

**Die Rolle der Stickstoffmonoxidsynthasen in der sich
entwickelnden septischen Kardiomyopathie im
murinen Modell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Rainer Windler
aus Zeven

Düsseldorf, Mai 2012

aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des
Universitätsklinikums
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. MW Merx
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. V Urlacher

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2012

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	8
1.1 Pathophysiologie der Sepsis.....	8
1.1.1 Häodynamische Auswirkungen der Sepsis	5
1.2 Stickstoffmonoxid (NO').....	7
1.3 NO-Synthasen und ihre Bedeutung in physiologischen Prozessen	8
1.4 NO unter pathophysiologischen Bedingungen (Sepsis).....	12
1.5 Inhibition der NO-Synthasen	14
1.7 Zielsetzung der Arbeit	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Versuchstiere	17
2.2 Versuchsübersicht.....	17
2.2. Verwendete Medikamente.....	18
2.2.1. Ketamin und Xylazin	18
2.2.2. Urethan	19
2.2.3. 1400W.....	19
2.2.4. Vinyl-L-NIO (V-LNIO)	19
2.2.5. Noradrenalin.....	20
2.3. Sepsisinduktion durch Coecum Ligatur und Punktion (CLP) bzw. Sham- Operation	20
2.4 Verabreichung des NOS1 Inhibitors über eine Osmosepumpe.....	22
2.5 APPLIKATION DES NOS2 INHIBITORS.....	22
2.6 Blutentnahme durch Herzpunktion.....	22
2.7. Bakteriennachweis in Lavage und Blutkultur	22
2.8. Überlebenszeiten nach Sepsisinduktion bzw. Sham-Behandlung.....	23
2.9. Invasive Druckmessung mittels Miniaturkatheter	23
2.10. Häodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff-Modell	25
2.11 Aortenringversuche im Organbad.....	26
2.12 Total GSH aus Vollblutproben	28

2.13 Bestimmung der Verformbarkeit der Erythrozyten mittels Laser-assisted-optical rotational cell Analysator (LORCA) in vitro	29
2.14 Bestimmung der Nitrit und Nitrat Konzentrationen im Plasma und Herzgewebe	31
2.15 Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (ESR)	33
2.16 Histologie.....	35
Darstellung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten.....	35
Darstellung von Lymphozyten	36
Proteinnachweis von Nitrotyrosin	36
2.17. Expressionsbestimmung mittels quantitativer RT-PCR.....	37
2.17.1. RNA-Isolation.....	37
2.17.2. Reverse-Transkription der RNA in cDNA.....	38
2.17.3. qRT-PCR	38
2.18 Statistik	40
3. ERGEBNISSE	41
3.1 Bakteriennachweis in peritonealer Lavage und Blutkultur	41
3.2 Überlebensanalysen.....	41
3.3 Nitrit/Nitrat Konzentrationen im Plasma	42
3.3.1 Nitrit Konzentrationen im Plasma 6 und 12h nach Sepsis Induktion	42
3.3.2 Nitrat Konzentrationen im Plasma 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion.....	43
3.4 GSH Konzentrationen im Vollblut 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion	45
3.5 Erythrozytäre Verformbarkeit nach Sepsis Induktion.....	46
3.6 Einwanderung von Entzündungszellen ins Herzgewebe	47
3.6.1 Neutrophile Granulozyten.....	47
3.6.2 Monozyten.....	48
3.6.3 Lymphozyten	49
3.7 Hämodynamik nach Sepsis Induktion mittels Miniatur-Katheter	50
3.7.1 Mittlerer Arterieller Druck.....	50
3.7.2 Linksventrikulärer entwickelter Druck und Katecholamin Antwort	51
3.7.3 dP/dt_{max}.....	53
3.7.4 dP/dT_{min}.....	55
3.7.5 Herzfrequenz	57

3.8 Untersuchungen WT versus NOS3^{-/-} Mäuse	58
3.8.1 Langendorff.....	58
3.8.1.1 Linksventrikulärer entwickelter Druck	59
3.8.1.2 dP/dt_{max}.....	59
3.8.1.3 dP/dt_{min}.....	60
3.8.2 Aortenringanlage.....	61
3.8.2.1 Vitalitätsprüfung durch KCl.....	61
3.8.2.2 Dosis-Wirkung Acetylcholin.....	62
3.8.2.3 Dosis-Wirkungs-Kurve Phenylephrin	62
3.8.2.4 Dosis-Wirkung SNP	63
3.8.4 Nitrit/Nitrat Konzentrationen im Herz Gewebe.....	64
3.8.4.1 Nitrit Konzentrationen	65
3.8.5.2 Nitrat Konzentrationen.....	65
3.8.6 Bioaktives NO im Herzgewebe.....	66
3.8.7 Genexpression im Herzgewebe	67
3.8.7.1 Gen-Expression der NOS3 (endotheliale NO-Synthase) im Herzgewebe.....	67
3.8.7.2 Gen-Expression der NOS2 (induzierbaren NO-Synthase) im Herzgewebe	68
3.8.7.3 Gen-Expression der NOS1 (neuronalen NO-Synthase) im Herzgewebe	69
3.8.7.4 Gen-Expression von Interleukin 6 (IL-6) im Herzgewebe.....	69
3.8.7.5 Gen-Expression von Tumor Nekrose Faktor (TNF) im Herzgewebe	70
3.8.8 Nitrotyrosin.....	71
4. DISKUSSION	73
4.1 Sepsisinduktion mittels Coecum-Ligatur und Punktion.....	73
4.2 Auswirkungen der Inhibition der NO-Synthasen auf die NO_x Konzentrationen	74
4.3 GSH Depletion.....	75
4.4 Verformbarkeit der Erythrozyten	76
4.5 Myokardiale Immunantwort.....	77
4.6 Hämodynamische Auswirkungen der NO-Synthase Inhibition in vivo.....	78
4.7 Hämodynamische Auswirkungen der NOS3 Depletion ex vivo	80
4.8 Bioaktives NO der NOS3	80

4.9 Beteiligung der NOS3 an der vaskulären Dysfunktion.....	81
4.10 NOS3 induziert die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren.....	82
4.11 NOS3 produziertes NO führt zu vermehrter Nitrotyrosin Formation.....	83
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	84
5. ABSTRACT.....	85
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	86
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	100
8. MATERIALIENLISTE.....	102
DANKSAGUNG.....	106
LEBENS LAUF.....	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signalübertragung der TLR's.....	2
Abbildung 2: Mögliche zu Grunde liegende Mechanismen der septischen Kardiomyopathie.....	5
Abbildung 3: Aufbau der Stickstoffmonoxid-Synthase	9
Abbildung 4: Die NOS3 unter physiologischen Bedingungen.....	11
Abbildung 5: Versuchsübersicht	18
Abbildung 6: Lineweaver-Burk Analyse	31
Abbildung 7: Aufbau des ENO-20.....	32
Abbildung 8: ESR Spektrum	34
Abbildung 9: Kaplan-Meier Überlebensanalyse.....	42
Abbildung 10: Nitrit Konzentrationen im Plasma.....	43
Abbildung 11: Nitrat Konzentrationen im Plasma	44
Abbildung 12: GSH Konzentrationen im Vollblut	45
Abbildung 13: Nötiger Scherstress (SS) für ½ maximale Elongation.....	47
Abbildung 14: Anzahl eingewanderter Neutrophiler Granulozyten.....	48
Abbildung 15: Anzahl eingewanderter Monozyten.....	49
Abbildung 16: Anzahl eingewanderter Lymphozyten.....	50
Abbildung 17: Mittlerer Arterieller Druck.	51
Abbildung 18: Linksventrikulärer entwickelter Druck.	52
Abbildung 19: Anstieg des linksventrikulären entwickelten Druckes.....	53
Abbildung 20: dP/dT_{max}	54
Abbildung 21: Anstieg des dP/dt_{max}	55
Abbildung 22: dP/dt_{min}	56
Abbildung 23: Anstieg des dP/dt_{min}	57
Abbildung 24: Herzfrequenz.	58
Abbildung 25: Linksventrikulärer entwickelter Druck <i>ex vivo</i>	59
Abbildung 26: Änderungen des dP/dt_{max} <i>ex vivo</i>	60
Abbildung 27: Änderungen des dP/dt_{min} <i>ex vivo</i>	60
Abbildung 28: Kontraktion der Aorten nach KCl-Gabe	61
Abbildung 29: Acetylcholin induzierte Dilatation der Aortenringe.....	62
Abbildung 30: Phenylephrin induzierte Kontraktion der Aortenringe.....	63
Abbildung 31: SNP induzierte Dilatation in den Aortenringen.....	64
Abbildung 32: SNP induzierte Dilatation in den Aortenringen.....	64
Abbildung 33: Nitrit Konzentrationen im Herzgewebe.	65
Abbildung 34: Nitrat Konzentrationen im Herzgewebe.	66
Abbildung 35: Bioaktives NO im Herzgewebe.	67
Abbildung 36: Genexpression der NOS3 im Herzgewebe	68
Abbildung 37: Genexpression der NOS2 im Herzgewebe.....	68
Abbildung 38: Genexpression der NOS1 im Herzgewebe	69
Abbildung 39: Genexpression von IL-6 im Herzgewebe	70
Abbildung 40: Genexpression von TNF im Herzgewebe	71
Abbildung 41: Fluoreszenznachweis von Nitrotyrosin im Herzgewebe	72

1. Einleitung

1.1 Pathophysiologie der Sepsis

Erste Erwähnung findet die Sepsis schon bei Hippokrates 400 vor Christus als ein Fieber, das durch faulende Materie verursacht wird. Nachdem Robert Koch ab 1876 Bakterien als Verursacher von verschiedenen Infektionen identifiziert hatte und Schottmüller 1914 die Wirkung von Toxinen der Bakterien auf den Organismus beschrieb [1], wurde die Sepsis als Reaktion des Körpers auf einen Bakterienbefall definiert. In vielen Patienten konnten aber weder im Blut noch an anderer Stelle im Körper ein Infektionsherd gefunden werden, der für die Auslösung der Sepsis verantwortlich war. Eine erste einheitliche Definition, die bis heute gebräuchlich ist, wurde für die Sepsis erst 1992 auf einer Konferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine eingeführt. Die Sepsis ist demnach eine systemische Entzündungsreaktion mit einer zusätzlichen Infektion. Die Sepsis stellt die Reaktion des eigenen Körpers auf das Vorhandensein von Bakterien dar und führt zu einer überschießenden Immunreaktion des Körpers bis hin zum Tod. Pathophysiologisch ist die Sepsis ein Zusammenspiel aus proinflammatorischen, antiinflammatorischen, prokoagulativen und antikoagulativen Prozessen, um eingedrungene und in der Blutbahn verbreitete Erreger aus dem Körper zu eliminieren.

Ausgelöst wird eine Sepsis hauptsächlich durch bakterielle Erreger, gefolgt von Pilzen und Viren. Daten von 2003 zeigten eine ausgeglichene Verteilung der grampositiven (55,7%) wie –negativen Bakterien (54,1%) als Ursache der Sepsis auf Deutschen Intensivstationen [2]. Das Eindringen der Erreger erfolgt in 68% der Fälle über den Respirationstrakt, über das Abdomen (22%), das Blut (20%) und den Urogenitaltrakt (14%). Patienten, die dem klinischen Bild einer Sepsis entsprechen, wiesen nur in 60% der Fälle eine für Bakterien positive Blutkultur auf [3]. Die gramnegativen wie positiven Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze besitzen eine begrenzte Anzahl an einzigartigen zellulären Bestandteilen, die Vertebraten nicht aufweisen. Diese werden als sogenannten „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMP) bezeichnet und spielen in der Entstehung einer Sepsis eine entscheidende Rolle [4]. Sie werden von den „Pathogen Recognition Receptors“

1. Einleitung

(PRR) gebunden welche an den Zelloberflächen der Wirtszellen und Immunzellen exprimiert werden, z.B. „Toll Like Receptors“ (TLR). Im Zytoplasma der Wirtszellen existieren ebenfalls PRRs, die zur Aufspürung invasiver intrazellulärer Pathogene dienen [5]. Die Immunzellen besitzen eine ganze Reihe dieser Rezeptoren, wobei den TLRs besondere Aufmerksamkeit geschenkt wird. In experimentellen Sepsis Modellen wie auch in septischen Patienten konnte eine Erhöhung der TLR Expression nachgewiesen werden [6-8]. Durch die Bindung der PAMPs, z. B. Lipopolysaccharide (LPS) bei gramnegativen Bakterien, kommt es während der Sepsis zur Aktivierung von Signalkaskaden in der Wirtszelle. Bei den TLRs erfolgt die Signalübertragung hauptsächlich über Adaptor Proteine: das „Myeloid Differentiation primary-response protein 88“ (MyD88) und drei nicht-MyD88 Proteine. Die Signalwege führen unter anderem zur Aktivierung von NfκB (siehe Abb. 1). NfκB ist involviert in der transkriptionalen Regulation von über 150 Genen, von denen der größte Anteil proinflammatorische Eigenschaften aufweist [9].

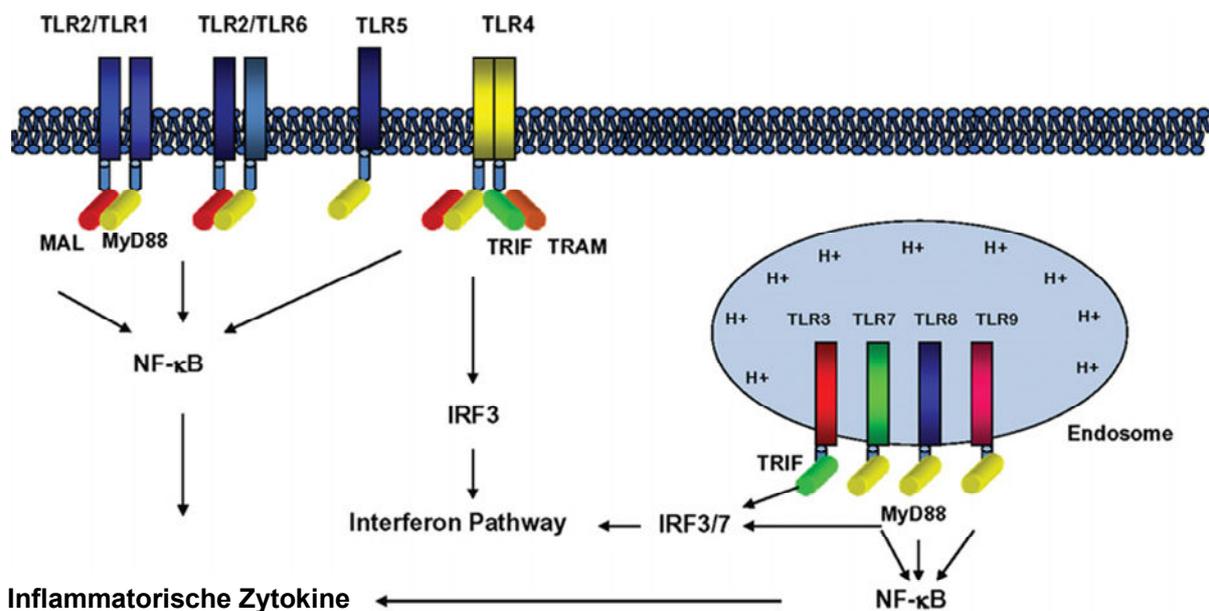


Abbildung 1: Signalübertragung der TLR's (modifiziert nach Vallejo [10])

Die Hochregulierung dieser proinflammatorischen Gene führt zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen (als Mediatoren), die in der Zelle verbleiben oder in das Kreislaufsystem entlassen werden. Eine Konsequenz der Signalkaskade in den Immunzellen und den Wirtszellen in der Sepsis ist somit die Synthese und das Entlassen einer steigenden Menge von Mediatoren. In Tabelle 1 sind einige wichtige pro- und antiinflammatorische Mediatoren zusammengestellt.

1. Einleitung

Tabelle 1: Pro- und antiinflammatorische Mediatoren in der Sepsis und ihre Auswirkungen auf den Organismus (modifiziert nach Jean-Baptiste 2007 [11])

	Auswirkungen
Proinflammatorischer Mediator	
TNFa	Fieber, Hypotension, Schock ähnliches Syndrom, Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Endothel Zellen
IL-1	Fieber, Hypotension, Anorexie, Schlaf, T-Zellen und Makrophagen Aktivierung
IL-6	Akut-Phase Protein Produktion, T-Zellen und B-Zellen Proliferation
IL-8	Chemotaxis für neutrophile Granulozyten und T-Zellen
HMGB-1	Sepsis ähnliches Syndrom, Hypotension, Schock
MIF	Erhöhung der TNFa und TLR4 Expression
NO	Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, Zytotoxisch
PAF	Histamin Freisetzung von Thrombozyten, Aktivierung von Endothel Zellen und Thrombozyten
C3a-C5a	Histamin Freisetzung, erhöhte Kapillarpermeabilität, Vasodilatation
PGE2	Vasodilatation
TXA2	erhöhter pulmonaler Widerstand
LTC4, LTD4, LTE4	erhöhte pulmonale Kapillarpermeabilität, Bronchospasmus
Anti-inflammatorische Mediatoren	
IL-10	Unterdrückung von INF, IL-1 und Makrophagen-Funktionen
PGI2	Runterregulierung von TNFa
Soluble TNFa Rezeptoren	Blockade des TNFa Rezeptors
IL-1 Rezeptor Antagonisten	Kompetitive Bindung an den IL-1 Rezeptor, Blockierung der IL-1 Aktivitäten
Hitzeschock-Proteine	Erhöhte Expression von IK-B, negative Rückkopplung auf die NF-kB Aktivierung, Inhibition von TNFa und IL-1
Phosphatasen	Dephosphorylierung zytoplasmatischer Substrate, Reduktion NF-kB abhängiger TNFa Produktion, Deaktivierung von Leukozyten und Endothelzellen
Cortisol	Inhibition von NF-kB, Reduktion der Produktion von TNFa, IL-1, IL-6, Eicosanoiden und NO, Freisetzen von Hitzeschock-Proteinen

TNF= Tumor Nekrose Faktor; 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= Prostazyklin; TXA= Thromboxa; LTC, LTD, LTE= Leukotrien C,D,E; Ik-B= Inhibitor von kB

Das angeborene Immunsystem reagiert zu erst auf die eingedrungen Erreger durch Aktivierung der Immunzellen (Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten) durch die von den Wirtszellen synthetisierten Mediatoren. Die Immunzellen dienen der Erkennung und Eliminierung der Mikroorganismen und ihrer Bestandteile [12]. Die Einwanderung von Leukozyten in der Frühphase der Sepsis verläuft wie folgt: Die Leukozyten „verlagern“ ihren Standort im Blutstrom vom Zentrum in die Peripherie. Nun können die Leukozyten mit den Endothelzellen auf molekularer Ebene interagieren. Die Ausschüttung von Zytokinen und/oder Chemokinen im Wirtsgewebe führt zu einem Chemoattraktanz Gradienten an der extrazellulären Matrix und induziert die Aktivierung der Endothelzellen. P- und E-Selektin werden an den Endothelzellen exprimiert und das auf den Leukozyten kontinuierlich exprimierte L-Selektin verbindet sich mit den Kohlenhydrat Liganden und verursacht somit die initiale Berührung und das Rollen der Leukozyten an der Gefäßwand [13]. Chemokine, gebunden an der luminalen Oberfläche des Endothels, führen zur Aktivierung von 7 „G Protein-Coupled Receptors“ auf den Leukozyten. Dies führt zu einer Integrin-Aktivierung und somit zu einer stärkeren Adhäsion der

1. Einleitung

rollenden Leukozyten am Endothel [14]. Auf die Adhäsion der Leukozyten folgt die Extravasation durch das Endothel in das darunter liegende Gewebe [15]. Im Gewebe erfolgt nun die Initiation der Infektionskontrolle und dadurch eine Gewebe-„Reparatur“.

Im Blutkreislauf zirkulierende Monozyten gehören zu den ersten Immunzellen, die auf das Eindringen von Pathogenen in das Gewebe reagieren [16]. Sie wandeln sich im Gewebe zu Makrophagen um und phagozytisieren die eingedrungenen Erreger. Dabei entlassen sie eine Vielzahl an Zyto- und Chemokine um weitere Immunzellen des angeborenen Immunsystems zum Ort der Infektion zu führen [17].

Durch diese Ausschüttung an Zyto- und Chemokinen werden die neutrophilen Granulozyten zur bakteriellen Infektion geführt und durch die PAMPs der Pathogene aktiviert. Am Ort der Infektion beseitigen sie die Pathogene durch Phagozytose und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [18]. Die reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid (NO) sind in diesem Zusammenhang nicht nur an der Abtötung von Bakterien beteiligt [19], sondern spielen auch bei der Gewebeschädigung, gesteigerter vaskulärer Permeabilität und Organverletzung eine Rolle [20, 21]. In der späteren Phase der Sepsis verhindert der Anstieg an PRRs und Chemokine/Zytokine im Blutkreislauf, dass weitere Immunzellen in das betroffene Gewebe eindringen können, da der nötige chemotaktische Gradient fehlt [22] [23]. Die in das Gewebe eingedrungenen Pathogene können nicht mehr erfolgreich bekämpft werden, die Patienten entwickeln eine ausgeprägte Immunsuppression.

In diesem Zusammenhang konnte in septischen Patienten ein Rückgang der zirkulierenden Lymphozyten festgestellt werden, der vor allen Dingen durch die Apoptose der Immunzellen hervorgerufen wird [24]. Die dadurch hervorgerufene Immunsuppression begünstigt bei betroffenen Patienten Zweitinfektionen [25] vor allem in der späteren Phase der Sepsis. In Studien mit T-Zellen defizienten Mäusen konnte eine Abnahme der Mortalität in einem akut letalen CLP-Modell [26] oder bei der Sepsis-Induktion durch die Injektion von *Escherichia coli* [27] festgestellt werden. Die gleichen Autoren wiesen außerdem nach, dass es zu einer Abnahme von proinflammatorischen Zytokinen in den T-Zellen defizienten Mäusen kommt.

