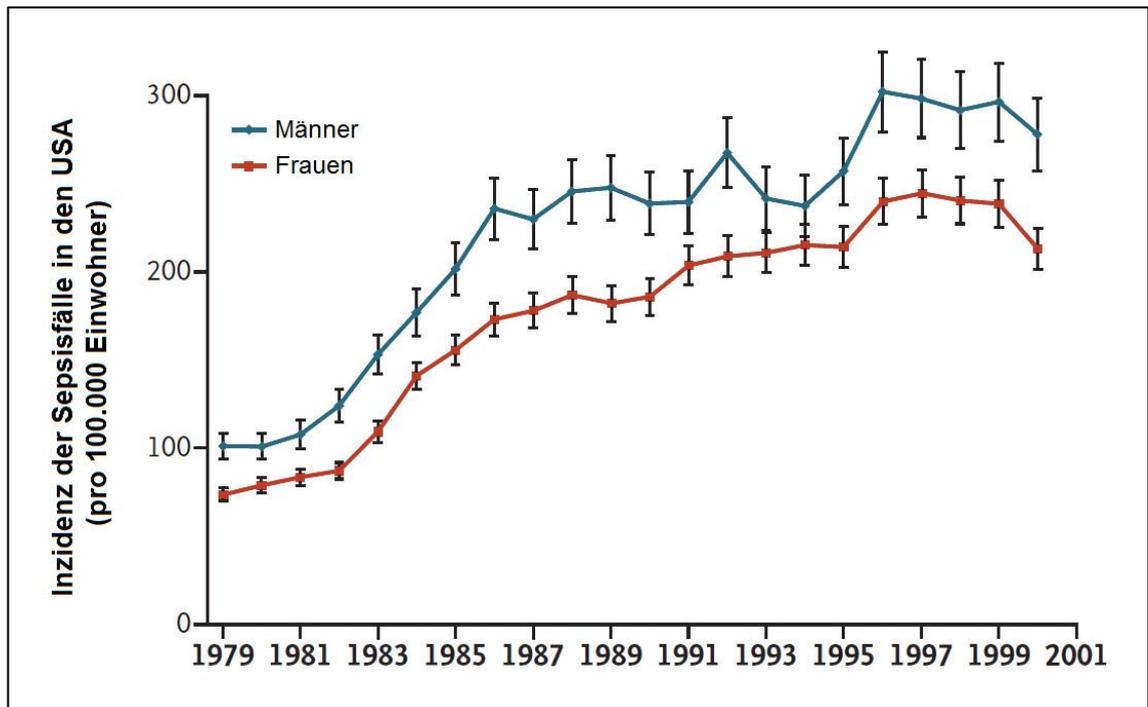


Abbildung 1.2: Inzidenz der Sepsisfälle in den USA von 1979-2000 in Abhängigkeit vom Geschlecht (modifiziert nach Martin G.S.<sup>9</sup>)

### 1.1.3. Pathogenese und Pathophysiologie

Pathogenese und Pathophysiologie der Sepsis liegen sehr komplexe Mechanismen zugrunde, die bis heute nicht vollständig geklärt sind.

Eine Sepsis entwickelt sich dann, wenn eine initial notwendige Abwehrreaktion des Körpers auf eine Infektion überschießend ausfällt und letztlich unkontrolliert abläuft<sup>14</sup>.

Dabei kommt es in der Regel im Zuge eines biphasischen Verlaufes zu einer Hyperinflammation mit anschließender Suppression des Immunsystems. Beide Phasen sind schädlich für den Organismus und verantwortlich für multiple Organschäden, die bis zum Tod führen können<sup>15</sup>.

Beteiligt an dieser Immunreaktion sind diverse humorale Systeme wie Zytokine, das Komplement- und Gerinnungssystem, sowie zelluläre Komponenten z.B. Monozyten / Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Endothelzellen.

### 1.1.3.1 Erregerspektrum

Die Hauptursache für eine Sepsis sind bakterielle Erreger, gefolgt von Pilzinfektionen und Viren.

Gram-positive Bakterien waren in den USA im Jahr 2000 für 52,1% der Infektionen verantwortlich, während Gram-negative Erreger für 37,6% der Infektionen verantwortlich waren. Mischinfektionen machten 4,7%, Pilze 4,6% der Fälle aus, bei stark zunehmender Inzidenz<sup>9</sup> (siehe Abb. 1.3). Dieser Zunahme liegt ein vermehrter Gebrauch von Breitspektrumantibiotika und Immunsuppressiva zugrunde<sup>16</sup>. Aktuelle Daten deutscher Intensivstationen von 2003 zeigen eine ausgeglichene Verteilung Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien (55,7 respektive 54,1%)<sup>10</sup>.

Die häufigste Infektionsquelle stellt der Respirationstrakt (68%) dar, gefolgt von Abdomen (22%), Blut (20%) und Urogenitaltrakt (14%). Positive Kulturen lassen sich jedoch nur bei 60% der Patienten mit dem klinischen Bild einer Sepsis nachweisen<sup>17</sup>.

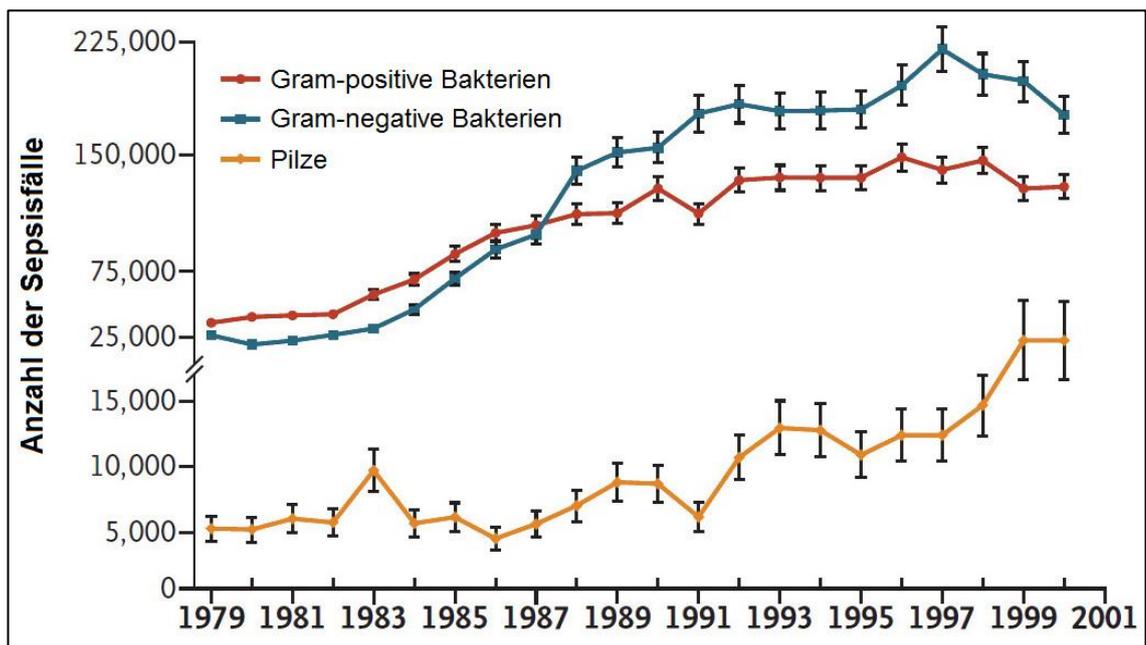


Abbildung 1.3: Erregerspektrum der Sepsis in den USA (modifiziert nach Martin G.S.<sup>9</sup>)

### 1.1.3.2. Entzündungsreaktion

Je nach Erreger und auslösendem Agens gibt es verschiedene Wege, die Entzündungskaskade zu initiieren. Diese endet jedoch stets in der Expression pro-inflammatorischer Mediatoren mit nachfolgender Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehr.

Das angeborene Immunsystem stellt den ersten Abwehrmechanismus auf eine Infektion dar und muss mit seinen leukozytären Zellen eindringende Mikroorganismen sowie deren Bestandteile erkennen und eliminieren<sup>18</sup>. Die Erkennung fremder Mikroorganismen geschieht über sogenannte „Pattern Recognition Receptors“ (PRR) an die konservierte Strukturen mikrobieller Pathogene („Pathogen Associated Molecular Patterns = PAMP) binden können<sup>14,18,19</sup>. PAMPs können z.B. Lipopolysaccharide (Endotoxin), Peptidoglycane, Lipopetide, Lipoteichonsäuren, Flagellin, Curli, Mannan und unmethylierte CpG-Sequenzen bakterieller DNA sein<sup>14,18</sup>.

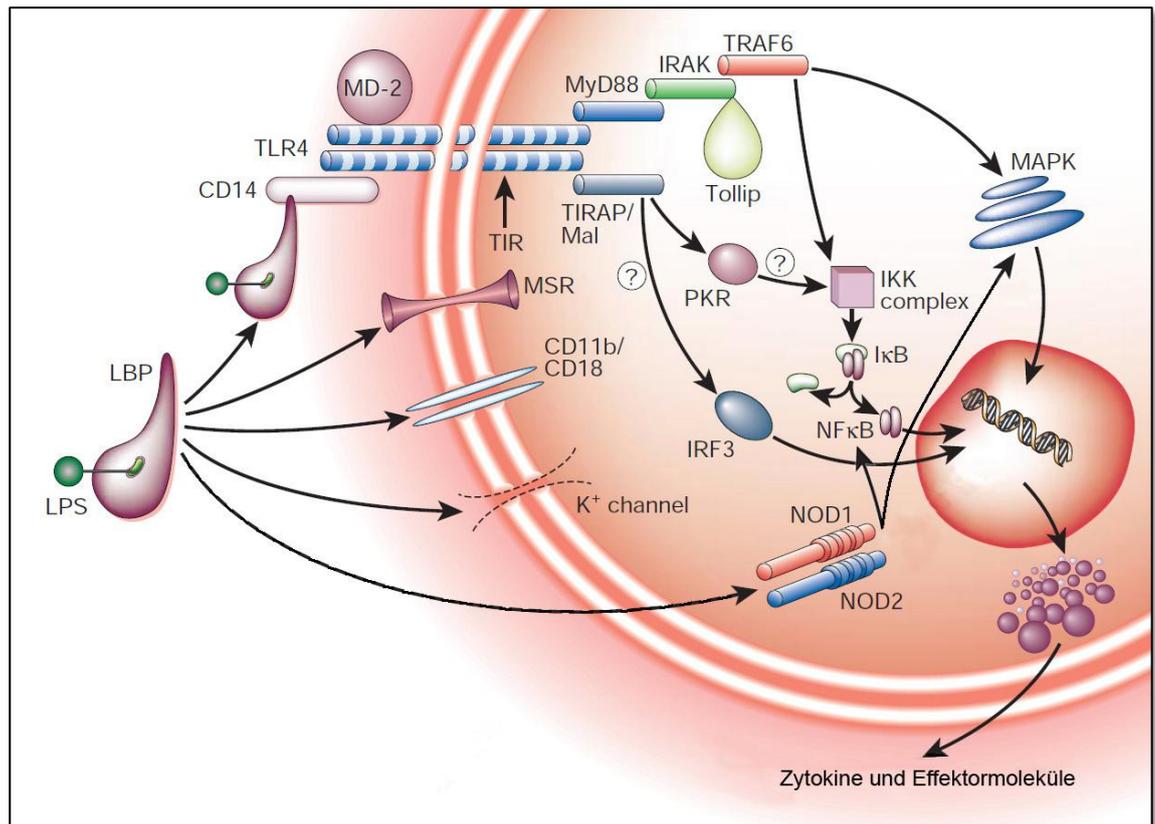
Entscheidend zur Aufklärung der Mechanismen, die hinter Erkennung fremder Mikroorganismen und Induktion der entzündlichen Signalkaskaden stehen, hat die Entdeckung der Toll-like Rezeptoren (TLR) beigetragen. Von den bisher zehn beim Menschen beschriebenen Rezeptoren sind sieben an der Erkennung von mikrobiellen Motiven beteiligt. TLR2 z.B. erkennt PAMPs auf der Zellwand Gram-positiver Bakterien, TLR4 auf der von Gram-negativen<sup>20</sup>.

#### *Gram-negative Sepsis:*

Lipopolysaccharide (LPS) sind ein wichtiger Bestandteil der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien und spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung Gram-negativer Sepsis<sup>21</sup>.

Eine Übersicht über diese Mechanismen zur Auslösung einer Gram-negativen Sepsis gibt Abbildung 1.4.

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.4: Zelloberflächenerkennung von Lipopolysacchariden (LPS)**

LPS geht einen Komplex mit LBP (LPS-binding protein) ein. Dieser bindet an CD14, welches mit einem TLR4-MD2 Komplex assoziiert ist. Den intrazellulären Signalweg vermittelt die TLR4 Domäne TIR (Toll/IL-1 receptor homology domain) über Bindung von MyD 88 und IRAK oder MyD88 unabhängig über TIRAP mit PKR und IRF3. Intrazelluläre Rezeptoren für LPS sind NOD1 und NOD2. Letztlich kommt es über NF-κB und MAPK zu einer vermehrten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Effektormolekülen.

Auch MSR (macrophage scavenger receptor), CD11b/CD18 und Ionenkanäle können LPS identifizieren (modifiziert nach Cohen J. und Park J.H.<sup>14,22</sup>)

### *Gram-positive Sepsis:*

Gram-positive Erreger können über zwei verschiedene Mechanismen eine Sepsis auslösen.

Zum einen, in Analogie zu Gram-negativen Bakterien, durch Stimulation von Immunzellen durch Zellwandbestandteile (z.B. Lipoteichonsäuren, Peptidoglycane und Lipopeptide), zum anderen durch Produktion von Exotoxinen, die als Superantigen fungieren<sup>18</sup>.

Die Immunantwort auf Zellwandbestandteile wird hauptsächlich über TLR2 vermittelt und resultiert ebenfalls in einer vermehrten NF- $\kappa$ B- und Mediatorexpression<sup>23</sup>.

Superantigene sind in der Lage an MHCII Moleküle antigenpräsentierender Zellen und die V $\beta$  Kette des T-Zell Rezeptors zu binden. Auf diese Weise aktivieren sie eine sehr große Anzahl von T-Zellen, die massive Mengen proinflammatorischer Zytokine freisetzen<sup>24</sup>.

### *Biphasischer Verlauf der Entzündung :*

Der Induktion einer generalisierten Entzündungsreaktion steht die gleichzeitige physiologische Aktivierung anti-entzündlicher Mechanismen gegenüber, um eine balancierte Immunantwort zu ermöglichen.

Im Verlauf einer septischen Erkrankung kommt es jedoch zu überhöhter Ausprägung beider Komponenten. Im Anschluss an die initiale hyperinflammatorische Phase dominiert eine Immunsuppression, bis hin zur Immunparalyse. Die richtige Balance zwischen Inflammation und Immunsuppression wirkt sich jedoch entscheidend auf die Mortalität bei Sepsis aus<sup>15,25</sup>.

Die durch externe Stimuli ausgelöste systemische Entzündungsreaktion wird getragen von Zytokinen (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, HMGB-1 und MIF) sowie von nicht-zytokinen Mediatoren (NO, PAF, Eicosanoide und Komplementfaktoren). Dem gegenüber stehen endogene antiinflammatorische Substanzen (IL-10, sTNF-R, IL-1-Ra, Prostaglandin I<sub>2</sub>, Hitzeschock-Proteine, Phosphatasen und Kortisol)<sup>23</sup>. Des Weiteren tragen eine vermehrte Apoptose von B- und CD<sub>4</sub> T-Lymphozyten und dendritischen Zellen sowie eine Anergie der T-Lymphozyten zur Schwächung der Immunabwehr bei<sup>26,27</sup>.

## 1. Einleitung

**Tabelle 1.2: Liste der Pro- und Anti-inflammatorischen Mediatoren und ihrer Wirkung**  
(modifiziert nach Jean-Baptiste E.<sup>23</sup>)

<b>Mediator</b>	<b>Effekt</b>
<b><i>Pro-Inflammatorisch</i></b>	
TNF $\alpha$	Fieber, Hypotension, Schock, Aktivierung von PMN und Endothelzellen
IL-1	Fieber, Hypotension, Müdigkeit, T-Zell und Makrophagen Aktivierung
IL-6	Akut-Phase-Proteine, T- und B-Zell Proliferation
IL-8	Chemotaxis für Neutrophile und T-Zellen
HMGB-1	Sepsis ähnliches Syndrom, Hypotension, Schock
MIF	Verstärkte TNF $\alpha$ und TLR4 Expression
NO	Relaxation glatter Muskulatur, Zytotoxisch
PAF	Histaminliberation aus Thrombozyten, Aktivierung von Endothelzellen und Thrombozyten
C3a-C5a	Histaminliberation, Erhöhte Kapillarpermeabilität, Vasodilatation
PGE2, PGI2	Vasodilatation
TXA2	Erhöhter pulmonaler Widerstand
LTC4, LTD4, LTE4	Erhöhte pulmonale Kapillarpermeabilität, Bronchospasmus
<b><i>Anti-Inflammatorisch</i></b>	
IL-10	Suppression von INF, IL-1 und Makrophagen
PGI2	Downregulation von TNF $\alpha$
sTNF-R	Blockade TNF $\alpha$ Rezeptor
IL-1-Ra	Kompetitive Hemmung der IL-1 Wirkung
Hitzeschock-Proteine	Vermehrte Expression von IK-B, Inhibition von TNF $\alpha$ und IL-1
Phosphatasen	Dephosphorylierung zytoplasmatischer Substrate, Reduktion NF-kB abhängiger TNF $\alpha$ Produktion, Deaktivierung von Leukozyten und Endothelzellen
Cortisol	Inhibition von NF-kB, Reduktion der Produktion von TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, Eicosanoiden und NO, Freisetzen von Hitzeschock-Proteinen

TNF = Tumor-Nekrose-Faktor; PMN = neutrophile Granulozyten; IL = Interleukin; HMGB-1 = high-mobility group box-1 protein; MIF = macrophage migratory inhibitory factor; TLR = Toll-like Rezeptor; NO = Stickstoffmonoxid; PAF = Plättchenaktivierender Faktor; INF = Interferon; PGI = Prostacyclin; TXA = Thromboxan; LTC, LTD, LTE = Leukotrien C,D,E; IK-B = Inhibitor von kB

### **1.1.3.3. Dysbalance der Hämostase**

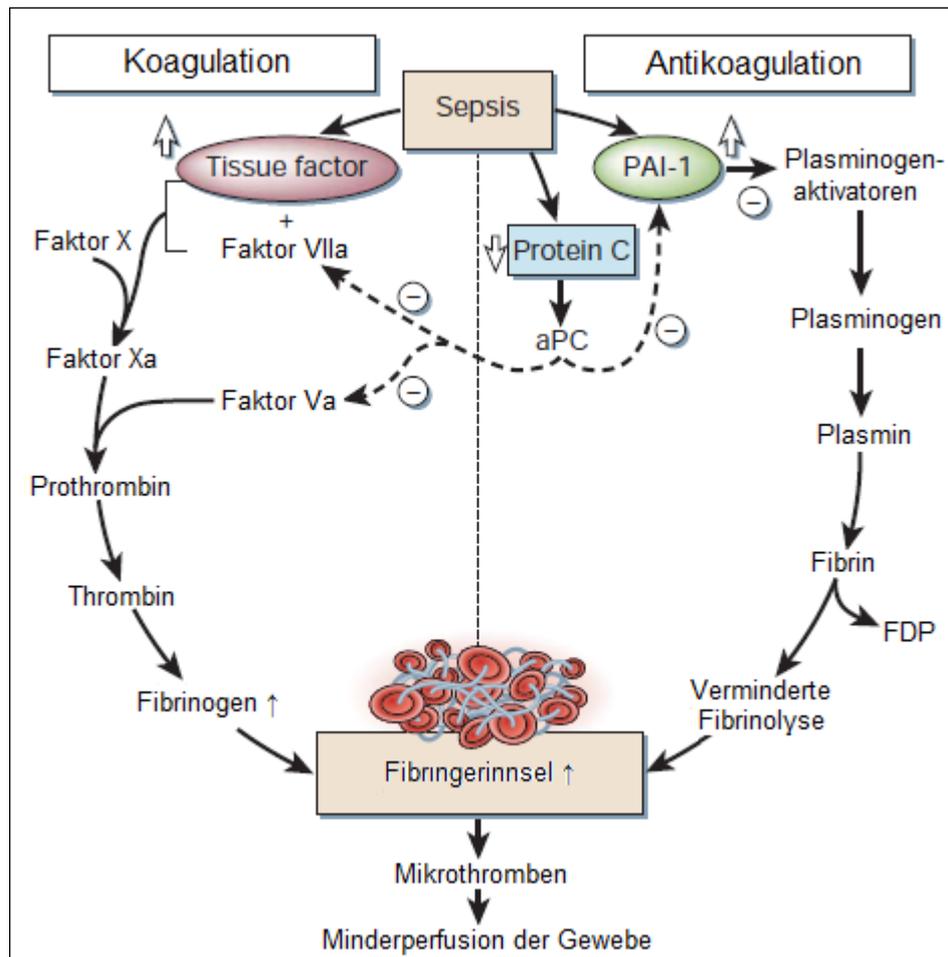
Eine der wichtigsten pathogenetischen Faktoren der Sepsis und maßgeblich am Outcome beteiligt ist die Dysbalance der Hämostase. Diese umfasst die vermehrte Aktivierung der Koagulation mit gleichzeitiger Herunterregulation des antikoagulatorischen und fibrinolytischen Systems<sup>28</sup>. Dies führt in 30 bis 50% der septischen Patienten zu der Komplikation einer disseminierten intravasalen Gerinnung, die Mikrozirkulationsstörungen bis hin zum multiplen Organversagen hervorrufen kann<sup>29,30</sup>.

Diese Dysbalance wird durch pro-inflammatorische Zytokine ausgelöst, hauptsächlich durch IL-1 und IL-6.

Eine zentrale Rolle spielt hierbei die vermehrte Expression von Gewebethromboplastin (Tissue factor = TF) auf Monozyten und Endothelzellen, ausgelöst durch LPS und die meisten inflammatorischen Zytokine. TF aktiviert eine Serie proteolytischer Kaskaden in deren Zuge es letztendlich zur Bildung von Fibrin kommt. Dazu steigt die Konzentration von Plasminogen-activator inhibitor type-1 (PAI-1) an, der die Spaltung von Plasminogen in das fibrinolytisch wirksame Plasmin verhindert<sup>31</sup>.

Parallel dazu sinken die Plasmalevel der natürlichen Gerinnungshemmer Antithrombin III, Protein C und des Tissue factor pathway inhibitors (TFPI). Die Folge ist eine verminderte Hemmung von PAI-1, Thrombin sowie den Faktoren VIIIa, Va und Xa (*Siehe Abbildung 1.5*).

Weiterhin führt die Entzündung zu einer Aktivierung von Thrombozyten, deren nun negativ geladene Zelloberfläche ebenfalls prokoagulatorisch wirkt<sup>28</sup>.



**Abbildung 1.5: Dysbalance des Gerinnungssystems**

Nicht dargestellt ist die Hemmung der Umwandlung von Faktor X in Xa durch TFPI und die Hemmung von Thrombin sowie den Faktoren VIIa und Xa durch Antithrombin III (modifiziert nach Cohen J.<sup>14</sup>)

#### 1.1.3.4. Organdysfunktionen

Das Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) ist der häufigste Grund für sepsisbedingte Mortalität<sup>32</sup>.

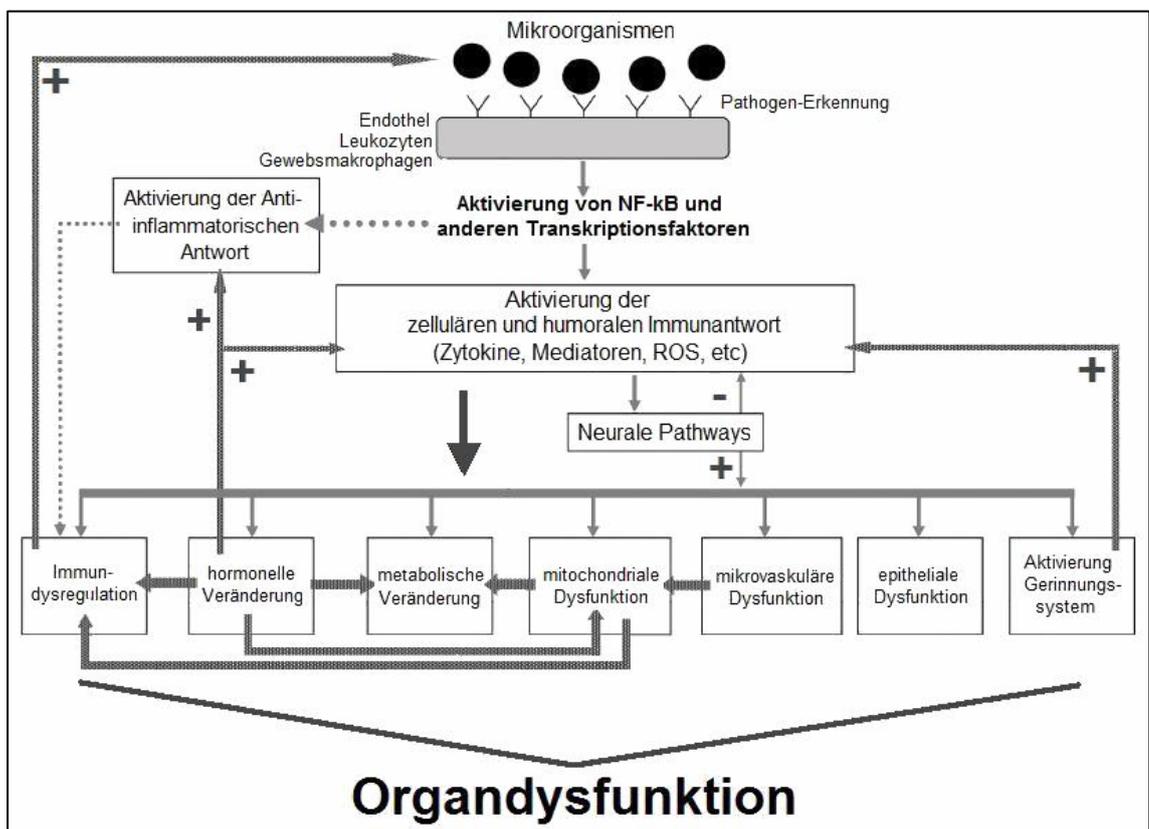
Das aktuelle Verständnis der Pathophysiologie des Sepsis-assoziierten MODS zeigt, dass an diesem komplexen Geschehen multiple Zellpopulationen, Mediatoren und Signalwege beteiligt sind. Zudem ist die Palette der potentiell betroffenen Organe sehr groß. Die genauen Mechanismen, durch welche eine Sepsis multiple Organdysfunktionen auslöst, bleiben weiterhin unklar<sup>33</sup>.

So kommt es durch die oben beschriebenen Dysregulationen der Immunantwort und des Gerinnungssystems über diverse Mediatoren zu Störungen der kardialen und vaskulären Funktion mit Mikro- und Makrozirkulationsstörungen,

## 1. Einleitung

zu metabolischen Veränderungen wie Hyperglykämie, mitochondrialer Dysfunktion mit zellulärer Hypoxie und epithelialer Dysfunktion mit Verlust der zellulären Barrierefunktion<sup>32,33</sup>. Hinzu kommt die direkte Toxizität der bakteriellen Toxine auf die parenchymatösen Organe<sup>34</sup> und eine Dysregulation der Apoptose mit vermehrtem Zelltod in wichtigen Organen<sup>35</sup>. Betroffen sind neben anderen Organen z.B. die Lunge (bis hin zum ARDS), Nieren (Nierenversagen), Gehirn (Enzephalopathie) oder die Leber (Ischämische Hepatitis).

Abbildung 1.6 gibt eine Übersicht über die Mechanismen, welche zur Organdysfunktion im Zuge einer Sepsis führen können.



**Abbildung 1.6: Systemische Signalwege, welche zur Organdysfunktion bei Sepsis führen können** (modifiziert nach Abraham E. und Singer M.<sup>33</sup>)

ROS=Reaktive-Sauerstoff-Spezies

Ein zentraler Mechanismus und Gegenstand dieser Arbeit ist die Beeinflussung der kardiovaskulären Funktion, auf welche im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

### 1.2. Stickstoffmonoxid (NO) und die septische Hämodynamik

#### 1.2.1. Synthese und Stoffwechsel von NO

Bereits im Jahr 1980 stellte Robert F. Furchgott fest, dass Acetylcholin nur dann relaxierend auf das isolierte Präparat einer Hasenaorta wirkt, wenn dieses eine intakte Endothelschicht aufweist<sup>36</sup>. So kam die Vermutung auf, dass das Endothel, durch Acetylcholin induziert einen vasorelaxierenden Faktor freisetzt, der zunächst als EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor) bezeichnet wurde.

Später wurde durch Ferid Murad gezeigt, dass EDRF die gleiche cGMP abhängige Signalkaskade initiiert wie NO und letztendlich von Robert F. Furchgott und Luis J. Ignarro nachgewiesen, dass EDRF tatsächlich dem Stickstoffmonoxid (NO) entspricht<sup>37-39</sup>. „Für ihre Arbeiten über die Rolle von Stickstoffmonoxid als Botenstoff im Herz-Kreislaufsystem“ wurden diese drei Wissenschaftler 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Alfred Nobel selbst wurde jedoch bereits weit früher, kurz vor seinem Tode 1896, mit dem NO-Donor Glyceroltrinitrat gegen seine Angina Pectoris behandelt.

Die Bildung von NO wird durch unterschiedliche Isoformen der NO-Synthasen (NOS) katalysiert, welche L-Arginin zu L-Citrullin und NO umwandeln.

Kofaktoren für die NO-Synthese sind Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), Flavin-Adenosin-Dinucleotid, Flavin-Mononucleotid und molekularer Sauerstoff (O<sub>2</sub>)<sup>40</sup>. Die NO-Synthasen sind Dimere, welche eine Oxygenase- und eine Reduktase-Domäne besitzen. NADPH bindet an die Reduktase-Domäne und gibt ein Elektron ab. Dieses wiederum wird mittels der Redox-Carrier Flavin-Adenosin-Dinucleotid und Flavin-Mononucleotid in Richtung der Oxygenase-Domäne transportiert und gelangt nach Interaktion mit BH<sub>4</sub> und Häm zur aktiven Seite des Enzyms. An der Oxygenase-Domäne läuft dann die Reaktion von L-Arginin und Sauerstoff zu L-Citrullin und NO ab<sup>41</sup>.

Die Isoformen werden in konstitutive (cNOS) und induzierbare (iNOS oder NOS-2) NO-Synthasen unterteilt. Die cNOS sind membranständig, während die iNOS im Zytosol lokalisiert ist. Die cNOS sind Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin abhängig, die

iNOS arbeitet  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin unabhängig und deren Expression kann im Rahmen inflammatorischer Prozesse akut gesteigert werden<sup>42,43</sup>.

Bei den cNOS wird unterschieden in eine neuronale NOS (nNOS oder NOS-1), die vorwiegend durch Neurone exprimiert wird und eine endotheliale NOS (eNOS oder NOS-3), die sich hauptsächlich in Endothelzellen wiederfindet und maßgeblich für die physiologische Hämodynamik verantwortlich ist<sup>44</sup>. eNOS und nNOS werden jedoch auch beide, in unterschiedlicher zellulärer Lokalisation, in Kardiomyozyten exprimiert.

Kürzlich wurden zudem eine Variante der nNOS in Form der mitochondrialen NOS (mtNOS)<sup>45</sup> und eine der eNOS in Form der erythrozytären NOS (RBC-NOS) entdeckt<sup>46</sup>. Die Induktion der mtNOS, welche eine Rolle in der Regulation von ATP-Synthese und  $\text{O}_2$ -Verbrauch spielt, könnte zur mitochondrialen Dysfunktion im Zuge einer Sepsis beitragen<sup>47</sup>.

NO ist ein farbloses Gas, das wasserlöslich ist und frei über Zellmembranen diffundieren kann. Auf Grund seines ungepaarten Elektrons ist es ein Radikal mit hoher Reaktivität und geringer Stabilität. In Wasser, Ultrafiltrat und Plasma wird NO vor allem zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) oxidiert, welches für mehrere Stunden stabil ist. In Vollblut, d.h. in Anwesenheit von oxygeniertem Hämoglobin (oxyHb) hat NO eine extrem kurze Halbwertszeit von weniger als einer Sekunde. Es reagiert mit oxyHb zu Methämoglobin (metHb) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) und auch Nitrit (HWZ: 110s) wird zügig zu Nitrat umgewandelt. Nitrat stellt somit mit einer HWZ von 8 Stunden ein stabiles Endprodukt des NO-Metabolismus in vivo dar und weist mit ca. 30-60 $\mu\text{M}$  im Vollblut eine etwa 100 bis 200-mal höhere Konzentration auf als Nitrit<sup>48</sup>.

Nitrit und Nitrat sind also Stoffwechselprodukte um NO in Blut und Gewebe zu stabilisieren und können als Marker für die zirkulierende NO Menge dienen.

Sie können jedoch über diverse enzymatische und nicht enzymatische Reaktionen auch wieder zu NO reduziert werden. Da dies im Gegensatz zum L-Arginin-NOS-Weg Sauerstoff unabhängig funktioniert, kann der Nitrat-Nitrit-NO-Weg als Backup-System zur NO Produktion unter sauerstoffarmen Bedingungen angesehen werden<sup>49</sup>.