1.1.1 Häodynamische Auswirkungen der Sepsis

Neben der Einwanderung der Leukozyten in betroffenes Gewebe kommt es zu einem massiven Anstieg an proinflammatorischen Zytokinen, z. B. Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interleukin-6 (IL-6). Es konnte nachgewiesen werden, dass die erhöhte Menge an Zytokinen, die während des Inflammationsprozesses von den Wirtszellen und den Immunzellen freigesetzt werden, in *in vitro* Versuchen direkt zu einer Erniedrigung der myokardialen Kontraktilität führen [28]. Von Kardiomyozyten ist aber ebenfalls bekannt, dass sie in der Lage sind selbst diese Zytokine während der Sepsis zu bilden [29] um eigenständig auf die eingedrungenen Pathogene reagieren zu können. Eine Reihe an Studien konnte im Herz die Expression von TLR's nachweisen unter ihnen auch das TLR4 [30, 31]. TLR4 Knockout Mäuse sind vor einer kardialen Dysfunktion geschützt, die durch LPS induziert wurde [32]. Die Abbildung 2 zeigt die mannigfaltigen Mechanismen, die einer septischen Kardiomyopathie zu Grunde liegen können.

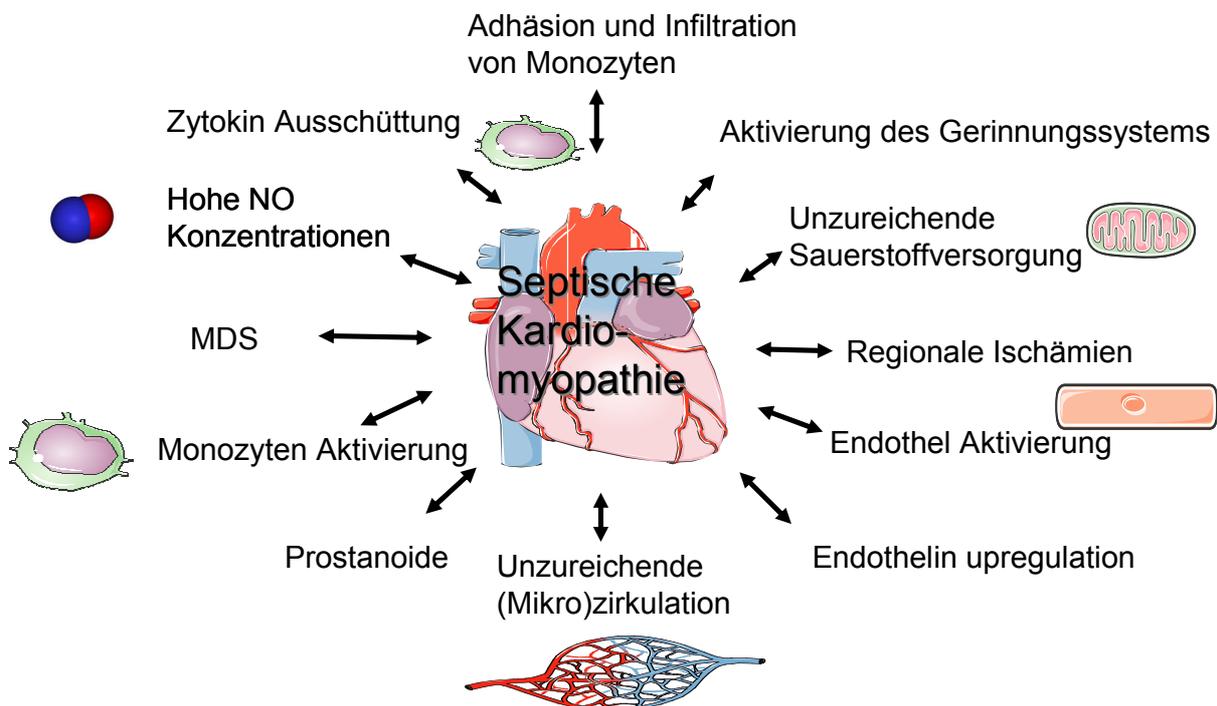


Abbildung 2: Mögliche zu Grunde liegende Mechanismen der septischen Kardiomyopathie (modifiziert nach Merx 2007 [33]), MDS= Myocardial depressant substance

In gesunden Herzen führt die Gabe von Katecholaminen zu einer gesteigerten Kontraktilität und einer Erhöhung der Herzfrequenz über die Interaktion mit den β -Adrenorezeptoren im Myokard. Werden diese Rezeptoren exzessiv über einen längeren Zeitraum stimuliert, kommt es zur Schädigung des Herzens über eine

1. Einleitung

Kalzium Überladung und einer Nekrose in den Zellen [34]. In septischen Patienten und im Tiermodell konnten erhöhte Konzentrationen an Katecholaminen festgestellt werden [35, 36]. In einem murinen Sepsis Modell wurde eine verringerte Dichte an β -Adrenorezeptoren im Herzgewebe nachgewiesen [37], die Herzen reagierten nicht mehr auf die Gabe von Katecholaminen. Andere Arbeiten führen die kontraktile Dysfunktion auf eine Zytokin-Stimulation zurück, wenn die β -Adrenorezeptoren Dichte auf dem Myokard normal vorlag [38]. In der Sepsis kommt es darüber hinaus zu einer Schädigung der Mitochondrien im Allgemeinen wie auch im Herzgewebe. Die myokardialen Mitochondrien zeigen im Tiermodell und im Menschen während der Sepsis ultrastrukturelle Schäden [39-41]. Die vermehrte Produktion der Mitochondrien an Superoxid und NO [42] führt in Kombination mit dem Fehlen von intramitochondrialen Antioxidantien zur Inhibition der oxidativen Phosphorylierung und ATP Generierung [43]. Dies hindert die Zellen an der Nutzung des molekularen Sauerstoffs für die ATP Produktion und verursacht Sepsis induzierte Organ Dysfunktion [44]. In der Ausbildung der septischen Kardiomyopathie ist die Apoptose der Kardiomyozyten beteiligt [45, 46]. Die Aktivierung von verschiedenen Caspasen konnte in Kardiomyozyten nachgewiesen werden, die mit septischem menschlichem Serum behandelt wurden [47]. Dies führte in den Kardiomyozyten zu einer erhöhten Anzahl an apoptotischen Zellen. Ebenso ist die Aktivierung der Caspase 3 durch Endotoxin assoziiert mit einer verringerten Calcium-Myofilament-Antwort, Aufspaltung der kontraktile Proteine und eine Auflösung der Sarkomere [48].

Die Sepsis stellt eine der häufigsten Todesursachen von Patienten auf Intensivstationen dar [49] und gehört mit einer Mortalitätsrate von über 35- 70% [50, 51] zu den führenden Todesursachen der Industrieländer. Das Vorliegen einer kardiovaskulären Dysfunktion bei septischen Patienten ist assoziiert mit einer signifikanten Erhöhung der Mortalität auf 70-90% [33, 49]. Neuere Erkenntnisse über die komplexen Zusammenhänge des zellulären und humoralen Immunsystems während Krankheitszuständen wie Schock, Inflammation, Organversagen und resultierende Veränderungen im Cytokinnetzwerk haben zumindest zu einer verbesserten Charakterisierung dieser Patienten geführt [52]. Trotzdem fehlen noch Einsichten in die genauen Regulationsprozesse, mit deren Hilfe auch erfolgreiche therapeutische Interventionen denkbar wären. Der Einsatz globaler NOS-Inhibitoren war in klinischen Studien sogar mit einer erhöhten Mortalität im Vergleich zu Placebo

[53] vergesellschaftet. Die Aufklärung der Rolle der einzelnen NOS Isoformen in der Sepsis könnte so richtungweisend für spezifische Therapieoptionen sein.

1.2 Stickstoffmonoxid (NO[•])

NO ist ein farbloses Gas mit einer Wasserlöslichkeit von 1-3 mmol/l bei 20°C und 1 atm [54]. Es besitzt eine hohe Lipophilie und ist ungeladen. Es gehört zu den kleinsten stabilen Molekülen der Natur und kann in biologischem Material in alle Richtungen diffundieren, ohne dass Membranen Hindernisse darstellen [55]. Die Reichweite von NO in Geweben wird mit 200-600µm angegeben und wird begrenzt durch die hohe Reaktivität des Moleküls [56]. Die Halbwertszeit von NO wurde von Gryglewski et al. [57] mit einer Bioassay Kaskade auf <7s bestimmt. Spätere Versuche zeigten eine Halbwertszeit von <6s [58] unter physiologischen Bedingungen. NO weist mit dem Sauerstoff Superoxidanion eine Reaktionsrate von $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf [59] und reagiert somit 6mal schneller als das Superoxid mit der Superoxid Dismutase. Seit über 100 Jahren ist bereits bekannt, dass NO eine stabile Bindung mit Hämoglobin eingeht, welche schneller abläuft als die Bindung mit Kohlenmonoxid oder Sauerstoff.

Der Entdeckung, dass NO im Säugetierorganismus gebildet wird und physiologische Funktionen übernimmt, ging voraus, dass NO die Guanylate Zykase aktivieren kann [60] und eine erhöhte Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) durch die Guanylate Zykase im vaskulären glatten Muskel zur Relaxation des Gefäßes führt und somit einen erhöhten Blutfluss erlaubt [61].

1980 konnten Furchgott und Zawadzki feststellen, dass vom Endothel von Gefäßen ein Stoff ausgeschieden werden muss, der zur Relaxation der Gefäßmuskulatur führt [62]. Da Furchgott diesen „Stoff“ nicht genauer benennen konnte, gab er der Substanz den Namen „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF). In diesem Zusammenhang konnte Furchgott 1984 [63] zeigen, dass die Superoxid Dismutase, welche das Superoxid entfernt, den EDRF vor Inaktivierung schützt und das Oxyhämoglobin den EDRF inhibiert. Außerdem konnte in Kaninchen Aorten, deren Endothel zerstört wurde, nachgewiesen werden, dass die Aorten dilatieren, wenn „saures“ anorganisches Nitrit zum Organbad gegeben wurde. Er kam somit zu der Schlussfolgerung dass es sich bei EDRF wahrscheinlich um Stickstoffmonoxid handelt und postulierte diese Annahme auf einem Symposium 1987, fast zeitgleich mit Ignarro [64], der unabhängig von Furchgott zur gleichen Schlussfolgerung kam.

Vor dieser Entdeckung war unbekannt, dass NO in Säugetieren gebildet wird und an physiologische Funktionen beteiligt ist.

1.3 NO-Synthasen und ihre Bedeutung in physiologischen Prozessen

Im Jahre 1981 gelang es Green et al. im Menschen wie auch in der Ratte festzustellen, dass beide Organismen mehr Nitrat aufwiesen, als sie über die Nahrung aufnahmen [65, 66]. Durch die Untersuchung keimfreier Ratten konnten sie außerdem ausschließen, dass die Synthetisierung des Nitrats über Bakterien des Gastrointestinaltraktes erfolgte. Somit musste das Nitrat im Körper selbst über eine Biosynthese hergestellt werden [66].

Vier Jahre später veröffentlichten Stuehr und Maletta eine Studie, in der sie zeigten, dass die Gabe von LPS auf Makrophagen in Zellkultur zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration von Nitrit und Nitrat führte [67]. Die Makrophagen waren somit unter Inflammationsbedingungen in der Lage selbst Nitrit und Nitrat zu synthetisieren. Dieser Anstieg war abhängig von der Verfügbarkeit von L-Arginin, was als Substrat der Reaktion zu dienen schien [68]. Neben Nitrit und Nitrat kam es ebenfalls zur Bildung von L-Citrullin als Ko-Produkt der Synthese [69]. Als initiales Produkt der Biosynthese von Nitrit und Nitrat konnte NO identifiziert werden [69]. Der zu Grunde liegende Pathway der NO-Synthese wurde von Palmer und Moncada aufgedeckt und als L-Arginin-NO-Pathway betitelt (siehe Abb. 3). Es konnte von ihnen einwandfrei nachgewiesen werden, dass aus L-Arginin und den Kofaktoren BH_4 und NADPH Stickstoffmonoxid und Citrullin gebildet wird [70].

1. Einleitung

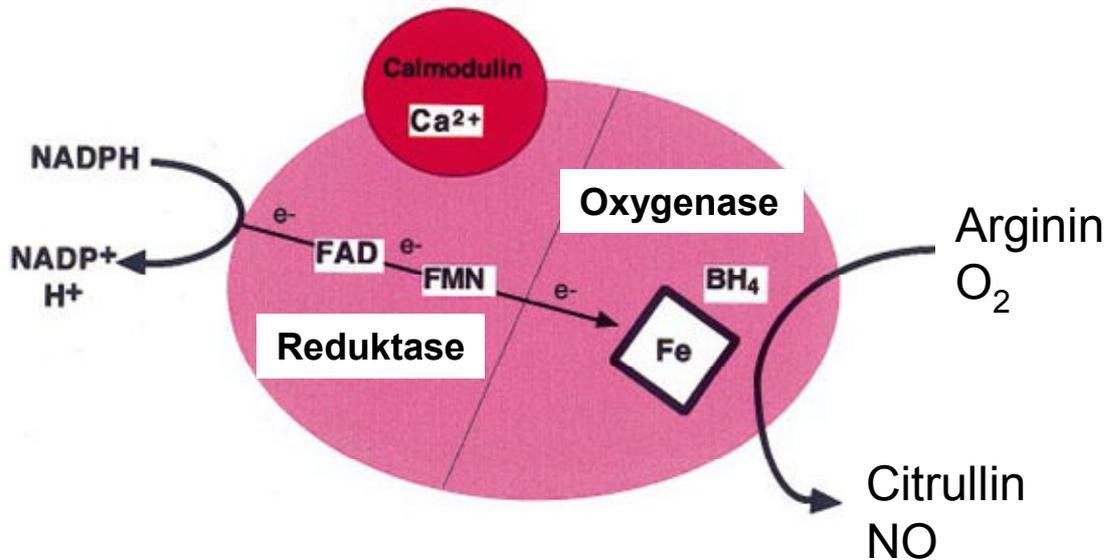


Abbildung 3: Aufbau der Stickstoffmonoxid-Synthase mit L-Arginin-NO-Pathway und Elektronentransport von der Reduktasen- zur Oxygenasen-Domäne. (Modifiziert nach Alderton et al. 2001 [71])

Die Nomenklatur der unterschiedlichen NO-Synthasen beruht auf der zeitlichen Abfolge des erfolgreichen Klonens der cDNA (NOS1, NOS2 und NOS3). Die Benennung der Synthasen nach dem Zelltyp aus dem sie erstmals geklont wurden ist zwar weit verbreitet, aber nicht eindeutig, da monotypische Zellpopulationen eine, zwei oder sogar alle 3 Isoformen der NO-Synthasen aufweisen können. Die neuronale NO-Synthase (nNOS; **NOS1**) wurde als erstes NO synthetisierendes Enzym im Gehirn von Ratten nachgewiesen [72] und ihre Struktur beschrieben [73]. Die NOS1 wird den konstitutiv exprimierenden NO-Synthasen zugerechnet, welche kontinuierlich nanomolare Mengen an NO synthetisieren und calciumabhängig sind. Schon Jahre vor der Beschreibung der neuronalen Form der NO-Synthase konnte nachgewiesen werden, dass im Gehirn NO (EDRF) auf ähnlicher Weise gebildet wird wie in den Endothelzellen [74] und als wichtiger Neurotransmitter im Gehirn fungiert. Die NOS1 ist aber nicht auf das Gehirn beschränkt, dieses Enzym konnte in vielen anderen Geweben ebenfalls nachgewiesen werden [75-77]. Unter anderem wurde die NOS1 auch in Kardiomyozyten von Mäusen nachgewiesen [78], in denen das gebildete NO wahrscheinlich eine Funktion bei der Kontraktilität des Herzens einnimmt.

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS; **NOS2**) wurde fast zeitgleich von drei unterschiedlichen Autoren unabhängig von einander aus Maus Makrophagen kloniert und exprimiert [79-81]. Im Unterschied zu den beiden konstitutiv exprimierten NO-

1. Einleitung

Synthasen (NOS1 und NOS3) ist die NOS2 calcium-unabhängig und die Synthese von NO kann in vielen Geweben durch proinflammatorische Zytokine induziert werden. Das Calmodulin ist fest an das NOS2 Protein gebunden [82, 83]. Dieser Zustand erklärt die Unabhängigkeit des Proteins von physiologischen Änderungen der Calciumkonzentration. Da die NOS2 durch proinflammatorische Stimulation stark induziert werden kann, wird die NOS2 als „high-output“ Quelle für NO angesehen. Das Enzym produziert jedoch im Vergleich zu der NOS1 und NOS3 nicht größere Mengen an NO, vielmehr ist es so, dass sehr viel mehr des Proteins gleichzeitig induziert und exprimiert werden kann [84, 85] und somit höhere Konzentrationen von NO produziert werden können. Nach der Induktion produziert die Synthese über Stunden große Mengen NO [86]. Die NOS2 wird vorrangig in den aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z. B. Makrophagen [87], hoch reguliert. Aber auch in vielen anderen Zelltypen konnte eine Expression des Enzymes unter Inflammationsbedingungen festgestellt werden [88-90]. Das von der NOS2 gebildete NO wird unter anderem zur antibakteriellen Immunabwehr genutzt. Makrophagen und neutrophile Granulozyten verfügen über die induzierbare NOS (NOS2) und produzieren NO und Superoxid zur gleichen Zeit. Aus diesen beiden Komponenten entsteht Peroxynitrit, das zur Abtötung oder Verletzung von Bakterien genutzt werden kann [91].

Obwohl die endotheliale NO-Synthase (eNOS; **NOS3**) als erste Quelle von NO bekannt war, wurde sie als letztes kloniert und exprimiert [92-94]. Die NOS3 gehört, wie die NOS1 zu den konstitutiv exprimierten NO-Synthasen, welche fortwährend nanomolare Mengen an NO produzieren. Die NOS3 ist vor allen Dingen im Endothel des Gefäßsystems lokalisiert und das von ihr gebildete NO spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung des Vasotonus (siehe Abb. 4) in den Gefäßen der Säugetiere [62, 70]. An den Plasmamembranen ist die NOS3 gebunden und assoziiert mit Caveolin [95]. Sie wird reguliert durch Phosphorylierung und aktiviert durch den Einstrom von Calcium durch Membranen gebundene Rezeptoren [96]. Die Phosphorylierung der NOS3 hat Auswirkungen auf ihre Aktivität und wird hervorgerufen durch einen flussmedierten erhöhten Scherrstress [97, 98]. Das Serine 1179 wird über die Protein Kinase AKT phosphoryliert [99, 100]. Dies führt zu einer Zunahme des Elektronenflusses durch die Reduktase Domäne und steigert die NO-

1. Einleitung

Produktion [101]. Andererseits wird die endotheliale NO-Synthese durch transkriptionale Prozesse gesteuert [102, 103].

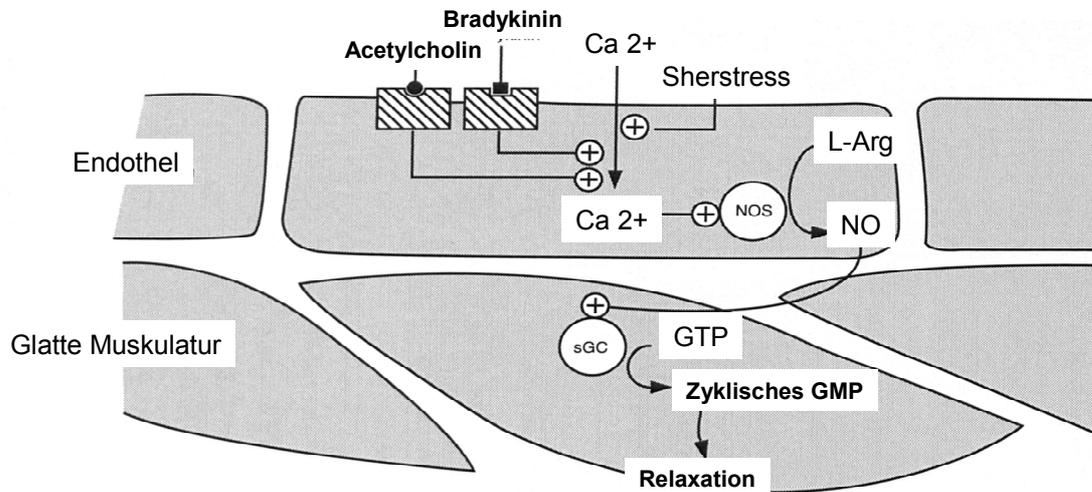


Abbildung 4: Die NOS3 unter physiologischen Bedingungen.
(modifiziert nach Moncada 1993 [104])

Sobald NO im Gefäßsystem vorhanden ist wird über die Guanylate Zykylase im glatten Gefäßmuskel cGMP gebildet. Das zyklische GMP führt zur Relaxation der Muskulatur und zur Vasodilatation der Gefäße. Für den Organismus ist es unabdingbar das NO fortwährend aus dem Gefäßsystem zu entfernen oder die Guanylate Zykylase bleibt voll aktiv und führt zu einer andauerenden Relaxation der Gefäße und schließlich zum Zusammenbruch des Vasotonus. Eine Möglichkeit des Systems ist es, NO in andere Produkte umzuwandeln. Zu diesen Produkten gehört das Nitrit, welches als relativ stabiles Zwischenprodukt der NO Synthese angesehen wird [105]. Im Plasma wird das NO durch die Multi-Kupfer-Oxidase und NO-Oxidase Ceruloplasmin schnell zu Nitrit oxidiert [106]. Die Auto-Oxidation des NO's mit Sauerstoff und Wasser läuft dagegen relativ langsam im Gewebe ab. Nitrit liegt unter physiologischen Bedingungen in einer Konzentration im nanomolaren Bereich vor [107]. In NOS Knockout Mäusen sind die Level an Nitrit im Plasma um bis zu 70% reduziert (NOS3 KO Mäuse) und spiegeln die Aktivität der konstitutiven NO-Synthese wider [107]. Dem Säugetier Organismus stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung das gebildete Nitrit wieder zu NO zu reduzieren. Dies geschieht z.B. unter Mitwirkung von Deoxyhämoglobin [108, 109] und Myoglobin [110-112]. Diese Abläufe der Nitrit Reduzierung finden besonders unter sauren und hypoxischen Bedingungen statt, wie sie in der Sepsis vorliegen.