NO kann des Weiteren mit Sauerstoff zu Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ ) und Stickstofftrioxid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) reagieren, welche wiederum zu Nitrit und Nitrat

hydrolysieren oder mit Thiolen (RSH) zu Nitrosothiolen (RSNO) und mit Aminen (RNH) zu Nitrosaminen (RNNO) reagieren können<sup>50</sup>.

Bei hohem oxidativem Stress gewinnt auch die Reaktion von NO mit Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) zum stark zytotoxischen Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) an Bedeutung<sup>51</sup>.

### 1.2.2. Beeinflussung der septischen Hämodynamik durch NO

Die septische Hämodynamik ist gekennzeichnet durch zwei unterschiedliche Phasen.

Zunächst kommt es zu einer hyperdynamen Kreislaufsituation, welche durch Tachykardie, erhöhten Cardiac Index (CI) und erniedrigten peripheren Gefäßwiderstand (SVR) gekennzeichnet ist. Es kommt zu einer Hypotonie, welche für endo- und exogene Katecholamine weitgehend refraktär ist.

Im weiteren Verlauf der Sepsis nimmt das Initial hohe Herzzeitvolumen bei unverändert niedrigem SVR ab, und es resultiert der hämodynamische Schock. Die septische Hämodynamik wird also dominiert von einer generalisierten Vasodilatation zum einen und der septischen Kardiomyopathie zum anderen. In beiden Fällen spielt Stickstoffmonoxid eine entscheidende Rolle<sup>52</sup>.

#### *Vasodilatation:*

Für die katecholaminrefraktäre Hypotension bei generalisierter Vasodilatation spielt NO eine prominente Rolle. Vermittelt wird dies im Wesentlichen über eine Induktion der löslichen Guanylatcyclase (sGC) einerseits und eine Aktivierung von vaskulären Kaliumkanälen andererseits.

Unter physiologischen Bedingungen diffundiert das von Endothelzellen gebildete NO in die benachbarten glatten Muskelzellen und aktiviert dort die sGC. Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) wird gebildet, welches über eine Aktivierung der Proteinkinase-G zu einer Reduktion der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration und somit zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt<sup>53</sup>.

Kaliumkanäle regulieren das Membranpotential glatter Gefäßmuskelzellen. Durch Aktivierung kommt es zu einem Kaliumausstrom mit Hyperpolarisation. Dies wiederum führt zum Schließen von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$  Kanälen,

was eine Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$  Einstroms mit konsekutiver Vasodilatation nach sich zieht<sup>54</sup>.

Kaliumkanäle können im Zuge einer Sepsis entweder über cGMP oder direkt über NO aktiviert werden. Hauptsächlich verantwortlich für die septische Vasoplegie sind die kalziumaktivierten Kaliumkanäle<sup>55</sup>.

Im Rahmen der Sepsis kann durch Endotoxin und die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie durch IFN- $\gamma$  die NO-Synthase Aktivität massiv gesteigert werden, was nachfolgend zu einer Generierung großer Mengen von NO und ausgeprägter Vasodilatation führt<sup>44</sup>.

Das verminderte Ansprechen der Adrenorezeptoren auf endo- und exogene Katecholamine trägt weiter zur Abnahme des SVR im septischen Schock bei.

### *Kardiomyopathie:*

Die septische Kardiomyopathie ist gekennzeichnet durch eine biventrikuläre Abnahme der systolischen und diastolischen Funktion. Es kommt als Zeichen der reduzierten Kontraktilität zur Abnahme des Schlagvolumens und im Zuge einer verminderten Compliance zu einer Zunahme des enddiastolischen Volumens. Es resultiert eine starke Abnahme der Ejektionsfraktion bis hin zum kardiogenen Schock<sup>56</sup>.

Diese Kardiomyopathie ist eng assoziiert mit einer erhöhten Mortalitätsrate. So steigt diese bei septischen Patienten auf 70-90% an, sofern eine kardiovaskuläre Dysfunktion vorliegt, im Gegensatz zu 20% wenn diese nicht auftritt<sup>57</sup>.

Obwohl für eine große Anzahl von Mediatoren und Signalwegen die Assoziation mit der septischen Kardiomyopathie belegt werden konnte, (eine Übersicht gibt Abbildung 1.7.) ist der exakte Mechanismus bis heute unklar.

## 1. Einleitung

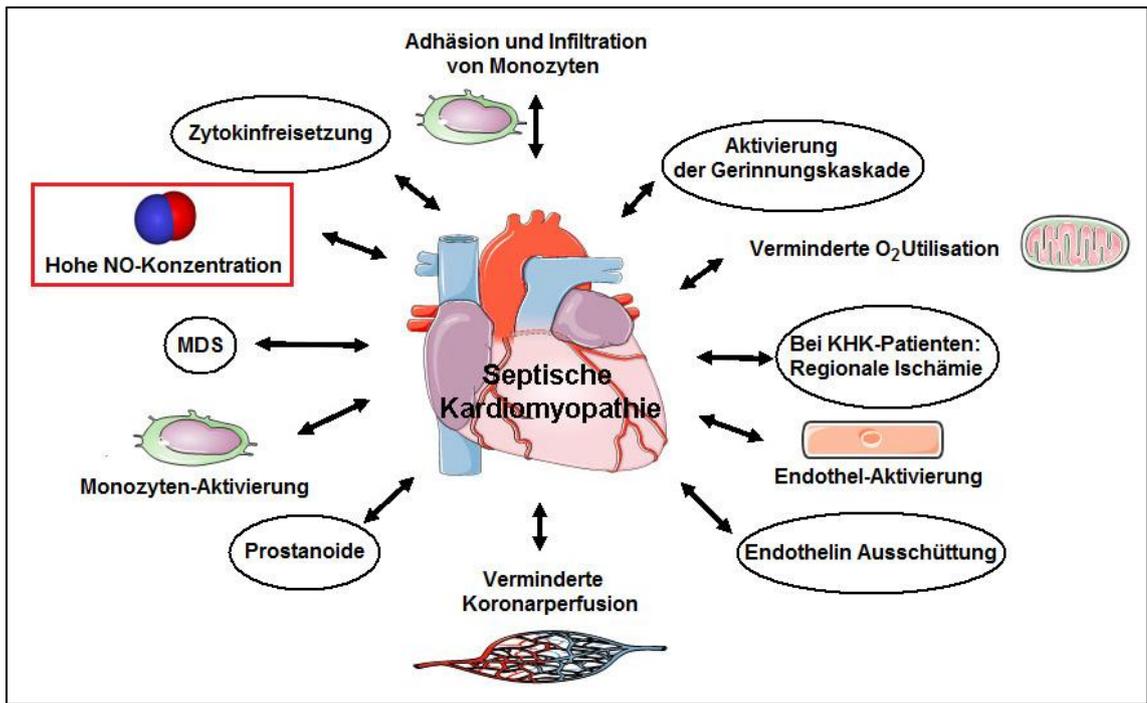


Abbildung 1.7: Mögliche zugrunde liegende Mechanismen der septischen Kardiomyopathie (modifiziert nach Merx M.W.<sup>56</sup>)

MDS=myocardial depressant substance

Stickstoffmonoxid spielt hier eine entscheidende Rolle und gilt als einer der Hauptmediatoren für das kardiozirkulatorische Versagen im Rahmen der Sepsis<sup>52</sup>.

Bemerkenswerterweise hat NO unter physiologischen und pathologischen Bedingungen konträren Einfluss auf die kardiale Funktion.

So sind niedrige Dosen NO in der Lage bei gesunden Probanden die LV-Funktion zu steigern, wohingegen eine Infusion mit dem globalen NOS-Hemmer N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) zu einer Reduktion des CI führt<sup>58</sup>. Kelm et al. konnten zudem zeigen, dass hohe Dosen NO in der Lage sind, die kontraktile Funktion der Herzens zu verschlechtern<sup>59</sup>.

Die Mechanismen, welche der Beeinflussung der myokardialen Funktion durch NO zugrunde liegen sind zahlreich.

Als negative NO Wirkung tragen zur Myokarddepression folgende Faktoren bei:

- Vermehrte cGMP-Bildung in Kardiomyozyten, dadurch reduzierter  $\beta$ -adrenerg vermitteltem Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration und reduzierte Affinität der Myofilamente gegenüber Kalzium<sup>60</sup>.

## 1. Einleitung

---

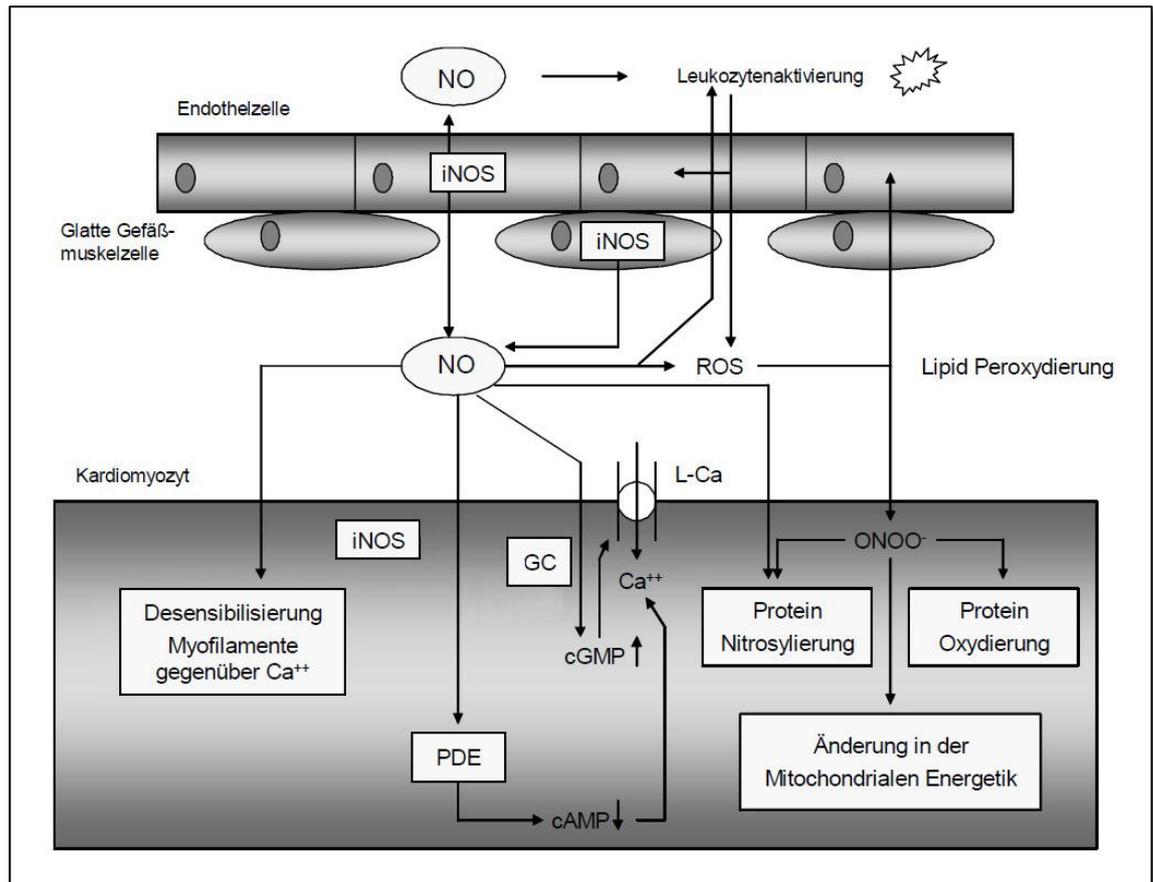
- Absinken der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch vermehrten cAMP Abbau mittels Induktion der Phosphodiesterase<sup>61</sup> sowie direkter Beeinflussung der Proteinkinase-G und des L-Typ Kalzium Kanals<sup>62</sup>.
- Hemmung der mitochondrialen Funktion und damit der ATP Produktion, (zudem strenge Assoziation zur Schwere des septischen Schocks)<sup>59,63</sup>.
- Zellulärer Schaden durch hohe Dosen NO, welches mit reaktiven Sauerstoffspezies zum toxischen Radikal Peroxynitrit reagiert<sup>64</sup>.
- Durch Peroxynitrit kommt es zudem zu einer sogenannten Entkopplung der endothelialen NO-Synthase, sodass diese selbst zytotoxische Superoxid-Anionen produziert<sup>65,66</sup>.
- Bei hoher NO Konzentration Triggerung von Apoptose myokardialer Zellen und somit Funktionsverlust des Arbeitsmyokards<sup>67,68</sup>.

Demgegenüber stehen jedoch die kardioprotektiven Eigenschaften des NOs:

- Direkte Aktivierung der Adenylatcyclase mit konsekutivem Anstieg von cAMP und dadurch vermehrtem  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in die Kardiomyozyten<sup>69</sup>.
- Die vasodilatatorischen Effekte von NO führen in septischen Patienten zu einem normalen oder sogar erhöhten Koronarfluss<sup>70</sup> und wirken den vasokonstriktorischen Effekten anderer Substanzen wie Endothelin entgegen, welche im Rahmen der Entzündungsreaktion ebenfalls ausgeschüttet werden<sup>71</sup>.
- Stickstoffmonoxid weist ein antiarrhythmisches Potential auf<sup>72</sup>.
- NO ist in der Lage, die Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin, VCAM-1 sowie ICAM-1 nach unten zu regulieren und so die Adhäsion und Migration von Entzündungszellen ins Herzmuskelgewebe zu hemmen<sup>73,74</sup>. Der frühzeitigen Aktivierung und Infiltration inflammatorischer Zellen in das Herzmuskelgewebe wird jedoch ein bedeutender Anteil an der kardialen Dysfunktion während der Sepsis zugesprochen<sup>75</sup>.

Eine Übersicht über die cGMP-abhängigen und unabhängigen zellulären Wirkmechanismen von NO auf die kardiale Funktion gibt Abbildung 1.8.

# 1. Einleitung



**Abbildung 1.8: Modulation der kardialen Funktion durch Stickstoffmonoxid** (modifiziert nach Price S.<sup>76</sup>)

NO=Stickstoffmonoxid; ONOO<sup>-</sup>=Peroxynitrit; GC=lösliche Guanylatzyklase;

PDE=Phosphodiesterase; ROS=Reaktive-Sauerstoff-Spezies; cAMP=zyklisches AMP; cGMP=zyklisches GMP

Durch zahlreiche Studien ist belegt, dass die NO Konzentration während klinischer und experimenteller Sepsis stark ansteigt<sup>77,78</sup>.

Welche Isoform der NO-Synthasen und in welchem Maße diese jeweils für den Anstieg der NO-Konzentration und die kardiovaskuläre Dysfunktion verantwortlich zeichnet, ist bisher jedoch nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert.

Die Induktion von Expression und Aktivität der iNOS mit nachfolgendem Anstieg der NO-Spiegel und Beeinträchtigung der myokardialen Funktion ist in zahlreichen Studien bereits belegt<sup>44,79</sup>.

Die Rolle der eNOS hingegen ist, aufgrund von teils diametralen Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen, weniger eindeutig.

So sprechen neuere Arbeiten von Connelly et al. sowie Pa et al. der eNOS eine entscheidende pro-inflammatorische Rolle in der Frühphase der Sepsis zu. Sie wiesen zudem in Versuchen mit eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen eine eNOS vermittelte Induktion der iNOS Aktivität nach<sup>80,81</sup>.

Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass eine eNOS Überexpression in der Lage ist, septische Mäuse vor myokardialer Dysfunktion zu schützen und deren Mortalitätsrate zu senken<sup>82,83</sup>.

Ebenso bleiben besonders Untersuchungen, welche die Bedeutung der nNOS für die septische Hämodynamik betreffen in der Literatur bisher unterrepräsentiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen zudem eine unterschätzte Wirkung der nNOS für die kardiale Funktion im Rahmen der Sepsis nach.

### 1.3. Therapie der Sepsis

Trotz zunehmendem Erkenntnisgewinn über die Pathophysiologie der Sepsis ist deren Therapie schwierig und ungeachtet aller modernen Maßnahmen sind Morbidität und Mortalität weiterhin sehr hoch (*siehe 1.1.2*).

Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie ist, ähnlich wie bei akutem Myokardinfarkt oder Schlaganfall die Zeit bis zur Diagnosestellung und Beginn einer adäquaten intensivmedizinischen Therapie<sup>84</sup>.

Die Therapie der Sepsis lässt sich allgemein unterteilen in eine kausale-, eine supportive- und in die adjunktive Therapie.

Die *kausale Therapie* beinhaltet die vollständige Fokussanierung, als Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Therapie durch chirurgische Maßnahmen und/oder eine rasche Antibiotikagabe.

Die frühzeitige, intravenöse, kalkulierte Antibiotikatherapie reduziert die Letalität septischer Patienten signifikant<sup>85,86</sup>. Die kalkulierte antibiotische Therapie sollte so früh wie möglich von einer spezifischen Therapie nach Antibiogramm abgelöst werden.

Die *supportive Therapie* umfasst die Unterstützung gestörter Organfunktionen mit dem primären Ziel der hämodynamische Stabilisierung zum Erreichen eines adäquaten zellulären O<sub>2</sub>-Angebotes.

Die erste Maßnahme stellt hier die aggressive Volumensubstitution dar, um einen suffizienten venösen Rückstrom, kardiale Vorlast und ein adäquates Herzzeitvolumen zu erzielen<sup>6,84</sup>.

Besteht trotz Volumentherapie ein eingeschränktes Herzzeitvolumen, so ist Dobutamin als positiv inotropes Katecholamin Medikament der ersten Wahl. Hypotensive Patienten sollten zusätzlich Noradrenalin als Vasopressor erhalten, um den reduzierten systemischen Gefäßwiderstand zu erhöhen.

Die Indikation zu weiterer supportiver Therapie wie Intubation und Beatmung oder Nierenersatzverfahren bei akutem Nierenversagen sollte großzügig gestellt werden<sup>6</sup>.

Unter den *adjunktiven Therapien* versteht man die Behandlung gemeinsam mit und zusätzlich zur Standardtherapie.

Im Zuge des besseren Verständnisses der Pathophysiologie sind zahlreiche Studien zur Therapie durch Beeinflussung diverser Mediatoren durchgeführt worden. Dazu gehören zum Beispiel HMGB-1, MIF, C5a und Caspasen<sup>87</sup>. Im Folgenden soll nur auf die Therapiemöglichkeiten eingegangen werden, die Einzug in die aktuellen Leitlinien und den klinischen Alltag gehalten haben.

Annane et al. konnten in einer 2002 veröffentlichten Studie einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten im septischen Schock zeigen, wenn diese 7 Tage lang mit Hydrokortison (50mg i.v., viermal täglich) oder Fludrokortison (50mg i.v., einmal täglich) behandelt wurden<sup>88</sup>. Daher empfehlen die aktuellen Leitlinien eine Gabe von 200-300mg/Tag Hydrokortison über 24 Stunden, wenn Patienten im septischen Schock trotz ausreichender Volumentherapie Vasopressoren erhalten, um einen adäquaten Blutdruck aufrecht zu erhalten<sup>6</sup>.

Des Weiteren ist rekombinantes aktiviertes Protein C (rhAPC) bei Patienten mit hohem Mortalitätsrisiko indiziert. Es hat antithrombotische, antiinflammatorische und profibrinolytische Wirkung und Bernard et al. konnten 2001 in einer randomisierten Placebo-kontrollierten, doppelblinden Multicenterstudie eine Reduktion des absoluten Mortalitätsrisikos um 6,1% für Patienten mit schwerer Sepsis belegen. Das Blutungsrisiko stieg jedoch von 2% auf 3,5% an<sup>89</sup> und somit ist die Indikation zur Gabe von rhAPC auf Patienten mit schwerer Sepsis und Versagen von mindestens 2 Organen bzw. einem APACHE-II-Score von > 25 beschränkt<sup>6</sup>.

Wie bereits unter 1.2.2. beschrieben wird NO als ein Hauptmediator der septischen Hämodynamik angesehen. Daher scheint die NOS-Inhibition als adjunktive Therapie vielversprechend zu sein.

Tatsächlich gibt es zahlreiche präklinische und einige klinische Studien über den Einfluss von selektiven und unselektiven NOS-Inhibitoren auf die septische Kreislaufkrankung mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

So konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Kontraktilität von isolierten Kardiomyozyten, welche mit Serum von septischen Patienten inkubiert wurden durch den unselektiven NOS-Blocker N<sup>G</sup>-Methyl-L-Argininhydrochlorid (L-NMMA) aufgehoben werden konnte<sup>90</sup>.

Dagegen zeigten andere Studien an Hunden und Schweinen, dass die Applikation unselektiver Blocker wie L-NMMA und L-N- $\omega$ -Amino-Arginin (L-

NAA) zwar zu einer Verbesserung des systemischen Gefäßwiderstandes und des arteriellen Mitteldruckes führt, aber gleichzeitig eine Senkung der Herzfrequenz, des Herzzeitvolumens und des femoroarteriellen Blutflusses verursacht. Zudem kommt es zu keiner Verbesserung der systemischen Sauerstoffaufnahme und einer insgesamt erhöhten Mortalitätsrate<sup>58,91-93</sup>.

Eine große randomisierte, Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie über die L-NMMA Wirkung bei Menschen im septischen Schock zeigte eine Reduktion der Schocksymptomatik und einen erhöhten systemischen Widerstand, jedoch ebenfalls eine Reduktion des Herzzeitindex und der Sauerstoffversorgung. Dazu trat gehäuft eine pulmonalarterielle Hypertonie auf<sup>94</sup>. Die Phase III Studie wurde wegen einer 10% höheren Mortalitätsrate in der Verum-Gruppe mit einer Häufung kardiovaskulärer Todesfälle abgebrochen<sup>95</sup>.

Die unbefriedigenden Ergebnisse der unselektiven NOS-Hemmung führen zu der Idee einer hoch selektiven Blockade einzelner NOS-Isotypen.

So existieren Hinweise, dass die selektive Hemmung der iNOS überzeugendere Ergebnisse liefern könnte. Matejovic et al. konnten an septischen Schweinen demonstrieren, dass N-(3-(Aminomethyl)Benzyl)Azetamidin (1400W) und L-N6(1-Iminoethyl)-Lysin (L-NIL) sich auch positiv auf die Hypotension und den Gefäßwiderstand auswirkten, jedoch ohne eine myokardiale Depression zu verursachen<sup>96,97</sup>.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen indes eine positive Wirkung der selektiven iNOS Blockade durch 1400W auf die kardiale Funktion und das Überleben septischer Mäuse.

Insgesamt sind die Ergebnisse, die Behandlung der septischen Kreislaufkrankung mittels NOS-Inhibitoren betreffend, noch sehr variabel und speziell im klinischen Setting sehr ernüchternd.

Da der Einfluss der jeweiligen NO-Synthasen auf die septische Hämodynamik und die Mortalität jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte (siehe 1.2.2.) fehlt hier eine verlässliche Grundlage, auf der eine Therapie mittels selektiver NOS Hemmung basieren könnte.

Zudem weisen die einzelnen Studien eine große Variabilität auf, was die Art der Versuchstiere, des eingesetzten Sepsismodells, des Blockers sowie dessen Dosierung und die sonstige Therapie betrifft.

### 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Sepsis ist eine medizinisch und volkswirtschaftlich äußerst relevante Erkrankung mit steigender Inzidenz. Trotz aller Fortschritte der modernen Intensivmedizin und neuer Therapieansätze bleibt die Mortalitätsrate der Sepsis und des septischen Schocks auffallend hoch.

Einen großen Anteil daran hat die kardiovaskuläre Dysfunktion, welche auf einer katecholaminresistenten Vasodilatation und der septischen Kardiomyopathie basiert.

Für eben diese Dysfunktion spielt Stickstoffmonoxid, welches im Rahmen einer Sepsis vermehrt gebildet wird, über diverse Mechanismen eine zentrale Rolle. Welche NO-Synthase, in welchem Maße für die gesteigerten NO-Spiegel verantwortlich ist, bleibt bis heute unklar.

Aus diesem Grund fehlte bisher auch eine solide Basis, um die NO-Synthasen als Therapieziel einzubeziehen, was zu den desillusionierenden Resultaten präklinischer und klinischer Studien führte.

Daher liegen der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen zugrunde:

- Wie wirkt sich in einem murinen Modell die Sepsis auf NO-Spiegel, kardiozirkulatorische Funktion, Inflammation, iNOS Expression und Überleben aus?
- Welche NO-Synthase ist für den NO-Anstieg während einer Sepsis verantwortlich?
- Welche Bedeutung haben die einzelnen NO-Synthasen für die kardiozirkulatorische Funktion, die Entzündungsreaktion sowie die Überlebensrate septischer Mäuse?

## 2. Material und Methoden

### 2.2. Versuchstiere

Verwendet wurden männliche C57-Black6 Wildtyp-Mäuse sowie eNOS Doppelknockout-Mäuse (eNOS<sup>-/-</sup>)<sup>98</sup> mit einem Körpergewicht von 25-35 Gramm und einem Mindestalter von sechs Wochen. Unterbringung und Pflege sowie Räumlichkeiten und Personal stellte das Institut für Versuchstierkunde der RWTH-Aachen zur Verfügung.

Für die medizinische Versorgung war der Versuchsleiter mit Unterstützung von Veterinärmedizinern des Institutes für Versuchstierkunde verantwortlich.

Die Tiere wurden in Käfigen der Größe 3 in Gruppen auf Holzgranulat gehalten. Die Raumtemperatur betrug 19-21°C bei angestrebter Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Es bestand ein 12-Stunden-Tag/Nacht-Zyklus und die Versuche wurden zur Vermeidung zirkadianer Schwankungen zur gleichen Tageszeit durchgeführt.

Die Tiere erhielten Altromin Ratte/Maus Zuchtfutter und Wasser ad libitum.

Somit lagen nach §2 des Tierschutzgesetzes artgerechte Haltungsbedingungen vor.

### 2.3. Übersicht des Versuchsablaufes

Baseline	OP	12h postop
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blutprobe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Applikation des selektiven iNOS-Inhibitors (1400W) / nNOS-Inhibitors (L-VNIO)</li> <li>• Sepsisinduktion (CLP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• invasive Hämodynamik</li> <li>• Blutprobe</li> <li>• Herzentnahme</li> <li>• NOx- Level Plasma/ Gewebe</li> <li>• Immunhistologie</li> <li>• RT-PCR (iNOS-Expression)</li> </ul>

Abbildung 2.1: Übersicht über den gesamten Versuchsablauf

Zunächst erfolgte eine Baseline-Blutentnahme. Anschließend wurden die selektiven NOS-Blocker 1400W (iNOS) oder Vinyl-L-NIO (nNOS) appliziert und eine Sepsis durch Coecum-Ligatur-und-Punktion (CLP) induziert.

12 Stunden nach der Operation erfolgten die invasive Messung der hämodynamischen Parameter sowie die Entnahme einer weiteren Blutprobe und des Herzens. In Gewebe und Plasma wurden die NO<sub>x</sub>-Level gemessen und das Gewebe der Immunhistologie sowie der iNOS-Expressionsanalyse zugeführt.

### **2.3. Blutentnahmen und Applikation der NO-Synthase Inhibitoren**

Die Blutentnahmen für die Baselinewerte und die Gabe der NOS-Inhibitoren erfolgte präoperativ an tief narkotisierten Tieren (siehe 2.4.).

Zur Gewinnung der basalen Blutproben führten wir zunächst eine transthorakale Punktion des Herzens mit einer 1ml Tuberkulinspritze (Tuberculin Syringe, BD, Franklin Lakes, USA) durch und entnahmen ohne starken Sog auszuüben 200µl Vollblut. Dieses wurde dann für die weitere Analyse aufbereitet (siehe 2.9.).

Die Verabreichung des selektiven iNOS-Inhibitors 1400W (13,2 mg/kg KG - Alexis Biochemicals, Buttler Pike, USA) erfolgte durch präoperative Injektion eines subkutanen Depots (6,6 mg/kg KG gelöst in 0,9% NaCl) und eine postoperative intraperitoneale Injektion gleicher Dosis zur sofortigen Wirkung.

Der nNOS-Inhibitor L-VNIO (Alexis Biochemicals) wurde über osmotische Minipumpen mit einem Gesamtvolumen von 100µl (Alzet Micro-Osmotic Pump, Model 1003D, Durect Corporation, Cupertino, USA) appliziert. Diese wurden in Folge der Sepsisinduktion in den Retroperitonealraum eingebracht und verblieben dort bis zum Versuchsende. Die Pumpen gaben stündlich 1µl der Lösung ab. Damit wurde den Tieren über den gesamten Versuchsablauf 0,5 mg/kg KG/Tag des selektiven nNOS-Inhibitors verabreicht.

Die abschließende Blutentnahme erfolgt vor Entnahme der Herzen am offenen Thorax abermals durch eine kardiale Punktion mit anschließender Probenaufbereitung.

### **2.4. Sepsisinduktion durch Coecum Ligatur und Punktion (CLP) sowie Sham-Operation**

Zur Erzeugung eines klinisch relevanten Sepsismodells erfolgte die Induktion einer diffusen, kotigen Peritonitis mittels einer Coecum Ligatur und Punktion (CLP).

Hierzu wurden die Tiere zunächst anästhesiert. Dies erfolgte durch eine intraperitoneale Gabe von S-Ketaminhydrochlorid (60µg/g Körpergewicht - Ketanest S®, Parke-Davis/Pfizer Pharma, Berlin) und Xylazinhydrochlorid (10µg/g Körpergewicht - Xylazin 2%, Bernburg AG, Bernburg). Eine ausreichende Narkosetiefe wurde mittels „tail pinch“, d.h. dem Setzen eines Schmerzreizes an der Schwanzwurzel überprüft.

War dies gegeben, wurde das Fell im Abdominalbereich mit einem Kleintierrasiergerät (Favorita II, Aesculap AG, Tuttlingen) entfernt und die Mäuse auf dem 37°C warmen Operationstisch in Rückenlage an Schwanz und Extremitäten fixiert.

Die Haut im Operationsgebiet wurde nun großflächig mit Povidon-Iod Lösung (Betasisodona® Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg) desinfiziert.

Anschließend erfolgte eine mediane Unterbauchlaparotomie. Hierzu wurde die Haut mit einer anatomischen Pinzette etwas angehoben und mit Hilfe einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) auf einer Strecke von 10-15mm inzidiert.

Zur Eröffnung der Bauchhöhle wurden mit einer feinen, geraden Schere (FST 14088-10) die Linea alba und das Peritoneum ebenfalls auf einer Länge von ca. 10mm in medianer Schnittführung eröffnet.

Anschließend wurde unter Zuhilfenahme zweier, mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl) getränkter Wattestäbchen vorsichtig, unter Schonung der umliegenden Strukturen das Coecum mobilisiert, auf der gesamten Länge dargestellt und auf einer sterilen mit NaCl befeuchteten Kompresse platziert.

Nun erfolgte die Ligatur des Coecums unmittelbar distal der Ileozökalklappe mit einem 5-0 PH-Seidenfaden (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) wobei streng drauf geachtet wurde, das Lumen von Ileum und Colon nicht einzuengen, um einen postoperativen mechanischen Ileus zu vermeiden.

## 2. Material und Methoden

---

Anschließend wurde das Coecum mit einer 20G Kanüle nach der „durch und durch“ Methode von der antimesenterialen Seite her so punktiert, dass die Kanüle im Lumen bis zum erneuten Austritt weiter distal vorgeschoben wurde. Um einen sofortigen Verschluss der Punktionsstellen zu vermeiden wurde nun aus den zwei resultierenden Punktionsstellen durch manuelle Kompression ein wenig Stuhl herausgedrückt, so dass beide Öffnungen diskret mit Stuhl versehen waren. Mittels der feuchten Wattestäbchen wurde das Coecum nun wieder vorsichtig zurück in die Abdominalhöhle reponiert.

Peritoneum, Muskulatur und Haut wurden adaptiert und mit 4-0 PH-Seide (Ethicon) in Einzelknopftechnik verschlossen. Abschließend wurde die Wunde erneut mit der Povidon-Iod Lösung desinfiziert.

Die Kontroll-Operation, im folgenden Sham-Operation genannt, erfolgte exakt in gleicher Weise. Hierbei wurde jedoch sowohl auf die Ligatur der Coecums, als auch auf dessen Punktion verzichtet und der unversehrte Darm zurück in die Abdominalhöhle reponiert. So ist davon auszugehen, dass bei den Sham-operierten Tieren keine Sepsisinduktion erfolgte.

Unmittelbar postoperativ wurden alle Tiere mit einer Volumensubstitution durch subkutane Injektion von 0,9% isotonischer NaCl Lösung (0,05 ml/g Körpergewicht) versorgt und bis zum Ende der Narkose unter einer 37°C warmen Wärmelampe platziert. Im postoperativen Verlauf wurde zur ausreichenden Analgesie alle sechs Stunden ( $\pm 1$ h) Tramadol® (20 $\mu$ g/kg Körpergewicht – Grünenthal GmbH, Aachen) subkutan appliziert, sowie weiteres Volumen verabreicht.

Wasser und Futter standen den Mäusen ad libitum bereit.

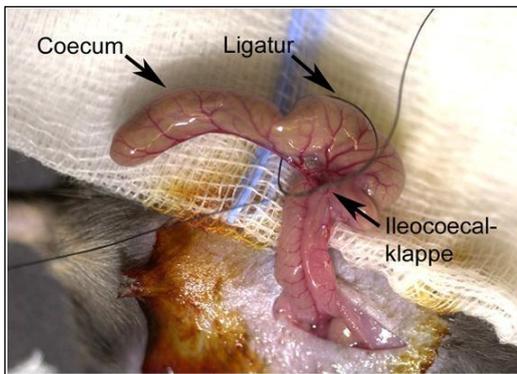
## 2. Material und Methoden



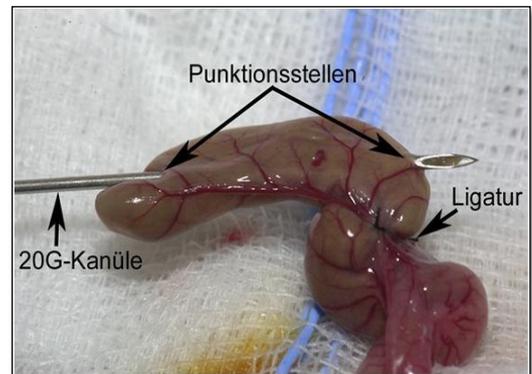
**Abbildung 2.2: Rasur und Desinfektion des OP-Gebietes, Fixierung auf dem OP-Tisch**



**Abbildung 2.3: Eröffnung des Abdomens**



**Abbildung 2.4: Mobilisation und Ligatur des Coecums**



**Abbildung 2.5: Punktion des Coecums**



**Abbildung 2.6: Verschluss des Abdomens**



**Abbildung 2.7: Volumensubstitution**

### **2.5. Überlebenszeit septischer und nicht-septischer Versuchstiere**

Zunächst wurde in einer ersten Versuchsreihe an einer separaten Mäusepopulation die Überlebenszeit der verschiedenen Versuchstiergruppen ermittelt.

Dazu wurden sowohl Wildtypmäuse als auch eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse der CLP-Operation unterzogen.

Zudem erfolgte jeweils eine präoperative Applikation des selektiven iNOS Inhibitors 1400W bzw. die Gabe des nNOS Inhibitors L-VNIO oder eines Placebos. Diese 6 Gruppen wurden postoperativ unter stündlicher Kontrolle engmaschig über den Zeitraum von mindestens 118 Stunden überwacht und der Todeszeitpunkt festgehalten.

### **2.6. Invasive Druck-Volumen Messung mittels Miniaturkatheter**

Die invasive Druck-Volumen Messung in der Aorta ascendens und im linken Ventrikel wurde 12 ± 2 Stunden postoperativ nach CLP- bzw. Sham-OP durchgeführt. Dabei wurden in allen Versuchstiergruppen Baselinewerte und die Werte nach intraperitonealer Applikation von Noradrenalin aufgezeichnet.

#### **2.6.1. Versuchsaufbau und Präparation**

Die Mäuse wurden mit Urethan (1 molar, 1,5g/kg Körpergewicht – ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt a.M.) anästhesiert und die Narkosetiefe durch „tail pinch“ überprüft.

Die ausreichend narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage an Schwanz und Extremitäten auf einem 37°C warmen Operationstisch fixiert.

Als Erstes wurde die Haut auf der rechten Seite des Halses mittels einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11) in Höhe des Kehlkopfes auf einer Strecke von ca. 2cm in kraniokaudalem Verlauf inzidiert. Die eröffnete Haut wurde mit gebogenen Mikropinzetten (BD333R, Aesculap AG) retrahiert.

Die weitere Präparation erfolgte nun zur besseren Darstellung der anatomischen Strukturen mit Hilfe eines Lichtmikroskops (MZ9.5, Leica Microsystems, Wetzlar).

Zunächst wurden die unter der Haut gelegenen Speicheldrüsen mit den gebogenen Mikropinzetten mobilisiert und seitlich aus dem OP-Gebiet geschwenkt. Die nun sichtbaren subkutanen Faszien der geraden

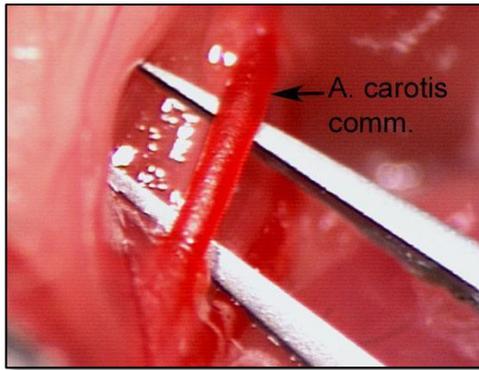
## 2. Material und Methoden

---

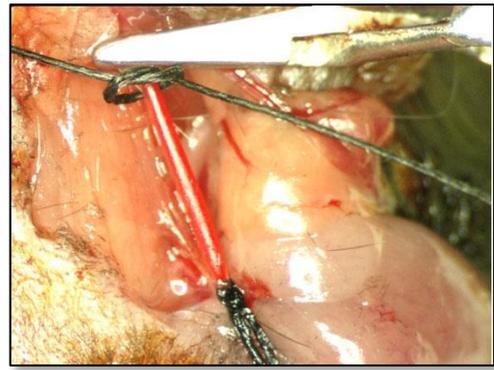
Halsmuskulatur wurden vorsichtig auseinandergezogen und eröffnet. Nach anschließender Lateralisierung der geraden Halsmuskulatur kam die Trachea zur Darstellung. In der Tiefe imponierte nun die etwa 2 mm neben der Trachea liegende Vagina carotica mit der Arteria carotis communis, der Vena jugularis und dem Nervus vagus. Nach Eröffnen der Gefäßnervenscheide erfolgte die behutsame Mobilisierung der A. carotis communis mit Hilfe der gebogenen Mikropinzetten. Sie wurde auf einer Länge von ca. 1,5 cm unter umsichtiger Schonung der benachbarten Strukturen, insbesondere des Nervus vagus, bis zur Bifurkation dargestellt.

Nun erfolgte die proximale Ligatur der Arterie direkt kaudal der Bifurkation mittels eines 5-0 PH-Seiden Fadens, der zur besseren Darstellung des Arterienverlaufes mit leichter Spannung mittels Klebeband am OP-Tisch fixiert wurde. Etwa 1-2cm kaudal der Gefäßligatur wurde die Arterie mit einem Gefäßclip (FST 18055-04) abgeklemmt, so dass ein vom Blutfluss ausgeschalteter Gefäßabschnitt entstand.

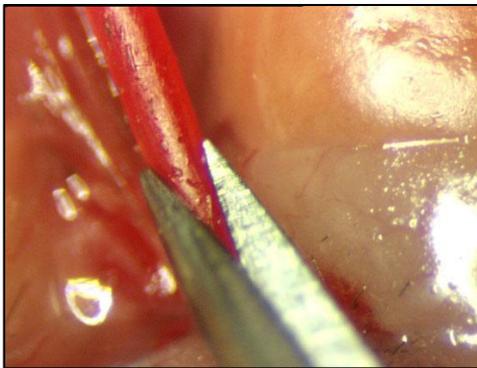
Anschließend wurde das Gefäß in diesem Abschnitt mittels einer geraden Sprungschere (FST 15003-08) in horizontaler Richtung eröffnet. Dies erfolgte gerade soweit, dass der im Außendurchmesser 1,4 French messende Druck-Volumen-Miniaturkatheter (SPR 839, Millar Instruments, Houston, USA) eingeführt werden konnte. Nach Verschieben des Katheters über einige Millimeter in das Gefäßlumen hinein, wurde dieser mittels 5-0 PH-Seide locker im Gefäß fixiert. Anschließend wurde die Gefäßklemme gelöst, um unter Kontrolle der Druck-Volumen Werte ein weiteres Verschieben über die A. carotis communis, den Truncus brachiocephalicus und die ascendierende Aorta bis in den linken Ventrikel zu ermöglichen. Der Katheter wurde vor jedem Versuch mit 0 und 180 mmHg als Unter- bzw. Obergrenze neu kalibriert.



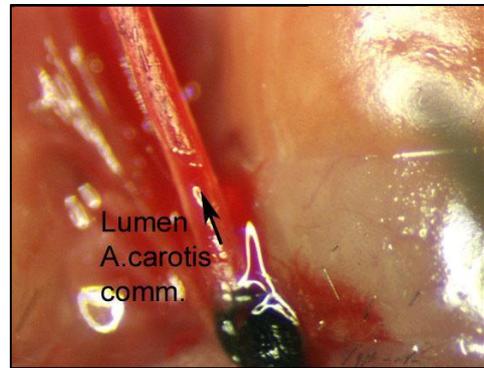
**Abbildung 2.8:** Präparierte A. carotis communis



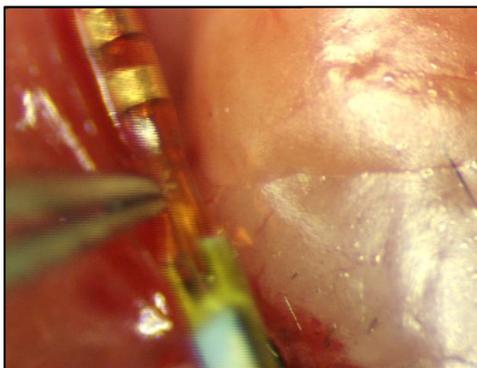
**Abbildung 2.9:** A. carotis communis mit Ligaturen und Gefäßclip



**Abbildung 2.10:** Eröffnung des Gefäßlumens



**Abbildung 2.11:** Eröffnetes Lumen der A. carotis communis



**Abbildung 2.12:** Millar Katheter in der A. carotis communis

## 2.6.2. Versuchsdurchführung

### 2.6.2.1. Messwerte

Der Miniaturkatheter wurde per Interfacebox (PO-Box Analog Interface – 16, emka Technologies s.a., Paris, Frankreich) mit einem PC verbunden und folgende Messwerte konnten während des Versuchsablaufes in Echtzeit mittels der Software IOX (emka Technologies s.a.) erhoben werden:

**Tabelle 2.1: Aufgezeichnete Messwerte des Druck-Volumen-Katheters**

Messwert	Einheit	Erläuterung
LVDP	mmHg	Linksventrikulär entwickelter Druck
DP	mmHg	Differenz aus maximalem und minimalem Druck
$dP/dt_{max}$	mmHg/s	Maximale Druckerhöhungsrate während der Kontraktion
$dP/dt_{min}$	mmHg/s	Maximale Druckabnahmerate während der Relaxation
LVESP	mmHg	Linksventrikulär endsystolischer Druck
LVEDP	mmHg	Linksventrikulär enddiastolischer Druck
EDV	Relative Volumen Einheit [RVU]	Enddiastolisches Volumen
ESV	RVU	Endsystolisches Volumen
SV	RVU	Schlagvolumen
CO	RVU	Herzzeitvolumen (SVxHR)
HR	Schläge/min	Herzfrequenz

Um die kontraktile Funktion des Herzens zu bestimmen wurde der LVDP sowie der  $dP/dt_{max}$  untersucht.

Der Left-Ventricular-Developed-Pressure (LVDP) entspricht dem endsystolischen Druck (LVESP) abzüglich des enddiastolischen Druckes (LVEDP) und spiegelt somit den vom linken Ventrikel aufgetragenen Druckunterschied wider.

Der  $dP/dt_{max}$ -Wert entspricht der maximalen Druckerhöhungsrate während der Kontraktionsphase.

Beide Werte bilden also die kontraktile Funktion des Herzens zuverlässig ab und eignen sich somit für die Untersuchung der myokardialen Depression während der septischen Kreislaufkrankung.

Das Ausmaß der bereits beschriebenen Katecholaminresistenz wurde anhand der Reaktion auf die Gabe des sympathomimetisch wirksamen Noradrenalins verifiziert.

### **2.6.2.2. Protokoll der Versuchsdurchführung**

Das Protokoll zum Versuchsablauf der Katheteruntersuchung wurde in der Software IOX geschrieben und gespeichert. So konnte es zu jedem Versuch standardisiert abgearbeitet und die Daten akquiriert werden.

Das Protokoll umfasste 3 Phasen:

- 1) Baseline Aorta
- 2) Baseline linker Ventrikel
- 3) Noradrenalingabe

In den einzelnen Abschnitten wurden die Daten automatisch kontinuierlich erfasst und gespeichert, sodass sie zu jeder Zeit dem jeweiligen Abschnitt des Versuches zuzuordnen waren.

Unmittelbar nach dem Öffnen des Gefäßclips konnten auf dem Monitor die Druckkurve sowie eine Druck-Volumen-Schleife in Echtzeit beobachtet werden. Mittels dieser Kontrolle wurde der Katheter vorsichtig über die A. carotis communis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Hier wurden nun eine Minute lang die unter 2.6.2.1 aufgelisteten Druck-Volumen Daten erhoben und gespeichert.

Anschließend erfolgte unter großer Vorsicht, um die Aortenklappe nicht zu beschädigen, das Verschieben der Katheterspitze in den linken Ventrikel. Hierbei war darauf zu achten, dass die Spitze des Katheters nicht an der Herzinnenseite anlag und regelrechte Druck-Volumen-Kurven zur Darstellung kamen. Auch hier erfolgte die einminütige Datenerfassung.

Nun wurde Arterenol® (40µg/kg/min - Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt a.M.) über eine Spritzenpumpe (Precidor, Infors AG, Basel, Schweiz) kontinuierlich intraperitoneal appliziert und anhand der Echtzeitdarstellung unserer

Messdaten der Wirkungseintritt bis zu einer Plateauphase beobachtet. Hier wurden nun abermals für eine Minute die Daten aufgezeichnet.

Nach Beendigung des Versuches wurde das Gefäß zügig mittels der kaudalen Ligatur nach vorsichtiger Entfernung des Katheters wieder verschlossen.

### 2.7. Verwendete Medikamente

#### 2.7.1. Urethan

Urethan gehört chemisch zur Gruppe der Carbamate.

Es ist ein Anästhetikum, welches vielfach in Tierversuchen verwendet wird, da es kaum Einfluss auf das Autonome- und Herz-Kreislauf-System hat. Es bewirkt eine langanhaltende, gleichbleibende Narkosetiefe mit erheblicher Erholungszeit, was in der langsamen hepatischen Metabolisierung begründet liegt und es für den Einsatz bei längeren chirurgischen Maßnahmen prädestiniert.

Es kann zudem über verschiedene parenterale Zugänge appliziert werden. Da es sowohl hepatotoxisch als auch kanzerogen ist, wird es nur zur Narkose von Versuchstieren verwendet, welche anschließend euthanasiert werden<sup>99</sup>.

Urethan wirkt sowohl inhibitorisch als auch exzitatorisch an verschiedenen Ionenkanälen des ZNS. Es potenziert die Stimulation des neuronalen nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors, des  $\gamma$ -Aminobuttersäure(GABA)<sub>A</sub>-Rezeptors und des Glyzin-Rezeptors. Außerdem erfolgt eine moderate Hemmung der glutaminergen Transmitterrezeptoren N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure (AMPA).

Da mit Urethan narkotisierte Tiere ein sehr ähnliches physiologisches und pharmakologisches Verhalten aufweisen wie nicht narkotisierte Tiere, eignet sich diese Substanz hervorragend zur Untersuchung hämodynamischer Parameter wie der invasiven Druck-Volumen-Messung<sup>100</sup>.

Urethan wurde ausschließlich zur finalen Narkose verwandt und in einer 1-molaren Konzentration intraperitoneal appliziert.

### 2.7.2. Ketamin und Xylazin

Die Anästhesie vor CLP- bzw- Sham-Operation erfolgte gewichtsadaptiert als intraperitoneale Injektion mittels S-Ketaminhydrochlorid (60µg/g Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (10µg/g Körpergewicht). Durch diese Kombination und Dosierung wird eine zuverlässige Sedation, Relaxation und Analgesie erreicht<sup>101</sup>.

S-Ketaminhydrochlorid weist einen komplexen Wirkmechanismus an verschiedenen Rezeptoren auf. Es ist ein nicht-kompetitiver Antagonist am exzitatorischen NMDA-Rezeptor und senkt dadurch die nozizeptive Neurotransmission im ZNS. Es wirkt agonistisch an Opiatrezeptoren und hat Einfluss auf die zentrale und periphere monoaminerge und cholinerge Übertragung. Des Weiteren hemmt es die periphere Wiederaufnahme von Katecholaminen. Insgesamt führt dies zu einer „dissoziativen Anästhesie“, einem kataleptischen Zustand mit Bewusstseinsverlust, Analgesie und Amnesie<sup>102</sup>.

Xylazinhydrochlorid gehört in die Gruppe der  $\alpha$ -Agonisten und wirkt an zentralen und peripheren  $\alpha$ -Adrenorezeptoren. Es wirkt sedativ, analgetisch und muskelrelaxierend. Durch Senkung des zentralen Sympathikotonus kommt es zu einer Kardiodepression mit negativ inotropen und chronotropen Effekten und einem Blutdruckabfall<sup>99</sup>.

Im Gegensatz zu den kardiovaskulären Effekten kommt es bei der Ketamin/Xylazin Narkose nur zu einer geringen Beeinflussung der Atemtätigkeit<sup>101</sup>, was eine Intubation und Beatmung der Versuchstiere nicht erforderlich machte.

### 2.7.3. 1400W

1400W (N-(3-(Aminomethyl)Benzyl)Azetamidin) ist der bisher selektivste aller beschriebenen iNOS Blocker<sup>41</sup>. Er ist bei in vitro Versuchen 5000-fach selektiver für humane iNOS gegenüber eNOS und 200-fach selektiver gegenüber nNOS. In Experimenten mit Rattenaorta konnte eine 1000-fach höhere Selektivität für iNOS gegenüber eNOS gezeigt werden. Die Hemmung der iNOS scheint nahezu irreversibel zu sein und ist von NADPH als Kofaktor abhängig.

1400W ist zell- und gewebebegängig und weiterhin besteht im Gegensatz zu anderen iNOS Blockern eine geringe Toxizität. Eine kontinuierliche Infusion von 120mg/Tag über sieben Tage wird von Ratten toleriert. Erst eine intravenöse Bolusinjektion von 50mg/kg Körpergewicht ist bei Ratten und Mäusen letal<sup>103</sup>. Es besteht also eine große therapeutische Breite, um eine adäquate, selektive Hemmung der iNOS zu erreichen.

### 2.7.4. Vinyl-L-NIO (L-VNIO)

Vinyl-L-NIO ( $N^5$ -(1-imino-3-butenyl)-L-ornithin) ist der, für murine Zwecke selektivste, kommerziell erhältliche nNOS-Inhibitor. Es weist für Ratten nNOS eine Inhibitionskonstante von  $K_i=0,1\mu\text{m}$  auf, für murine iNOS  $K_i=60\mu\text{m}$  und für bovine eNOS  $K_i=12\mu\text{m}$  auf. Für humane NOS Formen ist dieser Blocker jedoch nur relativ gering selektiv<sup>104</sup>. Es liegen bisher keine rein murinen Selektivitätsanalysen für alle NOS Formen vor. Die Hemmung der nNOS ist kompetitiv zu L-Arginin und auch hier von NADPH als Kofaktor abhängig<sup>105</sup>.

### 2.7.5. Noradrenalin

Noradrenalin ist ein Katecholamin und Botenstoff des sympathischen Nervensystems. Es wirkt als Agonist an  $\alpha$  - und geringer auch an  $\beta_1$ -Rezeptoren.

Eine Bindung an  $\alpha_1$ -Rezeptoren führt zu einer G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C. Diese spaltet Phosphatidylinositol in Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG).  $IP_3$  setzt intrazellulär Calcium-Ionen frei und führt so zu einer Tonuserhöhung der glatten Gefäßmuskulatur. Es kommt zur Vasokonstriktion mit Nachlaststeigerung.

Die Stimulation der  $\beta_1$ -Rezeptoren führt, ebenfalls G-Protein gekoppelt, zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels, welches die Proteinkinase A aktiviert. Diese phosphoryliert Calcium-Kanäle in den Kardiomyocyten, deren Öffnungsneigung erhöht wird, und so kommt es über Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zur positiv inotropen Wirkung am Herzen<sup>106</sup>.

Im septischen Schock gilt Noradrenalin als das Mittel der Wahl und ist somit gut geeignet, die im septischen Schock vorherrschende Vasoplegie mit Katecholaminresistenz (siehe 1.2.2) im vorliegenden Modell zu überprüfen.

### 2.8. Bestimmung der NO<sub>x</sub>-Spiegel im Plasma und im Gewebe

Zur Bestimmung von Nitrit und Nitrat als Oxidationsprodukte des Stickstoffmonoxids im Plasma wurde die reduktive Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion (CLD), sowie die Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC = High Performance Liquid Chromatography) verwendet.

#### 2.8.1. Reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz

Zur Detektion des Nitritgehaltes im Plasma wurde die Methode der Reduktiven Gasphasen-Chemilumineszenz (CLD) verwendet. Es ist eine Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität, um NO in flüssigen oder gasförmigen Proben zu messen<sup>107</sup>.

Die Methode beruht auf der Messung von Lichtquanten, die stöchiometrisch bei der Reaktion von NO mit Ozon freigesetzt werden.

Die Messungen wurden an einem NO-Analysator der Firma Eco Physics (CLD 88, Eco Physics, Dürnten, Schweiz) durchgeführt, welchem eine Apparatur vorgeschaltet war, die die Freisetzung von NO aus der Probe und die Zuleitung des gasförmigen Moleküls ermöglichte (*Siehe Abbildung 2.13*).

Zur Messung des NO Gehaltes wurden jeweils 100µl der flüssigen Proben dreifach mit einer gasdichten Spritze (Typ 1710/50 RN, Hamilton AG, Bonaduz, Schweiz) durch eine Kunststoffmembran in die Reaktionskammer injiziert.

Im Reaktionsgefäß befand sich eine reduktive, iodhaltige Reaktionslösung aus 1,62g Kaliumiodid und 0,57g Iod, gelöst in 15ml HPLC-Wasser und 202,5ml Essigsäure. Diese Lösung wurde durch ein 60°C warmes Wasserbad erhitzt und setzt aus dem, in der Probe enthaltenem Nitrit Nitrosoniumionen (NO<sup>+</sup>) frei, welche mit dem Iodid (I<sup>-</sup>) weiter zu NO reagierten.



Helium als inertes Gas wurde mit konstantem Fluss über eine Glasfritte durch diese Reaktionslösung geleitet und transportierte so das, auf diese Weise

äquimolar aus Nitrit gebildete, gasförmige NO über ein Kühlsystem und zum Abfangen höherer Stickoxide durch einen mit 1M Natriumhydroxid (NaOH) gefüllten und via Eis gekühlten Glasbehälter in den Analysator. Das Kühlsystem dient der Verhinderung einer Verunreinigung des Analysators sowie der Vermeidung von Störsignalen.

In der Reaktionskammer des Analysators wurde die Konzentration des zugeleiteten NO nun mittels einer Photoreaktion bestimmt. Hierzu wurde der Kammer aus Sauerstoff generiertes Ozon unter konstantem Fluss zugeführt, welches mit NO zu Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) reagiert. Diese Reaktion läuft sehr schnell ab ( $10^{-7} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  bei Raumtemperatur), so dass auch sehr schnelle Änderungen der NO Konzentration detektiert werden können<sup>108</sup>. Ein Teil des gebildeten NO<sub>2</sub> befindet sich nach der Reaktion in einem angeregten Zustand (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>). Diese überschüssige Energie des angeregten Zustandes wird dann in Form von Lichtquanten ( $h\nu$ ) emittiert.



Das emittierte Licht befindet sich im Rot- und Infrarotbereich mit Wellenlängen von ca. 640-3000nm und ist für einen großen Konzentrationsbereich linear proportional zum NO-Gehalt der Probe<sup>108</sup>.

Die schwache Rotlichtemission wurde durch einen Photoverstärker erfasst, der von der Reaktionskammer durch einen Rotlichtfilter getrennt war. Die Temperatur des Photoverstärkers wurde konstant gehalten, da die Lichtemission der Chemilumineszenzreaktion von Ozon und NO temperaturabhängig ist. Ebenso musste der Fluss der einströmenden Gase Helium und Ozon konstant gehalten werden<sup>109</sup>.

Die Größe des Signals wurde als Fläche unter der Kurve bestimmt. Vor jeder Analyse wurde ein wässriger Nitritstandard zur Eichung der Anlage aufgegeben.

Zur Aufnahme und Auswertung der Daten diente ein PC mit der Software Euchrom (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) der über eine Interfacebox (Knauer GmbH) mit der CLD-Anlage verbunden war.

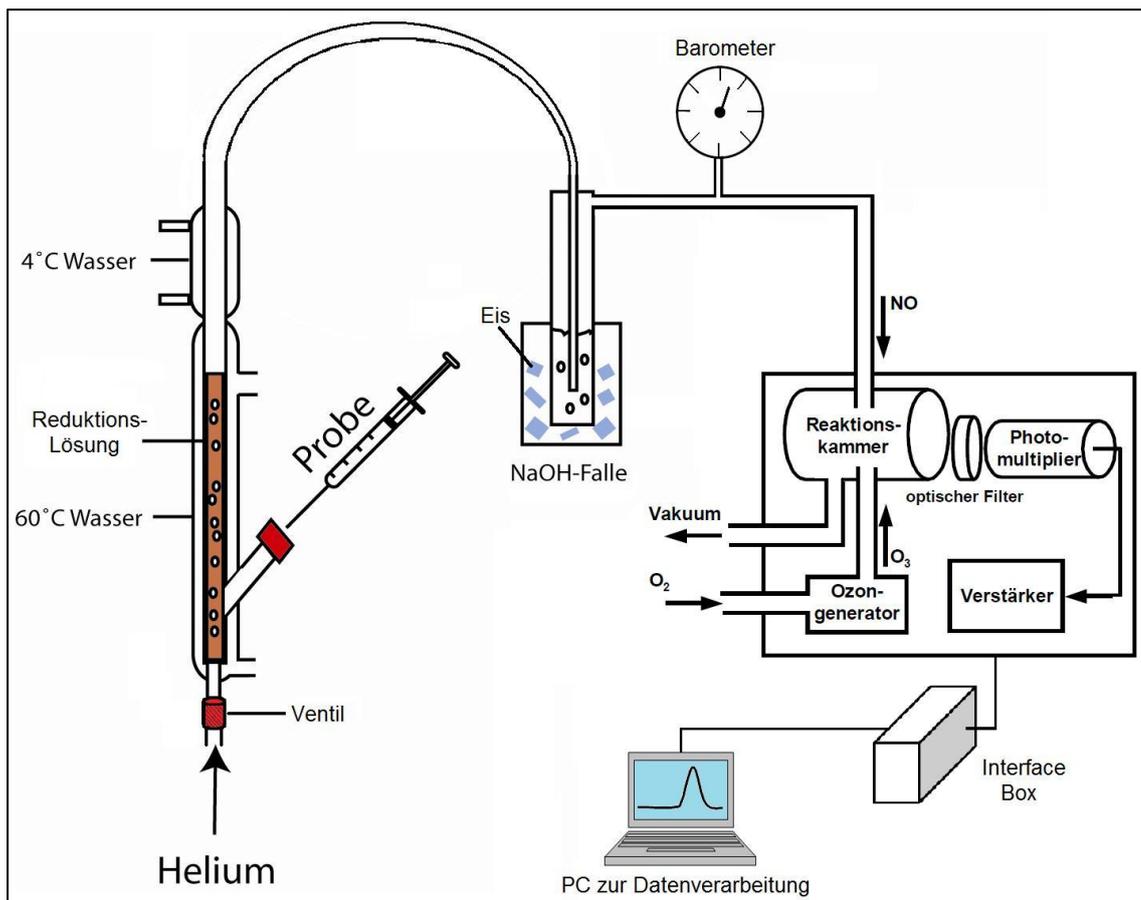


Abbildung 2.13: Aufbau der CLD-Anlage

### 2.8.2. Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

Die Messung von Nitrat im Plasma erfolgte mit dem automatischen  $\text{NO}_x$ -Analysator ENO-20 (Eicom, Kyoto, Japan). Die Plasmaproben wurden in den vorgeschalteten Autoinjektor 719AL (Eicom) gegeben.

Die Messung in diesem Gerät basiert auf einer Kombination aus Umkehrphasen-Chromatographie und einer Azokopplung.

Nitrit und Nitrat wurden dabei zunächst durch eine Umkehrphase-Separationssäule getrennt, welche mit Polystyrol-Polymeren (NO-PAK 4,5x50mm, Eicom) gepackt war.

Weiterhin wurde in einer, mit Kupfer-Kadmiumgranulat gefüllten Reduktionssäule (NO-RED, Eicom) Nitrat zu Nitrit reduziert.

Das primäre, sowie das aus Nitrat reduzierte Nitrit wurden in einer Reaktionsschleife mit Griess-Reagenz (Sulfanilamid und N-(1-naphthyl)ethyldiamin) versetzt und ein rötlicher Diazofarbstoff entstand.

## 2. Material und Methoden

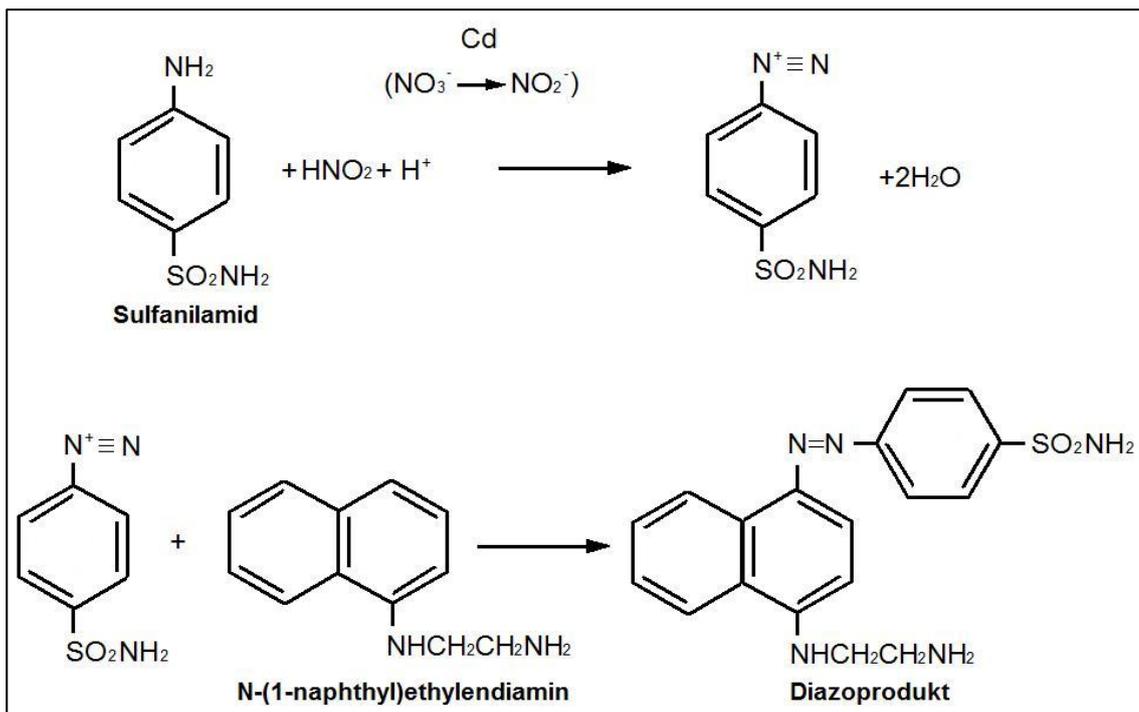


Abbildung 2.14: Azokupplungsreaktion (modifiziert nach Bryan N.S.<sup>110</sup>)

Die Absorption des Diazofarbstoffes wurde bei 540nm Wellenlänge von einem Durchflussspektrophotometer (NOD-10, Eicom) gemessen und ist proportional zur Nitritkonzentration. Der Nitritpeak erschien 4,5 Minuten nach Probeninjektion, der von Nitrat nach 8 Minuten.

Separations- und Reduktionssäule, sowie die Reaktionsschleife waren von einem konstant 35°C warmen Gehäuse umgeben.

Die mobile Phase, bestehend aus 10% Methanol mit 0,15M NaCl/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  und 0,5 g/l EDTA-4Na wurde per Pumpe mit konstantem Fluss von 0,33ml/min ins System geleitet. Das Griess-Reagenz, bestehend aus 1,25% HCl mit 5g/l Sulfanilamid und 0,25 g/l N-(1-naphthyl)ethylenediamin wurde mit konstanten 0,1ml/min in die Reaktionsschleife gepumpt<sup>111,112</sup>.

Das System ist in der Lage Nitrit bis zu einem Schwellenwert von 1nmol/l zu detektieren<sup>113</sup>.

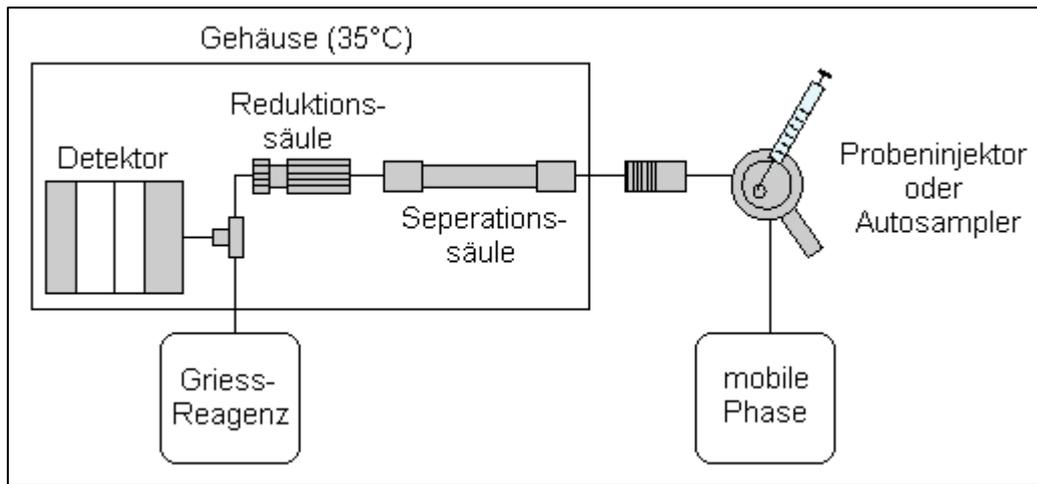


Abbildung 2.15: Aufbau des ENO-20 NO-Ansalyators (modifiziert nach Bryan N.S.<sup>110</sup>)

### 2.9. Probenaufbereitung zur Bestimmung von Nitrit mittels CLD und Nitrat mittels HPLC

Die gewonnenen Vollblutproben wurden mit Heparin (Heparin-Natrium, B.Braun AG, Melsungen) als Antikoagulanzen versehen (1 IU/ml) und für 1 Minute bei 4°C und 5000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der plasmatische Überstand abgenommen und bei - 80°C eingefroren. Vor der Messung wurden die Proben aufgetaut, im Verhältnis 1:1 mit Methanol vermischt und bei 4°C für 10 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert um Proteine auszufällen. Nun konnten die Plasmaproben der Analyse zugeführt werden<sup>114</sup>.