1. Einleitung

Nitrat wird als stabiles Endprodukt der NO-Synthese angesehen und ist neben Nitrit als Marker für die NO-Produktion etabliert. Aus der Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin entsteht Nitrat und Methämoglobin. Da Oxyhämoglobin in den Erythrozyten in hohen Konzentrationen vorliegt, ist Nitrat das Hauptprodukt des NO Stoffwechsels. Es liegt im Gegensatz zum Nitrit in μM Konzentrationen vor. Lange Zeit wurde angenommen, dass es im Säugetierorganismus keine Möglichkeit gibt das Nitrat wieder zu reduzieren. Lundberg et al. konnte eine Möglichkeit nachweisen, wie der Körper Nitrat zu Nitrit und somit weiter zu NO reduzieren kann. Durch die Aufnahme einer großen Menge an Nitrat über die Nahrung, wird dieses von den Speicheldrüsen aktiv aus dem Blut aufgenommen und liegt im Speichel konzentriert vor [113]. In der Mundhöhle wird das Nitrat durch fakultativ anaerobe Bakterien durch ihre Nitratreduktase zu Nitrit reduziert [113, 114] und somit steht das Nitrit dem Organismus durch die Aufnahme in das Blut über die oben genannten Möglichkeiten der Nitritreduktion als NO Quelle zur Verfügung. Erste Hinweise auf eine funktionelle Nitratreduktase außerhalb der Mundhöhle konnte in den Geweben und Plasma von Mäusen, Ratten und Menschen gefunden werden. In den Mäusen wurde das Nitrat intraperitoneal appliziert und führte zu einem Anstieg der Nitrat und Nitrit Konzentration im Plasma und den Organen. Die Applikation zeigte in keimfreien Mäusen den gleichen Effekt, eine Beteiligung von Bakterien an der Reduktion des Nitrates konnte somit ausgeschlossen werden [115]. Der größte Anteil an produziertem Nitrat im Organismus wird über den Urin ausgeschieden [113].

1.4 NO unter pathophysiologischen Bedingungen (Sepsis)

Die massive Freisetzung des biologischen Moleküls Stickstoffmonoxid (NO), welche in experimentell induzierter und klinischer Sepsis nachgewiesen werden konnte [116], spielt eine zentrale pathophysiologische Rolle in der Sepsis. Folge der erhöhten NO-Produktion ist eine systemische Vasodilatation mit Abnahme des systemischen Widerstandes, eine Herabregulation der Adrenorezeptoren an den Zellmembranen glatter Muskelzellen [117] und Unterdrückung der biologischen Aktivität von Katecholaminen [118-120]. Hohe NO-Dosen führen zudem zu einer direkten Beeinträchtigung der kardialen Funktion mit Abnahme der Kontraktilität [121] und sind mitverantwortlich für die Ausbildung der so genannten septischen Kardiomyopathie [33].

1. Einleitung

Es wird kontrovers diskutiert, welche NO-Synthase in welchem Stadium der Sepsis die Funktion des Hauptproduzenten von NO inne hat. Die NOS2 wird von vielen Autoren als Hauptproduzent des NO im septischen Geschehen angesehen.

Die Rolle der beiden konstitutiv exprimierten NO-Synthesen (NOS1 und NOS3) ist Schwerpunkt von Untersuchungen weltweit. Der NOS3 kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Stellung zu, da sie im septischen Geschehen entkoppelt wird. Eine Entkopplung bedeutet, es liegt eine Diskrepanz zwischen NOS Protein und NO-Produktion vor. Die NOS3 bildet unter diesen Umständen weniger NO, sondern es wird vermehrt Superoxid produziert [122]. Hauptsächlich kommt es zur entkoppelten NOS, wenn der Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH4) reduziert vorliegt. Die enzymatische Reduktion des molekularen Sauerstoffs ist nicht länger an das L-Arginin gekoppelt und somit kommt es zur Produktion von Superoxidionen und nicht zur Bildung von NO [123]. Das von der entkoppelten NOS3 gebildete Superoxid reagiert schneller mit NO als es von der Superoxid Dismutase (SOD) abgefangen und in H₂O₂ umgewandelt werden kann [124]. Aus dieser Reaktion geht das ebenfalls reaktive Peroxynitrit hervor.

Im Sepsisverlauf weist Peroxynitrit die Fähigkeit auf die Muskelkontraktilität über die Denaturierung von Proteinen, den Calcium Fluss und die mitochondrialen Atmung zu stören [83, 125]. Die Neutralisation von Peroxynitrit führt hingegen zu einer verbesserten kardialen Funktion im septischen Tiermodell [126]. Ein Teil des Peroxynitrits wird in Nitrotyrosin umgewandelt und kann als Marker einer vermehrten Peroxynitrit-Produktion angesehen werden.

In der frühen Phase der Sepsis steigert NO die Phagozytose der neutrophilen Granulozyten [127]. Im Gegensatz dazu nimmt die Adhäsion, die Rollen, die Migration, die oxidativen und mikrobizidalen Aktivitäten in der späten Phase der Sepsis durch NO ab [128, 129]. Die verringerte Migration der neutrophilen Granulozyten kann zum Teil durch die Herabregulation von CXCR2 durch NO erklärt werden [130].

Die erhöhten NO Konzentrationen in der Sepsis führen zu einer Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies in der Mikrozirkulation und zu einer Störung der Weiterleitung von Signalen und/oder der Kommunikation entlang der Blutgefäße. Die mikrovaskuläre Homeostasis nimmt ab [131, 132]. Dies wird als ein führender Grund für die heterogene Gewebespersion während der Sepsis im Tiermodell und in der menschlichen Sepsis angesehen [133-135] und führt zu hypoxischem Gewebe durch

die Unterversorgung mit Sauerstoff [136] welches schließlich zum Organversagen führt. Die exzessive Produktion von NO führt zu Hypotension und Katecholamin-Resistenz im septischen Schock [137].

Die kardiodepressive Wirkung der proinflammatorischen Zytokine ist allem Anschein nach durch NO vermittelt. Werden Kardiomyozyten von Ratten septischem Serum ausgesetzt verringert sich die Kontraktilität der Zellen, die Inhibition der NOS mit unselektiven Inhibitoren hebt diesen Effekt wieder auf [138]. Die Gabe des NO Donors Natrium Nitroprusside (SNP) führt in Patienten zu einer Abnahme des systolisch entwickelten Druckes trotz einer Zunahme der diastolischen Relaxation und Dehnbarkeit [139]. Erhöhte Konzentrationen an NO, wie sie in der Sepsis vorliegen, haben somit einen direkten Einfluss auf die Hämodynamik.

1.5 Inhibition der NO-Synthasen

In der Sepsis wird die übermäßige Produktion von NO als einer der Hauptgründe für das Multiorganversagen im septischen Schock und dem späteren Versterben der Patienten angesehen. Dem Körper ist es durch die Dilatation der Gefäße nicht möglich, die Organe ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Letztendlich Versagen die Organe und der Patient stirbt. Um diesen Problem entgegen zu wirken wurden Studien in septischen Tiermodellen durchgeführt, denen verschiedene NOS-Inhibitoren verabreicht wurden. Für die Inhibition der NOS liegen eine Reihe verschiedener Substanzen vor. Eine große Anzahl an Inhibitoren stellen die L-Arginin Analoga dar, diese binden an der L-Arginin Bindungsstelle am NOS-Protein. Es kommt zu einer kompetitiven Inhibition der NO-Synthese. Für alle drei NOS Isoformen liegen Inhibitoren vor, wobei die ausnahmslose Inhibition der NOS3 wegen mangelnder Spezifität zurzeit nicht möglich ist. Unter den verschiedenen Isoformen der NO-Synthasen (NOS) wird in der Sepsis insbesondere die NOS2 als leistungsstarkes NO-produzierendes Enzym diskutiert [140]. Unter anderem Entero- und Endotoxine sowie proinflammatorische Zytokine fördern die Expression der NOS2 in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Zellen des Endokards und Makrophagen [141]. Als innovativer Therapieansatz führte jedoch die Inhibition der NOS2 in experimentellen Sepsismodellen zu widersprüchlichen Ergebnissen [142-145]. In NOS2^{-/-} Mäusen oder pharmakologischer Inhibition der NOS2 konnte nach Induktion der Sepsis via CLP eine Zunahme der Norepinephrin Antwort mit verbesserter systolischer Funktion nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde aber

1. Einleitung

eine verringerte linksventrikuläre Relaxation festgestellt [146]. Die Rolle der konstitutiven NOS in der Sepsis, NOS3 und NOS1, welche insbesondere für die physiologische NO-Produktion verantwortlich sind, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits hatten NOS3- überexprimierende transgene Mäuse eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und eine bessere Überlebensprognose [147]. Andererseits wiesen NOS3^{-/-} Mäuse nach LPS-Gabe ein stabileres hämodynamisches Profil auf mit dem Resultat einer verbesserten Prognose der Versuchstiere [148]. Die pharmakologische Inhibition der NOS1 führte zu einer verbesserten Reaktion der Arteriolen auf Acetylcholin im Muskel septischer Ratten [149]. In einem Entzündungsmodell der Lunge bei Schafen hatte die Inhibition der NOS1 eine Verbesserung des pulmonalen Gasaustausches und vermindertem Anstieg der Plasma-NO_x-Spiegel zur Folge [150]. Sears et al. zeigte, dass die Inhibition der NOS1 assoziiert war mit einer Zunahme des intrazellulären Calciums in Kardiomyozyten und demzufolge mit einem positiv inotropen Effekt [151]. Welchen Einfluss die Inhibition der NOS1 und NOS3 auf den Verlauf der Sepsis und insbesondere die Ausprägung der septischen Kardiomyopathie in einem klinisch relevanten Sepsismodell hat, ist bislang nicht untersucht worden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Sepsis gehört trotz aller Fortschritte der modernen Intensivmedizin zu einer Erkrankung mit hoher Sterblichkeitsrate. Basierend auf der septischen Kardiomyopathie und einer katecholaminresistenten Vasodilatation, hat die kardiovaskuläre Dysfunktion daran einen großen Anteil. Das Stickstoffmonoxid spielt in diesem Zusammenhang eine große Rolle, da es direkt und indirekt an der kardialen Dysfunktion mitwirkt.

Im Hinblick darauf soll diese Arbeit klären:

- welche NOS den Hauptanteil an NO in der Frühphase des septischen Geschehens produziert
- ob die pharmakologische Inhibition bzw. genetische Depletion der verschiedenen NOS zu einem verlängertem Überleben führt
- welche Auswirkungen die Inhibition der NOS auf die Einwanderung von Entzündungszellen ins Herzgewebe hat
- ob die Inhibitionen/Deletion zu einer Milderung der septischen Kardiomyopathie führen

Im Laufe der Versuchsserien kristallisierte sich eine besondere Bedeutung der NOS3 in der Frühphase der Sepsis heraus. Die weiteren Fragestellungen wurden somit in WT und NOS3^{-/-} Mäusen durchgeführt, um einen besseren Einblick in die Rolle der NOS3 in der sich entwickelnden Sepsis zu erhalten:

- Verursacht die NOS3 eine kardiale und/oder eine vaskuläre Dysfunktion in der sich entwickelnden Sepsis?
- Ist die Genexpression von Proinflammatorischen Mediatoren durch die NOS3 in der Frühphase der Sepsis beeinflusst?
- Ist das NO der NOS3 an einer vermehrten Peroxynitrit Produktion in der frühen Phase der Sepsis beteiligt?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden männliche C57/Black6 Mäuse und NOS3 Knockout Mäuse mit C57/BL6 Hintergrund verwendet. Dieser Knockout Stamm wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke erstellt und phänotypisiert [152]. Das Körpergewicht lag bei allen Mäusen zwischen 25-35g und das Alter betrug 12-16 Wochen. Die Unterbringung und Pflege sowie Räumlichkeiten und Personal wurden von der Tierversuchsanstalt des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden in Käfigen vorgeschriebener Größe (Typ 2 oder 3) in Gruppen auf Holzgranulat bei einer Raumtemperatur von 19-21°C und einer angestrebten Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten. Es bestand ein 12-Stunden-Tag/ Nacht-Zyklus. Die Tiere erhielten Sniff Ratte/ Maus- Haltungsfutter und ein spezielles keimarmes Tränkwasser ad libitum. Die Tierversuche dieser Arbeit wurden nach der Genehmigung des Tierversuchsantrages durch das LANUV NRW in den Räumlichkeiten des Kardiologischen Labors an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.2 Versuchsübersicht

In der allgemeinen Versuchsübersicht (Abb. 5) ist zu erkennen, dass direkt nach der Coecum) Ligatur und Punction (CLP) bzw. sham Operation die Applikation (subkutan/ intraperitoneal) bzw. das Einsetzen der Osmosepumpe mit den NOS1 bzw. NOS2 Inhibitor oder Placebo erfolgte. 6 bzw. 12 Stunden nach der Sepsis Induktion erfolgte die Erhebung aller Messwerte dieser Studie.

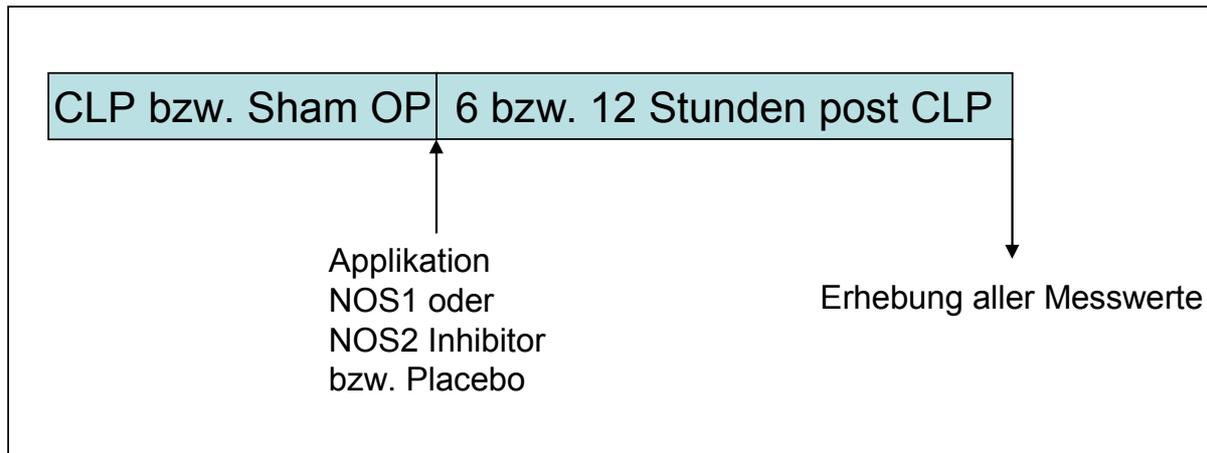


Abbildung 5: Versuchsübersicht

2.2. Verwendete Medikamente

2.2.1. 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 [153].

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.

Xylazinhydrochlorid gehört in die Gruppe der α -Agonisten und wirkt an zentralen und peripheren α -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 [154].

Im Gegensatz zu den kardiovaskulären Effekten kommt es bei der Ketamin/Xylazin Narkose nur zu einer geringen Beeinflussung der Atemtätigkeit [153], was eine Intubation und Beatmung der Versuchstiere nicht erforderlich machte.

2.2.2. Urethan

Urethan ist ein Anästhetikum, das häufig in Tierversuchen Verwendung findet, da es nachweislich einen sehr geringen Einfluss auf das Herz-Kreislaufsystem hat und somit für hämodynamische Untersuchungen prädestiniert ist. Die Narkosetiefe ist langanhaltend und gleichbleibend und mit einer erheblichen Erholungszeit verbunden. Dies ist durch die lange Halbwertszeit des Urethans im Organismus zu erklären, was mit einer langsamen hepatischen Metabolisierung einhergeht. Urethan ist somit für den Einsatz bei längeren chirurgischen Eingriffen gut geeignet, besonders wenn es sich um terminale Versuche wie in dieser Arbeit handelt [154].

Mit Urethan narkotisierte Tiere weisen ein sehr ähnliches physiologisches und pharmakologisches Verhalten auf wie nicht narkotisierte Tiere. Somit eignet sich diese Substanz hervorragend zur Untersuchung hämodynamischer Parameter, wie bei der invasiven Druck-Volumen-Messung [155].

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

2.2.3. 1400W

1400W (N-(3-(Aminomethyl(Benzyl)Azetamidin) ist der bisher selektivste aller beschriebenen NOS2 Blocker [71]. Er ist bei in vitro Versuchen 5000-fach selektiver für humane NOS2 gegenüber eNOS und 200-fach selektiver gegenüber NOS1. In Experimenten mit Rattenaorten konnte eine 1000-fach höhere Selektivität für NOS2 gegenüber NOS3 gezeigt werden. Die Hemmung der NOS2 scheint nahezu irreversibel zu sein und ist von NADPH als Kofaktor abhängig.

1400W ist zell- und gewebebegängig und weiterhin besteht im Gegensatz zu anderen NOS2 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 [156]. Es besteht also eine große therapeutische Breite, um eine adäquate, selektive Hemmung der NOS2 zu erreichen.

2.2.4. Vinyl-L-NIO (V-LNIO)

Vinyl-L-NIO (N5-(1-imino-3-butenyl)-L-ornithin) ist der, für murine Zwecke selektivste, kommerziell erhältliche NOS1-Inhibitor. In Ratten weist es eine Inhibitionskonstante

2. Material und Methoden

von $K_i=0,1\mu\text{m}$ für die NOS1, für die murine NOS2 $K_i=60\mu\text{m}$ und für die bovine NOS3 $K_i=12\mu\text{m}$ auf. Für humane NOS Formen ist dieser Blocker jedoch nur relativ gering selektiv [157]. Es liegen bisher keine rein murinen Selektivitätsanalysen für alle NOS Formen vor. Die Hemmung der NOS1 ist kompetitiv zu L-Arginin und auch hier von NADPH als Kofaktor abhängig [158].

2.2.5. Noradrenalin

Noradrenalin ist ein Katecholamin und Botenstoff des sympathischen Nervensystems. Es wirkt als Agonist an α - und geringer auch an β 1-Rezeptoren.

Eine Bindung an α 1-Rezeptoren führt zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung der Phospholipase C. Diese spaltet Phosphatidylinositol in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). IP3 setzt intrazellulär Calcium-Ionen frei und führt so zu einer Tonuserhöhung der glatten Gefäßmuskulatur. Es kommt zur Vasokonstriktion mit Nachlaststeigerung.

Die Stimulation der β 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.

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

2.3. Sepsisinduktion durch Coecum Ligatur und Punktion (CLP) bzw. Sham- Operation

Die Caecum-Ligatur und Punktion führt in den Tieren zur Entstehung einer Übergangsstelle der Bakterien aus dem Darm-Lumen in den Peritonealraum der Maus. Durch den Eintritt in den Peritonealraum kommt es meist zu einer ausgeprägten Bauchfellentzündung.

Durch intraperitoneale Injektion von S-ketaminhydrochlorid (Ketanest S, Parke-Davis, Pfizer; 60mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2% Bernburg, medistar; 10mg/kg Körpergewicht) erfolgte die Anästhesie der Mäuse. Der

2. Material und Methoden

Zwischenzehenreflex diente als Kontrolle der ausreichenden Narkosetiefe. Unter Narkose wurde der Operationsbereich, das Abdomen, rasiert und das Versuchstier auf einem auf 37°C vorgewärmten Operationstisch auf dem Rücken liegend fixiert. Die Hautdesinfektion des Operationsbereiches erfolgte mit Povidon-Iod (Betaisodona Lösung, Mundipharma). Zu Operationsbeginn folgte eine Hautinzision von 10-15 mm mit einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11) entlang der Linea alba. Zur Eröffnung der Bauchhöhle wurde mit einer geraden feinen Schere (FST 14088-10) das Peritoneum ebenfalls in einer Länge von ca. 10 mm in medianer Schnitfführung durchtrennt. Die Mobilisierung des Caecums aus der Bauchhöhle geschah mit Hilfe zweier mit Kochsalzlösung (NaCl) befeuchteter Wattestäbchen, ohne umliegende Strukturen zu schädigen. Die Darstellung des Caecums erfolgte während des gesamten Operationsverlaufs auf einer mit NaCl getränkten sterilen 2 x 2 cm großen Kompresse. Das Coecum wurde anschließend unmittelbar distal der Ileocoecalklappe mit einem Seidenfaden ligiert. Mit einer 20G Kanüle wurde das Coecum mittels Punktionsmethode „durch und durch“ punktiert, wobei die Kanüle innerhalb des Coecum-Lumens vorgeschoben und weiter distal wieder hinausgeführt wurde, so entstanden zwei Punktionsstellen. Nach Entfernung der Kanüle wurde aus den beiden Punktionsstellen eine kleine Stuhlmenge herausgedrückt. Das Reponieren des Coecums in die Bauchhöhle erfolgte mit Hilfe der mit NaCl befeuchteten Wattestäbchen. Peritoneum und Muskelschicht wurden adaptiert und mit 4-0 Seide in Einzelknopfnahntechnik verschlossen. Ebenso erfolgte die Adaptation und Naht der Haut. Abschließend wurde die Hautnaht mit Betaisodona Lösung desinfiziert. Die Sepsisinduktion mittels CLP wurde in WT C57/BL6 Mäusen wie in NOS3 KO Mäusen durchgeführt. Als Kontrolle der CLP-Induktion dienten sham operierte Tiere. Die Sham-Operation wurde durchgeführt wie die CLP-Induktion mit Ausnahme der Ligatur und Punktion des Coecums. Zur Volumensubstitution erhielten alle Mäuse unmittelbar postoperativ und im Weiteren Versuchsablauf alle 6-8 Stunden 0,9% NaCl (0,05 ml/g Körpergewicht) subkutan, zur Schmerzmedikation erhielten die Tiere im gleichen Zeitraum Temgesic (0,05-0,1mg/kg subkutan). Bis zum Versucheende wurden die Tiere unter eine Wärmelampe bei etwa 37°C platziert. Wasser und Futter wurden ad libitum bereitgestellt.