Die Mäuseherzen wurden unmittelbar nach der Entnahme aus dem Thorax kanüliert und mit einer NEM/EDTA Lösung blutfrei gespült. Die Lösung enthielt 100mM NEM (N-Ethylmaleimid) und 2,5mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat) in 0,9% NaCl Lösung.

EDTA ist ein Chelator, der zweiwertige Metallkationen bindet und dadurch den Kupferionen vermittelten RxNO-Abbau verhindert. NEM verhindert durch Alkylierung von Thiolgruppen die artifizielle Entstehung von Nitrosothiolen<sup>115</sup>.

Die Herzen wurden nun in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels eines Glas-auf-Glas Homogenisators (Homogen<sup>Plus</sup>, Schütt-Biotec GmbH, Göttingen) in eiskaltem NEM/EDTA Puffer homogenisiert und die Proben der Analyse zugeführt.

### 2.10. iNOS Expressionsbestimmung mittels quantitativer RT-PCR

Um die Expression von iNOS im Herzgewebe 12 Stunden nach Sepsisinduktion zu bestimmen wurde zunächst die RNA aus dem Gewebe isoliert, in cDNA umgeschrieben und deren Menge dann mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) bestimmt.

#### 2.10.1. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mittels des „RNeasy® Fibrous Tissue Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Gebrauchsanweisung.

Hierbei wurden die Zellen zunächst lysiert um die RNA freizusetzen. Dies geschah durch einen stark denaturierenden, Guanidinisothiocyanat (GITC) enthaltenden Puffer, durch den RNasen sofort effizient inaktiviert werden, sodass die Isolierung einer intakten RNA gewährleistet wurde. Dann wurden die Proben mechanisch homogenisiert, (Glas-auf-Glas Homogenisator Homogen<sup>Plus</sup>) um hochmolekulare genomische DNA und Zellbestandteile zu spalten und die Viskosität des Lysates zu reduzieren.

Anschließend wurde durch Hinzugabe von Proteinase K Lösung und Inkubation (55°C – 10min) ein Proteinverdau von Strukturproteinen initiiert.

Diese Lösung wurde dann zentrifugiert (3min – 10.000 x g) und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit Ethanol (96-100%) vermischt, um optimale Bindungsbedingungen einzustellen. Anschließend wurde diese Lösung auf die RNeasy Minisäule aufgetragen, in der an einer Silicagel-Membran die Gesamt-RNA haften bleibt. Um eine Verunreinigung mit DNA zu vermeiden wurde zudem eine DNase Lösung auf die Säule gegeben. Durch mehrmaliges Zugeben von verschiedenen Puffern und anschließendem Zentrifugieren wurden die übrigen Substanzen effektiv ausgewaschen.

Zuletzt wurde die Säule in ein neues Collection-Tube gegeben, RNAase-freies Wasser direkt auf die Silicagel-Membran pipettiert und für eine Minute bei  $\geq 8000$  x g zentrifugiert. So erhielt man ein Eluat mit aufgereinigter RNA.

Mit der RNeasy Methode werden RNA-Moleküle mit einer Länge von über 200 Nukleotiden isoliert. Da die meisten RNA-Spezies mit  $< 200$  Nukleotiden Länge (z. B. 5,8SrRNA, 5S-rRNA und tRNAs, die zusammen 15–20 % der Gesamt-RNA ausmachen) durch das Verfahren selektiv abgetrennt wurden, kam es zu einer Anreicherung der mRNA.

### **2.10.2. Reverse-Transkription der RNA in cDNA**

Die so gewonnene RNA wurde mit Hilfe des „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ (Qiagen GmbH) in cDNA umgeschrieben.

Hierzu wurde 1µg RNA zusammen mit 12µl RNase-freiem Wasser und 2µl gDNA Wipeout Buffer für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Dies diente der Elimination von kontaminierender Genom-DNA.

Nun wurden die Komponenten des Reverse-Transkriptase Master Mix auf Eis vorgelegt: 1µl Quantiscript Reverse Transcriptase (enthält zusätzlich einen RNase-Inhibitor), 4µl Quantiscript RT-Buffer (enthält Mg<sup>2+</sup> und die dNTPs) und 1µl RT Primer Mix (Optimierte Mischung von Oligo-dT- und Zufallsprimern, welche einen hohen cDNA Ertrag von allen Regionen des RNA Transskriptes versprechen).

6µl des Master Mix wurden nun mit 14µl des RNA Templates mittels Vortex gemischt und bei 42°C für 15 Minuten inkubiert, um die Transkription in cDNA zu ermöglichen. Ein anschließendes Erwärmen der Proben auf 95°C für 3 Minuten stoppte die Aktivität der Reverse-Transkriptase.

Die so gewonnene cDNA wurde nun der quantitativen RT-PCR zugeführt.

### **2.10.3. qRT-PCR**

Für die Quantifizierung der cDNA verwendeten wir ein TaqMan®-Assay der Firma Applied Biosystems, Carlsbad, USA.

Dies beruht auf dem Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).

Eine für die Zielsequenz spezifische, einsträngige TaqMan®-Sonde besteht aus Oligonukleotiden, welche komplementär zu einem Stück der cDNA sind, das sich zwischen den beiden PCR-Primern befindet. Diese Sonde enthält zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe. Am 5' Ende einen Reporter und am 3' Ende einen sogenannten Quencher, der einen Teil der Energie des Reporters durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) aufnimmt, sofern er sich in räumlicher Nähe zu ihm befindet. In der intakten und hybridisierten Sonde nimmt so der Quencher die Energie des Reporters auf und unterdrückt dessen Fluoreszenz.

Die verwendete DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und spaltet so während der Amplifikation des Gegenstranges zuerst den Reporter von der hybridisierten Sonde ab. Der Quencher ist nun nicht mehr in der Lage

## 2. Material und Methoden

die Energie des Reporters aufzunehmen, welcher daraufhin Licht spezifischer Wellenlänge emittiert. Die Intensität dieser Fluoreszenz nimmt mit jedem PCR-Zyklus zu und korreliert so mit der Menge an ursprünglich in der Probe vorhandenen cDNA Kopien und somit der Expression des Zielgens<sup>16</sup>.

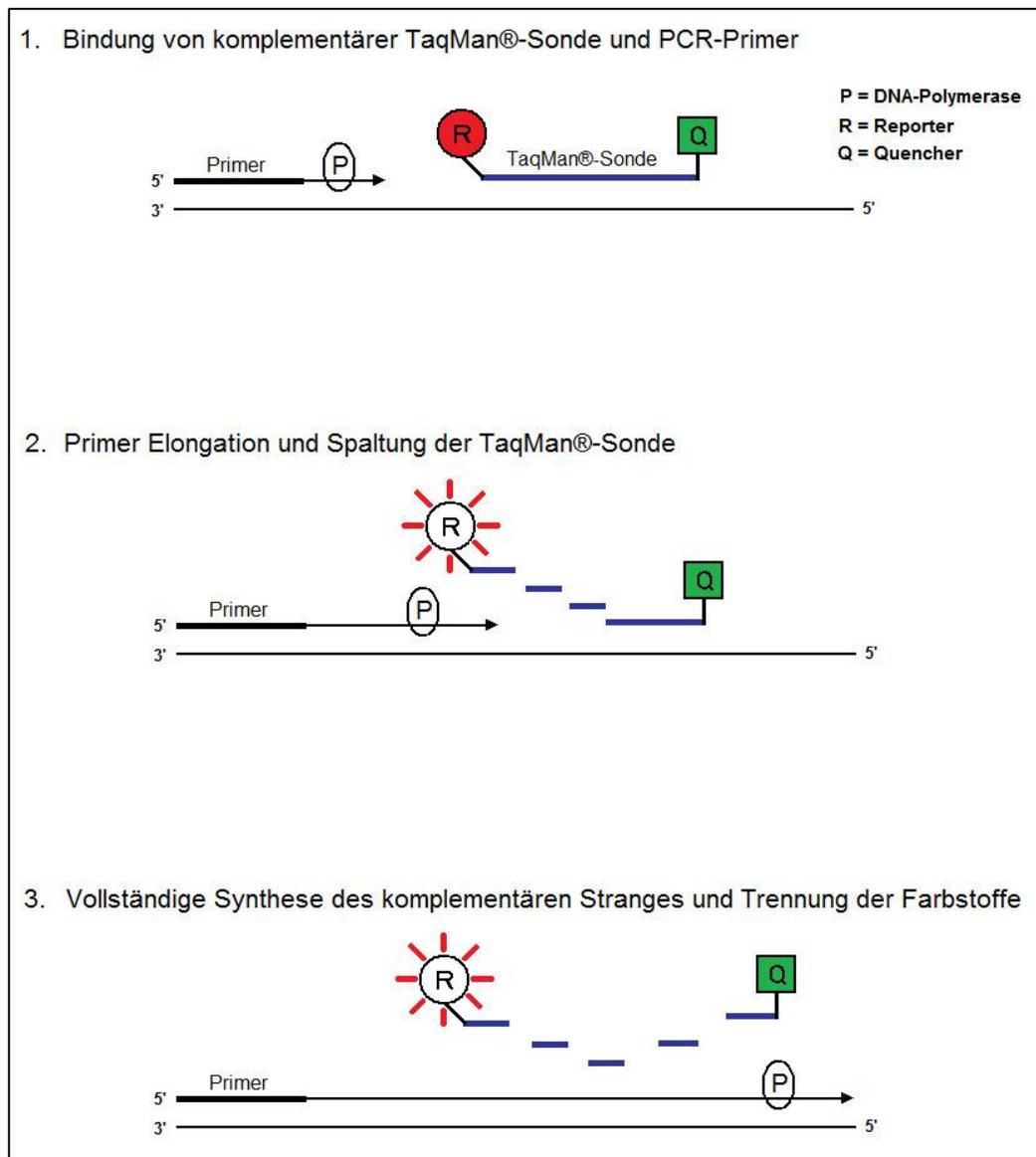


Abbildung 2.16: Prinzip des TaqMan® Assays

### Durchführung:

Zunächst wurde eine 1:5 verdünnte cDNA Lösung aus 20µl cDNA und 80µl RNase/DNase freiem Wasser hergestellt (1µl = 10ng cDNA).

## 2. Material und Methoden

---

Anschließend wurde der PCR-Reaktionsmix aus folgenden Komponenten auf Eis angesetzt und anschließend zentrifugiert:

- 10µl TaqMan® Gene Expression Master Mix
- 1µl TaqMan® Gene Expression Assay (iNOS oder GAPDH)
- 1µl cDNA Lösung (10ng cDNA)
- 8µl RNase/DNase freies Wasser

Der verwendete TaqMan® Gene Expression Master Mix enthält die DNA-Polymerase (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase) eine Uracil-DNA-Glycosylase zur Elimination von Restprodukten der cDNA Reverse-Transkription, dNTPs mit dUTP, eine passive Fluoreszenz-Referenz (ROX™) sowie einen optimierten Puffer.

Die TaqMan® Gene Expression Assays enthalten jeweils die Primer und TaqMan®-Sonde für die murine iNOS oder die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH ist ein Housekeeping-Gen, d.h. es wird unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert und nicht reguliert. Somit diente es als Referenzgen für die Expression des Zielgens iNOS.

20µl dieses Reaktionsmixes wurden nun in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (Micro Amp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems) pipettiert, diese mit einer Folie (Micro Amp® Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) abgedeckt und zentrifugiert.

Abschließend wurde die Expression mit Hilfe des ABI 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems) mit den folgenden Schritten gemessen.

1. Enzymaktivierung: 95°C für 10 Minuten
2. Denaturierung: 95°C für 15 Sekunden
3. Annealing und Elongation: 60°C für 1 Minute

→ Schritt 2 und 3 wurden 40-mal wiederholt

Gemessen wurde hier der sogenannte Cycle-Threshold (Ct-Wert). Dieser Wert beschreibt den Zyklus, an dem der Fluoreszenzwert des Reporters erstmals die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Dies geschieht umso eher, je höher der

Ausgangswert an cDNA Kopien war. Ermittelt wurde nun das  $\Delta\text{Ct}$ , d.h. die Differenz zwischen Ziel- und Referenzgen. Um einen Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen ziehen zu können, wurde der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert als Differenz der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte zwischen den jeweiligen Gruppen berechnet. Nach der Gleichung  $n=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  konnte dann die n-fache Expression angegeben werden.

### 2.11. Histologie

Um die Infiltration von Entzündungszellen in das Herzgewebe der septischen Tiere darstellen zu können, verwendeten wir verschiedene histologische und immunhistochemische Verfahren.

Hierzu wurden die Herzen zunächst über Nacht in 4% Formalin-Phosphat-Puffer fixiert. Anschließend erfolgte die Dehydrierung des Gewebes durch Behandlung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und zuletzt Xylol. Das dehydrierte Gewebe wurde dann in Paraffin eingebettet.

Aus den Paraffinblöcken wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotomes drei Serien aus 5 $\mu\text{m}$  dicken Schnitten, jeweils in 400 $\mu\text{m}$  Abstand voneinander angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

Bevor das Gewebe der spezifischen Färbung zugeführt werden konnte, wurde es mittels Xylol, absteigender Alkoholreihe und PBS-Puffer entparaffiniert und rehydriert.

#### *Darstellung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten:*

Um die Granulozyten und Monozyten im Herzgewebe anzufärben wurde ein histochemisches Verfahren unter Ausnutzung der spezifischen Esterasen der jeweiligen Zellen verwendet.

Granulozyten sind in der Lage, Naphthol-AS-D-Chloracetat zu spalten, Monozyten spalten  $\alpha$ -Naphthyl-Acetate. Die Hydrolyse der Esterbindungen setzt Naphthol frei, welches mit einem hinzugegebenen Diazoniumsalz zu einem Azofarbstoff reagiert.

Zur Anwendung kamen hier kommerzielle Kits der Firma Sigma-Aldrich, St. Luis, USA. (Naphthol-AS-D-Chloroacetate-Esterase, 91C sowie  $\alpha$ -Naphthyl-Acetate-Esterase, 91A)

### *Versuchsprotokoll:*

1. 160 ml deionisiertes Wasser auf 37 °C erwärmen.
2. 4 ml Natriumnitrit-Lösung + 4 ml Färbe-Lösung für 2 Minuten inkubieren und anschließend dem deionisierten Wasser hinzugeben.
  - Fast Red Violet LB Lösung - *Granulozyten*
  - Fast Blue BB Lösung – *Monozyten*
3. 20 ml TRIZMAL™ Pufferkonzentrat hinzufügen
  - TRIZMAL™ 6,3 – *Granulozyten*
  - TRIZMAL™ 7,6 – *Monozyten*
4. 4 ml Substrat-Lösung hinzufügen
  - Naphthol-AS-D-Chloracetat – *Granulozyten*
  - $\alpha$ -Naphthyl-Acetat – *Monozyten*
5. Präparate für 25 Minuten bei 37°C in dieser Lösung inkubieren
6. Gründlich mit deionisiertem Wasser abspülen
7. Präparate für 2 Minuten mit Hämatoxylin-Lösung als Gegenfärbung inkubieren
8. 5 Minuten mit Leitungswasser spülen
9. Mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA, H-1000) eindecken

### *Darstellung von Lymphozyten:*

Um die lymphozytäre Infiltration zu messen, wurde eine indirekte immunhistochemische Methode angewandt. Hierbei wurde ein Primärantikörper gegen das CD3 Oberflächenantigen von T-Lymphozyten verwendet. Gegen diesen wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper gerichtet, an welchen wiederum ein FITC-tragender Streptavidin-Komplex zur Färbung gebunden wurde.

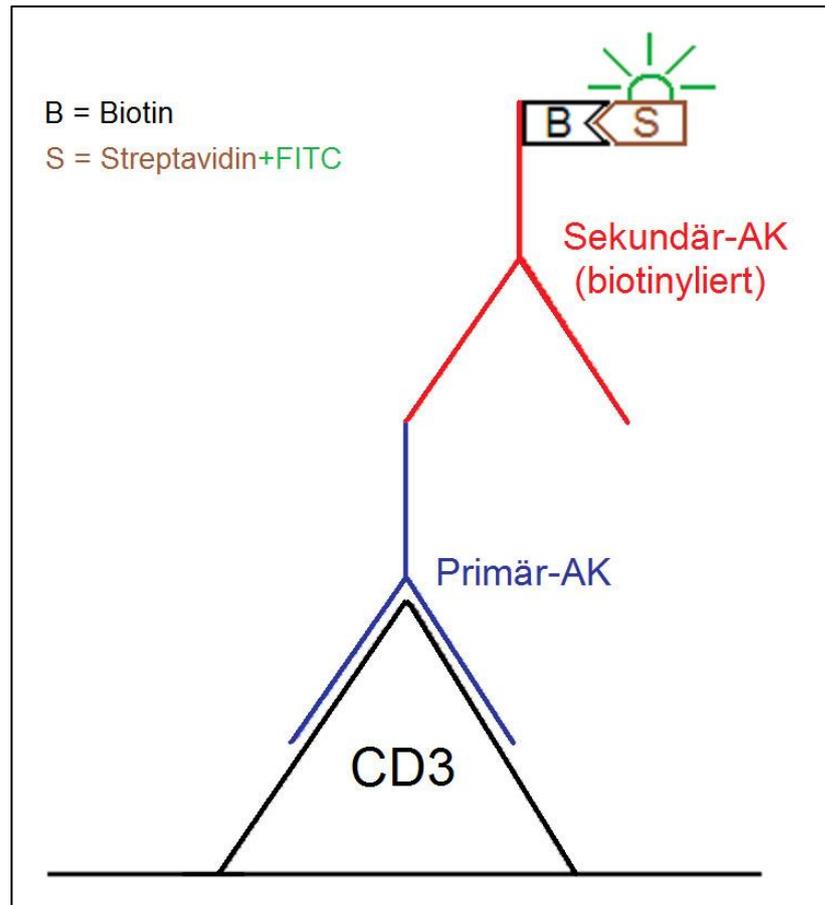


Abbildung 2.17: Prinzip der immunhistochemischen Lymphozyten Färbung

### Versuchsprotokoll:

Zunächst wurden die Objektträger in einer Citratlösung im Mikrowellengerät gekocht, um die Oberflächenantigene zu demaskieren und unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Hierzu wurden verwendet:

- 630 ml deionisiertes Wasser
- 12,6 ml Lösung A (2,101g Citronensäure auf 100ml H<sub>2</sub>O)
- 57,7 ml Lösung B (14,7g Natriumcitrat auf 500ml H<sub>2</sub>O)
- 350µl Polysorbat 20 (Tween® 20 - Sigma-Aldrich, St. Luis, USA)

Nach 20-minütiger Abkühlung wurden die Objektträger dann 5 Minuten mit PBS-Puffer gespült.

## 2. Material und Methoden

---

Um weitere unspezifische Protein- und Avidinbindungsstellen zu blockieren wurden die Schnitte für 10 Minuten bei 37°C in einer Blockierlösung inkubiert, bestehend aus:

- 6 ml 1% Bovines Serumalbumin (BSA, SP-5050, Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 3 Tropfen Blockier-Serum (Normal Horse Serum, S2000, Vector Laboratories)
- 24 Tropfen Avidin D (aus Avidin-Biotin Blocking Kit – Vector Laboratories)

Nach erneutem 5-minütigem Spülen mit PBS konnte der Primärantikörper (Anti-CD3, MCA-1477, Serotec AG, Martinsried/Planegg) für 24 Stunden bei 4°C inkubiert werden. Dieser wurde 1:200 verdünnt, in einer Lösung, bestehend aus:

- 6ml PBS
- 90 µl Blockierlösung (siehe oben)
- 24 Tropfen Biotin (aus Avidin-Biotin Blocking Kit – Vector Laboratories)

Anschließend wurde, nach Spülen mit PBS, der biotinylierte Sekundärantikörper (BA-1300, Vector Laboratories) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert:

- 6 Tropfen Sekundärantikörper
- 6 ml PBS
- 12 Tropfen normal Horse Serum

Im Anschluss an 5-minütiges Spülen mit PBS wurde nun der Komplex aus FITC und Streptavidin (SA-5001, Vector Laboratories) im Verhältnis 1:33 mit PBS verdünnt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.

Das Streptavidin bindet mit hoher Affinität an das Biotin des Sekundärantikörpers, welcher dann durch das FITC sichtbar wird.

Abschließend erfolgte eine letzte Spülung mit PBS und das Eindecken der Objektträger mit Vectashield Mounting Medium mit DAPI (H-1200, Vector Laboratories). Dies diente dem Erhalt der Fluoreszenz und dem Anfärben der Zellkerne.

Alle Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (DM RX, Leica Microsystems, Wetzlar), welches mit einem Rasterokular versehen war betrachtet. In 6 verschiedenen Feldern pro Serie wurden die jeweiligen Zellen ausgezählt und deren Anzahl in Zellen/mm<sup>2</sup> angegeben.

### **2.12. Statistische Auswertung der Messergebnisse**

Aus den Einzeldaten wurden zunächst die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Für den Vergleich der Mittelwerte aus den unterschiedlichen Versuchstiergruppen wurde unter der Voraussetzung normalverteilter Messwerte der „Student's t-Test“ für unabhängige Stichproben angewandt. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  galt als signifikant.

Unterschiede in wiederholten Messungen wurden mit dem „ANOVA“ Signifikanztest und nachfolgendem „Bonferroni post hoc test“ analysiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Nachweis einer Bakteriämie durch Anlage von Blutkulturen

Um den mikrobiologischen Nachweis einer Bakteriämie nach der CLP-Operation zu führen, wurden einmalig von allen Versuchstiergruppen 12 Stunden nach Sepsisinduktion Blutkulturen angelegt.

In der Verum-Gruppe mit und ohne Applikation der NOS-Inhibitoren ließen sich folgende pathogene Keime im Blut nachweisen:

- Enterococcus cloacae
- E. coli
- Proteus mirabilis
- Alcaligenes faecalis

Die Sham-operierten Tiere wiesen keine nachweisbare Bakteriämie auf.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass sowohl die CLP- als auch die Sham-Operationen erfolgreich durchgeführt werden konnten.

#### 3.2. Überlebenszeit nach Sepsisinduktion

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Überlebenszeit der septischen Tiere beobachtet und die Mortalität von Wildtypen (WT) und eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen, jeweils mit und ohne präoperative Applikation von 1400W oder L-VNIO gegenübergestellt.

Hieraus ergaben sich insgesamt sechs Versuchstiergruppen.

Die beste Überlebensrate zeigten die eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Blocker, mit einer mittleren Überlebenszeit von 69,5h. Die letzte Maus starb nach 118 Stunden.

Die größte Mortalität wiesen WT-Mäuse ohne Blocker, sowie eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere mit Blockade der iNOS bzw. nNOS auf. Die mittleren Überlebenszeiten sank hier auf 29h; 26,75h bzw. 29,25h, ohne dass ein statistisch signifikanter Unterschied erzielt wurde.

Die WT-Mäuse mit iNOS-Blockade wiesen signifikant bessere Überlebensraten auf, als die WT-Tiere ohne Blockade (62h; p=0,022).

Die WT-Tiere mit nNOS-Blockade hatten ebenfalls ein signifikant höheres Überleben (38h; p=0,0031), welches jedoch geringer war, als das der iNOS inhibierten Mäuse (p=0,092)

### 3. Ergebnisse

Abbildung 3.1 zeigt den prozentualen Anteil der überlebenden CLP-Tiere im zeitlichen Verlauf.

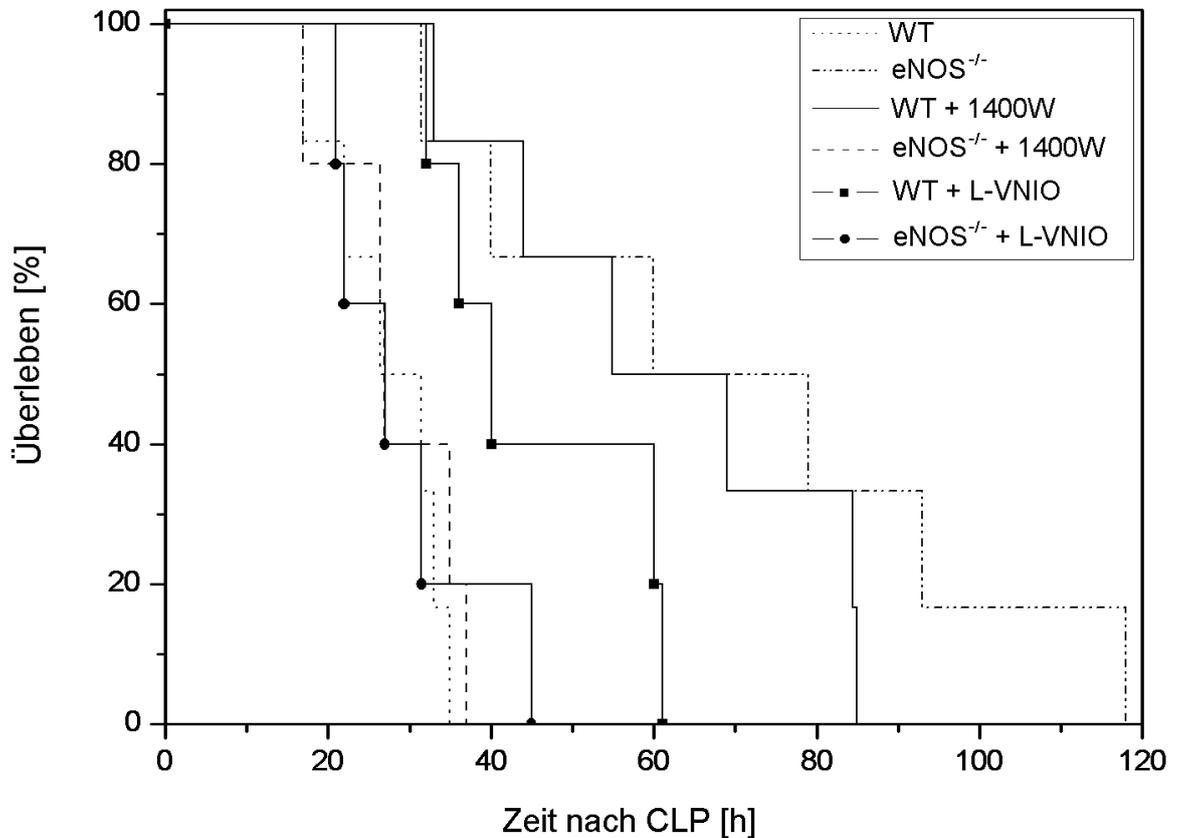


Abbildung 3.1: Postoperative Überlebensrate in Prozent der septischen WT und eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere mit und ohne Blockade der NO-Synthase im zeitlichen Verlauf

#### Zusammenfassung:

Die WT-Gruppe profitierte signifikant von der Inhibition der NO-Synthasen (iNOS>nNOS), die besten Überlebensraten jedoch wiesen die eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse auf.

Hemmt man bei diesen Tieren jedoch zusätzlich noch eine weitere NOS durch die Gabe von 1400W oder L-VNIO, sank die Überlebensrate in etwa auf das Niveau der septischen Wildtypen ab.

### 3.3. NO<sub>x</sub>-Spiegel

Um die Menge an Stickstoffmonoxid, welches von der Summe der NO-Synthesen gebildet wurde zu bestimmen, wurden die Plasmaspiegel der Reaktionsprodukte Nitrit und Nitrat aller Versuchstiergruppen bestimmt. Hieraus können Rückschlüsse auf die Beteiligung der jeweiligen NO-Synthesen an der septischen Hämodynamik gezogen werden. Analysiert wurden die NO<sub>x</sub>-Spiegel im Blutplasma vor und nach Sepsisinduktion, sowie im Herzgewebe septischer Tiere.

Die wesentlich größere Bedeutung wird hierbei den Nitrat-Werten beigemessen, da diese im Vollblut eine etwa 100 bis 200-fach höhere Konzentration aufweisen als Nitrit und Nitrat mit einer Halbwertszeit von acht Stunden das stabile Endprodukt des NO-Stoffwechsels darstellt. (siehe 1.2.1).

#### 3.3.1. Nitrat und Nitrit Werte im Plasma

*Nitrat:*

Zunächst imponierten die deutlich geringeren Nitrat-Werte der eNOS<sup>-/-</sup>-Gruppe. Sowohl die Baselin-Werte (4,24 ± 2,9 µM), als auch die Werte der septischen Tiere (12,63 ± 4,07 µM) lagen hier deutlich unter denen der WT-Gruppe (BL: 25,07 ± 3,66 µM; p<0,001 und CLP: 41,8 ± 7,07 µM; p<0,001).

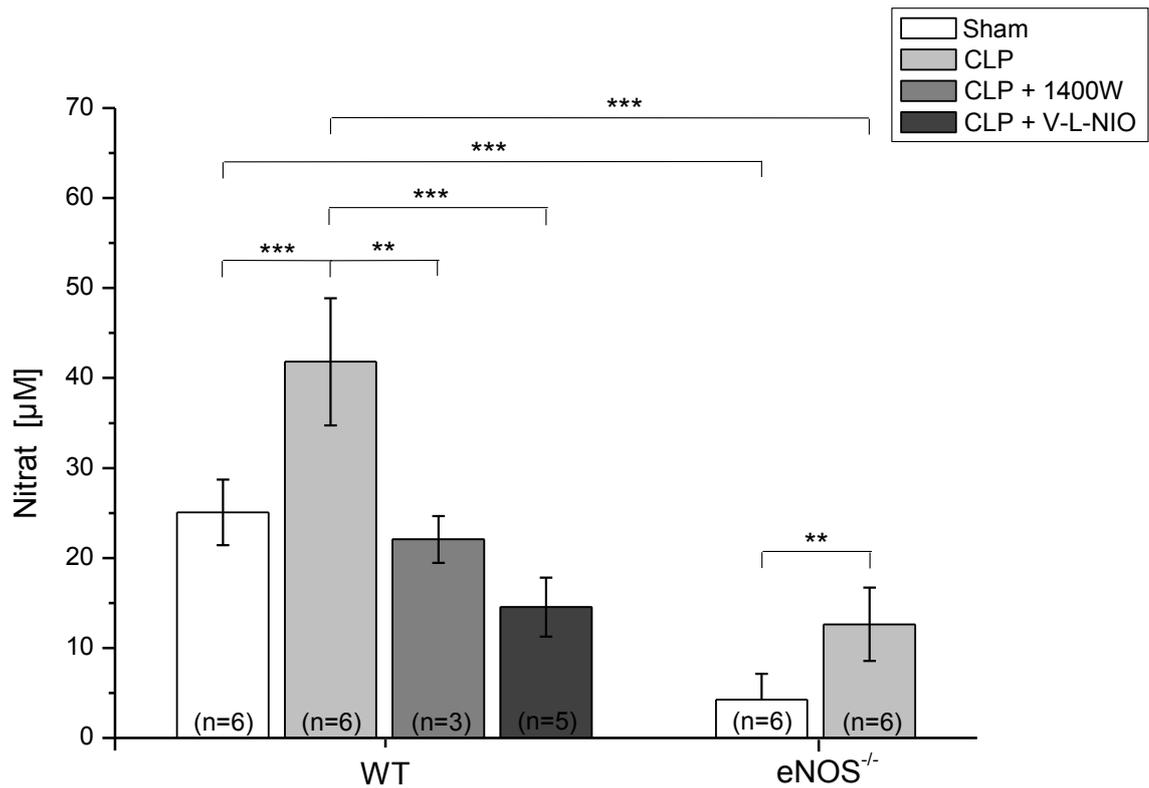
Ebenso zeigen obige Werte, dass die Induktion einer Sepsis zu massiv gesteigerten Nitrat-Werten im Plasma führte. Die Wildtypen stiegen hier um 66,73% an (p<0,001), die eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse sogar um 197,88% (p=0,0078).

Die Applikation der NOS-Inhibitoren verhinderte in der WT-Gruppe diesen Anstieg und führte sogar zu reduzierten Plasma-Nitrat-Werten gegenüber den nicht septischen Tieren.

Die Nitrat-Spiegel der mit 1400W behandelten WT-Mäuse lagen im Mittel bei 22,06 ± 2,62 µM, einem Minus von 47,22% gegenüber den septischen Tieren ohne NOS-Blockade (p=0,0026).