2.4 Verabreichung des NOS1 Inhibitors über eine Osmosepumpe

Zur Inhibition der NOS1 wurde V-LNIO genutzt, welches mittels einer osmotischen Minipumpe (Alzet) kontinuierlich über den gesamten Versuchsablauf verabreicht (0,5mg/kg/Tag) wurde. Die Pumpe wurde 4 Stunden vor dem Einsetzen in die Maus in 37°C NaCl equilibriert, so dass die Pumpen sofort nach dem Einsetzen mit der Freisetzung begannen. Vor dem Verschließen des Peritoneums bei der CLP Operation wurden die Mini-Pumpen in den Bauchraum verbracht und verblieben dort bis zum Ende des Versuches.

2.5 Applikation des NOS2 Inhibitors

Der Versuchstiergruppe mit NOS2 Inhibition wurde direkt vor der Operation subkutan 6,66mg/kg 1400W injiziert und im Anschluss an die Operation die gleiche Menge intraperitoneal verabreicht. Dies sollte die sofortige Wirkung des Inhibitors nach der Operation sicherstellen.

2.6 Blutentnahme durch Herzpunktion

Für die Untersuchung der Glutathion (GSH) Konzentrationen im Vollblut, der Bestimmung der Nitrit und Nitrat Konzentrationen sowie für die Bestimmung der erythrozytären Verformbarkeit war es nötig den Tieren terminal Blut zu entnehmen. Dies erfolgte durch die Herzpunktion durch den geschlossenen Thorax der Maus. Andere Möglichkeiten der Blutentnahme wiesen Limitierungen in der Menge des gewonnenen Blutes (Herzpunktion bei geöffneten Thorax) oder Kontaminationen mit Nitrit und Nitrat (retrobulbär) auf, so dass diese Methoden nicht in Frage kamen.

2.7. Bakteriennachweis in Lavage und Blutkultur

Zur Feststellung der bakteriellen Situation der Mäuse nach CLP wurden aus Vollblut der Tiere Blutkulturen angelegt und eine Lavage des Peritonealraumes durchgeführt. Vor der Blutentnahme und peritonealer Flüssigkeitsgewinnung wurden die Tiere mit Esketaminhydrochlorid (Ketanest S, Parke-Davis, Pfizer; 100mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2% Bernburg, medistar; 10mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Die Blutproben wurden per Herzpunktion den Tieren entnommen und in EDTA-Röhrchen überführt. Zur Gewinnung von Flüssigkeit aus dem peritoneal Raum wurden den Mäusen 12 Stunden nach Sepsis-Induktion 2ml NaCl in den Bauraum

gespritzt und durch die geschlossene Bauchdecke mit den Finger einmassiert. Die Bauchdecke wurde eröffnet und die Flüssigkeit mit einer 1 ml Spritze aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die peritoneale Flüssigkeit und die Blutproben wurden an das Mikrobiologische Labor der TVA übergeben (Leiterin: Frau Dr. vet. med. Peter) und dort wurden Kulturen angefertigt und auf spezifischen Platten die Bakterien angezogen. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden dem Verfasser zur Verfügung gestellt.

2.8. Überlebenszeiten nach Sepsisinduktion bzw. Sham-Behandlung

In einem ersten experimentellen Versuchsansatz wurden die Überlebenszeiten der acht Versuchstiergruppen gegenübergestellt. Bei 4 Gruppen (C57/BL6 + Placebo vs. C57/BL6 + 1400W vs. C57/B6 + V-LNIO vs. NOS3 KO + Placebo, jeweils n=12) wurde eine Sepsis mittels CLP induziert, bei den anderen 4 Gruppen (C57/BL6 + Placebo vs. C57/B6 + 1400W vs. C57/BL6 + V-LNIO vs. NOS3 KO + Placebo jeweils n=12) erfolgte eine Sham-Behandlung. Alle acht Gruppen wurden postoperativ in 2-stündlichen Kontrollen engmaschig über einen Zeitraum von mindestens 72 Stunden überwacht und die jeweilige Überlebenszeit des einzelnen Versuchstiers festgehalten. Die Tiere erhielten als Analgesie alle 6-8 Stunden 0,05-0,1mg/kg Temgesic subkutan und hatten Zugang zu Wasser und Futter ad libitum.

2.9. Invasive Druckmessung mittels Miniaturkatheter

Methodik

Die invasive Druckmessung in der rechten A. carotis communis und im linken Ventrikel des Herzens wurde zu den Zeitpunkten 6 und 12 Stunden postoperativ nach Sepsisinduktion mittels CLP bzw. Sham-Behandlung in C57/BL6 wie auch in NOS3^{-/-} Mäusen durchgeführt. Die 6 unterschiedlichen Versuchstiergruppen wurden hinsichtlich der arteriellen Blutdruckwerte und Druckwerte im Herzen miteinander verglichen, dabei wurden sowohl Werte der Baseline als auch nach Applikation von Arterenol aufgezeichnet. Bei dem verwendeten Katheter handelt es sich um einen Druck-Volumen Katheter von der Firma Millar mit einem Durchmesser von 1,2 F (entspricht ca. 0,4 mm). Die Drucksensoren des Katheters befinden sich zwischen den zwei Volumen Sensoren.

2. Material und Methoden

Versuchsdurchführung

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte mit Urethan (1 molar) körperrgewichtsadaptiert (1,5g/kg Körpergewicht). Die ausreichende Narkosetiefe wurde per „Zwischenzehenreflex“ überprüft. Die Fixation des Versuchstieres erfolgte wie in 2.3 bereits beschrieben. Zu Operationsbeginn wurde mit einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11) auf der rechten Seite des Halses in Höhe des Kehlkopfes eine circa 2cm lange von kranial nach kaudal laufender Hautschnitt gesetzt und die Haut vorsichtig mit gebogenen Mikropinzetten (Aesculap BD333R) auseinander gezogen. Die weiteren Präparationsschritte erfolgten zur besseren Darstellung der anatomischen Strukturen unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops (Leica MZ9-5). Die unter der Haut liegende Faszien der geraden Halsmuskulatur wurden vorsichtig mit den gebogenen Mikropinzetten auseinander gezogen und die Speicheldrüse zur Seite gelegt, ohne dabei umliegende Strukturen zu schädigen. Nach Mobilisation der geraden Halsmuskulatur lag die Trachea frei. Lateral der Trachea wurde die etwa 2 mm entfernt liegende Gefäßnervenscheide mit der Arteria carotis communis, der Vena jugularis interna und des Nervus vagus sichtbar. Die Gefäßnervenscheide wurde eröffnet und mit einer gebogenen Mikropinzette die Aorta carotis communis mobilisiert. Die Darstellung der Aorta carotis communis erfolgte auf einer Länge von etwa 2 cm bis zur Bifurcatio carotis. Durch Ligatur der Aorta carotis communis unmittelbar kaudal der Bifurkation und Setzen eines Gefäßclips 1-2cm kaudal der Ligatur konnte eine von der Blutzirkulation ausgesparte Gefäßstelle erreicht werden. Mit einer geraden Sprungschere (FST 15003-8) wurde in die Gefäßwand dieses undurchbluteten Gefäßabschnittes vorsichtig ein kleines Loch geschnitten. Die Einführung des Katheters erfolgte über diese Öffnung unter Zuhilfenahme eines Katheterhalters (S&T 00608). Nach Öffnen der kaudal positionierten Gefäßklemme wurde der Katheter bis in die Aorta vorgeschoben und dort die Blutdruckdaten aufgezeichnet. Nach zwei minütiger Aufnahme wurde der Katheter über die Aortenklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben und dort die Druckdaten des Herzens Baseline für zwei Minuten und während 12 Minuten Arterienolgabe erhoben. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der IOX Software und die Auswertung erfolgte offline.

2.10. Hämodynamische Eigenschaften des isolierten Herzens im Langendorff-Modell

Methodik

Für die Experimente am isolierten Herzen der Maus wurde das Langendorff-Modell (Hugo Sachs Elektronik/ Harvard Apparatus) genutzt. Über die Aorta erfolgte die retrograde Perfusion des Herzens mit einer Perfusionslösung (Krebs-Henseleit-Lösung). Die Perfusion der Koronararterien wurde durch platzieren der Kanüle oberhalb der Aortenklappe sicher gestellt und mit einer Fadenligatur fixiert. Durch die retrograde Perfusion kommt es zum Schluss der Aortenklappe und das Perfusat muss durch die Koronarien fließen bevor es über den Sinus coronarius und die Koronarvenen das Herz verlässt. Die Oxygenierung des Perfusats erfolgte durch Begasung mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) über eine Glasfritte. Der Perfusionsdruck der Langendorff-Apparatur wurde konstant bei 100mmHg gehalten, der sich aus dem hydrostatischen Druck der Perfusat- Säule und dem Druck des Gases zusammensetzte. Ein Durchflussmesser (PLUGSYS Modul FLOW MEASUREMENT, FM Typ 662) nahm den resultierenden koronaren Fluss auf. Zusätzlich zum Perfusionsdruck und dem resultierenden koronaren Fluss wurde die mechanische Aktion des Herzens als isovolumetrische Kontraktionen des linken Ventrikels durch einen flüssigkeitsgefüllten Ballon aus Polyvinylchlorid gemessen. Dieser wurde im Labor selbst hergestellt. Der Ballon wurde vor Beginn der Messungen über den linken Vorhof in den linken Ventrikel eingeführt und wurde über eine spezielle Spritze (Rekordspritze Fortuna Optima) mit Flüssigkeit gefüllt, um die Vorlast des Herzens zu simulieren. Der Ballon war mit einem Druckwandler (ISOTEC) verbunden.

Versuchsdurchführung

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Versuchstier zur Herz- und Aortenentnahme auf einer auf 37°C vorgewärmten Wärmeplatte auf den Rücken liegend fixiert. Zur Brustkorberöffnung wurde unterhalb des Xiphoids mit einer gebogenen chirurgischen Schere (FST 14075-11) ein circa 1 cm langer vertikale Hautschnitt gesetzt, der die Eröffnung der thorakalen Faszie mit einschloss. Zur weiteren Eröffnung des Thorax erfolgten bilaterale Schnitte in kranialer Richtung unter Durchtrennung der Rippen. Der mobilisierte Teil des Thorax wurde am

2. Material und Methoden

Schlüsselbein vom Körper getrennt und zur Seite gelegt, um Herz und Lunge darstellen zu können. Zur Entnahme des Herzens wurde die Aorta am Aortenbogen mit einer feinen Pinzette ergriffen und durchtrennt. Das Herz konnte entnommen werden und in einer vorgekühlten, mit präoxygenierten und heparinisierten Puffer gefüllten Präparationsschale vom Thymus und anderen Geweben befreit werden. Alle weiteren Präparationschritte erfolgten unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops (Leica MZ9- 5). Die Aorta wurde in einer Länge von circa 1cm dargestellt und mittels Mikropinzetten (Aesculap BD 331 R) und einer feinen geraden Schere frei präpariert. Unmittelbar proximal des Abgangs des Truncus brachiocephalicus wurde die Aorta durchtrennt. Über die Durchtrennung der Venae pulmonales wurde ein Zugang zum linken Vorhof geschaffen, um durch diesen einen Ballon in den linken Ventrikel vorbringen zu können. Die Aorta wurde mit zwei feinen geraden Pinzetten gefasst und über die mit Perfusat gefüllte Aortenkanüle gezogen. Mittels Seide wurde die Aorta unter mikroskopischer Kontrolle auf der Kanüle ligiert. Um später eine ungehinderte Perfusion im koronaren Gefäßsystem zu gewährleisten, erfolgte zum Schluss ein Einschnitt der Arteria pulmonalis, welche sich unmittelbar in der Nähe zur Aorta befindet. Das isolierte Herz wurde schließlich über die Aortenkanüle an die Langendorff- Apparatur angeschlossen. Um Luftembolien im Herzen zu vermeiden wurde die Kanüle im schiefen Winkel mit der Apparatur verbunden aus der bereits Perfusat tropfte. In den linken Ventrikel wurde ein Ballon zur Druckaufnahme eingeführt und ein Herzschrittmacher an die Außenwand angelegt, um eine Herzfrequenz von circa 600 Schlägen pro Minute zu erreichen.

Versuchsprotokoll:

1. 20 Minuten Einschlagphase
2. 1 Minute Baseline Messung vor globaler Ischämie
3. 20 Sekunden Globale Ischämie
4. Aufnahme Fluss- und Druckpeaks und 5 Minuten Reperfusion

2.11 Aortenringversuche im Organbad

Die Präparation der Aorta wurde in den gleichen Tieren durchgeführt, denen schon das Herz für die ex vivo Untersuchung im Langendorff-Modell entnommen wurde. Zu Beginn wurden die verbliebenen Lungenflügel entfernt, um freie Sicht auf die Aorta

2. Material und Methoden

zu erhalten. Mit einer Mikroschere wurde die Scheide, welche die Aorta und Vene umschließt, an einer Seite eröffnet. Die Aorta wurde am kranialen Ende vom Aortenbogen getrennt und angehoben um noch anhaftendes Gewebe beim Herauspräparieren zu entfernen. Die Aorta wurde nun möglichst weit caudal durchtrennt, um ein möglichst langes Stück der Aorta zu erhalten. Die frei präparierte Aorta wurde in kalten Krebs-Henseleit Puffer verbracht und dort von etwaigen vorhandenen Gewebeanhaftungen befreit. Die Aorta wurde in drei gleich lange Stücke mit einer Länge von 1-2 mm geteilt und vorsichtig auf Gewebeklammern gezogen. Der Aortenring wurde über einen zweiten stationären Gegenhaken gezogen und auf eine Vorspannung von 10mN (~1g) im Organbad gebracht. Im Organbad wurde der Krebs-Henseleit-Puffer auf einer Temperatur von 37°C gehalten und über den gesamten Versuchsablauf mit Carbogen begast. Die Aortenringe wurden 90 Minuten im 2 ml Organbad equilibriert, die Vorspannung wurde alle 15 Minuten wiederhergestellt und der Puffer gewechselt. Nach Ablauf der 90 Minuten konnte mit dem Experiment begonnen werden.

Versuchsablauf:

1. 90 Minuten Equilibrierung
2. Gabe von 40 µl 4M Kaliumchloridlösung (Konzentration Organbad: 80mM)
3. Waschphase
4. Gabe von 20µl 10µM Phenylephrin Lösung (Konzentration Organbad: 0,1µM)
5. Aufsteigende Gabe von Acetylcholin (Konzentration Organbad: 1nm-10µM)
6. Waschphase
7. Aufsteigende Gabe von Phenylephrine (Konzentration Organbad: 1nm-10µM)
8. Waschphase
9. Gabe von 20µl 100µM Phenylephrine (Konzentration Organbad: 1µM)
10. Aufsteigende Gabe von SNP (Konzentration Organbad: 0,1nm-10µM)
11. Ende des Versuches

In den Waschphasen wurde der Puffer mehrfach gewechselt, um sicher zu stellen, dass alle Rückstände der Wirkstoffe beseitigt sind. Die aufsteigenden Gaben von den einzelnen Wirkstoffen erfolgten kumulativ. Gemessen wurden die Kraftentwicklungen in mN bei isometrischer Kontraktion und der Kraftabbau bei der Relaxation der Aortenringe. Alle Messungen wurden grundsätzlich als

2. Material und Methoden

Mehrfachbestimmung durchgeführt, pro Versuchsansatz wurden mindestens 2 Aortenringe eines Tieres parallel gemessen. Die Aufzeichnung der Versuchsergebnisse geschah online mit der Software Chart 2.0.

2.12 Total GSH aus Vollblutproben

Methodik

Die Konzentration von Glutathion ist in animalen Zellen und im Blut mit 5mM bzw. 1mM hoch und wird allgemein als eines der Hauptantioxidantien im humanen Gewebe beschrieben. Die Hauptfunktion des Glutathions im Vollblut ist der Schutz der Erythrozyten vor Oxidationsschäden. Die Glutathion Peroxidase katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid und lipiden Hydroperoxide zu Wasser und zugehörigen Alkoholen. Während dieses Prozesses wird GSH zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert. Über die Glutathion Reduktase und NADPH wird das GSSG wieder zu GSH reduziert. Die Reduktion des GSSG wurde in diesem Versuchsansatz nicht unterbunden, die Messung der Proben ergaben somit den Gesamt GSH Gehalt (GSht).

Der eingesetzte Assay zur Bestimmung des GSht verwendet die von Tietze [159] eingeführte enzymatische Methode zur quantitativen Bestimmung von reduziertem Glutathion. Das Ellman`s Reagenz(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid; DNTB) bildet bei der Reaktion mit GSH ein bei 412nm spektrophotometrisch detektierbares Produkt.

Versuchsdurchführung

Es wurden unbehandelte, 6h post CLP und 12h post CLP Tiere untersucht. Direkt nach Abnahme des Blutes mittels Herzpunktion wurde das Blut in ein lichtundurchlässiges Reaktionsgefäß überführt, in dem Heparin vorgelegt war, und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Bis zur Messung der Proben wurden diese in einem -80°C Gefrierschrank gelagert. Die Messung des GSht Gehaltes erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Berechnung der GSht Konzentrationen erfolgte in drei Schritten:

1. Bestimmung der Reaktionsrate

2. Material und Methoden

2. Erstellung der Kalibrationskurven
3. Berechnung der Konzentration der Analyte

Die Ermittlung der Reaktionsrate wurde als Absorptionsänderung bei 412nm als lineare Funktion aufgetragen und entsprach der GSH Konzentration im Reaktionsansatz. Dabei wurde die folgende Gleichung zur Berechnung verwendet:

$$\text{Absorbtion}_{412\text{nm}/\text{min}} = \frac{\text{Steigung der Geraden} * 3 \text{ min} + \text{Schnittpunkt mit der y-Achse}}{3 \text{ min}}$$

Die Nettorate der Absorptionsänderung_{412nm/min} wurde durch Abzug der Absorptionsänderung des Kontrollgefäßes ohne Probe von denen der Kalibration und Proben erreicht. Anschließend wurde eine Regressionsgerade für die Kalibratoren erstellt, bei der die Nettorate über die Konzentration aufgetragen wurde. Für GSht wurde eine Drei-Punkt- Regressionsgerade mit den Konzentrationen 0, 1,5 und 3µM erstellt. Die Berechnung der GSht Konzentrationen in den gemessenen Proben erfolgte anhand der ermittelten Regressionsgleichung, die mit dieser Gleichung beschrieben werden kann:

$$\text{GSht } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Nettorate}_{\text{Probe}} - \text{Schnittpunkt mit der y-Achse}}{\text{Steigung}_{\text{Kalibrator}}} * \text{Verdünnungsfaktor (488)}$$

2.13 Bestimmung der Verformbarkeit der Erythrozyten mittels Laser-assisted-optical rotational cell Analysator (LORCA) in vitro

Methodik

Zur Bestimmung des hämorheologischen Parameters der Verformbarkeit von Erythrozyten kam die Methode des Laser-assisted-optical rotational cell analysators zum Einsatz. Die wesentlichen Bestandteile des LORCA Messsystems ist ein 4mW Helium-Neon Laser, ein thermoreguliertes Zylinder-System, einem Stufenmotor und eine an einem Computer angeschlossenen Videokamera. Zur Messung der Probe wird diese in den äußeren rotierenden Glas-Zylinder (Cup) pipettiert. In der Mitte des Cups befindet sich ein statischer Metallzylinder, auch Bob genannt.

2. Material und Methoden

Der Helium-Neon Laser ist auf einen Spiegel gerichtet, wird von dort reflektiert und durchquert die Erythrozyten in der Probe. Durch die Durchquerung der Erythrozyten kommt es zur Veränderung der Beugung des Lichtes und das resultierende Diffraktionsmuster wird auf eine Membran projiziert. Bei ruhenden Erythrozyten stellt sich dieses Muster rund dar, bei wirkenden Scherkräften wird es elliptisch und eine Formveränderung tritt auf [160]. Die Projektionsmembran ist mit einer Millimeter-Kalibrationsleiste versehen, die eine Vermessung der beiden Zell-Radi a und b ermöglicht. Als Maß der Verformbarkeit wird von insgesamt 50 Aufnahmen aus den beiden Radi der Elongationsindex und der dazugehörigen Standardabweichung berechnet.

Versuchsdurchführung

Für die Verformbarkeitsuntersuchung der Erythrozyten wurde ein Volumen von 25 μ l anticoaguliertem Blut (Heparin) verwendet. Das Blut wurde bis zur Messung, nicht länger als 2h, auf Eis gelagert. 25 μ l jeder Probe wurde in je 5ml einer auf 37°C vorgewärmten 0,14mM Polyvinylpyrrolidon (PVP) Lösung gegeben. Dieses visköse Medium mit einer Osmolarität von 31mPa*sec diente der Erhöhung der auf die Probe ausübenden Scherkraft. Die Blutprobe verhält sich dadurch während der computerkontrollierten Messung annähernd wie eine Newtonschen Flüssigkeit. Für die eigentliche Messung wurde ein Volumen von 1ml der hergestellten Blut-PVP-Suspension zwischen Bob und Cup pipettiert und mittels Rotation des letzteren definierten Scherraten ausgesetzt. Insgesamt wurde der Elongationsindex von neun Scherraten berechnet. Aus den Elongationsindices konnte eine Lineweaver-Burk Analyse (siehe Abb. 6) durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Scherrate für die halbmaximale Elongation (K_{EI}) der verschiedenen Gruppen miteinander verglichen.

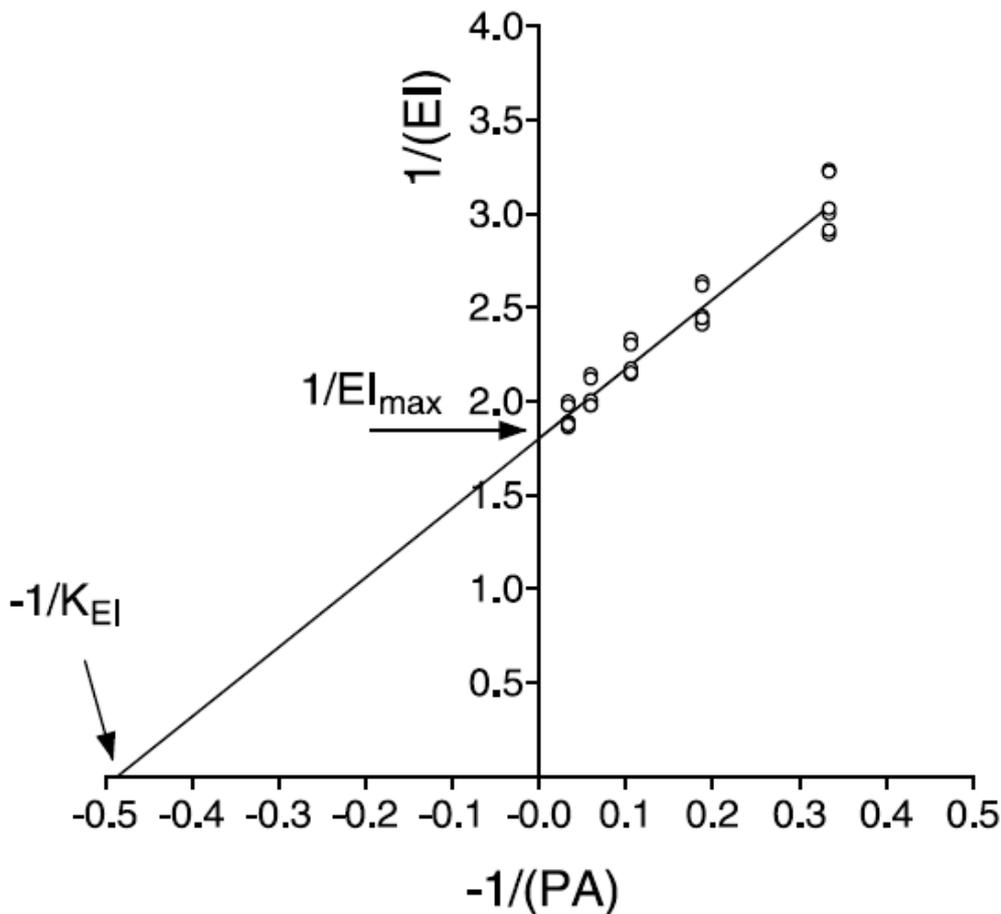


Abbildung 6: Lineweaver-Burk Analyse. (modifiziert nach Condon 2003 [161])

EI = Zell Elongationsindex, EI_{max} = maximale Elongation, K_{EI} = Sherrate welche halbmaximale Elongation verursacht

2.14 Bestimmung der Nitrit und Nitrat Konzentrationen im Plasma und Herzgewebe

Die Bestimmung der Konzentration von Nitrit und Nitrat aus den Plasma- und Herzgewebeproben erfolgte in einer simultanen Messung mit dem ENO-20 (siehe Abb. 7).

Methodik

Das Messprinzip beruht auf einer Kombination aus Umkehrphasen-Chromatographie und einer Azokopplung. Bevor die Proben in das System gelangen ist eine sogenannte Vorsäule vorgeschaltet, die in der Probe enthaltene Proteine herausfiltert. Diese Säule wurde vor jeder Messserie neu erstellt. Nach Durchlauf durch die Vorsäule gelangte die Probe in die Umkehrphase-Separationssäule, in der Nitrit und Nitrat zeitlich voneinander getrennt wurden. In der Kupfer-Kadmiumgranulat gefüllten Reduktionssäule wurde das Nitrat zu Nitrit reduziert und

2. Material und Methoden

in einer Reaktionsschleife wurde das Nitrit mit Griess-Reagenz (Sulfanilamid und N-(1naphthyl)ethyldiamin) versetzt und ein Diazofarbstoff entstand. Dessen Absorption wurde bei der Wellenlänge 540nm von einem Durchflussspektrophotometer gemessen und entspricht proportional der Nitritkonzentration. Durch die zeitliche Auftrennung des Nitrits der Probe und des aus Nitrat reduzierten Nitrits ist es möglich, das beide Messwerte in einem Lauf bestimmt werden konnten. Der Nitrit-Peak erscheint dabei nach einer Retentionszeit von ca. 4,5 Minuten und der Nitrat-Peak bei ca. 8 Minuten. Im Gehäuse, der „Säulen Ofen“, des ENO-20 lag eine konstante Temperatur von 35°C vor. Die mobile Phase, der sogenannte Carrier, wurde per Pumpe mit einem konstanten Fluss von 0,33ml/min in das System geleitet. In der Reaktionsschleife wurde das Gries-Reagenz, der Reaktor, mit einem Fluss von 0,1ml/min hinzugefügt.

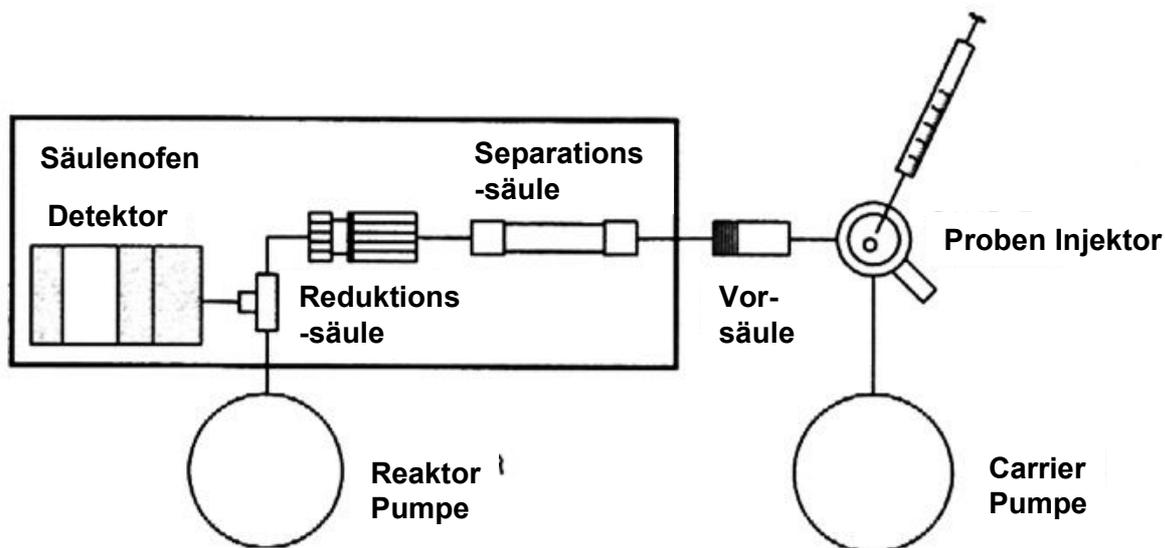


Abbildung 7: Aufbau des ENO-20 (modifiziert nach Bryan 2007 [162])

Versuchsdurchführung

Die bei -80°C gelagerten Plasma Proben wurden auf Eis aufgetaut und 1:1 mit Methanol gefällt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm, 4°C und 10 Minuten. Der Überstand wurde in HPLC-Reaktionsgefäße (Eppendorf Reaktionsgefäß 3810) überführt und in den vorgekühlten Autosampler gestellt.

Zur Bestimmung der Nitrit/Nitrat Konzentrationen aus den Geweben, wurden diese bis zur Aufbereitung bei -80°C gelagert. Die gefrorenen Gewebeproben wurden mit einem Glas-Glas Homogenisierung System von Schütt in NaCl in einem Verhältnis

1:5 homogenisiert. Das Homogenat wurde sofort im Anschluss 1:1 mit Methanol gefällt und wie bei den Plasma Proben beschrieben weiter verarbeitet.

Das Probevolumen sollte ein Gesamtvolumen von mindestens 70µl aufweisen, damit der Autosampler die Probe aufnehmen konnte. Vor dem Start einer Messserie musste eine Kalibrationslösung hergestellt werden, in der Nitrit und Nitrat in einer Konzentration von 10µM vorlag. Diese wurde vor der ersten Messung zweifach eingemessen. Auf Grundlage der Kalibration wurden die Konzentrationen der Proben mittels Area under curve bestimmt.

2.15 Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (ESR)

Methodik

Die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) ist eine physikalische Meßmethode, die Zugang zu Aspekten der Struktur, Molekül- und Gitterdynamik sowie Reaktionsdynamik von stofflichen Systemen bietet. Die ESR basiert auf der Absorption von Mikrowellenstrahlung durch ungepaarte Elektronen, die sich in einem von außen angelegten Magnetfeld befinden. Ungepaarte Elektronen haben aufgrund ihres Eigendrehimpulses, der auch als „Spin“ bezeichnet wird, ein magnetisches Moment. In einem äußeren Magnetfeld bestehen für ungepaarte Elektronen zwei Möglichkeiten der Spin- bzw. Magnetfeldorientierung. Der Grundzustand entspricht der Anziehung im äußeren Magnetfeld und wird als „parallel“, der angeregte Zustand ist durch Abstoßung im äußeren Magnetfeld gekennzeichnet und wird als „antiparallel“ bezeichnet (Zeemann-Aufspaltung). Man unterscheidet diamagnetische und paramagnetische Substanzen. Eine Substanz ist paramagnetisch, wenn sich die Elektronenspins nicht durch Spinpaarung gegenseitig aufheben. Nur in diesem Fall ist auch ein ESR-Signal zu beobachten. Die ESR-Spektroskopie hat eine Nachweisgrenze von etwa 10^{-9} mol/l (bezogen auf paramagnetische Zentren), und die Zeitauflösung liegt typischerweise im Bereich von 10–100ns. Bei einer Reihe von Prozessen treten intermediäre Spezies (meist Radikale wie $\text{NO}\cdot$) mit sehr kurzer Lebensdauer auf. Obwohl die hochauflösende ESR eine der zuverlässigsten Methoden für die direkte Messung von $\text{NO}\cdot$ in biologischen Prozessen repräsentiert [163, 164] ist sie für diese Untersuchungen jedoch zu langsam. In diesem Fall kann man sich einer Variante der Sondentechniken bedienen, bei der eine sogenannte Spinfalle (engl. spin trap) in das System eingebracht wird, die die kurzlebigen Radikale abfängt. Zu den $\text{NO}\cdot$ - Spinfallen gehören das hydrophile Eisen-N-methyl-D-

2. Material und Methoden

glucamin-Dithiocarbamate; $(\text{Fe}(\text{MGD})_2)$ und das hydrophobe Eisen-Diethyldithiocarbamat $(\text{Fe}(\text{DETC})_2)$ [165]. Diese Fallen werden für die selektive Detektion und Quantifizierung von geringen $\text{NO}\cdot$ -Mengen in Lösungen, Zellen oder tierischen sowie pflanzlichen Geweben eingesetzt [166-168], wobei ein paramagnetischer Mononitrosyl-Eisen $^{2+}$ -Dithiocarbamat-(MNIC)-Komplex entsteht. Dieser weist im ESR Spektrum eine charakteristische Tripletthyperfeinaufspaltung auf (Abb. 8). Diese beiden Agenzien bilden zusammen einen hydrophoben $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ Komplex, der als Spinfalle fungiert und der Detektion von $\text{NO}\cdot$ in Geweben dient [165, 169].

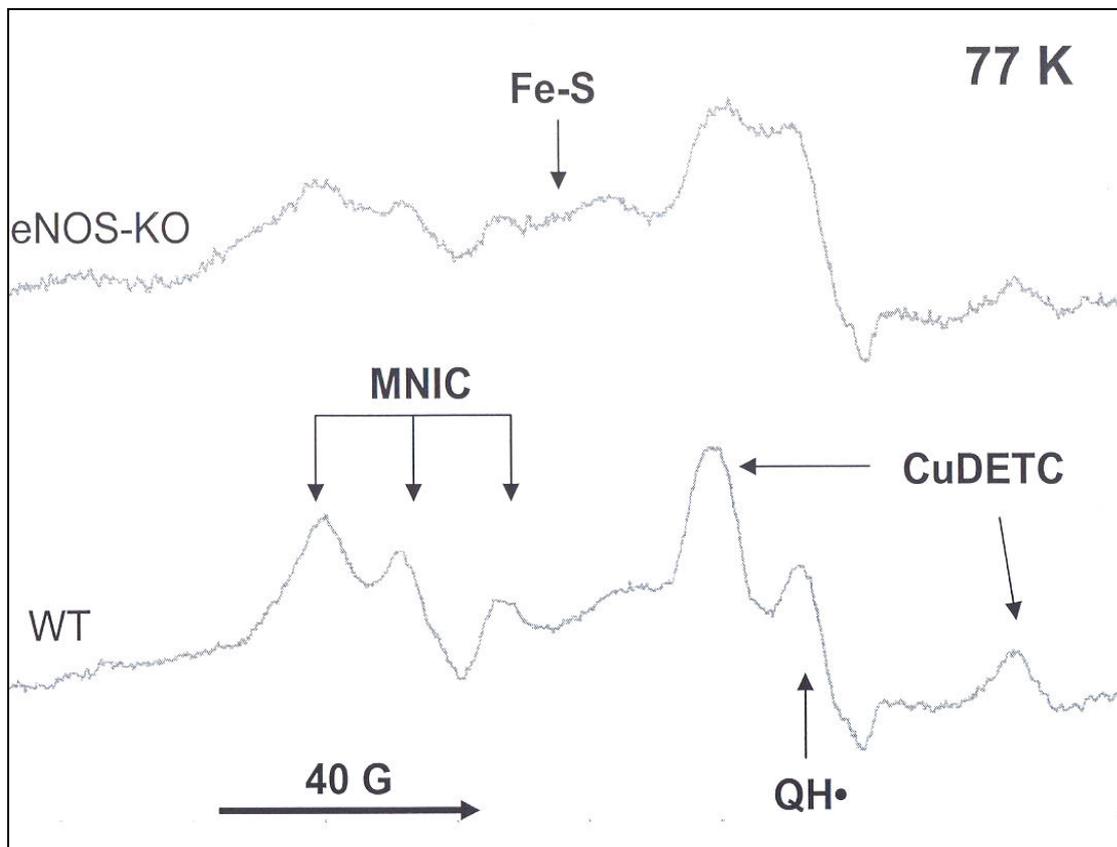


Abbildung 8: ESR Spektrum eines septischen $\text{NOS}^{3-/-}$ und WT Herzens im Vergleich.

Versuchsdurchführung

Den Versuchstieren wurden beide Reagenzien zum gleichen Zeitpunkt an unterschiedlichen Körperstellen injiziert (Nacken subkutan und intraperitoneal). Nach Injektion wurden die Tiere 30 Minuten in den Käfig zurückgesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Tiere narkotisiert und durch Verbluten getötet. Das Herz wurde entnommen und zur Untersuchung in Flüssigstickstoff Schock gefroren und bis zur Messung gelagert. Die ESR-Messapparatur bestand aus einem ESP300 Spektrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Deutschland), welches mit einer

2. Material und Methoden

Mikrowellenfrequenz von etwa 9,53 GHz arbeitet und mit einem hochsensitiven Probenkopf (V2.0) ausgestattet ist. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 77°K. Die ESR-Spektren wurden im Durchschnitt mit 30 Scans und einer Sweep time von 83s, einer Zeitkonstante von 82ms, einer Modulationsamplitude von 0,5mT, einer Modulationsfrequenz von 100KHz und 20mW Mikrowellenenergie bei einer Frequenz von 9,53 GHz aufgenommen. Die Proben wurden in Düsseldorf erstellt und von Herrn Dr. rer. nat Ernst van Faassen in Utrecht gemessen.

2.16 Histologie

Die Abwanderung von Entzündungszellen aus dem Blutkreislauf in das Herzgewebe nach Sepsis-Induktion wurde über verschiedene histologische und immun-histochemische Verfahren dargestellt.

Als vorbereitende Maßnahme wurden die Organe bei 4°C über Nacht in 4%igem phosphatgepufferten Formalin fixiert. Über eine aufsteigende Alkoholreihe wurde das Gewebe entwässert und in Xylol als Intermedium eingelegt. Dieses verdrängte den Alkohol und machte das Gewebe zugänglicher für das Paraffin. Das Einbetten der Organe erfolgte über 2x2 Stunden bei 60°C in flüssigem Paraffin. Die Organe wurden in Blöcke ausgegossen und auf einer Kälteplatte ausgehärtet. Das Schneiden der Blöcke fand an einem Rotationsmikrotom statt, von der ersten schneidbaren Schnittfläche wurden 10 jeweils 5µM dicke Schnitte für die verschiedenen Färbungen erstellt und auf Objektträger aufgezo-gen. Zum Entparafinieren kam Xylol zum Einsatz, die Rehydrierung der Schnitte wurde mit absteigender Alkoholreihe und PBS Puffer erreicht.

Darstellung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Methodik

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 α -Naphthyl-Acetat. Die Hydrolyse der Esterbindungen setzt Naphthol frei, welches mit einem hinzugegebenen Diazoniumsalz zu einem Azofarbstoff reagiert. Zum Einsatz kamen hier kommerzielle

2. Material und Methoden

Kits der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim. (Naphthol-AS-D-Chloroacetate-Esterase, 91C sowie α -Naphthyl-Acetate Esterase, 91A)

Versuchsdurchführung

Die Färbungen wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt

Darstellung von Lymphozyten

Methodik

Um die lymphozytäre Infiltration darstellen zu können wurde ein histochemisches Verfahren unter Ausnutzung der spezifischen Esterasen der Lymphozyten genutzt. Die Lymphozyten sind in der Lage α -Naphthyl-Buyrat. Wie bei den Monozyten und neutrophilen Granulozyten bereits erwähnt, setzt die Hydrolyse der Esterbindungen Naphtol frei und reagiert mit einem zugegebenen Diazoniumsalz zu einem Azofarbstoff. Das verwendete Kit stammt von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (α -Naphthyl-Buyrat-Esterase, 181-B).

Versuchsdurchführung

Die Färbungen wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Alle Schnitte wurden unter dem Mikroskop (DML, 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/mm² angegeben.

Proteinnachweis von Nitrotyrosin

Methodik:

Die Darstellung des Nitrotyrosin erfolgte durch die Bindung des gegen das 3-Nitrotyrosin gerichteten Primärantikörper (Rabbit Anti-Maus, Biomol) an den der Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit, Rockland) binden kann. Dieser ist mit DyLight 488 konjugiert, welches bei 488nm anregbar ist und so unter dem Fluoreszenz Mikroskop dargestellt werden kann.

Versuchsdurchführung:

2. Material und Methoden

Die Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparafiniert und bewässert mit absteigender Alkoholreihe. Damit die verwendeten Antikörper an das Protein binden können, mussten die Schnitte erst demaskiert werden. Die Schnitte wurden zu diesem Zweck in Citrat-Puffer gelegt und für 20 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Nach der Demaskierung wurden die Schnitte in 1%igem BSA und 3% Horse Serum geblockt. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C auf den Schnitten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit PBS wurde der Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Vectashield eingedeckt.

2.17. Expressionsbestimmung mittels quantitativer RT-PCR

Um die Expression von NOS1, NOS2, NOS3, IL-6 und TNF im Herzgewebe Baseline, 6 und 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.

2.17.1. RNA-Isolation

Methodik und Versuchsdurchführung

Die RNA-Isolation erfolgte mittels des „RNeasy® Fibrous Tissue Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Gebrauchsanweisung. Nach Homogenisierung und Lyse des Gewebes in einem Guanidinisothiocyanat (GITC) enthaltenden Puffer wurde das Homogenat für 3 Minuten bei Raumtemperatur und 10000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit Ethanol (96-100%) gemischt und auf die RNeasy Minisäulen aufgetragen. Durch einen 15 s Zentrifugationsschritt (Raumtemperatur >10000xg) wurde der Überstand durch die Silicagel-Membran gedrückt, an der die Gesamt RNA gebunden wurde. Durch mehrmaliges Waschen mit RPE- und RW1-Puffer wurde die RNA auf der Säule aufgereinigt und im letzten Schritt durch Aufgabe von RNase freiem Wasser eluiert und in einem Collection-Tube aufgefangen.

2.17.2. Reverse-Transkription der RNA in cDNA

Methodik

Die im „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ enthaltene Reverse Transkriptase schreibt die isolierte RNA in cDNA um. Ein großes Problem bei der Erstellung der cDNA und der späteren Verwendung in einer Realtime PCR stellt die genomische DNA dar. Das hier verwendete Kit trägt diesem Problem Rechnung, in dem ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit einem Wipeout Puffer eingefügt ist. Dieser Wipeout Puffer entfernt alle vorliegende genomische DNA aus der RNA Probe, so dass in der Probe nur die vorhandene RNA zu cDNA umgeschrieben wird.