Die mit L-VNIO behandelten WT-Tiere fielen hier noch stärker ab und zwar auf einen mittleren Nitrat-Spiegel von 14,53 ± 3,28 µM (- 65,24%, p<0,001).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.2: Plasma-Nitrat Werte nicht-septischer und septischer Tiere, WT mit iNOS- und nNOS-Blockade; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>**

#### *Nitrit:*

Auch bei den Nitrit-Werten fiel auf, dass die Tiere der eNOS<sup>-/-</sup>-Gruppe signifikant niedrigere Nitrit-Level aufwiesen, als die WT Tiere:

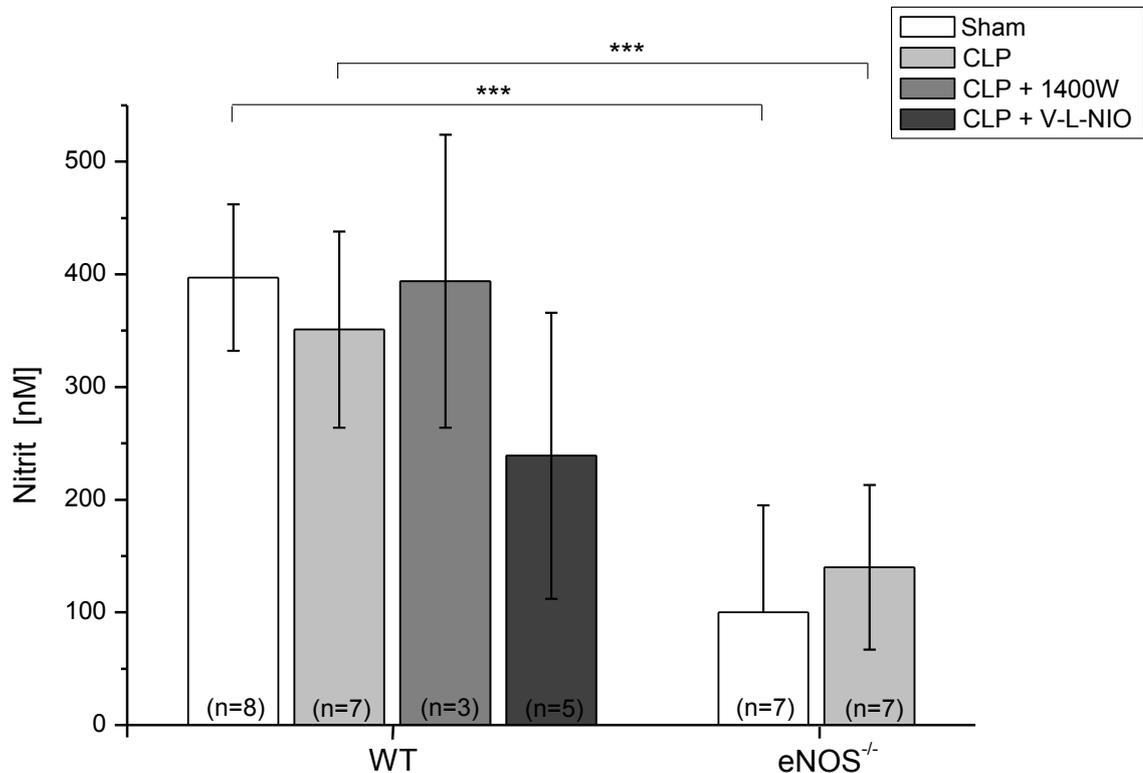
- WT Baseline vs. eNOS<sup>-/-</sup> Baseline: 397 ± 65 nM vs. 100 ± 95 nM; - 74,81%, p<0,001
- WT CLP vs. eNOS<sup>-/-</sup> CLP: 351 ± 87 nM vs. 140 ± 73 nM; - 79,20%, p<0,001

Die eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere stiegen nach Sepsisinduktion mit den Nitrit-Werten analog zu den Nitrat-Werten an und zwar um 40% gegenüber den Baseline-Werten (n.s. aufgrund der hohen Standardabweichung).

Die WT-Mäuse zeigten hingegen keinen Anstieg der Nitrit-Spiegel, sondern sanken um 11,59% (n.s.) ab.

### 3. Ergebnisse

Die NOS-Blockaden zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Während durch Blockade der iNOS die Nitrit-Werte der WT-Mäuse das Niveau der Baseline-Werte hielten ( $394 \pm 130$  nM), sanken die Werte durch nNOS-Blockade gegenüber den Mäusen ohne Blockade um 31,9% auf  $239 \pm 127$  nM.



**Abbildung 3.3: Plasma-Nitrit Werte nicht-septischer und septischer Tiere, WT mit iNOS- und nNOS-Blockade; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>**

#### *Zusammenfassung:*

Die Plasma NO<sub>x</sub>-Werte zeigen, dass die eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere basal, sowie in der septischen Hämodynamik eine deutlich niedrigere Gesamtaktivität der NO-Synthasen aufwiesen als Wildtypen.

Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse auch, dass die Sepsis zur einer deutlichen Steigerung der Synthese von Stickstoffmonoxid, mit massiv erhöhten NO<sub>x</sub>-Werten im Plasma führte.

Dies konnte durch die selektive iNOS-Blockade mittels 1400W kompensiert werden. Deutlicher noch ist der Effekt durch die nNOS-Blockade mittels

L-VNIO, welche in der Lage war, die Plasma  $\text{NO}_x$ -Levels noch unter den Wert der nichtseptischen Tiere zu senken.

Die Nitrit-Werte sollten hier in den Hintergrund gestellt werden. Zum einen auf Grund ihrer geringen Konzentration gegenüber den Nitrat-Werten und zum anderen, da Nitrit im Vollblut nicht stabil ist und rasch in Nitrat umgewandelt wird. Somit unterliegt es einem ständigen Fluss und die Werte zeigen lediglich eine Momentaufnahme.

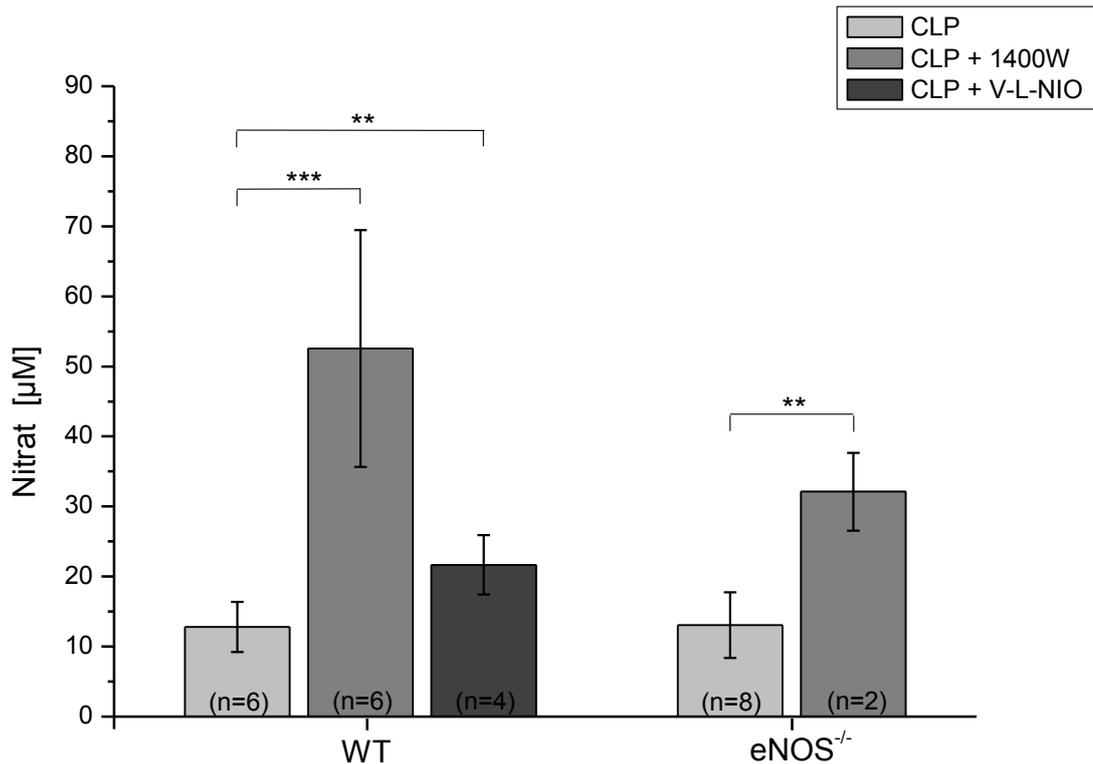
#### **3.3.2. Nitrat und Nitrit Werte im Herzgewebe**

##### *Nitrat:*

Bei den Gewebenitrat-Spiegeln wiesen septische WT- und  $\text{eNOS}^{-/-}$ -Mäuse unter Baseline-Bedingungen, im Gegensatz zum Plasma, sehr ähnliche Werte auf. Die Wildtypen lagen hier bei  $12,78 \pm 3,59 \mu\text{M}$  und die  $\text{eNOS}$  defizienten Tiere bei  $13,07 \pm 4,69 \mu\text{M}$ .

Weiterhin stieg, auch hier im Gegensatz zu den Ergebnissen der Plasmauntersuchung, das Nitrat im Herzgewebe bei Blockade der NO-Synthasen an. Den größten Effekt zeigte hier 1400W. Das Gewebe dieser Tiere wies mit  $52,55 \pm 16,9 \mu\text{M}$  eine um 311,2% höhere Nitrat-Konzentration auf, als das der Tiere ohne NOS-Blockade ( $p < 0,001$ ). Die Applikation von L-VNIO führte zu einer Gewebekonzentration von  $21,67 \pm 4,24 \mu\text{M}$ , einem Anstieg von 69,56% ( $p = 0,007$ ).

Auch in der  $\text{eNOS}^{-/-}$ -Gruppe führte die Gabe von 1400W zu einer Erhöhung der Nitrat-Konzentration im Gewebe. Hier kam es zu einem Anstieg auf  $32,11 \pm 8,54 \mu\text{M}$  (+ 145,68%,  $p = 0,002$ ).



**Abbildung 3.4: Nitrat Werte im Herzgewebe septischer Tiere, WT mit iNOS- und nNOS-Blockade; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>**

#### *Nitrit:*

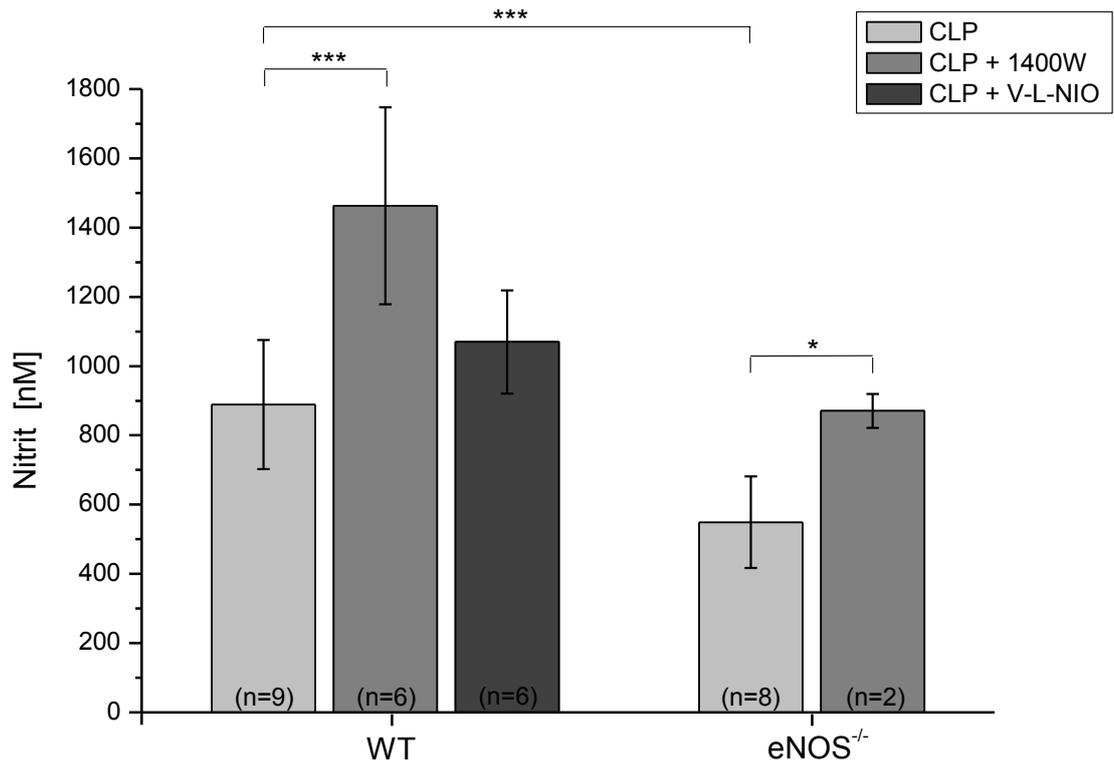
Insgesamt lag die Konzentration von Nitrit im Gewebe deutlich höher als im Plasma. Der Mittelwert der untersuchten Gruppen, welche sich hier überschneiden, lag im Gewebe bei 993 nM, während der Mittelwert der entsprechenden Plasma-Gruppen bei 281 nM lag.

Auch hier zeigte der Vergleich der Werte septischer eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere (549 ± 132 nM) mit denen der Wildtypen (889 ± 186 nM) im Mittel ein signifikant niedrigeres Gewebenitrit-Level für eNOS defiziente Mäuse (- 38,25%, p<0,001).

Ebenfalls führte die NOS-Blockade in beiden Gruppen zu einem Konzentrationsanstieg. Das Herzgewebe der iNOS inhibierten WT-Mäuse wies mit 1463 ± 284 nM eine um 64,57% höhere Nitrit-Konzentration auf, als das der nicht inhibierten Wildtypen (p<0,001). Die Applikation von L-VNIO führt zu 20,36% höheren Nitrit-Werten im Gewebe (1070 ± 149 nM), welche jedoch statistisch nicht signifikant waren.

Die Nitrit-Konzentration der eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere lag nach 1400W-Gabe 58,65% höher, als die der Tiere ohne Blocker und stieg somit auf 871 ± 49 nM (p=0,011) an.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.5: Nitrit Werte im Herzgewebe septischer Tiere, WT mit iNOS- und nNOS-Blockade; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>**

#### *Zusammenfassung:*

Insgesamt lagen die NO<sub>x</sub>-Level der eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere etwas unter dem Niveau der Wildtypen. Auffallend waren die erhöhten Gewebe-NO<sub>x</sub>-Spiegel bei septischen Tieren, deren NO-Synthasen zusätzlich durch 1400W oder L-VNIO inhibiert wurden. Dies stand auch im Kontrast zu den NO<sub>x</sub>-Konzentrationen im Plasma. Tatsächlich ist in der Literatur jedoch ein Anstieg der Gewebe NO<sub>x</sub>-Spiegel nach Applikation von NO-Synthase Inhibitoren beschrieben (*siehe 4.2*).

#### 3.4. Invasive Druck-Volumen Messung mittels Miniaturkatheter

##### 3.4.1. Druckwerte des linken Ventrikels

###### *LVDP:*

Bei den LVDP-Werten fiel zunächst auf, dass die CLP-operierten WT-Tiere eine signifikante Reduktion des LVDP gegenüber den Sham-operierten Tieren von 8,66% aufwiesen ( $93,06 \pm 3,74$  mmHg vs.  $101,88 \pm 4,71$  mmHg;  $p=0,004$ ).

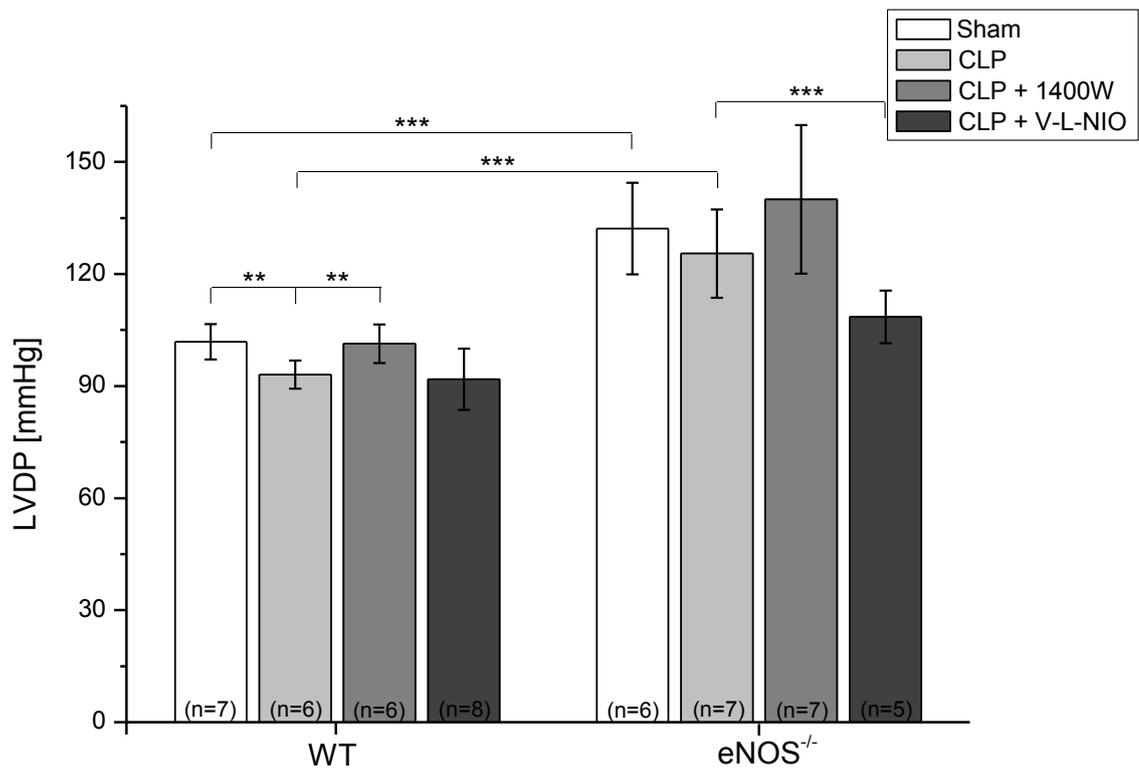
Ebenso augenscheinlich waren die deutlich höheren Druckwerte der eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere gegenüber den WT-Mäusen, sowohl in der CLP- ( $125,47 \pm 11,83$  mmHg;  $p < 0,001$ ), als auch in der Sham-Gruppe ( $132,19 \pm 12,27$  mmHg;  $p < 0,001$ ).

Der durch die Sepsis ausgelöste Druckabfall innerhalb der eNOS<sup>-/-</sup>-Gruppe ( $132,19 \pm 12,27$  mmHg vs.  $125,47 \pm 11,83$  mmHg) war jedoch mit 5,08% geringer und nicht mehr signifikant.

In beiden Versuchstiergruppen profitierten die septischen Tiere von der Gabe des selektiven iNOS-Blockers 1400W. Die WT-Tiere stiegen im Mittel um 8,16% auf  $101,33 \pm 5,21$  mmHg ( $p=0,011$ ), die eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere mit 5,08% etwas weniger stark auf  $140,01$  mmHg ( $p=0,04$ ).

Die Gabe des nNOS-Blockers L-VNIO hingegen führte in beiden Gruppen zu einem Absinken der Druckwerte. Die WT-Tiere sanken nicht signifikant auf  $91,83 \pm 8,18$  mmHg, die eNOS defizienten Mäuse jedoch deutlich um 13,52% auf  $108,51 \pm 7,02$  mmHg ( $p < 0,001$ ).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.6: LVDP nicht-septischer und septischer Tiere mit und ohne NOS-Blockade; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>**

#### *dP/dt<sub>max</sub>*:

Die Daten der maximalen Druckerhöhungsrate  $dP/dt_{max}$  zeigten eine gleiche Tendenz wie die LVDP-Werte.

Auch hier waren die Werte in der WT-Gruppe bei den CLP-Tieren signifikant niedriger als bei den Sham-Tieren ( $11280,77 \pm 1254,33$  mmHg/s vs.  $13408,13 \pm 826,64$  mmHg/s;  $p=0,005$ ). Die septischen eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen ebenso eine signifikant bessere Kontraktilität im Vergleich zu den septischen Wildtypen auf ( $11280,77 \pm 1254,33$  mmHg/s vs.  $14704,95 \pm 1602,37$  mmHg/s;  $p=0,001$ ). Bei den Sham-Tieren bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen WT und eNOS<sup>-/-</sup>.

Auffällig war weiterhin, dass die septischen eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse sogar um rund 558 mmHg/s höhere  $dP/dt_{max}$  Werte aufwiesen, als die nicht septischen Tiere (n.s.).

Die Werte nach iNOS-Blockade durch 1400W in der WT-Gruppe ( $13316,51 \pm 1119,16$  mmHg/s) lagen um 18,05% höher, als bei den Tieren ohne NOS-

### 3. Ergebnisse

Blockade ( $p=0,017$ ). Die nNOS-Blockade steigerte hingegen auch hier die Druckanstiegswerte nicht, sondern verminderte sie sogar um 325 mmHg/s (n.s.) In der eNOS<sup>-/-</sup>-Gruppe kam es sowohl nach der Applikation von 1400W, als auch von L-VNIO zu einem Abfall der dP/dt<sub>max</sub>-Werte. 1400W führte zu einer Reduktion um 3,97% (n.s.). Deutlich negativer wirkte sich die Gabe von L-VNIO mit einem Minus von 36,5% auf die Kontraktilität aus ( $p<0,001$ ).

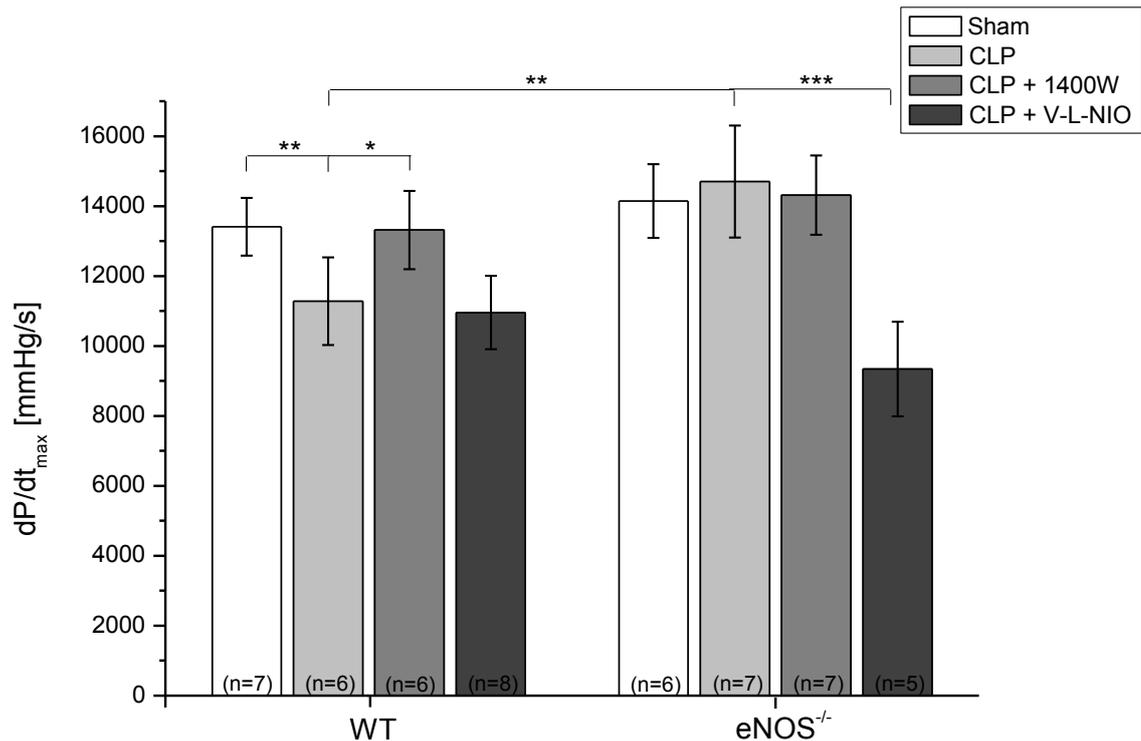


Abbildung 3.7: dP/dt<sub>max</sub> nicht-septischer und septischer Tiere mit und ohne NOS-Blockade; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>

#### 3.4.2. Druckwerte nach Applikation von Noradrenalin

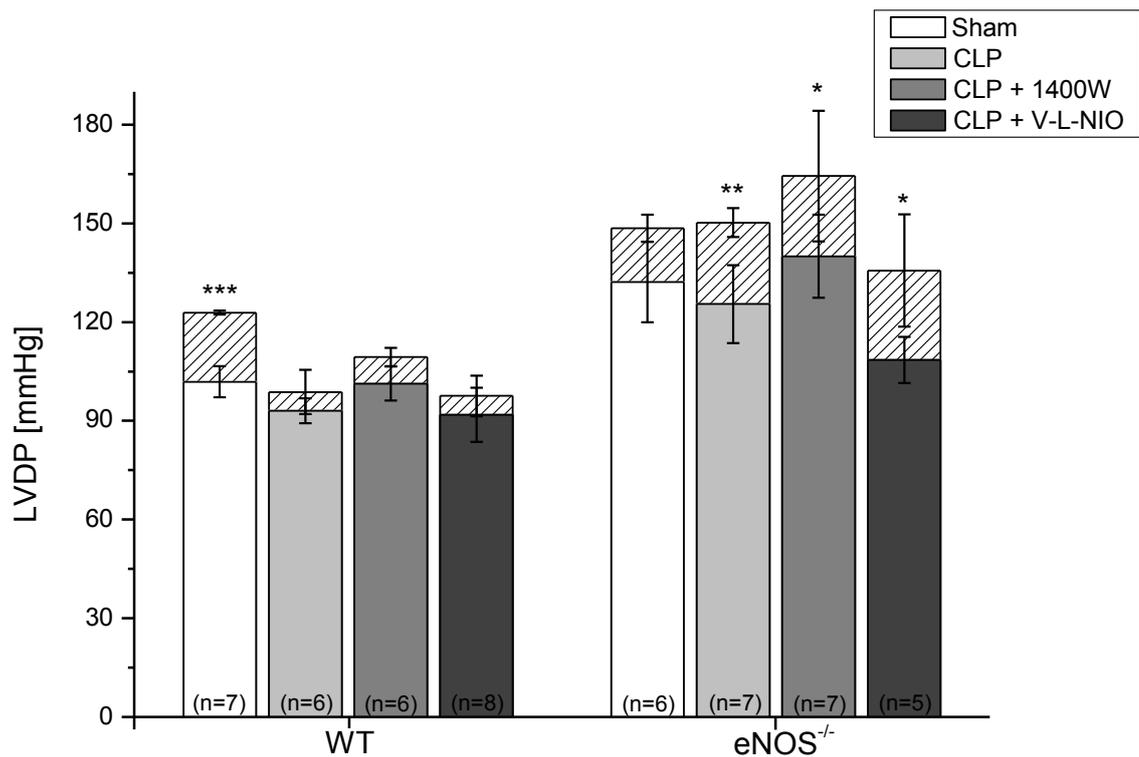
##### LVDP:

Nach der intraperitonealen Gabe des Katecholamins Noradrenalin ließ sich in der WT-Gruppe bei den Sham Tieren eine signifikante Steigerung des LVDPs um 20,61% ( $p<0,001$ ) beobachten.

Die CLP-Tiere stiegen nur noch im Bereich von einstelligen Prozentpunkten, welche statistisch nicht signifikant waren. Dies änderte bei den WT-Mäusen auch nicht die Applikation der beiden NOS-Inhibitoren (siehe Abbildung 3.8).

### 3. Ergebnisse

In der eNOS<sup>-/-</sup>-Gruppe bewirkte die Gabe von Noradrenalin bei den Sham Tieren eine knapp nicht signifikante Steigerung des LVDP um 12,34% (p=0,0508). Die septischen Tiere hingegen reagierten stärker auf das Katecholamin und stiegen um 19,74% auf 150,24 ± 4,41 mmHg an (p=0,005). Die iNOS- und nNOS-Blockade änderte auch hier wenig. Die mit 1400W behandelten Tiere stiegen um 22% auf 164,39 ± 19,86 mmHg an (p=0,028), die mit L-VNIO behandelten um 25,05% auf 135,69 ± 17,09 mmHg (p=0,025).



**Abbildung 3.8: Reaktion der LVDP Werte nicht-septischer und septischer Tiere mit und ohne NOS-Blockade auf die Applikation von Noradrenalin; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>**

#### *dP/dt<sub>max</sub>*

Die Werte der Druckerhöhungsrate verhielten sich insgesamt sehr analog zu den LVDP Werten.

Die WT-Sham Tiere stiegen um 13,24% auf 15183,88 ± 487,64 mmHg/s (p=0,038) an.

Die CLP-Tiere ohne Blockade stiegen lediglich um 0,7%. Die Werte der septischen Tiere nach Applikation von 1400W sanken um 2,57%, die der Tiere nach L-VNIO Gabe stiegen um 6,26%. Die Auswirkung des Noradrenalins auf

### 3. Ergebnisse

sämtliche Versuchstiergruppen der septischen WT-Mäuse war somit statistisch nicht signifikant.

In der eNOS<sup>-/-</sup>-Gruppe führte die Noradrenalin-Gabe bei den Sham-operierten Tieren zu einem Anstieg um 7,78% auf 15247,88 ± 2400,62 mmHg/s (n.s.).

Der dP/dt<sub>max</sub> der CLP-Tiere stiegen um 7,3% an (n.s.). Die Mäuse nach iNOS Blockade wiesen um 18,09% erhöhte Werte auf (16675,39 ± 2196,7 mmHg/s).

Auf Grund der relativ hohen Standardabweichung der basalen und stimulierten Werte war dieser Anstieg jedoch ebenso statistisch nicht signifikant.

Signifikant war hingegen der Anstieg der basal sehr niedrigen Druckerhöhungsgeschwindigkeit der septischen eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere nach Applikation von L-VNIO. Diese konnte durch die Gabe von Noradrenalin um 48,35% gesteigert werden (p=0,016).

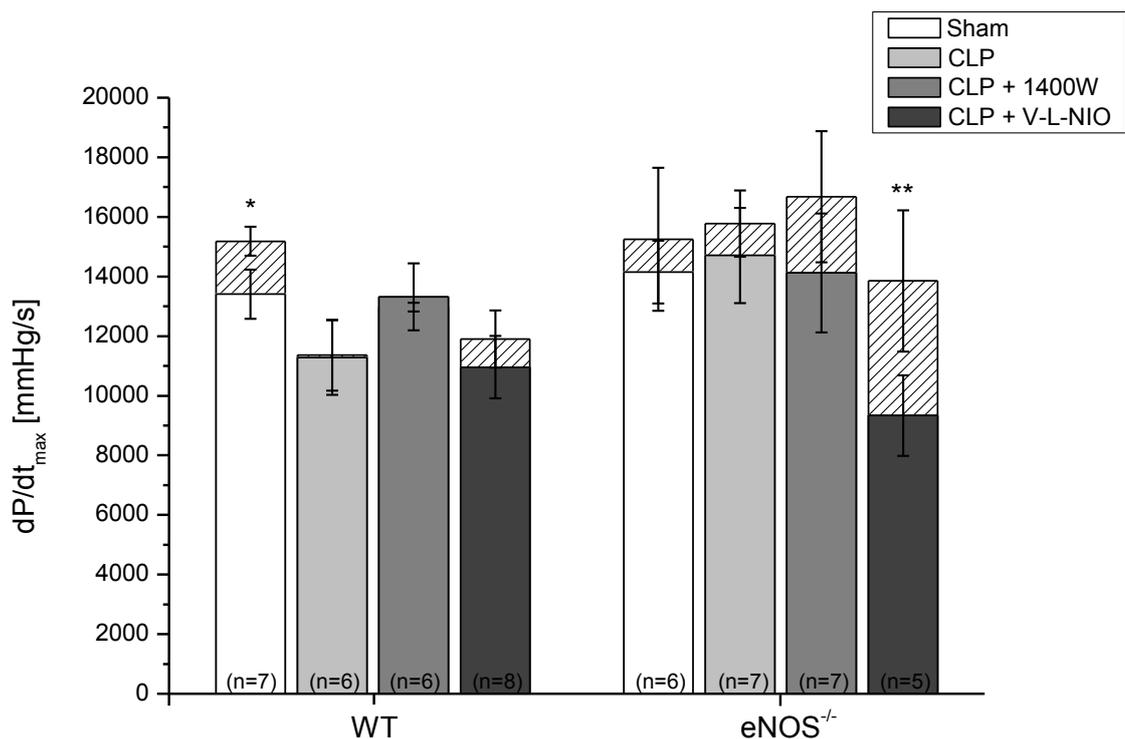


Abbildung 3.9: Reaktion der dP/dt<sub>max</sub> Werte nicht-septischer und septischer Tiere mit und ohne NOS-Blockade auf die Applikation von Noradrenalin; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>

*Zusammenfassung:*

Die eNOS defizienten Tiere weisen deutlich höhere Druckwerte auf, als die Wildtyp-Mäuse.

Die Induktion der Sepsis führte in beiden Gruppen durchweg zu niedrigeren Druckwerten (Ausnahme stellten hier die  $dP/dt_{max}$ -Werte der eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere dar). Diese waren durch die hoch selektive iNOS-Blockade mittels 1400W reversibel, die Blockade der nNOS mit L-VNIO hingegen verschlechterte sowohl die LVDP- als auch  $dP/dt_{max}$ -Werte, in der eNOS<sup>-/-</sup>-Gruppe sogar hoch signifikant.

Die septischen Wildtyp Mäuse wiesen eine deutliche Resistenz gegenüber Katecholaminen auf. Während es bei den Sham-operierten Tieren durch Noradrenalin Gabe zu einem signifikanten Anstieg von LVDP und  $dP/dt_{max}$  kam, war dies bei den septischen Tieren mit und ohne NOS-Blockade nicht der Fall.