Versuchsdurchführung

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte mittels „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ (Qiagen GmbH). 1µg RNA wurde mit 12µl RNase-freiem Wasser und 2µl gDNA Wipeout Puffer für 2 Minuten bei 42°C inkubiert um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu eliminieren. Aus den weiteren Bestandteilen des Kits wurde ein Mastermix nach Hersteller Angaben erstellt. 6µl des Master Mix wurden nun mit 14µl des RNA Templates mittels Vortex kurz gemischt und bei 42°C für 15 Minuten inkubiert, um die Transkription in cDNA zu ermöglichen. Zum Stoppen der Reaktionen wurden die Proben im Anschluss für 3 Minuten bei 95°C denaturiert

2.17.3. qRT-PCR

Methodik

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

2. Material und Methoden

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 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.

Versuchsdurchführung

Zunächst wurde eine 1:5 verdünnte cDNA Lösung aus 20µl cDNA und 80µl RNase/DNase freiem Wasser hergestellt (1µl = 10ng cDNA). 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
- 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 NOS2, NOS1 und NOS3 sowie für TNF und IL-6 oder die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH diente in diesem Versuchsansatz als sogenanntes Housekeeping-Gen. 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. Material und Methoden

2. Denaturierung: 95°C für 15 Sekunden
3. Tempern und Elongation: 60°C für 1 Minute
4. 40 Wiederholungen der Schritte 2 und 3

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 früher, je höher der Ausgangswert an cDNA Kopien war. Ermittelt wurde nun das ΔCt , 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 ΔCt -Werte zwischen den jeweiligen Gruppen berechnet. Nach der Gleichung $n=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ konnte dann die n-fache Expression angegeben werden.

2.18 Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Software Graph Pad Prism 5.0 verwendet. Die statistischen Signifikanzen der Kaplan-Meier Überlebensanalyse wurden mit einem Log-rank Test (Mantel-Cox) ermittelt. Als statistische Tests wurden One-Way-Anova mit Bonferroni Posthoc bzw. Dunns Test durchgeführt. Ein Niveau von $p < 0,05$ wurde als signifikant definiert. Die Genexpressionsanalysen wurden mit der Software REST 2009 von Quiagen durchgeführt. Zur Erhebung der Signifikanzen in den Aortenversuchen wurden die ermittelten Kurven auf ihren unterschiedlichen LOG-EC50 Wert mit einander verglichen und dem F-Test unterzogen. Soweit nicht anders angegeben sind alle Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Bakteriennachweis in peritonealer Lavage und Blutkultur

Um eine Bakteriämie in WT und in NOS3^{-/-} Mäusen festzustellen wurden nach 12 Stunden CLP Induktion aus den Tieren Blutkulturen und Kulturen aus der gewonnenen peritonealen Flüssigkeit erstellt (n=3). In der peritonealen Flüssigkeit wurden in beiden Mausstämmen nach Sepsis-Induktion die gleichen Bakterien vorgefunden (siehe Tabelle 2). Die Blutkulturen erbrachten nur in den Wildtyp-Mäusen einen Nachweis von E. coli.

Tabelle 2: Bakteriennachweis aus Blutkultur und Peritoneal Flüssigkeit

		Blutkultur	Peritoneal Flüssigkeit
WT c57/B6		Diplococcus, E. coli	E. coli, Diplococcus, Staph. xylosus
NOS3^{-/-}		Diplococcus	E. coli, Diplococcus, Staph. xylosus

3.2 Überlebensanalysen

Ein erster experimenteller Ansatz, um die Bedeutung der verschiedenen NO-Synthasen im Verlauf der Sepsis darzustellen, war die Erstellung einer Überlebensanalyse der septischen Mäuse. Es wurden insgesamt 4 Versuchstiergruppen untersucht: unbehandelte C57/B6 Wildtyp Mäuse, präoperativ mit NOS1 (V-LNIO; NOS1 Inhibition) oder NOS2 (1400W; NOS2 Inhibition) Inhibitor behandelte Mäuse und Mäuse mit genetischer Depletion der NOS3 (NOS3^{-/-}). In Abbildung 9 ist die Überlebenskurve der Tiere als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die pharmakologische Inhibition der NOS2 bzw. der NOS1 führten zu einer signifikanten Zunahme der medianen Überlebenszeit im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen (62 Stunden bzw. 36 Stunden vs. 29 Stunden; p<0,01). Die genetische Depletion der NOS3 führte zum größten Überlebensvorteil, die NOS3^{-/-} Mäuse wiesen eine mediane Überlebenszeit von 69 Stunden auf (p<0,01). Alle drei Isoformen der NO-Synthasen sind für die Mortalität nach Sepsis Induktion mittels CLP von Bedeutung. Sham operierte Tiere (nicht dargestellt) zeigten in keiner Versuchsgruppe eine Mortalität.

3. Ergebnisse

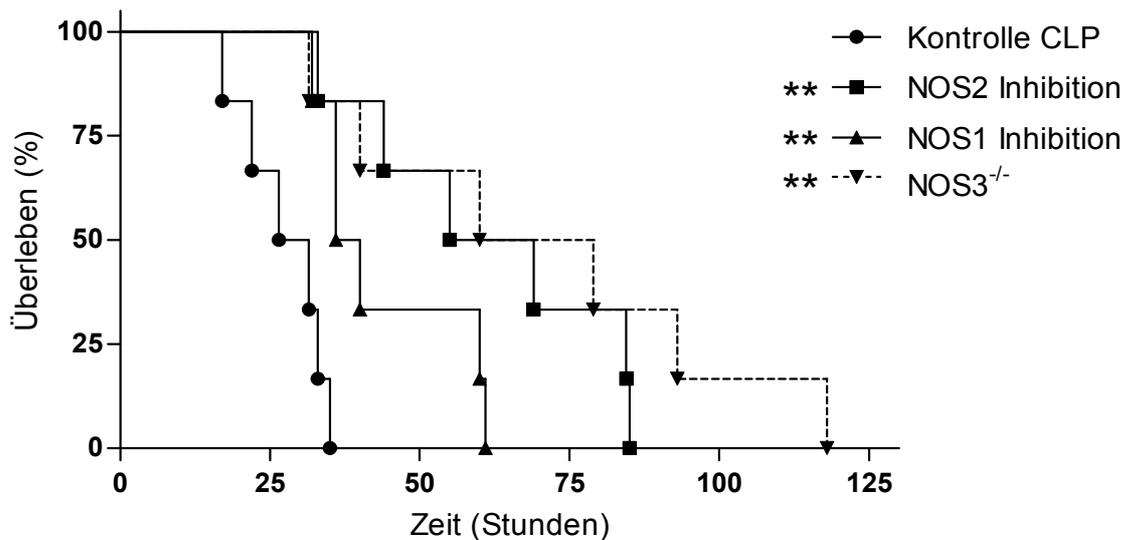


Abbildung 9: Kaplan-Meier Überlebensanalyse nach Sepsis-Induktion mittels CLP. (** $p < 0,01$ vs. Kontrolle CLP, Log-rank Test)

3.3 Nitrit/Nitrat Konzentrationen im Plasma

Zur Überprüfung, welche Auswirkungen die Inhibitionen der verschiedenen NO-Synthasen auf die Produkte der NO-Synthese (Nitrit und Nitrat) haben, wurden die Konzentrationen im Plasma bestimmt. Die Zeitpunkte basal (Kontrolle), 6 Stunden und 12 Stunden nach Sepsisinduktion mittels Coecum-Ligatur und Punktion (CLP) wurden für die Untersuchungen ausgewählt um die Frühphase der Sepsis betrachten zu können.

3.3.1 Nitrit Konzentrationen im Plasma 6 und 12h nach Sepsis

Induktion

Nitrit wird als umwandlungsfähiges Produkt der NO-Synthese angesehen, da es wieder zu NO reduziert werden kann. Somit könnte Nitrit eine Transport- und Zwischenspeicherfunktion von NO zukommen. Ein Anstieg der Nitrit-Konzentrationen im Plasma wäre nach Sepsis-Induktion anzunehmen, da ein Anstieg von NO zu erwarten ist. Die Inhibition der NOS2 und NOS1, sowie die genetische Depletion sollten in diesem Zusammenhang zu einer Verringerung der Nitrit-Konzentration führen. Basal wiesen die Plasma-Proben eine Nitrit-Konzentration von $0,402 \pm 0,119 \mu\text{M}$ auf, 6 (siehe Abb.10 A) und 12 Stunden (B) nach CLP Induktion waren die Nitrit-Konzentrationen in den unbehandelten WT vergleichbar hoch (6 Stunden:

3. Ergebnisse

0,395±0,146µM, 12 Stunden: 0,394±0,140µM; p>0,05). Die Nitrit Konzentrationen in den NOS2 inhibierten Tieren sanken nach 6 Stunden CLP Induktion ab (0,280±0,120µM; p<0,05), stiegen zum Zeitpunkt 12 Stunden auf das Niveau der Basaltiere (0,468±0,075µM). Die NOS1 Inhibition führte weder zum Zeitpunkt 6 Stunden (0,351±0,099µM) noch zum Zeitpunkt 12 Stunden (0,456±0,048µM) zu einem signifikanten Unterschied zu den Basaltieren. Die NOS3^{-/-} Tiere zeigten ebenfalls keine Unterschiede in den Nitrit-Konzentrationen im Plasma (6 Stunden: 0,347±0,109µM; 12 Stunden: 0,359±0,145µM) gegenüber den Basalwerten. Nur die pharmakologische Inhibition der NOS2 zeigte eine signifikante Abnahme der Nitrit-Konzentration zum Zeitpunkt 6 Stunden. Die Sepsis-Induktion führte zu keinem Zeitpunkt zu einer Erhöhung der Nitrit-Konzentrationen in den untersuchten Tieren.

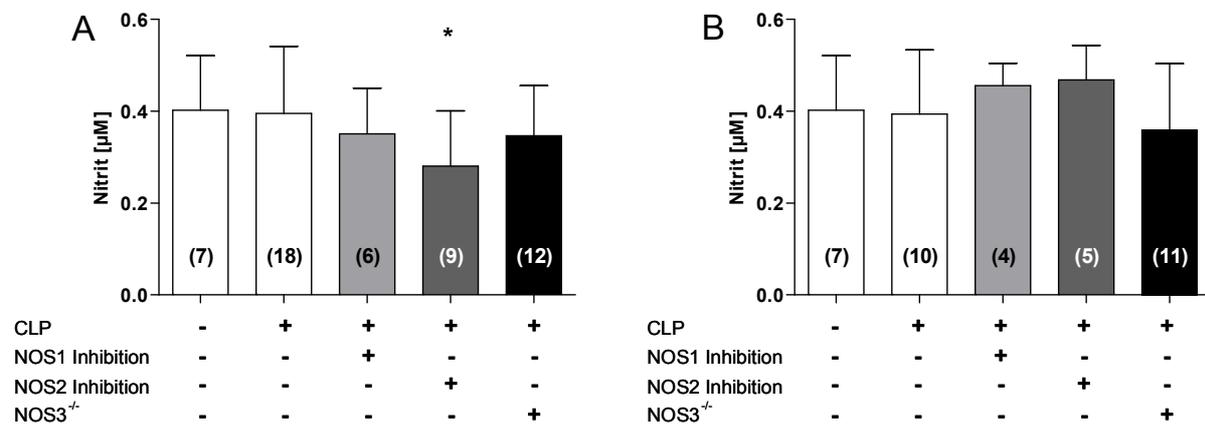


Abbildung 10: Nitrit Konzentrationen im Plasma zum Zeitpunkt 6 Stunden (A) und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion (B) ((Mittelwert ± SD, *p<0,05 einfaktorielles ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.3.2 Nitrat Konzentrationen im Plasma 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion

Im Gegensatz zum Nitrit wird das Nitrat als stabiles Endprodukt der NO-Synthese angesehen. Ein Anstieg der Nitrat-Konzentrationen nach Sepsis-Induktion war somit zu erwarten. In diesem Zusammenhang sollte die Inhibition der NOS2 und NOS1 sowie die genetische Depletion der NOS3 einen Einfluss auf die Nitrat-Konzentrationen haben. In den unbehandelten septischen Tieren erhöhte sich die Nitrat-Konzentrationen im Plasma signifikant gegenüber den Basaltieren nach 6 Stunden (siehe Abb. 11 A) Sepsis Induktion (67,94±17,19µM vs. 33,72±14,68µM; p<0,001). Die signifikante Erhöhung blieb zum Zeitpunkt 12 Stunden (siehe Abb. 11 B) bestehen (53,43±12,37µM vs. basal; p<0,01), war aber weniger stark ausgeprägt.

3. Ergebnisse

Die Inhibition der NOS2 verhinderte einen Anstieg der Nitrat-Konzentrationen 6 Stunden ($35,86 \pm 12,47 \mu\text{M}$ vs. basal; $p > 0,05$) und 12 Stunden ($27,5 \pm 8,00 \mu\text{M}$ vs. Basal; $p > 0,05$) nach Sepsis Induktion. Die Nitrat-Konzentration war zum Zeitpunkt 6 Stunden ($35,86 \pm 12,47 \mu\text{M}$; $p < 0,001$) und 12 Stunden ($27,5 \pm 8,00 \mu\text{M}$; $p < 0,001$) signifikant geringer als in den unbehandelten CLP-Tieren. Die Inhibition der NOS1 hatte keinen Einfluss auf den Anstieg der Nitrat-Konzentrationen im Plasma 6 Stunden nach Sepsis-Induktion ($62,72 \pm 21,45 \mu\text{M}$ vs. basal; $p < 0,05$). 12 Stunden nach Sepsis-Induktion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der NOS1 Inhibition und den Basalwerten festgestellt werden ($44,48 \pm 4,33 \mu\text{M}$; $p > 0,05$). Das Plasma der NOS3^{-/-} Tiere zeigte keine signifikanten Unterschiede zum Zeitpunkt 6 Stunden ($32,44 \pm 16,48 \mu\text{M}$; $p > 0,05$) und 12 Stunden ($29,8 \pm 10,58 \mu\text{M}$; $p > 0,05$) Sepsis-Induktion gegenüber den Basaltieren. Im Vergleich zu den unbehandelten CLP-Tieren erreichten die Nitrat-Konzentrationen der NOS3^{-/-} Mäuse zum Zeitpunkt 6 Stunden ($32,44 \pm 16,48 \mu\text{M}$ vs. $67,94 \pm 17,19 \mu\text{M}$; $p < 0,001$) und 12 Stunden ($29,8 \pm 10,58 \mu\text{M}$ vs. $53,43 \pm 12,37 \mu\text{M}$; $p < 0,001$) signifikant niedrigere Werte. Die Inhibition der NOS2 wie auch die genetische Depletion der NOS3 verhinderten zu beiden untersuchten Zeitpunkten nach Sepsis Induktion einen Anstieg der Nitrat Konzentrationen. Der Hauptanteil des Nitrates im Plasma stammte von der NOS3 und NOS2 produziertem NO. Der NOS1 kam in diesem Zusammenhang eine geringere Bedeutung zu.

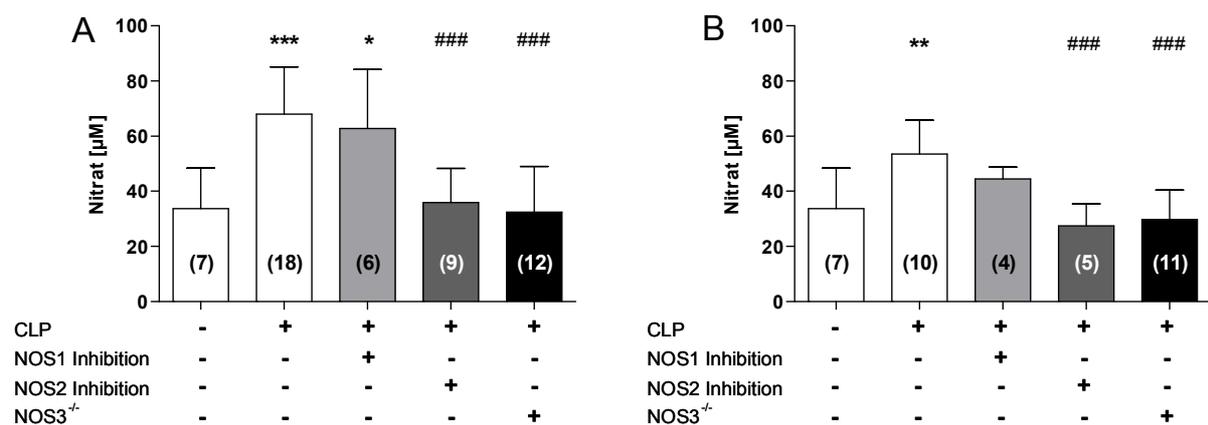


Abbildung 11: Nitrat Konzentrationen im Plasma zum Zeitpunkt 6 Stunden (A) und 12 Stunden (B) nach Sepsis Induktion (Mittelwert ± SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ vs. basal; ### $p < 0,001$ vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielles ANOVA und Dunns Post Hoc Test).**

3.4 GSH Konzentrationen im Vollblut 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion

In diesen Experimenten wurde als Marker für den oxidativen Stress das gesamt Glutathion im Vollblut gemessen. Ein hoher Anteil an oxidativen Stress führt im Vollblut zu einer Abnahme des gesamt Glutathion. 6h nach Sepsis Induktion kam es zu keinen signifikanten Änderungen der gesamt GSH Konzentrationen im Vollblut (Abb. 12 A). Die Konzentrationen im Vollblut der unbehandelten septischen Tiere ($1058 \pm 150,6 \mu\text{M}$), NOS1 Inhibition ($1104 \pm 116,6 \mu\text{M}$), NOS2 Inhibition ($1090 \pm 152,1 \mu\text{M}$) und NOS3^{-/-} ($1103 \pm 118,7 \mu\text{M}$) Tiere unterschieden sich nicht signifikant von den Basaltieren ($1119 \pm 114,1$; $p > 0,05$ für alle Gruppen).

Eine signifikante Abnahme der Konzentration war in den unbehandelten CLP-Tieren nach 12 Stunden (Abb. 12 B) nachzuweisen ($780,3 \pm 169,1 \mu\text{M}$ vs. $1119 \pm 114,1 \mu\text{M}$; $p < 0,001$). Die Inhibition der NOS1 ($1104 \pm 116,6 \mu\text{M}$ vs. basal; $p > 0,05$) führten zu keiner signifikanten Änderung der Konzentration 12 Stunden nach Sepsis-Induktion. Die gesamt GSH Konzentration im Vollblut der NOS2 inhibierten ($920,7 \pm 124 \mu\text{M}$ vs. basal; $p < 0,01$) wie auch NOS3^{-/-} Tiere zu diesem Zeitpunkt signifikant erniedrigt ($839,6 \pm 212,4 \mu\text{M}$ vs. basal; $p < 0,05$). Die Inhibition der NOS1 verhinderte eine auf oxidativen Stress zurückzuführende Abnahme der gesamt GSH-Konzentration im Vollblut. In den Wildtyp wie auch in den NOS2 inhibierten und NOS3^{-/-} Mäusen führte die Sepsis-Induktion nach 12 Stunden zu einer Depletion von GSH.

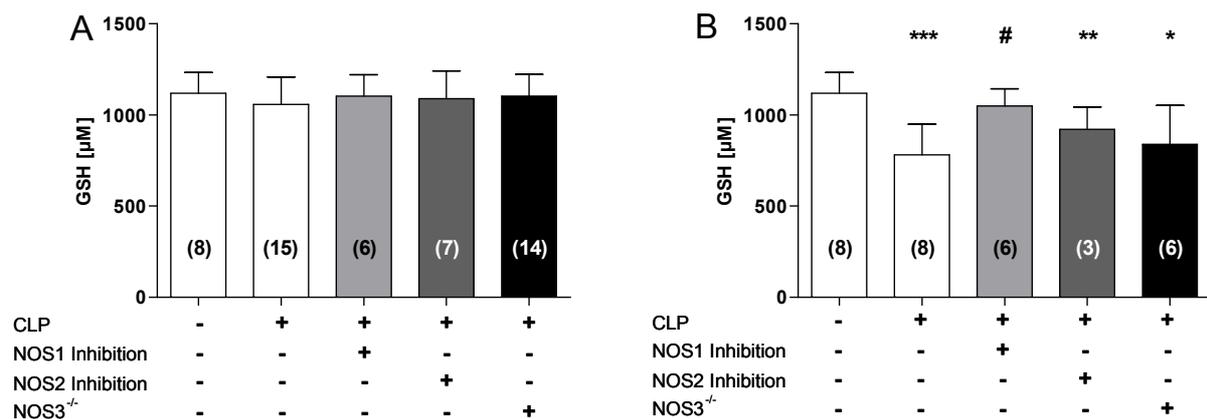


Abbildung 12: GSH Konzentrationen im Vollblut 6 bzw. 12 Stunden nach Sepsis Induktion. (Mittelwert ± SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ vs. basal; # $p < 0,05$ vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test)**

3.5 Erythrozytäre Verformbarkeit nach Sepsis Induktion

Oxidativer Stress ist eine Ursache für eine verminderte Verformbarkeit von Erythrozyten. In welchem Maße die verminderte GSH Konzentration im Vollblut die Verformbarkeit der Erythrozyten beeinflusst, wurde in diesem Versuchsansatz evaluiert. Eine Darstellungsart der Verformbarkeit ist der K(EI) Wert. Er stellt den Scherstress dar, der nötig ist um einen Erythrozyten $\frac{1}{2}$ maximal zu verformen. Je höher dieser Wert ist, desto größer ist der nötige Scherstress um das Blutkörperchen zu verformen. In Abbildung 13 ist der K(EI) Wert für den Zeitpunkt 6 (A) und 12 Stunden (B) nach Sepsis Induktion in allen Untersuchungsgruppen dargestellt. 6 Stunden nach Sepsis-Induktion kam es zu signifikanten Erhöhungen des K(EI)-Wertes in den Gruppen NOS1 Inhibition ($2,95 \pm 0,65$; $p < 0,01$) NOS2 Inhibition ($2,73 \pm 0,97$; $p < 0,01$), und NOS3^{-/-} ($2,74 \pm 0,65$; $p < 0,05$) gegenüber den Basaltieren. Der Anstieg des K(EI)-Wertes in der Kontrolle CLP Gruppe war nicht signifikant ($2,36 \pm 0,62$; $p > 0,05$) unterschiedlich zu den Basalwert.