Die eNOS defizienten Tiere wiesen diese Katecholaminresistenz nicht auf. Die septischen Tiere waren sogar in der Lage, von niedrigeren Basalwerten auf nahezu gleiche End-Werte wie die Sham-operierten Tiere zu gelangen. Die zusätzliche Gabe von 1400W veränderte das Ansprechen auf Noradrenalin nicht signifikant, wohl jedoch die nNOS-Inhibition durch L-VNIO. So führte diese, von den niedrigsten Basalwerten ausgehend, zu einem Anstieg des  $dP/dt_{max}$  um fast 50%.

#### **3.5. Histologie des Herzgewebes**

Infiltration und Aktivierung von Zellen des Immunsystems im Herzgewebe spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Gewebes Schadens, sowie der myokardialen Depression septischer Patienten und sind eng mit deren Schweregrad assoziiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Infiltrationsanalysen für neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten dargestellt.

##### *Neutrophile Granulozyten:*

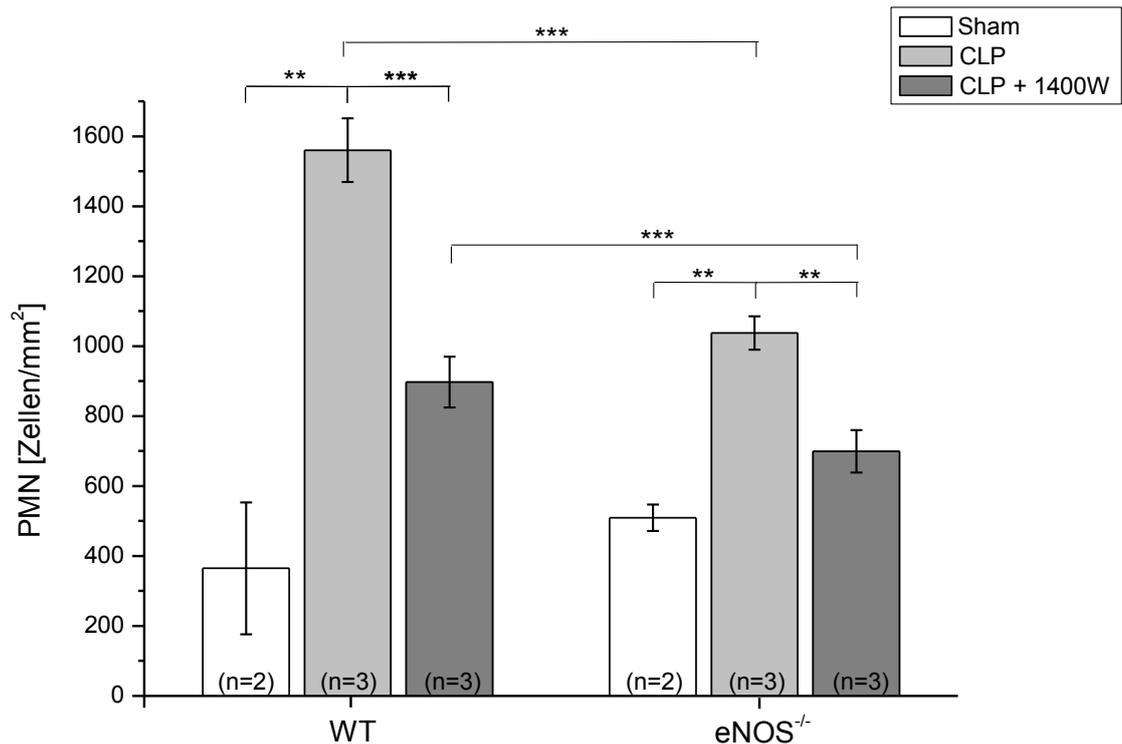
Die Sepsis, ausgelöst durch Coecum-Ligatur und Punktion (CLP), führte sowohl bei den Wildtypen, als auch in der eNOS<sup>-/-</sup>-Gruppe zu signifikant erhöhter Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Herzmuskelgewebe.

Bei den WT-Tieren stiegen die Werte von  $365 \pm 188$  auf  $1560 \pm 91$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  (+ 327,4%;  $p=0,002$ ). Bei den eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen kam es zu einem deutlich schwächeren Anstieg um 103,9% von  $509 \pm 37,88$  auf  $1038 \pm 47,9$  Zellen/ $\text{mm}^2$  ( $p=0,001$ ).

Die Blockade der iNOS mittels 1400W führte in beiden Gruppen zu einer Reduktion der neutrophilen Granulozyten im Herzgewebe. Die WT-Tiere sanken auf  $897 \pm 72,83$  Zellen/ $\text{mm}^2$  (- 42,5%,  $p<0,001$ ), die eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere auf  $699 \pm 60,8$  Zellen/ $\text{mm}^2$  (- 32,66%,  $p=0,0016$ ).

Insgesamt lag die Infiltrationsrate bei den septischen eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant niedriger als in der entsprechenden WT-Gruppe. (CLP:  $p<0,001$ ; CLP+1400W:  $p=0,022$ ).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.10: Neutrophile Granulozyten im Herzgewebe nicht-septischer und septischer Tiere mit und ohne nNOS-Blockade; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>**

#### *Monozyten:*

Die Werte der Monozyteninfiltration verhielten sich tendenziell analog zu denen der neutrophilen Granulozyten.

Die septischen Tiere stiegen auch hier mit den Werten an:

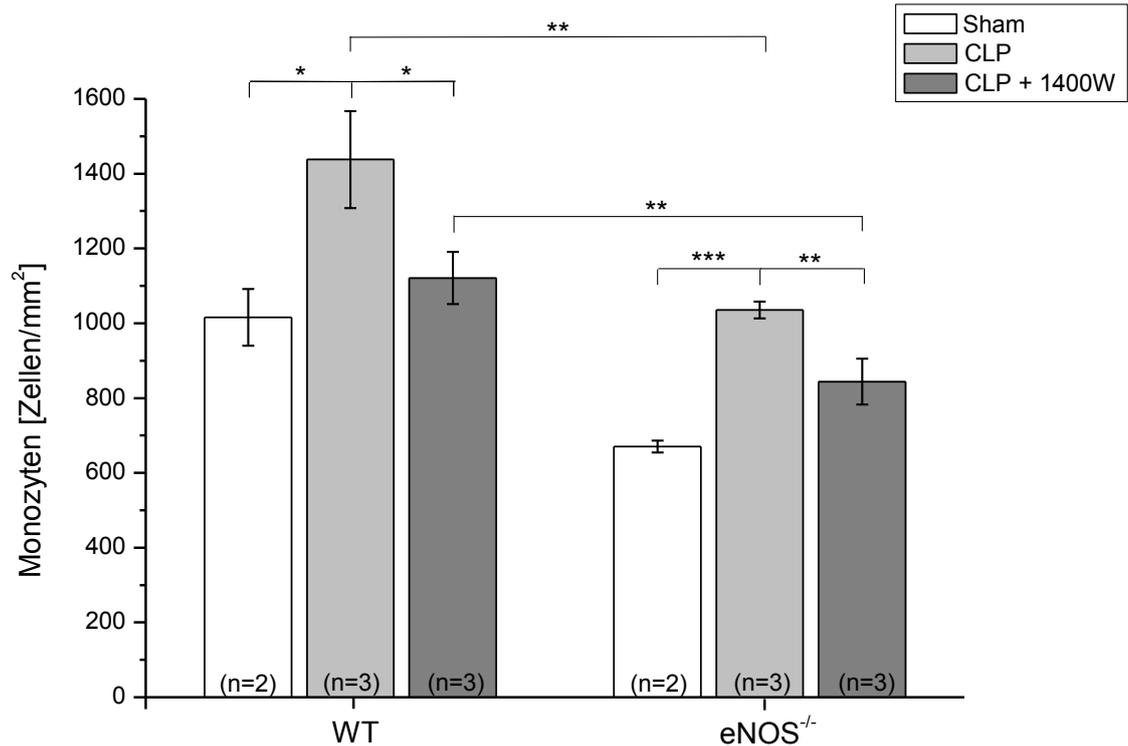
WT:  $1016 \pm 75,75$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $1438 \pm 129,60$  Zellen/mm<sup>2</sup>; + 41,54%,  
p=0,027

eNOS<sup>-/-</sup>:  $670 \pm 16,13$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $1036 \pm 22,43$  Zellen/mm<sup>2</sup>; + 54,63%,  
p<0,001

Die iNOS-Blockade mittels 1400W führte ebenso zu einer signifikant niedrigeren Infiltrationsrate der Monozyten ins Herzgewebe.

Die iNOS inhibierten Wildtypen sanken auf  $1121 \pm 69,40$  Zellen/mm<sup>2</sup> (- 22,05%,  
p=0,02), die eNOS defizienten Tiere auf  $844 \pm 61,31$  Zellen/mm<sup>2</sup> (- 18,53%,  
p=0,007).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.11: Monozyten im Herzgewebe nicht-septischer und septischer Tiere mit und ohne nNOS-Blockade; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>**

#### *Lymphozyten:*

Auch die Lymphozyten betreffend führte die Sepsis zu einer vermehrten Infiltration in das Herzgewebe septischer Tiere.

Entgegen der Ergebnisse der anderen Zelllinien, kommt es jedoch hier bei den eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einem deutlich stärkeren Ansteigen der Infiltrationswerte mit einer letztendlich auch absolut höheren Zellzahl.

Lagen die Werte der nicht-septischen Tiere noch etwa auf einem Level (WT:  $642 \pm 78,71$  Zellen/mm<sup>2</sup> – eNOS<sup>-/-</sup>:  $690 \pm 91,37$  Zellen/mm<sup>2</sup>), stiegen die eNOS defizienten Tiere nach CLP-Operation auf  $1461 \pm 22,05$  Zellen/mm<sup>2</sup> an (+ 111,74%,  $p < 0,001$ ). Die WT-Mäuse wiesen mit  $994 \pm 29,63$  Zellen/mm<sup>2</sup> einen geringeren Anstieg (+ 54,83%,  $p = 0,016$ ) auf und lagen 467 Zellen pro mm<sup>2</sup> unter dem Schnitt der eNOS<sup>-/-</sup> Gruppe ( $p < 0,001$ ).

Weiterhin fiel die Lymphozytenzahl nach 1400W-Applikation auf. Entgegen der anderen Zellarten stieg bei den WT-Tieren die Zellzahl pro mm<sup>2</sup> sogar leicht auf  $1026 \pm 65,80$  (n.s.) an. Die eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen jedoch bei iNOS Blockade wieder signifikant niedrigere Werte auf ( $898 \pm 43,4$  Zellen/mm<sup>2</sup>, - 38,54%,  $p < 0,001$ ).

### 3. Ergebnisse

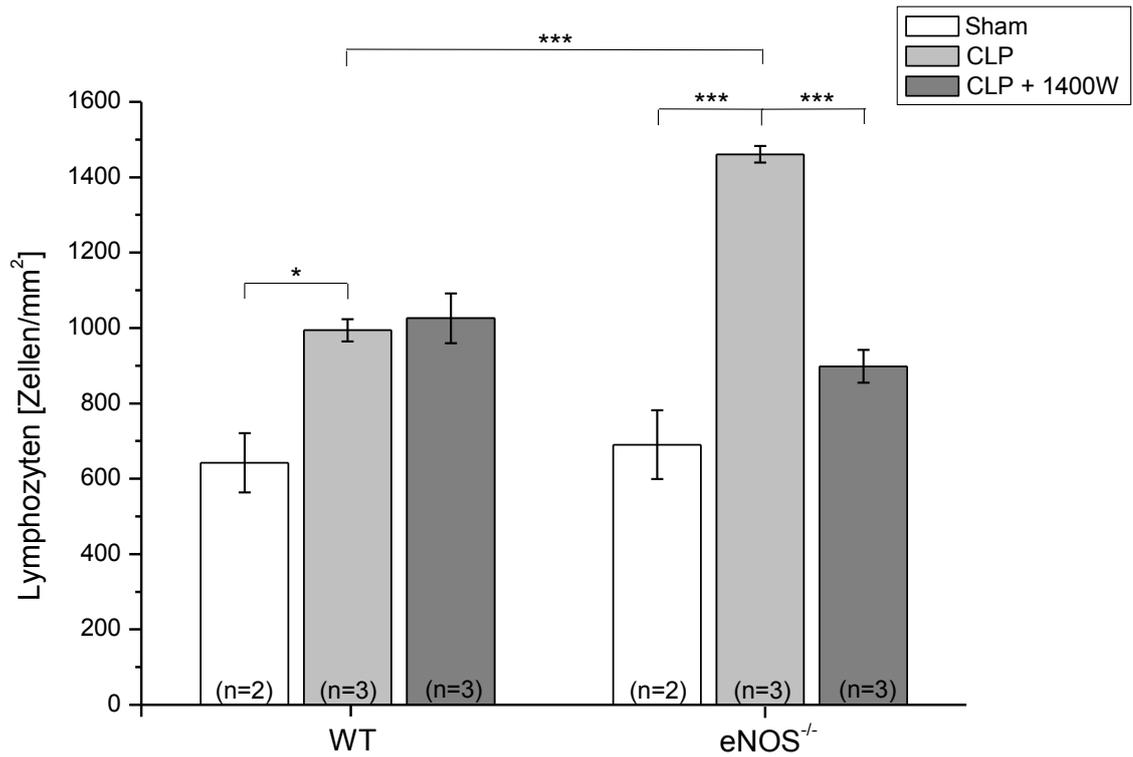


Abbildung 3.12: Lymphozyten im Herzgewebe nicht-septischer und septischer Tiere mit und ohne nNOS-Blockade; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>

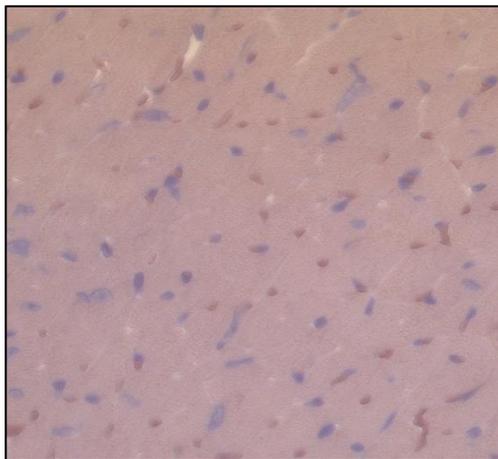


Abbildung 3.13: Neutrophile Granulozyten im Herzgewebe

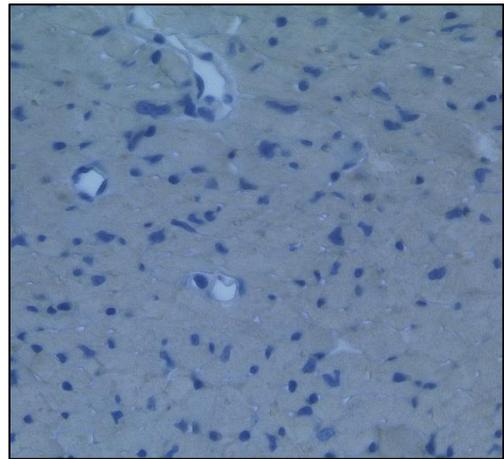
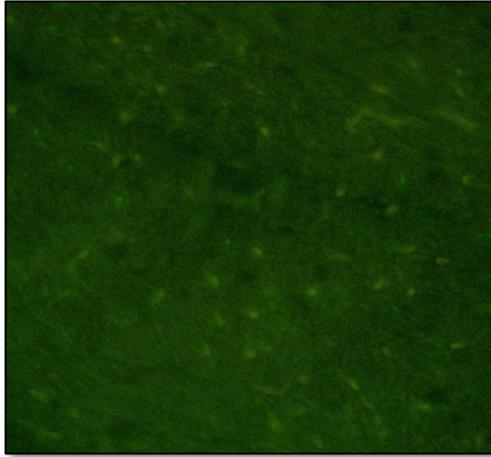


Abbildung 3.14: Monozyten im Herzgewebe



**Abbildung 3.15: Lymphozyten im  
Herzgewebe**

*Zusammenfassung:*

Insgesamt zeigte sich, dass es bei allen untersuchten Entzündungszellen durch das Auslösen einer Sepsis zu vermehrter Infiltration in das Herzgewebe kam. Verminderte NO-Level durch selektive iNOS-Blockade mittels 1400W und/oder genetische eNOS Defizienz führten zu signifikant niedrigeren Entzündungszellzahlen im Gewebe. Eine Ausnahme stellten hier die höheren Lymphozytenzahlen septischer eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere gegenüber den Wildtypen dar.

### 3.6. Relative iNOS Genexpressionsraten

Angegeben sind hier die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR als relative iNOS Expressionsrate im Bezug auf die Wildtyp Sham-Tiere (siehe 2.10.3.). Die WT-Sham Probe erhielt definitionsgemäß den Wert 1,0.

Die septischen WT-Tiere lagen mit einem Wert von  $1,16 \pm 0,06$  16% über dem Niveau der Sham operierten Tiere.

In der Gruppe der eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse hingegen wiesen septische und nicht-septische Tiere in etwa die gleichen iNOS Expressionsraten auf (Sham:  $1,03 \pm 0,29$  vs. CLP:  $1,02 \pm 0,25$ ), welche sich kaum von dem Wert der Referenzprobe unterschieden.

#### Zusammenfassung:

Bei Wildtypen führt die Induktion der Sepsis zu einer vermehrten iNOS Genexpressionsrate, bei eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren kommt es hingegen zu keiner Veränderung.

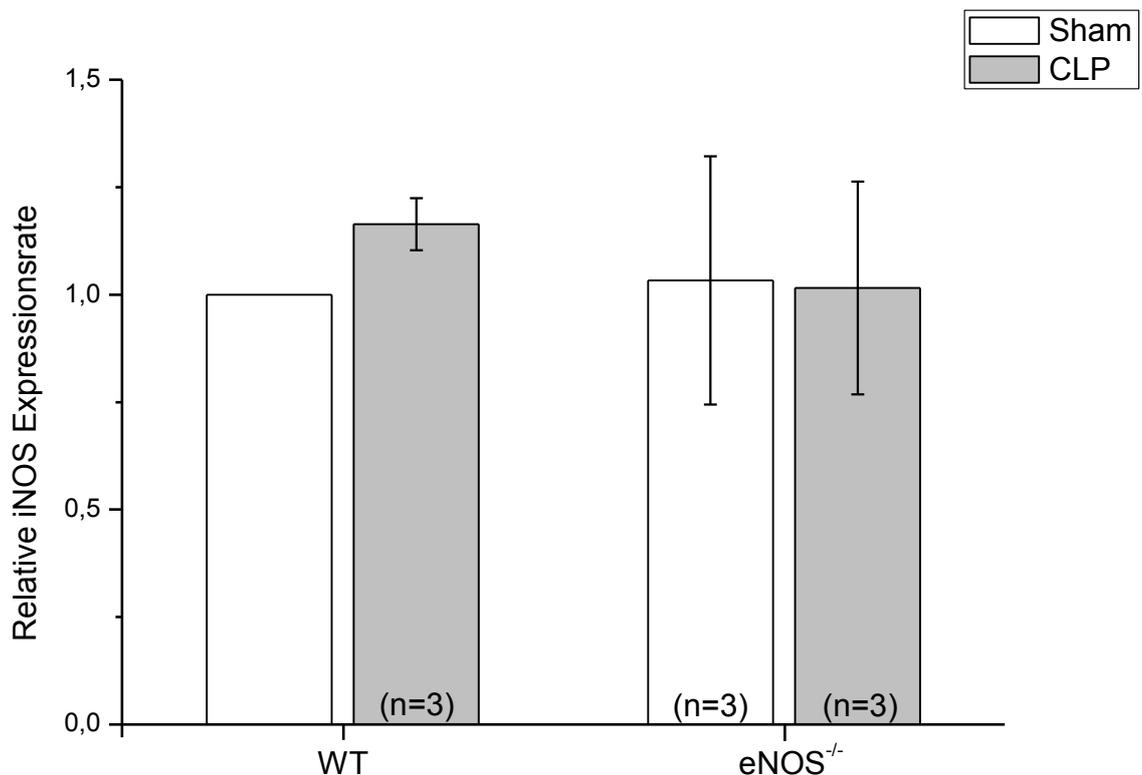


Abbildung 3.16: Relative iNOS Expressionsraten im Herzgewebe nicht-septischer und septischer Versuchstiere jeweils gegen GAPDH normiert und auf WT-Sham Tiere bezogen; WT vs. eNOS<sup>-/-</sup>

## 4. Diskussion

### 4.1. Sepsisinduktion durch CLP: Ein klinisch relevantes Modell

Viele klinische Studien zu neuen Therapieansätzen der Sepsis scheiterten, obschon sie in präklinischen Tierversuchsstudien vielversprechend waren. Hierzu zählen zum Beispiel die Gabe von Antikörpern gegen Endotoxin<sup>117</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>118</sup> oder IL-1<sup>119</sup> sowie PAF-Rezeptor Antagonisten<sup>120</sup>. Obwohl die Gründe für dieses Scheitern komplex sind, könnten unter anderem Sepsismodelle, welche die humane Pathophysiologie und Klinik nicht adäquat wiedergeben, entscheidend dazu beigetragen haben.

Es existieren diverse Modelle für die Untersuchung der Sepsis bei Versuchstieren. Auf der einen Seite das viel verwendete LPS-Modell, bei dem das Endotoxin Gram-negativer Bakterien systemisch verabreicht wird und zum anderen verschiedene Ansätze zum Auslösen einer generalisierten Infektion mittels lebender Organismen<sup>121</sup>.

Das Endotoxin-Modell zeichnet sich durch zahlreiche Nachteile für die klinische Relevanz aus. So ist LPS lediglich Bestandteil Gram-negativer Bakterien, welche nur für rund 50% der humanen Infektionen verantwortlich sind<sup>10</sup>. Darüber hinaus treten, mit der Ausnahme der Meningokokkämie<sup>122</sup>, in septischen Patienten mit Gram-negativen Infektionen lediglich niedrige oder nicht messbare LPS Level auf<sup>123</sup>. Nager sind im Vergleich zum Menschen relativ Endotoxin resistent und die hämodynamische Antwort variiert dosisabhängig sehr stark<sup>121</sup>. Zudem sind Pathogenese und Immunreaktion der Sepsis sehr komplex. Sie sind von diversen Stimuli abhängig und nicht nur von einem einzelnen Toxin. Ebenso divergiert die Zytokinantwort zwischen der klinischen Sepsis und dem LPS-Modell deutlich<sup>124,125</sup>.

Unter den verschiedenen Methoden der Sepsisinduktion durch lebende Organismen, gilt die von Wichterman et al. entwickelte und von uns verwendete CLP-Methode als Goldstandard<sup>126</sup>. Es ahmt die Pathophysiologie und den Krankheitsverlauf der humanen Sepsis am besten nach<sup>121,124</sup>. Es ist ein polymikrobielles Modell und beinhaltet die Infektion durch Gram-positive und –negative Bakterien, Aerobier sowie Anaerobier. Dies konnte durch den Nachweis positiver Blutkulturen von uns bestätigt werden.

Durch die Kombination aus diffuser Peritonitis mit nekrotischem Gewebe spiegelt es zum Beispiel den Krankheitsverlauf einer perforierten Appendizitis oder Divertikulitis mit einem persistierenden septischen Fokus wider<sup>127</sup>. Auch die Zytokinantwort gleicht der einer humanen Sepsis weit mehr als im LPS-Modell<sup>124</sup>. Die Methode ist zudem einfach durchzuführen und liefert durch die Standardisierung bekannter Einflussfaktoren (Nadeldicke, Anzahl der Punktionen, Alter und Geschlecht der Tiere, Diät<sup>126</sup>, sowie der Länge des abgebundenen Coecums<sup>128</sup> eine hohe Reproduzierbarkeit.

Auch aus hämodynamischer Sicht imitiert das CLP-Modell die Verhältnisse der humanen Sepsis am besten. So lässt sich hier –im Gegensatz zum LPS-Modell oder der intravenösen Bolusinjektion lebender Bakterien- ein biphasischer Verlauf mit einer initial hyperdynamen Phase, gefolgt von einer kompromittierten myokardialen Funktion und konsekutiv hypodynamer Phase beobachten<sup>129</sup>. In einem CLP-Modell mit Ratten konnte, ähnlich zu der Situation bei septischen Patienten, nach 2-10 Stunden zunächst eine Steigerung des Herzzeitvolumens mit gleichzeitig reduziertem systemischen Widerstand nachweisen werden. Nach etwa 20 Stunden sank dann das Herzzeitvolumen wieder signifikant ab<sup>130</sup>. Merx et al. beobachteten im murinen CLP-Modell einen Anstieg des Cardiac Output 6 Stunden nach Sepsisinduktion. Im Verlauf nahm der CO wieder ab und 20 Stunden postoperativ wiesen die Mäuse schließlich subnormale Werte auf<sup>131</sup>.

Insgesamt darf das von uns verwendete CLP-Sepsismodell als etabliert und auch speziell die Hämodynamik betreffend als klinisch sehr relevant eingestuft werden.

### **4.2. Neben iNOS und eNOS spielt auch die neuronale NO-Synthase eine bedeutende Rolle für die NO<sub>x</sub>-Spiegel während der Sepsis**

Die Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO) ist in Gewebe und Blutproben sehr schwer zu messen. Dies liegt zum einen an den sehr niedrigen Konzentrationen (10nM - 1µM) und zum anderen an der extrem kurzen Halbwertszeit von weniger als einer Sekunde in der Blutzirkulation. Daher werden die Plasmalevel der stabileren Stoffwechselprodukte Nitrit und Nitrat weithin als Surrogatparameter genutzt, um indirekt die NOS-Aktivität und Plasma NO-Level zu bestimmen<sup>110,132</sup>.

Durch zahlreiche Studien ist belegt, dass die gesteigerte NO Produktion in der Sepsis für eine massive Vasodilatation sowie myokardiale Dysfunktion verantwortlich ist, welche bis hin zum Multiorganversagen führen kann<sup>133,134</sup>. Welche der NOS Isoformen und in welchem Maße diese jeweils für diesen NO-Anstieg verantwortlich sind, ist bisher jedoch unklar und Gegenstand kontroverser Diskussion.

Unsere Ergebnisse zeigen in septischen Wildtypen eine deutliche Reduktion der Plasma-Nitrat Konzentration durch die selektive iNOS Blockade mittels 1400W. Dieses Ergebnis findet sich auch zahlreich in der Literatur wieder: In einem LPS-Sepsismodell mit Ratten konnte nach 1400W Applikation eine signifikante Reduktion der Plasma-Nitrat Konzentration festgestellt werden<sup>135</sup>. Auch in einem CLP-Modell mit Ratten traten signifikant reduzierte Plasma NO<sub>x</sub>-Level nach Applikation des selektiven iNOS Inhibitors ONO-1714 auf<sup>136</sup>. Ebenso konnte für die genetische iNOS-Defizienz ein fehlender Anstieg der Plasma-NO<sub>x</sub> Level in LPS behandelten Mäusen nachgewiesen werden<sup>137</sup>.

All diese Studien weisen eine gesteigerte NO-Produktion durch Induktion der iNOS Aktivität nach. Unsere eigenen Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die iNOS an den erhöhten NO<sub>x</sub>-Spiegeln septischer Tiere mitbeteiligt ist.

Die eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen in unseren Versuchen basal und nach Sepsisinduktion hoch signifikant niedrigere Plasma-NO<sub>x</sub> Spiegel auf, als die WT-Tiere.

Die basal niedrigeren NO<sub>x</sub>-Werte unterstreichen die Bedeutung der eNOS als Hauptregulator der physiologischen NO Produktion<sup>138</sup>.

Aber auch die niedrigeren NO<sub>x</sub>-Level septischer eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere wurden bereits in der Literatur beschrieben:

Vo et al. beobachteten in eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen eine um 50% geringere Plasma NO<sub>x</sub>-Konzentration nach LPS Applikation als in WT-Mäusen. Gleichzeitig kam es zu einer NF-κB vermittelten Steigerung der iNOS-Expression<sup>81</sup>. Connelly et al. konnten ebenfalls in LPS behandelten eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen einen signifikant geringeren NO<sub>x</sub>-Spiegel nachweisen als in der entsprechenden WT-Gruppe. Auch hier war die septische Induktion der iNOS Expression deutlich stärker in der WT- als in der eNOS<sup>-/-</sup>-Gruppe ausgeprägt<sup>80</sup>.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Vo und Connelly, im Einklang mit den eigenen Daten, deuten auf eine entscheidende pro-inflammatorische Rolle der eNOS in der Frühphase der Sepsis hin. Das zunächst von der eNOS gebildete NO scheint zum einen selbst und zum anderen indirekt, durch Steigerung der iNOS-Expression und Aktivität für die massiv erhöhten Stickstoffmonoxid Konzentrationen beizutragen.

Die Rolle der nNOS in der Sepsis ist bisher wenig untersucht und weitgehend unklar.

Unsere Ergebnisse zeigen eine deutliche Reduktion der NO<sub>x</sub>-Level nach Applikation des nNOS Inhibitors L-VNIO bei den septischen Versuchstieren. Ebenfalls reduzierte Plasma NO<sub>x</sub>-Werte konnten Enkhbaatar et al. in einer Versuchsreihe mit septischen Schafen nachweisen, nachdem diesen der nNOS Inhibitor ZK 234238 appliziert wurde<sup>139</sup>. Zudem konnte in Skelettmuskulatur septischer Ratten (CLP-Modell) ein signifikanter Anstieg der nNOS-, nicht jedoch der eNOS-Proteinexpression, bei gleichzeitig erhöhter cNOS Aktivität festgestellt werden<sup>140</sup>. Eine andere Studie zeigte in Skelettmuskulatur septischer WT-Mäuse nach CLP-Operation eine signifikant erhöhte cNOS Aktivität. Diese fiel jedoch in nNOS<sup>-/-</sup>-Tieren deutlich niedriger aus und lässt somit den Schluss einer dominanten nNOS Aktivität in der Skelettmuskulatur septischer Mäuse zu<sup>141</sup>. Eine weitere Arbeit wies in Studien an Skelettmuskulatur gesunder Probanden eine höhere eNOS- als nNOS Expression nach. In septischen Patienten jedoch wurde die Expression der

eNOS herunter- und die der nNOS herauf reguliert, so dass sich dieses Verhältnis umkehrte<sup>142</sup>.

Des Weiteren haben einige Arbeiten gezeigt, dass sich die neuronale NO-Synthese nicht nur in Neuronen, sondern auch in der Zellmembran und im sarkoplasmatischen Retikulum von Kardiomyozyten wiederfindet<sup>143</sup>.

Die vorliegenden Ergebnisse zur Nitrat/Nitrit Konzentration im Plasma septischer Tiere nach nNOS-Inhibition im Zusammenhang mit den erwähnten Expressionsstudien deuten auf eine unterschätzte Relevanz der neuronalen NO-Synthese für die septische Hämodynamik hin.

Gewebenitrit reflektiert den extravaskulären Pool von Stickstoffmonoxid<sup>144</sup>. Die signifikant niedrigere Nitritkonzentration im Herzgewebe septischer eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse weist daher auf eine Beteiligung der eNOS an der endogenen NO Produktion hin.

Die Gewebekonzentration von Nitrit und deutlicher noch von Nitrat im Herzen stieg in unseren Versuchen nach iNOS- und nNOS-Blockade an, ein Phänomen, welches in diversen Gewebetypen nach akuter NOS-Inhibition bereits beobachtet wurde. Dies scheint in einer, bei niedrigeren NO-Spiegeln vermehrt auftretenden Reaktion des NO mit Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) begründet zu liegen. Peroxynitrit seinerseits zerfällt hauptsächlich weiter zu Nitrat oder aber auch Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ), welches dann zu Nitrit oder Nitrat aufoxidiert wird<sup>144</sup>.

### 4.3. Beeinflussung der kardialen Funktion durch NO: Dosis sola facit venenum

In der Literatur werden viele Mechanismen für die Beeinflussung der kardialen Funktion durch NO beschrieben. Sowohl in vitro als auch in vivo sind positive, als auch negative Effekte beschrieben (siehe 1.2.2.). Insgesamt scheinen diese Effekte jedoch dosisabhängig zu sein. Während physiologische Konzentrationen von NO einen positiven Effekt auf die kardiale Funktion haben<sup>58,145</sup>, wirken sich hohe, pathologische Dosen von Stickstoffmonoxid negativ auf die Herzfunktion aus<sup>56,146,147</sup>.

Unsere Ergebnisse zeigen für eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse, im Gegensatz zu WT-Mäusen eine bessere systolische LV-Funktion mit höheren LVDP- und dP/dt<sub>max</sub> Werten ohne einen Unterschied zu den Sham operierten Tieren.

Die Bedeutung der endothelialen NO-Synthase für die kardiale Funktion in der septischen Kreislauferkrankung ist noch unklar, und in der Literatur finden sich dazu gegensätzliche Ergebnisse.

Connelly et al. beschreiben nicht nur erniedrigte NO<sub>x</sub>-Level für septische eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse, sondern auch eine bessere kardiale Funktion mit geringerem Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes als Folge der fehlenden iNOS Induktion<sup>80</sup>. Eine andere Arbeit wies in transgenen Mäusen mit eNOS Überexpression eine reduzierte basale Kontraktilität nach, die auf die NO induzierte Abnahme der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität von Myofilamenten zurückzuführen war<sup>146</sup>.

Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse von Ichinose et al. Hier wurden der eNOS-Überexpression protektive Eigenschaften im Bezug auf eine LPS induzierte Endotoxämie zugesprochen. Diese Tiere waren vor der myokardialen Dysfunktion sowie erhöhter Mortalität geschützt. Dies wurde mit einer NO vermittelten Reduktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und einer besseren Ca<sup>2+</sup> Utilisation und Sensitivität begründet<sup>82</sup>.

In unseren eigenen Versuchen zeigten die eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere zudem nach 12 Stunden ein besseres inotropes Ansprechen auf das Katecholamin Noradrenalin als die Wildtypen. Ähnliche Ergebnisse, allerdings ohne septischen Hintergrund, erzielten andere Arbeiten, die in eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen eine bessere Kontraktilität und Relaxation nach Gabe des  $\beta$ -Sympathomimetikums

Isoproterenol zeigten<sup>148</sup> bzw. in eNOS überexprimierenden Kardiomyozyten eine geringere inotrope Reaktion nachweisen konnten<sup>149</sup>.

Eigene Vorversuche und die aktuell vorliegenden Daten zeigen bei septischen eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen eine bessere kardiale Funktion, sowie besseres Ansprechen auf Katecholamine bei geringeren NO<sub>x</sub>-Spiegeln und unterstreichen die Hypothese des schädlichen Einflusses großer Mengen von Stickstoffmonoxid.

Die Inhibition der iNOS mittels 1400W führte in unseren Versuchen, ähnlich wie die genetische eNOS Defizienz ebenfalls zu einem Schutz vor sepsisbedingter myokardialer Dysfunktion. Dies ist in Studien mit endotoxämischem Sepsismodell sowohl für die genetische iNOS Defizienz<sup>79</sup>, als auch für eine selektive medikamentöse iNOS-Inhibition<sup>135,150-152</sup> ebenso gezeigt worden.

Ein verbessertes Ansprechen auf Katecholamine konnte jedoch in unserem Fall im Gegensatz zu den eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren, trotz deutlicher Reduktion der NO Produktion nicht festgestellt werden. Dies könnte in der Tatsache begründet liegen, dass in Kardiomyozyten vornehmlich die endotheliale NO-Synthase exprimiert wird und der parakrine Effekt von NO überwiegt<sup>69,146</sup>. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass durch LPS Injektion in Schweinen die iNOS Aktivität im Herzen, im Gegensatz zu anderen Organen nicht gesteigert wird<sup>153</sup>.

Diametral zu den übrigen Ergebnissen erscheint die Rolle der nNOS im Bezug auf die kardiale Funktion:

Unsere Ergebnisse zeigen für die Inhibition der nNOS, im Gegensatz zur iNOS Blockade keine Verbesserung, sondern sogar eine schlechtere LV-Funktion. Diese kardiale Dysfunktion prägt sich bei den eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren noch deutlicher aus.

Die Literatur bezüglich der Bedeutung der neuronalen NO-Synthase für die kardiale Kontraktilität ist geprägt von sehr variablen Methoden und Ergebnissen. In vivo Daten über den Einfluss der nNOS auf die myokardiale Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis sind zudem äußerst spärlich.

Einige Studien zeigten eine basal bessere LV-Funktion für nNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse<sup>154,155</sup>. Ebenso gibt es Arbeiten, die keine Änderung der basalen Kontraktilität für nNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse nachweisen konnten<sup>156</sup>.

Neben den niedrigeren NO<sub>x</sub>-Werten wiesen Enkhbaatar et al. in septischen Schafen nach nNOS-Inhibition eine Steigerung der LV-Funktion und des arteriellen Mitteldruckes nach<sup>139</sup>.

In vivo scheinen nNOS<sup>-/-</sup>, im Gegensatz zu eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen zudem ein schlechteres Ansprechen auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation aufzuweisen, als WT-Mäuse<sup>156</sup>. Acht Stunden nach Myokardinfarkt sinkt die Kontraktilität durch Dobutamin-Stimulation sogar ab<sup>155</sup>.

Die unterschiedliche Wirkung der beiden konstitutiven NO-Synthasen am Kardiomyozyten könnte in deren zellulären Lokalisation begründet liegen. NO inhibiert einerseits L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanäle, stimuliert jedoch in vitro über den Ryanodin-Rezeptor die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die endotheliale NO-Synthase liegt in Caveolae, wo sie gerade mit  $\beta$ -Rezeptoren und L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanälen kompartimentiert und so die  $\beta$ -adrenerge Inotropie inhibieren kann. Die neuronale NO-Synthase hingegen liegt vornehmlich im sarkoplasmatischen Retikulum und dort gebildetes NO führt bei in vitro Versuchen zu einem Ca<sup>2+</sup> Ausstrom ins Zytosol und somit zu einer vermehrten Kontraktion<sup>156</sup>.

Die verminderte oder sogar gegenteilige Wirkung von  $\beta$ -adrenergen Substanzen bei nNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen interpretieren die Autoren als eine geringere myokardiale Kontraktionsreserve.

Dies stellt auch einen möglichen Erklärungsansatz für die von uns festgestellte schlechtere LV-Funktion nach nNOS-Inhibition septischer Tiere dar. Im Rahmen der Sepsis kommt es zu einer generalisierten Vasodilatation mit Abnahme des systemischen Gefäßwiderstandes. Um hier eine adäquate Gewebepfusion zu gewährleisten, besteht initial eine hyperdynamische Kreislaufsituation unter Ausschöpfung der kardialen Reserven. Sind diese durch fehlende nNOS-Wirkung vermindert, führt dies zu einer deutlicheren Ausprägung der myokardialen Dysfunktion.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus den Plasma NO<sub>x</sub>-Werten der septischen Tiere. Diese sind nach nNOS-Inhibition signifikant niedriger als nach iNOS-Inhibition mit 1400W und auch deutlich niedriger als die physiologischen Werte in den Sham operierten Mäusen.

Wie bereits erläutert, hat Stickstoffmonoxid in physiologische Konzentrationen positive Auswirkungen auf die kardiozirkulatorische Funktion. Kommt es nun durch die nNOS-Inhibition mit L-VNIO zu einem zu starken Absinken der NO-Spiegel, fehlen die positiven Eigenschaften des NO, und es resultiert eine verschlechterte LV-Funktion. Dies begründet auch, warum der Effekt bei den eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren deutlicher ausfällt, denn hier sind durch den Ausfall der gesamten cNOS noch niedrigere NO-Spiegel zu erwarten.

### **4.4. NO als potenter Modulator der inflammatorischen Antwort**

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Sepsisinduktion in einer vermehrten Infiltration von neutrophilen Granulozyten (PMN), Monozyten und Lymphozyten resultiert. Diese Infiltration wird generell durch die medikamentöse iNOS-Blockade abgemildert. Sie ist für die PMN und Monozyten in WT-Mäusen stärker ausgeprägt, als in den eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren, die Lymphozyteninfiltration ist jedoch bemerkenswerter Weise in den eNOS defizienten Tieren höher.

Durch frühzeitige Aktivität von Entzündungszellen im Herzmuskelgewebe kommt es im Rahmen der Sepsis zu einer kardialen Dysfunktion<sup>75</sup>. So führt die unkontrollierte Aktivierung und Infiltration von Leukozyten zu einer vermehrten Freisetzung zytotoxischer Mediatoren wie Proteasen und reaktiver Sauerstoffspezies<sup>157</sup>. Der direkte Zellschaden, sowie eine vermehrte Zytokinfreisetzung, wie zum Beispiel von TNF- $\alpha$ , resultieren in Gewebeschaden, myokardialer Depression und letztendlich multiplem Organversagen<sup>14,75</sup>.

Die inflammatorische Reaktion während einer Sepsis muss jedoch insgesamt als zweischneidiges Schwert bezeichnet werden. Den negativen Auswirkungen einer überschießenden Entzündungsreaktion steht die Eradikation pathogener Keime gegenüber. So existieren Studien, die belegen, dass eine Therapie mit dem Granulozyten stimulierenden Zytokin G-CSF die Anzahl und Funktion von neutrophilen Granulozyten steigert, die Bakterien- und Endotoxinlast senkt und somit zu einer gesteigerten Überlebensrate führt<sup>158,159</sup>. Ebenso konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit schwerer Sepsis eine gestörte Migration neutrophiler Granulozyten auftritt und diese direkt mit einer höheren Bakteriämie und schlechterem Outcome assoziiert ist<sup>74</sup>.

Neben den granulozytären- ist auch die lymphozytäre Funktion essentiell für Immunabwehr im Rahmen der Sepsis. Hotchkiss et al. konnten an Hand eines murinen CLP-Sepsismodells zeigen, dass die Inhibition der Apoptose von Lymphozyten, wie sie während einer Sepsis vermehrt auftritt, zu einem klaren Überlebensvorteil führt<sup>160,161</sup>.

Stickstoffmonoxid stellt auch für die Inflammation während der Sepsis ein entscheidendes Molekül dar.

Es wird in vielen Zellen des Immunsystems produziert, so auch in den von uns untersuchten Zelllinien. Zudem reguliert es ebenso deren Funktion<sup>162</sup>.

Weiterhin bildet NO aus Entzündungszellen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffintermediate, die in der Lage sind, pathogene Zellen zu zerstören<sup>163,164</sup>.

Ebenso ist bekannt, dass NO die Proliferation von B- und T-Lymphozyten hemmen kann<sup>162,165,166</sup>. Dies geschieht über die Regulation von Caspasen<sup>167</sup> und eine IFN $\gamma$ -induzierte Apoptose<sup>168</sup>.

Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Infiltrationsrate von Entzündungszellen ins Gewebe als Teil der inflammatorischen Reaktion ist bisher nicht abschließend geklärt. Auf der einen Seite führt die Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie P- und E-Selektin, VCAM-1 sowie ICAM-1 durch NO zu verminderter Adhäsion und Migration von Entzündungszellen<sup>73,74</sup>. So beobachteten Benjamin et al. bei CLP-operierten Mäusen eine gestörte Migration neutrophiler Granulozyten mit konsekutiv hoher

Letalität, iNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen dieses Migrationsdefizit jedoch nicht auf

Auf der anderen Seite allerdings, ist die reduzierte inflammatorische Reaktion bei fehlender iNOS-Aktivität -und damit niedrigeren NO-Spiegeln- wie in unseren Ergebnissen dargestellt, in der Literatur sowohl für die medikamentöse iNOS Inhibition<sup>169</sup>, als auch für die genetische iNOS Defizienz<sup>170-172</sup> belegt und zum Teil durch eine reduzierte E- und P-Selektin Expression erklärt<sup>172</sup>.

Jedoch liegen auch hier Evidenzen vor, dass sich eine iNOS Defizienz negativ auf die Eradikation von Pathogenen auswirken kann. So sind iNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse nach LPS-Injektion zwar vor einem septischen Schock geschützt, nicht jedoch in der Lage, die Replikation von *Listeria monocytogenes* zu hemmen<sup>173</sup>. In der Studie von Benjamin et al. war die Mortalität der iNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse trotz reduziertem Migrationsdefizit sehr hoch, was auf eine verminderte bakterizide Funktion der neutrophilen Granulozyten bei fehlender NO-Produktion zurückgeführt wurde. Unterstützt wurde diese These durch die Feststellung einer hoch signifikant erhöhten Anzahl lebender Bakterien in der Peritonealhöhle der iNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse<sup>174</sup>.

Die Ergebnisse der eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen, dass es hier, im Gegensatz zu der WT-Gruppe, zu einer verminderten Infiltration von neutrophilen Granulozyten

und Monozyten kommt. Dies korreliert mit den Ergebnissen der erwähnten iNOS<sup>-/-</sup> Studien, steht aber im Kontrast zu anderen Studien, welche dem eNOS generierten NO eine anti-inflammatorische Wirkung zusprechen<sup>175-177</sup>.

Die höhere Lymphozytenzahl im Gewebe der septischen eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse gegenüber den Wildtypen, könnte in der bereits erwähnten Hemmung der Lymphozytenproliferation durch NO begründet liegen. Die eNOS defizienten Tiere weisen dauerhaft eine verminderte NO Produktion auf, was zu einer stärkeren Lymphozytenproliferation und letztendlich Infiltration in das Herzgewebe führt. Bei der akuten Senkung der NO Produktion durch die medikamentöse iNOS-Inhibition wäre hingegen ein Überwiegen der kurzfristigen Effekte gegenüber dem Langzeiteffekt der Proliferationssteigerung denkbar.

Weiterhin könnte die Entkopplung der endothelialen NO-Synthese durch Aktivierung des Immunsystems mit konsekutiver Generation von zytotoxischen Superoxid-Anionen eine Rolle spielen<sup>65,66</sup>.

Insgesamt liegen die Vorteile der eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse hier also in einem geringeren Zellschaden durch reaktive Sauerstoffspezies aus aktivierten Leukozyten und eNOS eigener Generation, sowie verbesserter Pathogeneradikation bei gesteigerter Lymphozytenfunktion.

Die Bedeutung der neuronalen NO Synthese für die Entzündungsreaktion in der Sepsis ist bisher weitgehend ungeklärt.

Daten von Sanz et al. zeigen, dass in einem nicht entzündlichen Setting die eNOS eine dominante Rolle für das Rolling und die Adhäsion von Leukozyten spielt, die nNOS jedoch in der Lage ist, diese Rolle in eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen weitgehend zu übernehmen. Dies unterstreicht auch die gesteigerte nNOS-Expression in Gehirn und Skelettmuskulatur von eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren<sup>178</sup>.

Unsere Ergebnisse der NO<sub>x</sub>-Spiegel belegen zudem die bedeutende Rolle der nNOS für die Produktion von NO in septischen Tieren (*siehe 4.2.*). Da NO, wie bereits erläutert, regulierend auf die Proliferation und Funktion inflammatorischer Zellen wirkt und an der Bildung von Pathogen abtötenden Intermediaten beteiligt ist, ist von einer bedeutenden Rolle der nNOS für die Entzündungsreaktion in der Sepsis auszugehen.

#### **4.5. Sepsis führt in eNOS Knockout Mäusen nicht zu einer vermehrten iNOS Expression**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die iNOS Expressionsrate in der WT-Gruppe durch Sepsisinduktion um 16% anstieg, während es bei eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen zu keiner signifikanten Veränderung kam.

Diese Erkenntnisse sind kongruent zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppen um Connelly und Vo. Connelly et al. konnten zunächst eine reduzierte iNOS Proteinexpression in LPS stimulierten Makrophagen von eNOS defizienten Mäusen nachweisen<sup>179</sup>. Später gelang auch der in vivo Nachweis einer geringeren iNOS Expression in Geweben von LPS behandelten eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen<sup>80</sup>. Vo et al. wiesen den Einfluss von endotheliale NO auf die Regulation der iNOS-Expression nach LPS Stimulation in isolierten Aorta-Ringen von Ratten mit und ohne endotheliale Überzug nach<sup>81</sup>.

Diese Arbeiten gehen von einer NF-κB medierte Genregulation aus und sprechen dem endotheliale NO eine pro-inflammatorische Bedeutung im Sinne einer Induktion der iNOS Expression zu.

Weitere Studien belegen grundsätzlich die gesteigerte iNOS Expression während Endotoxinschock oder Sepsis<sup>42,43,180,181</sup>.

Im Gegensatz dazu konnten Grandel et al. in, mit Staphylococcus aureus Toxin perfundierten Rattenherzen keine Anstieg der iNOS mRNA feststellen<sup>71</sup>.

Andere Arbeiten konnten nach LPS Gabe in Schweinen einen Anstieg der iNOS Expression in der Leber, jedoch nicht im Herzgewebe nachweisen<sup>153,182</sup>.

Die vorliegende Arbeit zeigt die eNOS-abhängige Induktion der iNOS Expression im Herzgewebe nun zum ersten Mal in vivo für ein polymikrobielles Sepsismodell und trägt dazu bei, die Lücke in der Literatur diesbezüglich zu schließen.

#### 4.6. NOS-Inhibition: Ein geeigneter Ansatz zur Senkung der Mortalität septischer Patienten?

Unsere Ergebnisse zusammenfassend sei noch einmal erwähnt, dass die eNOS defizienten Tiere eine signifikant höhere Überlebensrate als WT-Tiere zeigten. Letztere profitierten von der Gabe der selektiven iNOS- und nNOS-Inhibitoren, eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere verschlechterten sich unter deren Applikation jedoch deutlich bis auf das Niveau der Wildtypen.

Für das bessere mittlere Überleben der eNOS defizienten Tiere kommen mehrere Ursachen in Frage:

Zunächst haben die Hämodynamikdaten gezeigt, dass die eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse von der myokardialen Dysfunktion durch die Sepsis deutlich weniger betroffen waren, als die Wildtypen. Dies führt zu geringerem Blutdruckabfall in der hypodynamen Phase, verbesserter Makro- sowie Mikrozirkulation und konsekutiv geringerem Organversagen<sup>33</sup>.

Die geringeren NO<sub>x</sub>-Werte im Plasma septischer eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere lassen auf eine Vielzahl positiver Mechanismen schließen. Denkbar sind eine geringere Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion<sup>59,63</sup>, geringere Apoptoseraten<sup>67,68</sup> sowie geringerer oxidativer Stress durch verminderte Peroxynitrit Bildung und Entkopplung der eNOS<sup>65,183</sup>. Hinzu kommt die geringere Infiltration von Leukozyten in das Herzgewebe, welche ebenfalls einen akuten Zellschaden verursachen können<sup>15,184</sup>, sowie die vermehrte Infiltration von Lymphozyten, deren Funktion essentiell wichtig für das Überleben septischer Tiere ist<sup>160,161</sup>.

Der Absenkung der pathologisch hohen NO-Konzentration mit den genannten negativen Folgen kann auch die bessere Überlebensrate der septischen Wildtypmäuse nach iNOS- und nNOS-Inhibition zugeschrieben werden.

Das Stickstoffmonoxid jedoch nicht nur negative Auswirkungen hat und in physiologischen Konzentrationen essentiell für die Homöostase des Organismus ist, zeigen die erhöhten Sterberaten von eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren durch die zusätzliche medikamentöse NOS-Inhibition. Durch den überwiegenden Ausfall der NO-Synthasen in diesen Tieren ist eine subphysiologische NO-Konzentration zu erwarten. Stickstoffmonoxid wirkt sich jedoch in

physiologischen Dosen positiv auf die myokardiale Kontraktion<sup>58,145</sup> und die Apoptosehemmung<sup>67</sup> aus.

Da Stickstoffmonoxid, wie bereits dargelegt, ein potenter Regulator der Hämodynamik und Immunantwort, sowie in hohen Dosen zytotoxisch ist und zudem im Rahmen der Sepsis vermehrt gebildet wird, liegt es auf der Hand, die NO-Synthasen als therapeutisches Ziel zu betrachten.

Die Effekte auf die Gesamtmortalität in präklinischen Studien sind jedoch sehr unterschiedlich und eher enttäuschend. Kilbourn et al. haben in einem systematischen Review die positiven und negativen Effekte von 46 Tierversuchsstudien zusammengestellt. In acht Studien konnte die Gesamtmortalität durch NOS-Inhibition verbessert werden. Zwei Studien wiesen keine Veränderung der Mortalitätsrate auf und fünf Studien zeigten sogar eine vermehrte Sterblichkeit. Der Großteil der Studien verwendete Nagetiere und das LPS-Modell zusammen mit einer unselektiven NOS-Blockade<sup>185</sup>.

Studien zur Mortalität septischer Tiere unter selektiver nNOS-Inhibition existierten bisher nicht.

Die einzige klinische randomisierte Placebo-kontrollierte Phase III Doppelblindstudie zur NO-Synthase Hemmung septischer Patienten mittels des unselektiven NOS-Inhibitors L-N<sup>G</sup>-Methyl-Arginin-Hydrochlorid (L-NMMA) wurde auf Grund einer erhöhten Mortalitätsrate abgebrochen. An dieser Studie waren weltweit 124 Intensivstationen beteiligt und es wurden 797 Patienten mit septischem Schock eingeschlossen. Nach 28 Tagen zeigte sich jedoch eine Mortalitätsrate von 59% in der Verum-Gruppe gegenüber 49% in der Placebo-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Zwar sank die Anzahl der Todesfälle durch multiples Organversagen, aber ausgerechnet überproportional viele kardiovaskulär bedingte Todesfälle führten zu der insgesamt erhöhten Sterblichkeit<sup>95</sup>.

Die möglichen Ursachen für die divergierenden Ergebnisse innerhalb der Studien sind zahlreich. Einen Einfluss könnte die Auswahl der verwendeten Spezies und des Sepsismodells haben (siehe 4.1.), zudem die Selektivität, Applikationszeitpunkt, Applikationsform und Dosis des NOS-Inhibitors, sowie die Tatsache, dass es kaum Tierversuchsstudien mit begleitenden

Therapiemaßnahmen (Herdsanierung, Antibiotika, Volumensubstitution, Vasopressoren, etc.) gibt, wie sie im klinischen Setting verwendet werden.

So zeigt die NOS-Inhibition zwar teilweise vielversprechende Ergebnisse in präklinischen Studien, kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht als echte Therapieoption für Patienten mit einer Sepsis angesehen werden. Vor allem die nicht selektive NOS-Inhibition muss als klinisch gescheitert betrachtet werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Stickstoffmonoxid vermittelten Auswirkungen auf die septische Hämodynamik in einem murinen CLP-Modell zu untersuchen und aufzuklären, welche Bedeutung den jeweiligen NO-Synthasen in diesem Zusammenhang beizumessen ist.

Hierzu führten wir an Wildtyp- und eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen mit und ohne selektive Blockade der induzierbaren und neuronalen NO-Synthase folgende Versuche durch:

Um die Bildung von Stickstoffmonoxid zu quantifizieren erfolgten basal und nach Sepsisinduktion eine Messung der Nitrit- und Nitratspiegel im Plasma und Herzwewebe. Die kardiovaskuläre Funktion wurde mittels invasiver Druck-Volumen Messung über einen Miniaturkatheter vor und nach Applikation von Noradrenalin untersucht. Um die Auswirkung von Stickstoffmonoxid auf die myokardiale Entzündungsreaktion zu messen, erfolgte eine histologische Infiltrationsanalyse von leukozytären Zellen in das Herzmuskelgewebe. Ebenso wurde mittels quantitativer RT-PCR die sepsismodulierte Expressionsrate der iNOS gemessen und an einer separaten Population die mittlere Überlebenszeit der einzelnen Versuchstiergruppen ermittelt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es in septischen Tieren zu einer starken Erhöhung der Plasma NO<sub>x</sub>-Spiegel sowie der inflammatorischen Reaktion des Herzmuskels kam. Dies führte im Folgenden zu einer ausgeprägten kardiovaskulären Dysfunktion mit Katecholaminresistenz, welche letztendlich für eine Mortalitätsrate von 100% und eine mittlere Überlebenszeit von nur 29 Stunden verantwortlich war. Die Expressionsrate der induzierbaren NO-Synthase stieg durch Sepsisinduktion an.

Die hochselektive iNOS-Blockade bewirkte eine Reduktion der Plasma-NO<sub>x</sub>-Spiegel und auch der inflammatorischen Zellinfiltration in den Herzmuskel. Hierunter blieb die kardiale Funktion weitgehend erhalten und auch die mittlere Überlebenszeit der Wildtypen wurde in etwa verdoppelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die iNOS einen entscheidenden Anteil an der NO-Produktion und kardiovaskulären Dysfunktion im Zuge einer Sepsis hat.

Die Hemmung der nNOS führte sogar zu einer noch größeren Reduktion der NO<sub>x</sub>-Werte, jedoch überraschenderweise nicht zu einer verbesserten sondern

reduzierten LV-Funktion. Dies prägte sich besonders bei den eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen aus. Auch die mittlere Überlebenszeit der inhibierten WT-Tiere stieg nur auf 38 Stunden an und lag damit deutlich unter der von den iNOS inhibierten Tieren. Dies zeigt, dass die nNOS zum einen eine bisher unerwartete Bedeutung für die NO-Synthese in der Sepsis und des Weiteren eine kardioprotektive Wirkung hat. Diese beruht am ehesten auf der kardiomyozytären Lokalisation der nNOS im sarkoplasmatischen Retikulum und könnte zu den ernüchternden Resultaten der unselektiven NOS-Inhibition als Therapieansatz bei septischem Schock beigetragen haben.

Die besten Ergebnisse erzielten in allen Versuchsreihen die eNOS<sup>-/-</sup>-Tiere. Diese wiesen im Vergleich zu den medikamentös blockierten Tieren die niedrigsten NO<sub>x</sub>-Werte sowie die geringste inflammatorische Beeinträchtigung auf und waren daher vor myokardialer Depression und Katecholaminresistenz geschützt. Dies spiegelte sich auch in der längsten Überlebensdauer mit einem mittleren Überleben von 69,5 Stunden wider. Die fehlende Steigerung der iNOS Expressionsrate in septischen eNOS<sup>-/-</sup>-Tieren ist mit einer pro-inflammatorischen, regulativen Funktion der endothelialen NO-Synthese die iNOS betreffend vereinbar. Die Hemmung sowohl der induzierbaren, als auch der neuronalen NO-Synthase in eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen führte in den Überlebensversuchen zu keiner weiteren Zunahme der mittleren Überlebenszeit. Dies zeigt, dass eine übermäßige Inhibition der NO-Synthasen mit konsekutiv subphysiologischen NO-Werten negative Auswirkung auf die Überlebensdauer haben kann. Der Hintergrund könnte hierbei im Fehlen der ebenso vorhandenen positiven Wirkungen des Stickstoffmonoxids auf die kardiale Funktion sowie in verminderten NO mediierten bakteriziden Effekten liegen.

Insgesamt zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass eine NOS Inhibition als Therapie für den septischen Schock nur dann erfolgversprechend sein kann, wenn sie hochselektiv ist und die positiven Effekte von Stickstoffmonoxid nicht supprimiert. Im klinischen Einsatz ist zusätzlich der Zeitpunkt der Therapieinitiierung in Relation zur pathophysiologischen Phase der Sepsis von entscheidender Bedeutung.

Der Nachweis der zentralen Rolle der endothelialen NO-Synthase in unseren Versuchen legt eine selektive eNOS-Inhibition, zumindest in frühen Sepsis Phasen, als Therapieversuch nahe. Hierzu bedarf es im Vorfeld allerdings weiterer präklinischer Studien.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Lever A., Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ*: 2007; 335(7625): 879–883
- [2] Schottmüller H. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verh Dtsch Ges Inn Med*: 1914; 32: 257
- [3] Bone R.C., Fisher C.J., Clemmer T.P., Slotman G.J., Metz C.A., Balk R.A. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med*: 1989; 17(5): 389–393
- [4] Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*: 1992; 101(6): 1644–1655
- [5] Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G., S. S.C.C.M.S.I.C.M.C.C.P.T.S.I. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*: 2003; 31(4): 1250–1256
- [6] Reinhart K., Brunkhorst F., Bone H., 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., für Intensiv-und Notfallmedizin (DIVI) D.I.V., e.V. (DSG) D.S.G. [Diagnosis and therapy of sepsis. Guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine]. *Internist (Berl)*: 2006; 47(4): 356, 358–60, 362–8, passim

- [7] Uzzan B., Cohen R., Nicolas P., Cucherat M., Perret G.Y. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*: 2006; 34(7): 1996–2003
- [8] Wunder C., Eichelbrönner O., Roewer N. Are IL-6, IL-10 and PCT plasma concentrations reliable for outcome prediction in severe sepsis? A comparison with APACHE III and SAPS II. *Inflamm Res*: 2004; 53(4): 158–163
- [9] Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*: 2003; 348(16): 1546–1554
- [10] Engel C., Brunkhorst F.M., Bone H.G., Brunkhorst R., Gerlach H., Grond S., Gruendling M., Huhle G., Jaschinski U., John S., Mayer K., Oppert M., Olthoff D., Quintel M., Ragaller M., Rossaint R., Stuber F., Weiler N., Welte T., Bogatsch H., Hartog C., Loeffler M., Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*: 2007; 33(4): 606–618
- [11] Bauer M., Brunkhorst F., Welte T., Gerlach H., Reinhart K. [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist*: 2006; 55(8): 835–845
- [12] Moerer O., Schmid A., Hofmann M., Herklotz A., Reinhart K., Werdan K., Schneider H., Burchardi H. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med*: 2002; 28(10): 1440–1446
- [13] Moerer O., Burchardi H. [The cost of sepsis]. *Anaesthesist*: 2006; 55 Suppl 1: 36–42

- [14] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*: 2002; 420(6917): 885–891
- [15] Hotchkiss R.S., Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*: 2003; 348(2): 138–150
- [16] Marchetti O., Bille J., Fluckiger U., Eggimann P., Ruef C., Garbino J., Calandra T., Glauser M.P., Täuber M.G., Pittet D., of Switzerland F.I.N. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis*: 2004; 38(3): 311–320
- [17] Vincent J.L., Sakr Y., Sprung C.L., Ranieri V.M., Reinhart K., Gerlach H., Moreno R., Carlet J., Gall J.R.L., Payen D., in Acutely Ill Patients Investigators S.O. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*: 2006; 34(2): 344–353
- [18] Bochud P.Y., Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ*: 2003; 326(7383): 262–266
- [19] Janeway C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*: 2002; 20: 197–216
- [20] Huang B., Zhao J., Unkeless J.C., Feng Z.H., Xiong H. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene*: 2008; 27(2): 218–224
- [21] Alexander C., Rietschel E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*: 2001; 7(3): 167–202
- [22] Park J.H., Kim Y.G., Shaw M., Kanneganti T.D., Fujimoto Y., Fukase K., Inohara N., Núñez G. Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol*: 2007; 179(1): 514–521

- [23] Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med*: 2007; 22(2): 63–72
- [24] Sriskandan S., Altmann D.M. The immunology of sepsis. *J Pathol*: 2008; 214(2): 211–223
- [25] Munford R.S., Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med*: 2001; 163(2): 316–321
- [26] Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E., Schmieg R.E., Hui J.J., Chang K.C., Osborne D.F., Freeman B.D., Cobb J.P., Buchman T.G., Karl I.E. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*: 2001; 166(11): 6952–6963
- [27] Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E., Grayson M.H., Osborne D.F., Wagner T.H., Cobb J.P., Coopersmith C., Karl I.E. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol*: 2002; 168(5): 2493–2500
- [28] Schouten M., Wiersinga W.J., Levi M., van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*: 2008; 83(3): 536–545
- [29] Levi M., Cate H.T. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*: 1999; 341(8): 586–592
- [30] Hörner C., Bouchon A., Bierhaus A., Nawroth P.P., Martin E., Bardenheuer H.J., Weigand M.A. [Role of the innate immune response in sepsis]. *Anaesthesist*: 2004; 53(1): 10–28

- [31] Kinasewitz G.T., Yan S.B., Basson B., Comp P., Russell J.A., Cariou A., Um S.L., Utterback B., Laterre P.F., Dhainaut J.F., Group P.R.O.W.E.S.S.S.S. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. *Crit Care*: 2004; 8(2): R82–R90
- [32] Singh S., Evans T.W. Organ dysfunction during sepsis. *Intensive Care Med*: 2006; 32(3): 349–360
- [33] Abraham E., Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*: 2007; 35(10): 2408–2416
- [34] Müller-Werdan U., Werdan K. [End-organ damage in inflammation and sepsis]. *Internist (Berl)*: 2003; 44(7): 864–871
- [35] Marshall J.C. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*: 2001; 29(7 Suppl): S99–106
- [36] Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*: 1980; 288(5789): 373–376
- [37] Murad F., Waldman S., Molina C., Bennett B., Leitman D. Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res*: 1987; 249: 65–76
- [38] Furchgott R.F., Vanhoutte P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*: 1989; 3(9): 2007–2018

- [39] Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 1987; 84(24): 9265–9269
- [40] Leone A.M., Palmer R.M., Knowles R.G., Francis P.L., Ashton D.S., Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem*: 1991; 266(35): 23790–23795
- [41] Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*: 2001; 357(Pt 3): 593–615
- [42] Preiser J.C., Zhang H., Vray B., Hrabak A., Vincent J.L. Time course of inducible nitric oxide synthase activity following endotoxin administration in dogs. *Nitric Oxide*: 2001; 5(2): 208–211
- [43] Lanone S., Mebazaa A., Heymes C., Henin D., Poderoso J.J., Panis Y., Zedda C., Billiar T., Payen D., Aubier M., Boczkowski J. Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Respir Crit Care Med*: 2000; 162(6): 2308–2315
- [44] Kirkebøen K.A., Strand O.A. The role of nitric oxide in sepsis—an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*: 1999; 43(3): 275–288
- [45] Elfering S.L., Sarkela T.M., Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*: 2002; 277(41): 38079–38086
- [46] Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T., Lauer T., Dejam A., Jax T., Kumara I., Gharini P., Kabanova S., Ozüyan B., Schnürch H.G., Gödecke A., Weber A.A., Robenek M., Robenek H., Bloch W., Rösen P., Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*: 2006; 107(7): 2943–2951

- [47] López L.C., Escames G., Tapias V., Utrilla P., León J., Acuña-Castroviejo D. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*: 2006; 38(2): 267–278
- [48] Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*: 1999; 1411(2-3): 273–289
- [49] Lundberg J.O., Weitzberg E., Gladwin M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*: 2008; 7(2): 156–167
- [50] Rassaf T., Bryan N.S., Kelm M., Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med*: 2002; 33(11): 1590–1596
- [51] Beckman J.S., Koppenol W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*: 1996; 271(5 Pt 1): C1424–C1437
- [52] Vincent J.L., Zhang H., Szabo C., Preiser J.C. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*: 2000; 161(6): 1781–1785
- [53] Hofmann F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*: 2005; 280(1): 1–4
- [54] Ko E.A., Han J., Jung I.D., Park W.S. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*: 2008; 44(2): 65–81
- [55] Fernandes D., Assreuy J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock*: 2008; 30 Suppl 1: 10–13