Nach 12h Stunden war dieser Effekt nicht mehr nachzuweisen, alle untersuchten Proben waren, mit Ausnahme der Proben aus den Tieren mit NOS2 Inhibition ($3,447 \pm 1,04$ vs. basal; $p < 0,001$), auf Basalwerte gesunken (unbehandelt CLP: $2,01 \pm 0,46$; NOS1 Inhibition: $1,78 \pm 1,00$; NOS3^{-/-}: $1,66 \pm 0,49$ vs. basal; $p > 0,05$). Die Werte der NOS2 inhibierten Tiere zeigten eine signifikante Erhöhung gegenüber den unbehandelten CLP Tieren auf ($3,447 \pm 1,04$ vs. unbehandelt CLP; $p < 0,01$). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von NO-Synthasen zu einer Abnahme der Verformbarkeit zum Zeitpunkt 6 Stunden führte. Die NOS2 verhindert zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Sepsis Induktion eine Abnahme der Verformbarkeit in den Blutkörperchen.

3. Ergebnisse

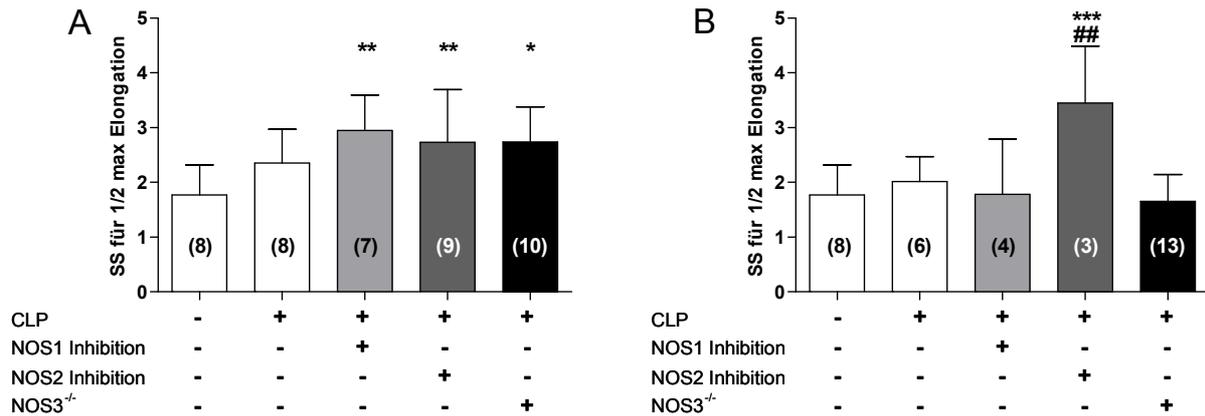


Abbildung 13: Nötiger Scherstress (SS) für 1/2 maximale Elongation der Erythrozyten 6 (A) und 12 Stunden (B) nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert ± SD, *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001 vs. basal; ##p<0,01 vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test).**

3.6 Einwanderung von Entzündungszellen ins Herzgewebe

Die Einwanderung von den verschiedenen Entzündungszellen in das Herzgewebe spielt für die Funktionalität des Herzens eine große Rolle. Es wurde die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten untersucht, um Unterschiede in der Anzahl der eingewanderten Immunzellen zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen aufzudecken.

3.6.1 Neutrophile Granulozyten

6h nach Sepsis Induktion (siehe Abb. 14 A) war die Anzahl eingewanderter neutrophiler Granulozyten in das Herzgewebe in allen Untersuchungsgruppen signifikant erhöht (Unbehandelt CLP: $1778 \pm 90,4$; NOS1 Inhibition: $1546 \pm 275,9$; NOS2 Inhibition: $1559 \pm 237,6$; NOS3^{-/-} : $1648 \pm 319,1$ vs. basal: 755 ± 134 ; p<0,001).

Zum Zeitpunkt 12 Stunden (siehe Abb. 14 B) stieg die Anzahl der eingewanderten Zellen in der unbehandelt CLP ($2362 \pm 178,1$ vs. basal; p<0,001) und in der NOS2 Inhibition Gruppe ($2408 \pm 353,2$ vs. basal; p<0,001) weiter an. Das Fehlen von NOS1 ($1506 \pm 161,8$ vs. basal; p<0,001) und NOS3 ($1620 \pm 205,8$ vs. basal; p<0,001) verhinderte zu diesem Zeitpunkt eine weitere Erhöhung der Anzahl an eingewanderten neutrophilen Granulozyten.

3. Ergebnisse

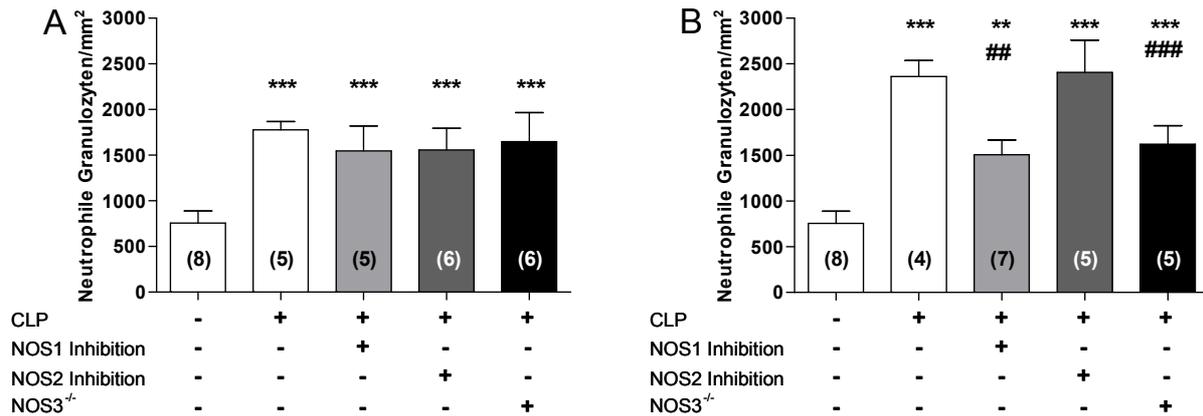


Abbildung 14: Anzahl eingewanderter Neutrophiler Granulozyten in das Herzgewebe 6 (A) bzw. 12 (B) Stunden nach Sepsis Induktion. (Mittelwert ± SD, **p<0,01; *p<0,001 vs. basal; ##p<0,01; ###p<0,001 vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test)**

3.6.2 Monozyten

Als Vorläuferzellen der Makrophagen ist die Anzahl der in das Gewebe eingewanderten Monozyten ein Hinweis auf laufende Entzündungsprozesse. Die Anzahl eingewanderter Monozyten in das Herzgewebe war 6 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 15 A) in der unbehandelte CLP- ($2297 \pm 323,9$; $p < 0,001$) und in der NOS2 Inhibitionsgruppe ($2324 \pm 407,5$; $p < 0,001$) signifikant erhöht gegenüber den Basalherzen ($896 \pm 86,81$). Die NOS1-Inhibition verhinderte einen signifikanten Anstieg der eingewanderten Zellen nicht (1769 ± 129 vs. basal; $p < 0,001$), es wurden signifikant weniger Zellen nachgewiesen im Vergleich zur unbehandelten CLP (1769 ± 129 vs. $2297 \pm 323,9$; $p < 0,05$). Die Anzahl an eingewanderten Monozyten war in den septischen NOS3^{-/-} Herzen signifikant unterschiedlich gegenüber den Basalherzen ($1538 \pm 264,6$; $p < 0,01$) und der unbehandelten CLP ($1538 \pm 264,6$; $p < 0,001$) unterschiedlich.

12 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 15 B) war die Anzahl der eingewanderten Zellen in der unbehandelten CLP ($2238 \pm 229,1$ vs. basal; $p < 0,001$) und NOS2 Inhibition ($2270 \pm 431,1$ vs. basal; $p < 0,001$) im gleichen Maße signifikant erhöht wie zum Zeitpunkt 6 Stunden, die Zellzahl war zu beiden Zeitpunkten in diesen Untersuchungsgruppen vergleichbar hoch. In den NOS1 inhibierten Herzgeweben blieb die signifikante Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zu den Basalherzen bestehen ($1906 \pm 578,7$; $p < 0,01$). Die NOS3^{-/-} Herzen wiesen 12 Stunden nach Sepsis-Induktion eine signifikante Erhöhung der Anzahl an eingewanderten Monozyten gegenüber den Basalherzen auf ($1668 \pm 297,1$ vs.

3. Ergebnisse

896±86,81; $p < 0,001$). Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Zellen bestand weiterhin zwischen den $\text{NOS3}^{-/-}$ und den unbehandelten CLP Gewebe (1668±297,1 vs. 2238±229,1; $p < 0,05$). In den Herzgeweben der $\text{NOS3}^{-/-}$ Tiere kam es zu einer Modulation der Einwanderung von monozytären Zellen.

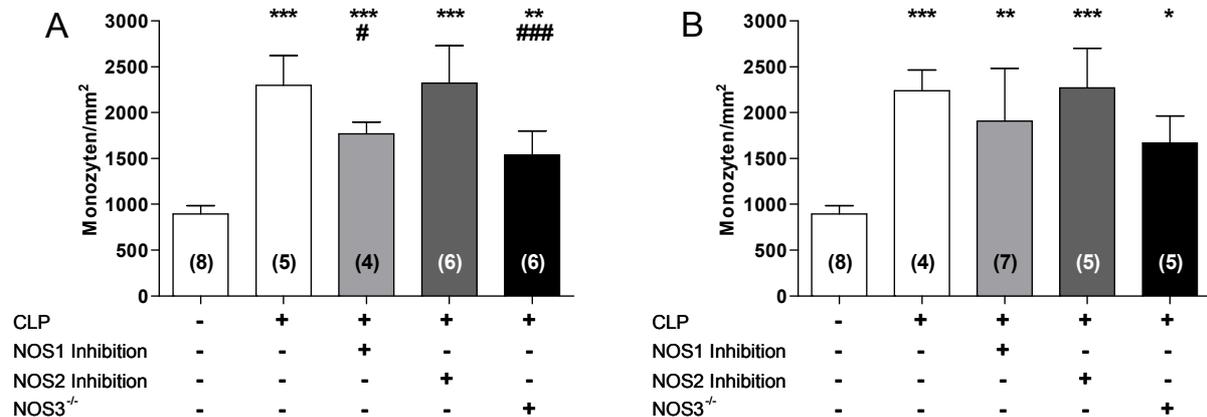


Abbildung 15: Anzahl eingewanderter Monozyten in das Herzgewebe 6 (A) bzw. 12 (B) Stunden nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert ± SD, ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ vs. basal; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test)**

3.6.3 Lymphozyten

Lymphozyten gehören zum adaptiven Immunsystem und spielen bei der Erkennung von Viren und Bakterien eine Rolle. In der unbehandelten CLP konnte zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsis Induktion (siehe Abb. 16 A) ein signifikanter Anstieg der Anzahl an eingewanderten Lymphozyten in das Herzgewebe im Vergleich zu den Basalherzen festgestellt werden (1375±247,3 vs. 439±64,1; $p < 0,001$). Durch die Inhibition der NOS2 wurde ein weniger starker Anstieg der Zellzahl gegenüber der Kontrolle beobachtet (1090±196,9 vs. 439±64,1; $p < 0,01$). Die genetische Depletion der NOS3 hatte keinen Einfluss auf die Anzahl eingewandeter Zellen, der Anstieg erreichte Signifikanz gegenüber den Basalherzen (1272±±378,5 vs. 439±64,1; $p < 0,001$). Die Herzen der NOS1 inhibierten Tiere zeigten keinen signifikanten Anstieg der eingewanderten Zellen (868,3±176,3; $p > 0,05$) gegenüber den Basalherzen. 12 Stunden nach Induktion der Sepsis (siehe Abb. 16 B) stieg die Anzahl der eingewanderten Lymphozyten in den unbehandelten CLP Tieren (1574±410,5; $p < 0,001$) und NOS2 Inhibition (1681±220,8; $p < 0,001$) weiter an. Die Herzen der $\text{NOS3}^{-/-}$ Tiere erreichten zum Zeitpunkt 12 Stunden eine vergleichbare Anzahl Zellen wie zum Zeitpunkt 6 Stunden (1325±232,7 vs. 1272±378,5; $p > 0,05$)

3. Ergebnisse

und unterschieden sich signifikant im Vergleich zu den Basalherzen ($1325 \pm 232,7$; $p < 0,001$). Das Herzgewebe der NOS1 inhibierten Tiere zeigte signifikant geringere Zellzahlen gegenüber den unbehandelten CLP-Herzen ($879 \pm 165,7$ vs. $1574 \pm 410,5$; $p < 0,05$).

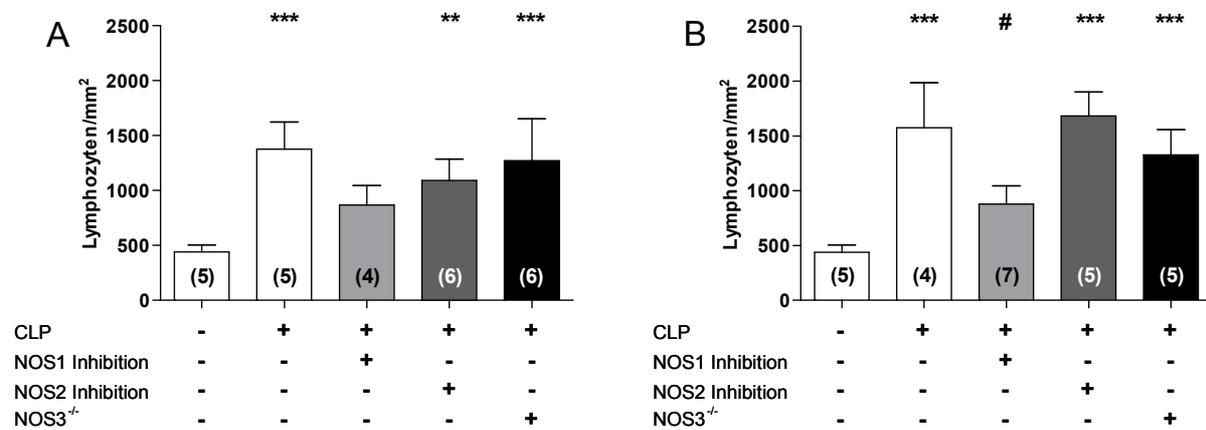


Abbildung 16: Anzahl eingewanderter Lymphozyten in das Herzgewebe 6 (A) bzw. 12 (B) Stunden nach Sepsis Induktion. (Mittelwert \pm SD, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. basal; # $p < 0,05$ vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test)

3.7 Hämodynamik nach Sepsis Induktion mittels Miniatur-Katheter

Im Folgenden werden die hämodynamischen Parameter der untersuchten Mäuse zum Zeitpunkt basal, als Kontrolle, und zu den Zeitpunkten 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion dargestellt. Es sollten Unterschiede zwischen den verschiedenen Inhibitionen/Depletion und unbehandelten Tieren aufgezeigt werden.

3.7.1 Mittlerer Arterieller Druck

Zu Beginn jeder Untersuchung wurde von jedem Tier Druckdaten aus der Aorta aufgezeichnet und daraus der mittlere arterielle Druck bestimmt. 6 Stunden nach Sepsis-Induktion (Abb. 17 A) wiesen die unbehandelten CLP Tiere eine signifikante Abnahme des mittleren arteriellen Blutdruckes auf ($61,55 \pm 4,53$ mmHg vs. $75,57 \pm 8,01$; $p < 0,05$). Die Inhibition der NOS2 konnte eine Verringerung des mittleren arteriellen Druckes 6 Stunden nach Sepsis-Induktion nicht verhindern ($62,33 \pm 11,27$ vs. $75,57 \pm 8,01$ mmHg; $p < 0,05$). Der mittlere arterielle Druck der NOS1 inhibierten Tiere zeigte zum Zeitpunkt 6 Stunden keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle auf ($72,2 \pm 17,98$ vs. $75,57 \pm 8,01$ mmHg; $p > 0,05$). Die Kontrolle NOS3^{-/-} Gruppe zeigte signifikant erhöhte Werte gegenüber der WT Kontrolle auf

3. Ergebnisse

(89,05±11,21 vs. 75,57±8,01mmHg; p<0,05). Auch 6 Stunden nach Sepsis-Induktion war ein signifikant erhöhter mittlerer arterieller Druck in den NOS3^{-/-} Tieren gegenüber den unbehandelten CLP Tieren nachzuweisen (91,15±14,65 vs. 61,55±11,27mmHg; p<0,01).

Während die septischen unbehandelten WT (60,54±8,045 vs. 75,57±8,01mmHg; p<0,01) wie auch die NOS2 (56,12±16,78 vs. 75,57±8,01mmHg; p<0,01) und NOS1 inhibierten Tiere (44,1±12,17 vs. 75,57±8,01mmHg; p<0,01) 12 Stunden nach Sepsis-Induktion (Abb. 17 B) einen signifikant niedrigeren Blutdruck aufwiesen als die Tiere der Kontrolle, führte das Fehlen der endothelialen NO-Synthase zu signifikant erhöhten Blutdruck-Werten gegenüber den unbehandelten WT CLP Tieren (94,29±18,38 vs. 60,54±8,045mmHg; p<0,001).

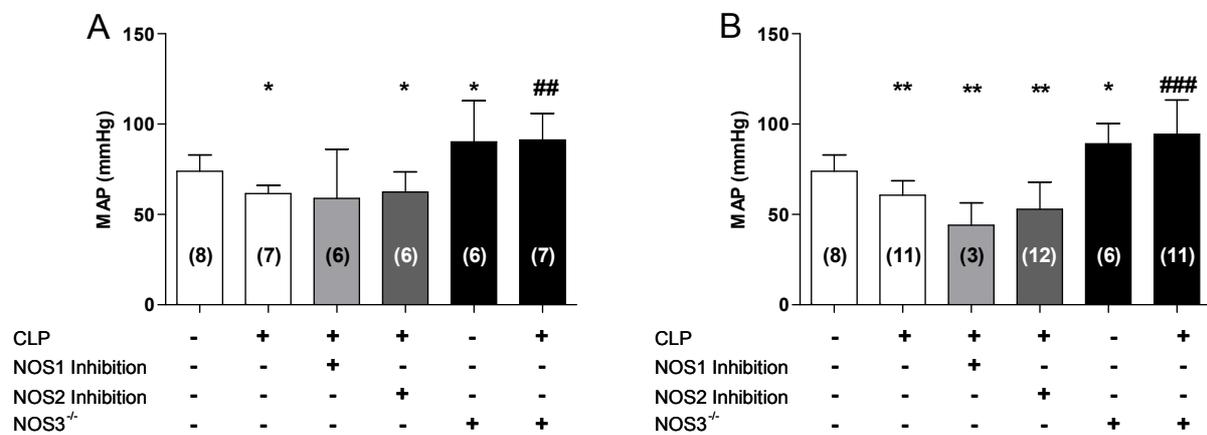


Abbildung 17: Mittlerer Arterieller Druck 6 (A) bzw. 12 (B) Stunden nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert ± SD, **p<0,01 vs. basal; ##p<0,01; ###p<0,001 vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.7.2 Linksventrikulärer entwickelter Druck und Katecholamin

Antwort

Die Pumpfunktion des Herzens wird mittels des entwickelten Druckes des linken Ventrikels dargestellt. In den unbehandelten WT CLP Tieren war der LVDP 6 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 18 A) signifikant verringert gegenüber der Kontrolle (91,4±4,7 vs. 110,9±21,2mmHg; p<0,01). In der NOS2 inhibierten Untersuchungsgruppe führte die Sepsis-Induktion nach 6 Stunden ebenfalls zu einem signifikanten Abfall des LVDP (90,3±9,7 vs. 110,9±21,2mmHg; p<0,05). Die Inhibition der NOS1 verhinderte einen signifikanten Abfall des Druckes (96,0±11,0 vs. 110,9±21,2mmHg; p>0,05). Die Kontrolle NOS3^{-/-} wiesen einen signifikant

3. Ergebnisse

erhöhten LVDP gegenüber der WT Kontrolle auf (144,9±36,4 vs. 110,9±21,2mmHg; p<0,05). Die Induktion der Sepsis führte in den NOS3^{-/-} Tieren zu keiner signifikanten Abnahme des LVDP gegenüber der Kontrolle NOS3^{-/-} (122,3±13,2 vs. 144,9±36,4; p>0,05). Der LVDP der septischen NOS3^{-/-} Tiere war zum Zeitpunkt 6 Stunden signifikant erhöht gegenüber den unbehandelten septischen WT Mäusen (122,3±13,2 vs. 91,4±4,7mmHg; p<0,001).

12 Stunden nach Sepsis-Induktion (Abb. 18 B) sank der LVDP in den unbehandelten CLP Tieren (90,2±7,7 vs. 110,9±21,2mmHg; p<0,001) und in der NOS2 Inhibition Versuchstiergruppe signifikant gegenüber der Kontrolle weiter ab (88,5±14,9 vs. 110,9±21,2mmHg; p<0,01). Die NOS1 inhibierten Tiere zeigten 12 Stunden nach Sepsis-Induktion einen signifikant erniedrigten LVDP (92,7±7,3 vs. 110,9±21,2mmHg; p<0,05). Die Funktion der Herzen der NOS3^{-/-} Tiere 12 Stunden nach Sepsis-Induktion entspricht im Wesentlichen der Funktion zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsis-Induktion (122,3±13,2 vs. 144,6±39,0mmHg; p>0,05) und erreichten gegenüber der den unbehandelten WT CLP Tieren Signifikanz (122,3±18,63 vs. 90,2±7,7mmHg; p<0,001).