- [56] Merx M.W., Weber C. Sepsis and the heart. *Circulation*: 2007; 116(7): 793–802
- [57] Parrillo J.E., Parker M.M., Natanson C., Suffredini A.F., Danner R.L., Cunnion R.E., Ognibene F.P. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med*: 1990; 113(3): 227–242
- [58] Rassaf T., Poll L.W., Brouzos P., Lauer T., Totzeck M., Kleinbongard P., Gharini P., Andersen K., Schulz R., Heusch G., Mödder U., Kelm M. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur Heart J*: 2006; 27(14): 1699–1705
- [59] Kelm M., Schäfer S., Dahmann R., Dolu B., Perings S., Decking U.K., Schrader J., Strauerj B.E. Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. *Cardiovasc Res*: 1997; 36(2): 185–194
- [60] Shah A.M., Spurgeon H.A., Sollott S.J., Talo A., Lakatta E.G. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca<sup>2+</sup> in intact cardiac myocytes. *Circ Res*: 1994; 74(5): 970–978
- [61] Fischmeister R., Hartzell H.C. Cyclic AMP phosphodiesterases and Ca<sup>2+</sup> current regulation in cardiac cells. *Life Sci*: 1991; 48(25): 2365–2376
- [62] Wahler G.M., Dollinger S.J. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol*: 1995; 268(1 Pt 1): C45–C54
- [63] Brealey D., Brand M., Hargreaves I., Heales S., Land J., Smolenski R., Davies N.A., Cooper C.E., Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*: 2002; 360(9328): 219–223

- [64] Belcher E., Mitchell J., Evans T. Myocardial dysfunction in sepsis: no role for NO? *Heart*. 2002; 87(6): 507–509
- [65] Rabelink T.J., Luscher T.F. Endothelial nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*: 2006; 26(2): 267–271
- [66] Förstermann U., Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*: 2006; 113(13): 1708–1714
- [67] Kim Y.M., Bombeck C.A., Billiar T.R. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res*: 1999; 84(3): 253–256
- [68] Kawaguchi H., Shin W.S., Wang Y., Inukai M., Kato M., Matsuo-Okai Y., Sakamoto A., Uehara Y., Kaneda Y., Toyooka T. In vivo gene transfection of human endothelial cell nitric oxide synthase in cardiomyocytes causes apoptosis-like cell death. Identification using Sendai virus-coated liposomes. *Circulation*: 1997; 95(10): 2441–2447
- [69] Kelly R.A., Balligand J.L., Smith T.W. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*: 1996; 79(3): 363–380
- [70] Cunnion R.E., Schaer G.L., Parker M.M., Natanson C., Parrillo J.E. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation*: 1986; 73(4): 637–644
- [71] Grandel U., Sibelius U., Schrickel J., Schmidt D., Buerke M., Fink L., Bournelis E., Heep M., Mayer K., Bohle R.M., Seeger W., Grimminger F. Biosynthesis of constitutive nitric oxide synthase-derived nitric oxide attenuates coronary vasoconstriction and myocardial depression in a model of septic heart failure induced by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Crit Care Med*: 2001; 29(1): 1–7

- [72] Vegh A., Papp J.G., Szekeres L., Parratt J.R. Prevention by an inhibitor of the L-arginine-nitric oxide pathway of the antiarrhythmic effects of bradykinin in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol*: 1993; 110(1): 18–19
- [73] Adams M.R., Jessup W., Hailstones D., Celermajer D.S. L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. *Circulation*: 1997; 95(3): 662–668
- [74] Alves-Filho J.C., de Freitas A., Spiller F., Souto F.O., Cunha F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*: 2008; 30 Suppl 1: 3–9
- [75] Tavener S.A., Kubes P. Cellular and molecular mechanisms underlying LPS-associated myocyte impairment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: 2006; 290(2): H800–H806
- [76] Price S., Anning P.B., Mitchell J.A., Evans T.W. Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications. *Eur Heart J*: 1999; 20(10): 715–724
- [77] Lorente J.A., Landín L., Pablo R.D., Renes E., Liste D. L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med*: 1993; 21(9): 1287–1295
- [78] Landry D.W., Oliver J.A. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*: 2001; 345(8): 588–595
- [79] Ullrich R., Scherrer-Crosbie M., Bloch K.D., Ichinose F., Nakajima H., Picard M.H., Zapol W.M., Quezado Z.M. Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice. *Circulation*: 2000; 102(12): 1440–1446

- [80] Connelly L., Madhani M., Hobbs A.J. Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo. *J Biol Chem*: 2005; 280(11): 10040–10046
- [81] Vo P.A., Lad B., Tomlinson J.A.P., Francis S., Ahluwalia A. autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. *J Biol Chem*: 2005; 280(8): 7236–7243
- [82] Ichinose F., Buys E.S., Neilan T.G., Furutani E.M., Morgan J.G., Jassal D.S., Graveline A.R., Searles R.J., Lim C.C., Kaneki M., Picard M.H., Scherrer-Crosbie M., Janssens S., Liao R., Bloch K.D. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 prevents myocardial dysfunction in murine models of septic shock. *Circ Res*: 2007; 100(1): 130–139
- [83] Yamashita T., Kawashima S., Ohashi Y., Ozaki M., Ueyama T., Ishida T., Inoue N., Hirata K., Akita H., Yokoyama M. Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*: 2000; 101(8): 931–937
- [84] Schuerholz T., Marx G. Management of sepsis. *Minerva Anesthesiol*: 2008; 74(5): 181–195
- [85] Garnacho-Montero J., Garcia-Garmendia J.L., Barrero-Almodovar A., Jimenez-Jimenez F.J., Perez-Paredes C., Ortiz-Leyba C. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Crit Care Med*: 2003; 31(12): 2742–2751
- [86] Leibovici L., Shraga I., Drucker M., Konigsberger H., Samra Z., Pitlik S.D. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med*: 1998; 244(5): 379–386

- [87] Riedemann N.C., Guo R.F., Ward P.A. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*: 2003; 9(5): 517–524
- [88] Annane D., Sébille V., Charpentier C., Bollaert P.E., François B., Korach J.M., Capellier G., Cohen Y., Azoulay E., Troché G., Chaumet-Riffaut P., Chaumet-Riffaut P., Bellissant E. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*: 2002; 288(7): 862–871
- [89] Bernard G.R., Vincent J.L., Laterre P.F., LaRosa S.P., Dhainaut J.F., Lopez-Rodriguez A., Steingrub J.S., Garber G.E., Helterbrand J.D., Ely E.W., Fisher C.J., human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group R. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*: 2001; 344(10): 699–709
- [90] Kumar A., Brar R., Wang P., Dee L., Skorupa G., Khadour F., Schulz R., Parrillo J.E. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol*: 1999; 276(1 Pt 2): R265–R276
- [91] Klabunde R.E., Ritger R.C. NG-monomethyl-L-arginine (NMA) restores arterial blood pressure but reduces cardiac output in a canine model of endotoxic shock. *Biochem Biophys Res Commun*: 1991; 178(3): 1135–1140
- [92] Cobb J.P., Natanson C., Hoffman W.D., Lodato R.F., Banks S., Koev C.A., Solomon M.A., Elin R.J., Hosseini J.M., Danner R.L. N omega-amino-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake canines challenged with endotoxin. *J Exp Med*: 1992; 176(4): 1175–1182

- [93] Träger K., Radermacher P., Rieger K.M., Grover R., Vlaten A., Iber T., Adler J., Georgieff M., Santak B. Norepinephrine and N(G)-monomethyl-L-arginine in hyperdynamic septic shock in pigs: effects on intestinal oxygen exchange and energy balance. *Crit Care Med*: 2000; 28(6): 2007–2014
- [94] Watson D., Grover R., Anzueto A., Lorente J., Smithies M., Bellomo R., Guntupalli K., Grossman S., Donaldson J., Gall J.R.L., Group G.W.I.S.S.S. Cardiovascular effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) in patients with septic shock: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med*: 2004; 32(1): 13–20
- [95] López A., Lorente J.A., Steingrub J., Bakker J., McLuckie A., Willatts S., Brockway M., Anzueto A., Holzapfel L., Breen D., Silverman M.S., Takala J., Donaldson J., Arneson C., Grove G., Grossman S., Grover R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med*: 2004; 32(1): 21–30
- [96] Matejovic M., Radermacher P., Tugtekin I., Stehr A., Theisen M., Vogt J., Wachter U., Ploner F., Georgieff M., Träger K. Effects of selective iNOS inhibition on gut and liver O<sub>2</sub>-exchange and energy metabolism during hyperdynamic porcine endotoxemia. *Shock*: 2001; 16(3): 203–210
- [97] Matejovic M., Krouzecky A., Martinkova V., Rokyta R., Kralova H., Treska V., Radermacher P., Novak I. Selective inducible nitric oxide synthase inhibition during long-term hyperdynamic porcine bacteremia. *Shock*: 2004; 21(5): 458–465
- [98] Gödecke A., Decking U.K., Ding Z., Hirchenhain J., Bidmon H.J., Gödecke S., Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res*: 1998; 82(2): 186–194

- [99] Janssen B.J.A., Celle T.D., Debets J.J.M., Brouns A.E., Callahan M.F., Smith T.L. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: 2004; 287(4): H1618–H1624
- [100] Hara K., Harris R.A. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth Analg*: 2002; 94(2): 313–8, table of contents
- [101] Erhardt W., Hebestedt A., Aschenbrenner G., Pichotka B., Blümel G. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med (Berl)*: 1984; 184(3): 159–169
- [102] Karow T., Lang-Roth R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Eigenverlag: 2006
- [103] Garvey E.P., Oplinger J.A., Furfine E.S., Kiff R.J., Laszlo F., Whittle B.J., Knowles R.G. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*: 1997; 272(8): 4959–4963
- [104] Bretscher L.E., Li H., Poulos T.L., Griffith O.W. Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel N5-(iminoalkyl)- and N5-(iminoalkenyl)-ornithines. *J Biol Chem*: 2003; 278(47): 46789–46797
- [105] Babu B.R., Griffith O.W. N5-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*: 1998; 273(15): 8882–8889
- [106] Lüllmann H., Mohr K., MartinWehling. *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag: 2003

- [107] Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*: 1993; 7(2): 349–360
- [108] Fontijn A., Sabadell A.J., Ronco R.J. Homogeneous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. Implications for continuous selective monitoring of gaseous air pollutants. *Analytical Chemistry*: 1970; 42(6): 575–579
- [109] Aoki T. Continuous flow determination of nitrite with membrane separation/chemiluminescence detection. *Biomed Chromatogr*: 1990; 4(3): 128–130
- [110] Bryan N.S., Grisham M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*: 2007; 43(5): 645–657
- [111] Yamada K., Nabeshima T. Simultaneous measurement of nitrite and nitrate levels as indices of nitric oxide release in the cerebellum of conscious rats. *J Neurochem*: 1997; 68(3): 1234–1243
- [112] Hattori M.A., Nishida N., Takesue K., Kato Y., Fujihara N. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *J Mol Endocrinol*: 2000; 24(1): 65–73
- [113] Rassaf T., Feelisch M., Kelm M. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med*: 2004; 36(4): 413–422
- [114] Hendgen-Cotta U., Grau M., Rassaf T., Gharini P., Kelm M., Kleinbongard P. Reductive gas-phase chemiluminescence and flow injection analysis for measurement of the nitric oxide pool in biological matrices. *Methods Enzymol*: 2008; 441: 295–315

- [115] Feelisch M., Rassaf T., Mnaimneh S., Singh N., Bryan N.S., Jourdain D., Kelm M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J*: 2002; 16(13): 1775–1785
- [116] Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res*: 1996; 6(10): 986–994
- [117] Nahra R., Dellinger R.P. Targeting the lipopolysaccharides: still a matter of debate? *Curr Opin Anaesthesiol*: 2008; 21(2): 98–104
- [118] Abraham E., Anzueto A., Gutierrez G., Tessler S., Pedro G.S., Wunderink R., Nogare A.D., Nasraway S., Berman S., Cooney R., Levy H., Baughman R., Rumbak M., Light R.B., Poole L., Allred R., Constant J., Pennington J., Porter S. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet*. 1998; 351(9107): 929–933
- [119] Opal S.M., Fisher C.J., Dhainaut J.F., Vincent J.L., Brase R., Lowry S.F., Sadoff J.C., Slotman G.J., Levy H., Balk R.A., Shelly M.P., Pribble J.P., LaBrecque J.F., Lookabaugh J., Donovan H., Dubin H., Baughman R., Norman J., DeMaria E., Matzel K., Abraham E., Seneff M. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med*: 1997; 25(7): 1115–1124

- [120] Dhainaut J.F., Tenailon A., Hemmer M., Damas P., Tulzo Y.L., Radermacher P., Schaller M.D., Sollet J.P., Wolff M., Holzapfel L., Zeni F., Vedrinne J.M., de Vathaire F., Gourlay M.L., Guinot P., Mira J.P. Confirmatory platelet-activating factor receptor antagonist trial in patients with severe gram-negative bacterial sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. BN 52021 Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med*: 1998; 26(12): 1963–1971
- [121] de Figueiredo L.F.P., Garrido A.G., Nakagawa N., Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*: 2008; 30 Suppl 1: 53–59
- [122] Brandtzaeg P., Kierulf P., Gaustad P., Skulberg A., Bruun J.N., Halvorsen S., Sørensen E. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis*: 1989; 159(2): 195–204
- [123] Casey L.C., Balk R.A., Bone R.C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*: 1993; 119(8): 771–778
- [124] Buras J.A., Holzmann B., Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*: 2005; 4(10): 854–865
- [125] Remick D.G., Newcomb D.E., Bolgos G.L., Call D.R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*: 2000; 13(2): 110–116
- [126] Wichterman K.A., Baue A.E., Chaudry I.H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*: 1980; 29(2): 189–201

- [127] Fink M.P., Heard S.O. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*: 1990; 49(2): 186–196
- [128] Singleton K.D., Wischmeyer P.E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res*: 2003; 35(6): 486–491
- [129] Wang P., Chaudry I.H. A Single Hit Model of Polymicrobial Sepsis: Cecal Ligation and Puncture. *Sepsis*: 1998; 2: 227–233
- [130] Zhou M., Wang P., Chaudry I.H. Cardiac contractility and structure are not significantly compromised even during the late, hypodynamic stage of sepsis. *Shock*: 1998; 9(5): 352–358
- [131] Merx M.W., Liehn E.A., Graf J., van de Sandt A., Schaltenbrand M., Schrader J., Hanrath P., Weber C. Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation*: 2005; 112(1): 117–124
- [132] Nussler A.K., Bruckner U.B., Vogt J., Radermacher P. Measuring end products of nitric oxide in vivo. *Methods Enzymol*: 2002; 359: 75–83
- [133] Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol*: 1997; 29(2): 159–166
- [134] Fernandes C.J., Akamine N., Knobel E. Myocardial depression in sepsis. *Shock*: 2008; 30 Suppl 1: 14–17
- [135] Pullamsetti S.S., Maring D., Ghofrani H.A., Mayer K., Weissmann N., Rosengarten B., Lehner M., Schudt C., Boer R., Grimminger F., Seeger W., Schermuly R.T. Effect of nitric oxide synthase (NOS) inhibition on macro- and microcirculation in a model of rat endotoxic shock. *Thromb Haemost*: 2006; 95(4): 720–727

- [136] Okamoto I., Abe M., Shibata K., Shimizu N., Sakata N., Katsuragi T., Tanaka K. Evaluating the role of inducible nitric oxide synthase using a novel and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in septic lung injury produced by cecal ligation and puncture. *Am J Respir Crit Care Med*: 2000; 162(2 Pt 1): 716–722
- [137] Chauhan S.D., Seggara G., Vo P.A., Macallister R.J., Hobbs A.J., Ahluwalia A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB J*: 2003; 17(6): 773–775
- [138] Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*: 1991; 43(2): 109–142
- [139] Enkhbaatar P., Lange M., Nakano Y., Hamahata A., Joncam C., Wang J., Jaroch S., Traber L., Herndon D., Traber D. Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Ovine Sepsis Model. *Shock*: 2008; 11: [Epub ahead of print]
- [140] Gocan N.C., Scott J.A., Tymk K. Nitric oxide produced via neuronal NOS may impair vasodilatation in septic rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: 2000; 278(5): H1480–H1489
- [141] Lidington D., Li F., Tymk K. Deletion of neuronal NOS prevents impaired vasodilation in septic mouse skeletal muscle. *Cardiovasc Res*: 2007; 74(1): 151–158
- [142] Lanone S., Mebazaa A., Heymes C., Valleur P., Mechighel P., Payen D., Aubier M., Boczkowski J. Sepsis is associated with reciprocal expressional modifications of constitutive nitric oxide synthase (NOS) in human skeletal muscle: down-regulation of NOS1 and up-regulation of NOS3. *Crit Care Med*: 2001; 29(9): 1720–1725

- [143] Burkard N., Rokita A.G., Kaufmann S.G., Hallhuber M., Wu R., Hu K., Hofmann U., Bonz A., Frantz S., Cartwright E.J., Neyses L., Maier L.S., Maier S.K.G., Renné T., Schuh K., Ritter O. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. *Circ Res*: 2007; 100(3): e32–e44
- [144] Bryan N.S., Rassaf T., Maloney R.E., Rodriguez C.M., Saijo F., Rodriguez J.R., Feelisch M. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 2004; 101(12): 4308–4313
- [145] Müller-Strahl G., Kottenberg K., Zimmer H.G., Noack E., Kojda G. Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart. *J Physiol*: 2000; 522 Pt 2: 311–320
- [146] Brunner F., Andrew P., Wölkart G., Zechner R., Mayer B. Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*: 2001; 104(25): 3097–3102
- [147] Flierl M.A., Rittirsch D., Huber-Lang M.S., Sarma J.V., Ward P.A. Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med*: 2008; 14(5-6): 327–336
- [148] Gyurko R., Kuhlencordt P., Fishman M.C., Huang P.L. Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: 2000; 278(3): H971–H981
- [149] Massion P.B., Dessy C., Desjardins F., Pelat M., Havaux X., Belge C., Moulin P., Guiot Y., Feron O., Janssens S., Balligand J.L. Cardiomyocyte-restricted overexpression of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) attenuates beta-adrenergic stimulation and reinforces vagal inhibition of cardiac contraction. *Circulation*: 2004; 110(17): 2666–2672

- [150] Ichinose F., Hataishi R., Wu J.C., Kawai N., Rodrigues A.C.T., Mallari C., Post J.M., Parkinson J.F., Picard M.H., Bloch K.D., Zapol W.M. A selective inducible NOS dimerization inhibitor prevents systemic, cardiac, and pulmonary hemodynamic dysfunction in endotoxemic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: 2003; 285(6): H2524–H2530
- [151] Strunk V., Hahnenkamp K., Schneuing M., Fischer L.G., Rich G.F. Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesth Analg*: 2001; 92(3): 681–687
- [152] Afulukwe I.F., Cohen R.I., Zeballos G.A., Iqbal M., Scharf S.M. Selective NOS inhibition restores myocardial contractility in endotoxemic rats; however, myocardial NO content does not correlate with myocardial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*: 2000; 162(1): 21–26
- [153] Doursout M.F., Oguchi T., Fischer U.M., Liang Y., Chelly B., Hartley C.J., Chelly J.E. Distribution of NOS isoforms in a porcine endotoxin shock model. *Shock*: 2008; 29(6): 692–702
- [154] Sears C.E., Bryant S.M., Ashley E.A., Lygate C.A., Rakovic S., Wallis H.L., Neubauer S., Terrar D.A., Casadei B. Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ Res*: 2003; 92(5): e52–e59
- [155] Dawson D., Lygate C.A., Zhang M.H., Hulbert K., Neubauer S., Casadei B. nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation*: 2005; 112(24): 3729–3737

- [156] Barouch L.A., Harrison R.W., Skaf M.W., Rosas G.O., Cappola T.P., Kobeissi Z.A., Hobai I.A., Lemmon C.A., Burnett A.L., O'Rourke B., Rodriguez E.R., Huang P.L., Lima J.A.C., Berkowitz D.E., Hare J.M. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*: 2002; 416(6878): 337–339
- [157] Parent C., Eichacker P.Q. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infect Dis Clin North Am*: 1999; 13(2): 427–47, x
- [158] Lundblad R., Nesland J.M., Giercksky K.E. Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Crit Care Med*: 1996; 24(5): 820–826
- [159] Bauhofer A., Lorenz W., Kohlert F., Torossian A. Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis improves survival and inflammation in a two-hit model of hemorrhage and sepsis. *Crit Care Med*: 2006; 34(3): 778–784
- [160] Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E., Chang K.C., Cobb J.P., Buchman T.G., Korsmeyer S.J., Karl I.E. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 1999; 96(25): 14541–14546
- [161] Hotchkiss R.S., Chang K.C., Swanson P.E., Tinsley K.W., Hui J.J., Klender P., Xanthoudakis S., Roy S., Black C., Grimm E., Aspiotis R., Han Y., Nicholson D.W., Karl I.E. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol*: 2000; 1(6): 496–501
- [162] Tripathi P., Tripathi P., Kashyap L., Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol*: 2007; 51(3): 443–452

- [163] Nathan C., Shiloh M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 2000; 97(16): 8841–8848
- [164] MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*: 1997; 15: 323–350
- [165] van der Veen R.C., Dietlin T.A., Gray J.D., Gilmore W. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. *Cell Immunol*: 2000; 199(1): 43–49
- [166] Zamora R., Vodovotz Y., Billiar T.R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med*: 2000; 6(5): 347–373
- [167] Mahidhara R.S., Hoffman R.A., Huang S., Wolf-Johnston A., Vodovotz Y., Simmons R.L., Billiar T.R. Nitric oxide-mediated inhibition of caspase-dependent T lymphocyte proliferation. *J Leukoc Biol*: 2003; 74(3): 403–411
- [168] Allione A., Bernabei P., Bosticardo M., Ariotti S., Forni G., Novelli F. Nitric oxide suppresses human T lymphocyte proliferation through IFN-gamma-dependent and IFN-gamma-independent induction of apoptosis. *J Immunol*: 1999; 163(8): 4182–4191
- [169] Wolfárd A., Kaszaki J., Szabó C., Szalay L., Nagy S., Boros M. Prevention of early myocardial depression in hyperdynamic endotoxemia in dogs. *Shock*: 2000; 13(1): 46–51
- [170] Cuenca J., Martín-Sanz P., Alvarez-Barrientos A.M., Boscá L., Goren N. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol*: 2006; 169(5): 1567–1576

- [171] Razavi H.M., Wang L.F., Weicker S., Rohan M., Law C., McCormack D.G., Mehta S. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med*: 2004; 170(3): 227–233
- [172] Lush C.W., Cepinskas G., Sibbald W.J., Kvietys P.R. Endothelial E- and P-selectin expression in iNOS- deficient mice exposed to polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*: 2001; 280(2): G291–G297
- [173] MacMicking J.D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D.S., Trumbauer M., Stevens K., Xie Q.W., Sokol K., Hutchinson N. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*: 1995; 81(4): 641–650
- [174] Benjamim C.F., Silva J.S., Fortes Z.B., Oliveira M.A., Ferreira S.H., Cunha F.Q. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun*: 2002; 70(7): 3602–3610
- [175] Iwata A., Sai S., Nitta Y., Chen M., de Fries-Hallstrand R., Dalesandro J., Thomas R., Allen M.D. Liposome-mediated gene transfection of endothelial nitric oxide synthase reduces endothelial activation and leukocyte infiltration in transplanted hearts. *Circulation*: 2001; 103(22): 2753–2759
- [176] Sasaki M., Bharwani S., Jordan P., Elrod J.W., Grisham M.B., Jackson T.H., Lefer D.J., Alexander J.S. Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis. *Free Radic Biol Med*: 2003; 35(12): 1679–1687

- [177] Fox-Robichaud A., Payne D., Hasan S.U., Ostrovsky L., Fairhead T., Reinhardt P., Kubes P. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J Clin Invest*: 1998; 101(11): 2497–2505
- [178] Sanz M.J., Hickey M.J., Johnston B., McCafferty D.M., Raharjo E., Huang P.L., Kubes P. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *Br J Pharmacol*: 2001; 134(2): 305–312
- [179] Connelly L., Jacobs A.T., Palacios-Callender M., Moncada S., Hobbs A.J. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem*: 2003; 278(29): 26480–26487
- [180] Liu S.F., Adcock I.M., Old R.W., Barnes P.J., Evans T.W. Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Crit Care Med*: 1996; 24(7): 1219–1225
- [181] Liu S.F., Barnes P.J., Evans T.W. Time course and cellular localization of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat in vivo. *Crit Care Med*: 1997; 25(3): 512–518
- [182] Cohen R.I., Hassell A.M., Ye X., Marzouk K., Liu S.F. Lipopolysaccharide down-regulates inducible nitric oxide synthase expression in swine heart in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*: 2003; 307(3): 451–458
- [183] Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*: 2008; 5(6): 338–349
- [184] Rittirsch D., Flierl M.A., Ward P.A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*: 2008; 8(10): 776–787

- [185] Kilbourn R.G., Szabó C., Traber D.L. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies. *Shock*: 1997; 7(4): 235–246

## 7. Abkürzungsverzeichnis

1400W	N-(3-(Aminomethyl)Benzyl)Azetamidin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BH4	Tetrahydrobiopterin
BL	Baseline
BSA	Bovines-Serum-Albumin
CaCl	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CI	Cardiac Index
CLP	Coecum-Ligatur-und-Punktion
cNOS	constitutive NO-Synthase
CO	Cardiac Output
CRP	C-Reaktives-Protein
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DP	Developed-Pressure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDRF	Endothelium-Derived-Relaxing-Factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	End-Diastolisches-Volumen

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

eNOS	endotheliale NO-Synthase
ESV	End-Systolisches-Volumen
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GITC	Guanidinisothiocyanat
HCl	Chlorwasserstoff
HMGB	High-Mobility-Group B
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
HR	Heart-Rate
HWZ	Halbwertszeit
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL1-Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herz Krankheit
L-NAA	L-N- $\omega$ -Amino-Arginin
L-NIL	L-N <sup>6</sup> (1-Iminoethyl)-Lysin
L-NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
LT-C,D,E	Leukotrien C,D,E
LVDP	Left-Ventrikular-Developed-Pressure
LVEDP	Left-Ventrikular-End-Diastolic-Pressure
LVESP	Left-Ventrikular-End-Systolic-Pressure
L-VNIO	N <sup>5</sup> -(1-imino-3-butenyl)-L-ornithin

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

MDS	Myocardial Depressing Substance
MEG	Mercaptoethylguanidin
metHb	Methämoglobin
MHCII	Major Histocompatibility Complex II
MIF	Macrophage-Migration-Inhibitory-Factor
MODS	Multi-Organ Dysfunktionssyndrom
mtNOS	mitochondriale NO-Synthase
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Stickstofftrioxid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	N-Ethylmaleimid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOS	NO-Synthase
NO <sub>x</sub>	Summe aus Nitrit und Nitrat
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
ONNO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
OP	Operation
oxyHb	oxygeniertes Hämoglobin
PAF	Plättchen-Aktivierender-Faktor
PAI-1	Plasminogen-Activator-Inhibitor
PAMP	Pathogen-Associated-Molecular-Pattern
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PCT	Procalcitonin
PDE	Phosphodiesterase

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

PGE2	Prostaglandin-E <sub>2</sub>
PGI2	Prostacyclin
PIRO-Klassifikation	Prädisposition-Infektion-Response-Organfunktion
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils
PRR	Pattern-Recognition-Receptor
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
RBC-NOS	Red Blood Cell NO-Synthase
rhAPC	rekombinant hergestelltes Aktiviertes-Protein-C
RNA	Ribonukleinsäure
RNH	Amine
RNNO	Nitrosamine
ROS	Reactive Oxygen Species
RSH	Thiole
RSNO	Nitrosothiole
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
sTNF-R	löslicher TNF-Rezeptor
SV	Schlagvolumen
SVR	Systemic Vascular Resistance
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor
TLR	Toll-Like-Receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNM-Klassifikation	Tumor-Nodus-Metastase
TXA2	Thromboxan A <sub>2</sub>
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8. Materialienliste

### Medikamente:

- 1400W Alexis Biochemicals, Buttlar Pike, USA
- L-VNIO Alexis Biochemicals, Buttlar Pike, USA
- Ketanest S® Parke-Davis/Pfizer Pharma, Berlin
- Xylazin 2% Bernburg AG, Bernburg
- Urethan ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt a.M.
- Betailsodona® Lösung Mundipharma GmbH, Limburg
- Tramadol® Grünenthal GmbH, Aachen
- Arterenol® Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt a.M.
- Heparin Heparin-Natrium, B.Braun AG, Melsungen

### Osmotische Medikamentenpumpe:

- Alzet Micro-Osmotic Pump, Model 1003D Durect Corporation,  
Cupertino, USA

### Spritzenpumpe:

- Precidor Infors AG, Basel, Schweiz

### Chemikalie:

Soweit nicht anders angegeben, bezogen von Merck KGaA, Darmstadt

- Kaliumiodid
- Iod
- Essigsäure
- HPLC-Wasser
- 1M Natriumhydroxid
- N-Ethylmaleimid (NEM)
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
- Ethanol (96-100%)
- Citronensäure
- Natriumcitrat
- Tween® 20 Sigma-Aldrich, St. Luis, USA



**Glas-auf-Glas Homogenisator:**

- Homogen<sup>Plus</sup> Schütt-Biotec GmbH, Göttingen

**NO-Analysator:**

- CLD 88 Eco Physics, Dürnten, Schweiz

**Gasdichte Spritze:**

- Typ 1710/50 RN Hamilton AG, Bonaduz, Schweiz

**HPLC – NO<sub>x</sub>-Analysator:**

- ENO-20 Eicom, Kyoto, Japan
- Autoinjektor 719AL Eicom, Kyoto, Japan

**qRT-PCR-Kits:**

- RNeasy® Fibrous Tissue Kit Qiagen GmbH, Hilden
- QuantiTect Reverse Transcription Kit Qiagen GmbH, Hilden
- TaqMan® Gene Expression Master Mix Applied Biosystems, Carlsbad, USA
- TaqMan® Gene Expression Assays Applied Biosystems

**Mikrotiterplatte und Abdeckfolie:**

- Micro Amp® Optical 96-Well Reaction Plate Applied Biosystems
- Micro Amp® Optical Adhesive Film Applied Biosystems

**Real-Time PCR System:**

- ABI 7300 Applied Biosystems

**Histologie-Material:**

- Leukozyten-Kits Sigma-Aldrich, St. Luis, USA
  - α-Naphtyl-Acetate-Esterase, 91A
  - Naphthol-AS-D-Chloroacetate-Esterase, 91C
- Blockierlösungen
  - BSA, SP-5050 Vector Laboratories
  - Normal Horse Serum, S2000 Vector Laboratories

## 8. Materialienliste

---

- Avidin-Biotin Blocking Kit            Vector Laboratories
- Antikörper
  - Anti-CD3, MCA-1477            Serotec AG, Martinsried/Planegg
  - Sekundärantikörper, BA-1300    Vector Laboratories
- Streptavidin-FITC Komplex
  - VC-SA-5001                    Vector Laboratories

## 9. Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm, ehemaliger Direktor der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Aachen, für die Möglichkeit in seiner Klinik arbeiten zu dürfen, die großzügige Überlassung des Themas sowie die Unterstützung meiner Promotion.

Mein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. Marc Merx für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Jederzeit war er mir ein freundschaftlicher und kompetenter Ansprechpartner und stand mir bei der Fertigstellung meiner Dissertation stets hilfreich zur Seite.

Ebenso danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Christian Weber und Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Jahnen-Dechent für ihre gutachterliche Tätigkeit und ihre Teilhabe an der Promotionskommission.

Ich danke auch dem gesamten Team der CBT-Forschergruppe für die gute Zusammenarbeit und eine schöne Zeit. Insbesondere Stefanie Becher und Rabia Ercan für ihren unermüdlichen Einsatz bei Durchführung und Auswertung der Versuche. Dr. med. Annette van de Sandt und Dipl.-Biol. Rainer Windler möchte ich ganz besonderes danken für die Aufnahme in dieses Projekt und die großartige Unterstützung in jeder Hinsicht.

Weiterhin danke ich Frau Dipl.-Biol. Ulrike Hendgen-Cotta und Herrn Privatdozent Dr. med. Tienush Rassaf für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und ihren wertvollen kompetenten Rat.

Meinen Eltern möchte ich diese Arbeit widmen, denn ihre liebevolle Unterstützung hat mir mein Studium, diese Promotion und so vieles mehr erst möglich gemacht.

Nicht genug danken kann ich meiner lieben Freundin Eva Mertens für ihre unermüdliche Geduld, ihr Verständnis und die Unterstützung auf jede erdenkliche Weise auch über meine Promotion hinaus.

## **10. Erklärung zur Datenaufbewahrung**

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, Jan Ohlig, Vaalser Straße 137, 52074 Aachen hinterlegt sind.

## 11. Curriculum vitae

### **Persönliche Daten:**

Name: Jan Ohlig  
Geburtsdatum: 27.11.1982  
Geburtsort: Würselen  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung:**

1989 - 1993: Kath. Grundschule Imgenbroich-Konzen  
1993 - 2002: Städt. St.Michael Gymnasium Monschau  
06/2002: Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

### **Studium:**

Seit 10/2003: Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der RWTH Aachen  
09/2006: Ablegen der Ärztlichen Basisprüfung im Rahmen des Modellstudiengangs Medizin an der RWTH Aachen  
12/2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
01/2010 Approbation als Arzt

### **Beruflicher Werdegang:**

Seit 02/2010 Assistenzarzt in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie am Universitätsklinikum der Heinrich Heine Universität Düsseldorf