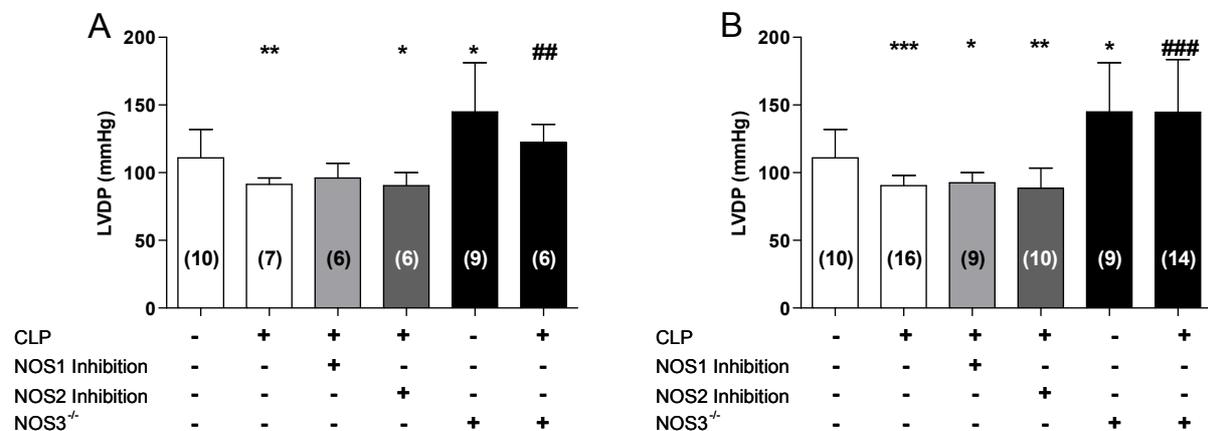


Abbildung 18: Linksventrikulärer entwickelter Druck 6 (A) bzw. 12 (B) Stunden nach Sepsis Induktion. (Mittelwert ± SD, *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001 vs. basal; ##p<0,01; ###p<0,001 vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test).**

In Abbildung 19 A+B ist der prozentuale Anstieg des LVDP nach Gabe von Arterenol gegenüber der Basalwerte der Herzen angegeben. 6 Stunden nach Sepsis-Induktion zeigten die unbehandelte CLP (16,9±7,0%), NOS2 Inhibition (22,1±4,1%) und NOS1 Inhibition (16,7±4,8%) keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle (15,4±6,6%). Die NOS3^{-/-} Tiere reagierten zu diesem Zeitpunkt signifikant stärker auf

3. Ergebnisse

Arterenol als die basalen NOS3^{-/-} (28,6±5,7 vs. 20,3±10,3%; p<0,05) und die unbehandelten CLP Tiere (28,6±5,7 vs. 16,9±7,0%;p<0,01).

Zum Zeitpunkt 12 Stunden war die Reaktion der septischen unbehandelten Tiere (3,3±5,1%; p<0,05), sowie der NOS2 Inhibition (4,3±4,5%;p<0,05) und NOS1 Inhibition (4,2±4,0%;p<0,05) signifikant verringert gegenüber der Kontrolle (15,4±6,6%). Die NOS3^{-/-} Tiere zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle NOS3^{-/-} und den septischen NOS3^{-/-} (20,3±10,3 vs. 20,4±4,9%; p>0,05) Tieren. Es lag ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten CLP und den NOS3^{-/-} Tieren vor (3,3±5,1 vs. 20,4±4,9%; p<0,01).

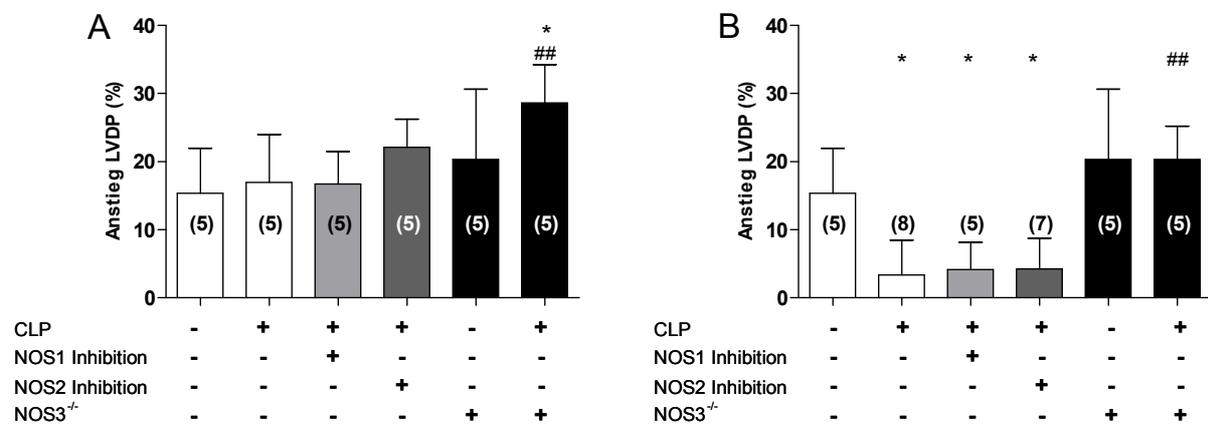


Abbildung 19: Anstieg des linksventrikulären entwickelten Druckes nach Katecholamin-Gabe in Prozent gegenüber den Basalwerten 6 (A) und 12 (B) Stunden nach Sepsis Induktion. (Mittelwert ± SD, *p<0,05 vs. Basal; ##p<0,01 vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test)

Einzig die genetische Depletion der NOS3 verhindert eine Beeinträchtigung des LVDP durch die Sepsis-Induktion. Die Abnahme der Reaktion auf Arterenol in den WT Mäusen ist auf eine zunehmende endotheliale Dysfunktion in den Gefäßen zurückzuführen.

3.7.3 dP/dt_{max}

Der dP/dt_{max} entspricht der maximalen Rate des Druckanstieges während der Kontraktion und spiegelt die kontraktile Funktion des Herzens wider. 6 Stunden nach Auslösung der Sepsis (siehe Abb. 20 A) war die kontraktile Funktion in den Kontrolle CLP (10895±1003 vs. 14142±3010mmHg/s; p<0,05) und NOS2 inhibierten Tieren (9920±2474 vs. 14142±3010mmHg/s; p<0,01) signifikant eingeschränkt. Die Unterschiede in der septischen NOS1 inhibierten (11361±1966mmHg/s; p>0,05) und NOS3^{-/-} Gruppe (11965±2907mmHg/s; p>0,05) erreichten gegenüber den WT

3. Ergebnisse

Kontrolltieren keine Signifikanz. 12 Stunden nach Sepsis-Induktion (Abb. 20 B) konnten in den unbehandelten CLP Tieren (10560 ± 2360 mmHg/s; $p < 0,01$), in der NOS2 Inhibition (9186 ± 3862 mmHg/s; $p < 0,01$) und in der NOS1 Inhibition (10706 ± 1396 mmHg/s; $p < 0,01$) signifikante Unterschiede im dP/dt_{max} gegenüber den WT Kontrolltieren festgestellt werden. Die Depletion der NOS3 führte zu diesem Zeitpunkt zu keiner Abnahme der kontraktilen Funktion des Herzens (13692 ± 2212 mmHg/s; $p > 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle NOS3^{-/-}. Die NOS3^{-/-} Tiere wiesen eine signifikant erhöhte kontraktile Funktion gegenüber den unbehandelten CLP Tieren auf (13692 ± 2212 vs. 10560 ± 2360 mmHg/s; $p < 0,01$). Die Depletion der NOS3 führte zu keinerlei Einschränkung der kontraktilen Funktion in den untersuchten Zeitpunkten nach Sepsis Induktion.

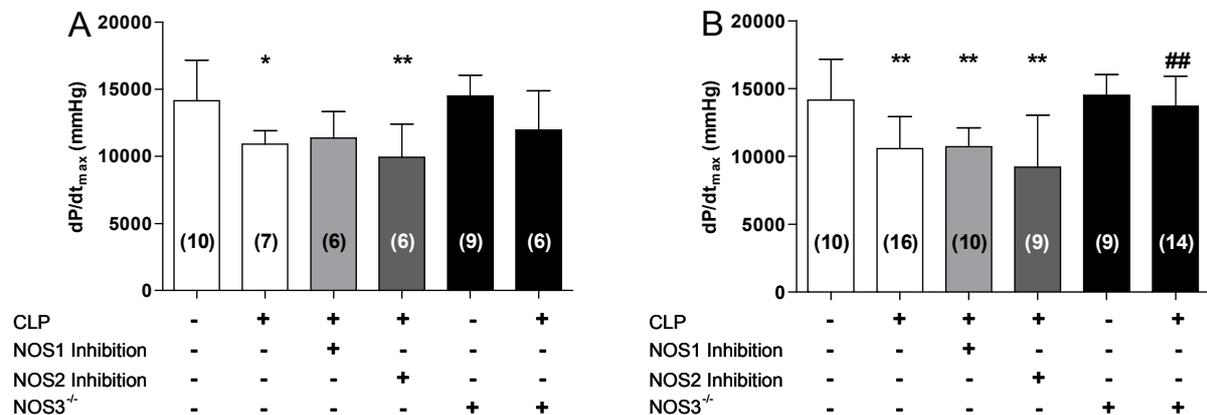


Abbildung 20: dP/dt_{max} in mmHg/s nach 6 (A) und 12 (B) Stunden Sepsis-Induktion. (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. basal; ## $p < 0,01$ vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielles ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

Die Gabe des Katecholamins Arterenol zeigte 6 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 21 A) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle ($37,4 \pm 20,4\%$), den unbehandelten CLP Tieren ($40,0 \pm 11,0\%$), der NOS2 Inhibition ($40,0 \pm 5,0\%$) und der NOS1 Inhibition ($28,3 \pm 20,9\%$) im prozentualen Anstieg des dP/dt_{max} auf. Allein die NOS3^{-/-} Tiere reagierten zu diesem Zeitpunkt signifikant stärker auf die Arterenol-Gabe im Vergleich zur Kontrolle NOS3^{-/-} ($21,8 \pm 5,2$ vs. $68,4 \pm 14,5\%$; $p < 0,01$).

12 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 21 B) reagierten die unbehandelten CLP ($-3,8 \pm 7,5\%$; $p < 0,01$), NOS2 Inhibition ($-3,8 \pm 8,0\%$; $p < 0,01$) und NOS1 Inhibition ($2,9 \pm 6,7\%$; $p < 0,01$) Mäuse signifikant verringert auf die Arterenol-Gabe im Vergleich zur Kontrolle. Die NOS3^{-/-} Tiere zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den NOS3^{-/-} Kontrolltieren ($21,7 \pm 6,8$ vs. $21,8 \pm 5,2\%$; $p > 0,05$), wiesen aber einen

3. Ergebnisse

signifikant erhöhten Anstieg des dP/dt_{max} gegenüber den unbehandelten CLP Tieren auf $(21,7 \pm 6,8$ vs. $-3,8 \pm 7,5\%$; $p < 0,01$).

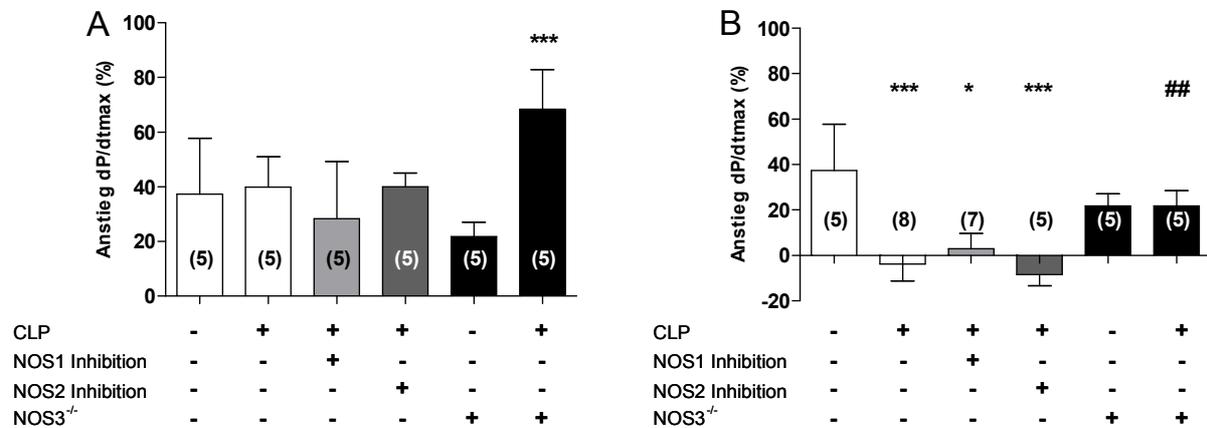


Abbildung 21: Anstieg des dP/dt_{max} nach Katecholamin-Gabe in Prozent zum Zeitpunkt 6 (A) und 12 (B) Stunden nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$, * $p < 0,001$ vs. basal; ## $p < 0,01$ vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test).**

3.7.4 dP/dT_{min}

Der dP/dt_{min} ist die maximale Erschlaffungsrate während der Diastole und spiegelt, wie auch der dP/dt_{max} die kontraktile Funktion des Herzens wider. In den untersuchten Mäusen kam es 6 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 22 A) in den unbehandelten Tieren zu einer signifikanten Abnahme des dP/dt_{min} (-6633 ± 1011 vs. -8515 ± 1976 mmHg/s; $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle. Tendenziell sanken die Werte in der NOS2 Inhibition Gruppe ab, erreichten aber keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (-6857 ± 1186 mmHg/s; $p > 0,05$). Der dP/dt_{min} der NOS1 Inhibition (-7994 ± 1803 mmHg/s; $p > 0,05$) und NOS3^{-/-} (-7931 ± 2602 vs. -8919 ± 1782 mmHg/s; $p > 0,05$) blieb weitestgehend unbeeinflusst.

12 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 22 B) zeigten die unbehandelten (-6554 ± 1320 vs. -8515 ± 1976 mmHg/s; $p < 0,01$) und die NOS2 Inhibition (-5856 ± 2145 vs. -8515 ± 1976 mmHg/s; $p < 0,05$) Tiere signifikante Einschränkungen in der diastolischen Funktion. Die septischen NOS3^{-/-} zeigten keine signifikante Abnahme des dP/dt_{min} zum Zeitpunkt 12 Stunden (-7955 ± 1295 vs. -8919 ± 1782 mmHg/s; $p > 0,05$) und signifikant höhere Werte im Vergleich zu den unbehandelten CLP (-7955 ± 1295 vs. -6554 ± 1320 ; $p < 0,05$) Tieren.

3. Ergebnisse

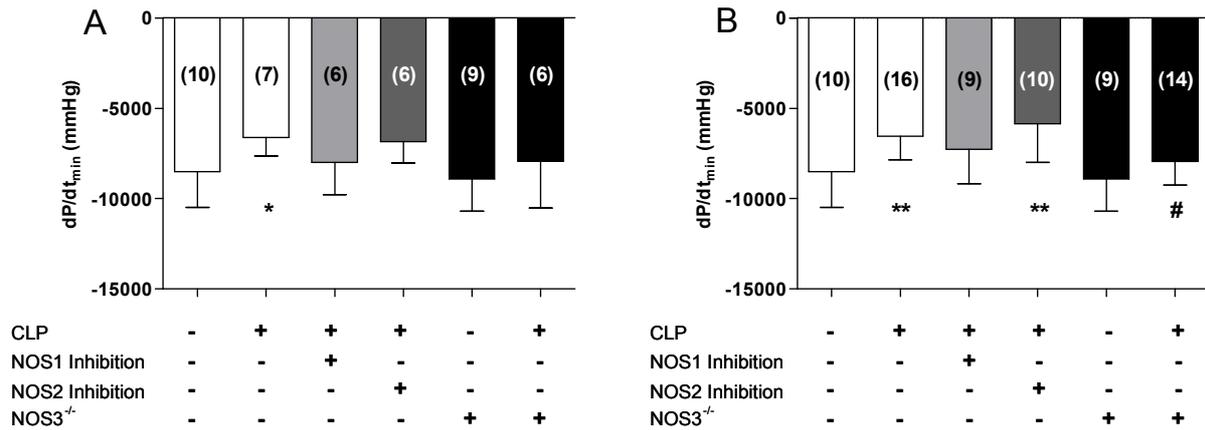


Abbildung 22: dP/dt_{min} nach 6 (A) und 12 (B) Stunden Sepsis Induktion. (Mittelwert ± SD, *p<0,05; **p<0,01 vs. basal; #p<0,05 vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

Die Gabe des Katecholamins Arterenol führte 6 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 23 A) in den unbehandelten Tieren ($18,3 \pm 16,5\%$; $p > 0,05$), NOS2 Inhibition ($22,1 \pm 7,2\%$; $p > 0,05$) und NOS1 Inhibition ($28,3 \pm 20,9\%$; $p > 0,05$) zu einer tendenziell geringeren Reaktion gegenüber der Kontrolle ($44,4 \pm 17,1\%$). Die Induktion der Sepsis steigerte die Reaktion der NOS3^{-/-} Tiere auf Arterenol signifikant gegenüber der Kontrolle NOS3^{-/-} ($47,4 \pm 20,5$ vs. $23,4 \pm 22,0\%$; $p < 0,05$). Die NOS3^{-/-} Tiere zeigten einen signifikant höheren Anstieg des dP/dt_{min} im Vergleich zu den unbehandelten CLP Tieren ($47,4 \pm 20,5$ vs. $18,3 \pm 16,5\%$; $p < 0,05$).

12 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 23 B) reagierten die unbehandelten Tiere signifikant geringer auf das Arterenol gegenüber der Kontrolle ($-2,6 \pm 7,2$ vs. $44,4 \pm 17,1\%$; $p < 0,001$). Auch in den Gruppen der NOS2 Inhibition ($7,8 \pm 10,0$ vs. $44,4 \pm 17,1\%$; $p < 0,05$) und NOS1 Inhibition ($1,9 \pm 10,1$ vs. $44,4 \pm 17,1\%$; $p < 0,01$) war eine signifikant verringerter Anstieg des dP/dt_{min} im Vergleich zu Kontrolle nachzuweisen. Die septischen NOS3^{-/-} Tiere reagierten mit einem signifikant höheren Anstieg des dP/dt_{min} auf die Katecholamin-Gabe gegenüber den unbehandelten CLP Tieren ($11,9 \pm 3,3$ vs. $-2,6 \pm 7,2\%$; $p < 0,05$).

3. Ergebnisse

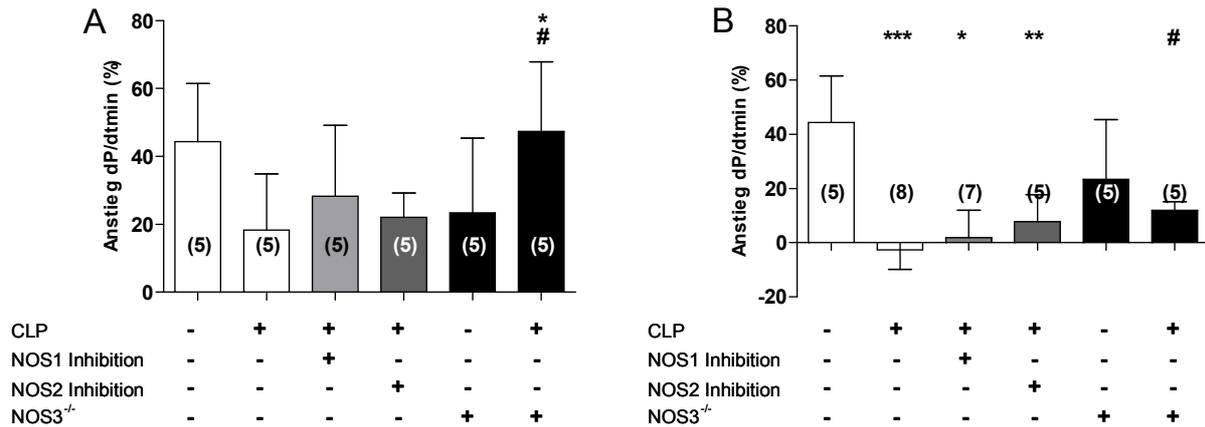


Abbildung 23: Anstieg des dP/dt_{min} nach Katecholamin-Gabe in Prozent 6 (A) und 12 (B) Stunden nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert ± SD, *p<0,05 **p<0,01; *p<0,001 vs. basal; #p<0,05 vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielles ANOVA und Dunns Post Hoc Test)**

3.7.5 Herzfrequenz

Im typischen Verlauf einer Sepsis kommt es in der Frühphase zu einer sogenannten hyperdynamen Phase. Diese ist vor allen Dingen durch einen Anstieg der Herzfrequenz gekennzeichnet. 6 Stunden nach Sepsis Induktion (siehe Abb. 24 A) war eine Erhöhung der Herzfrequenz in den unbehandelten CLP Mäusen gegenüber der Kontrolle zu beobachten (602±22 vs. 540±51bpm; p<0,05). In den Gruppen der NOS2 Inhibition (551±88bpm; p>0,05) und NOS1 Inhibition (594±36bpm; p>0,05) konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden. Zwischen der Kontrolle NOS3^{-/-} und den septischen NOS3^{-/-} lag kein signifikanter Unterschied vor (510±49 vs. 502±49bpm; p>0,05). Die NOS3^{-/-} Tiere zeigten eine signifikant verringerte Herzfrequenz gegenüber den unbehandelten CLP Mäusen auf (502±49 vs. 602±22bpm; p<0,01).

12 Stunden nach Sepsis Induktion (siehe Abb. 24 B) konnten keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Versuchstiergruppen festgestellt werden (p>0,05).

3. Ergebnisse

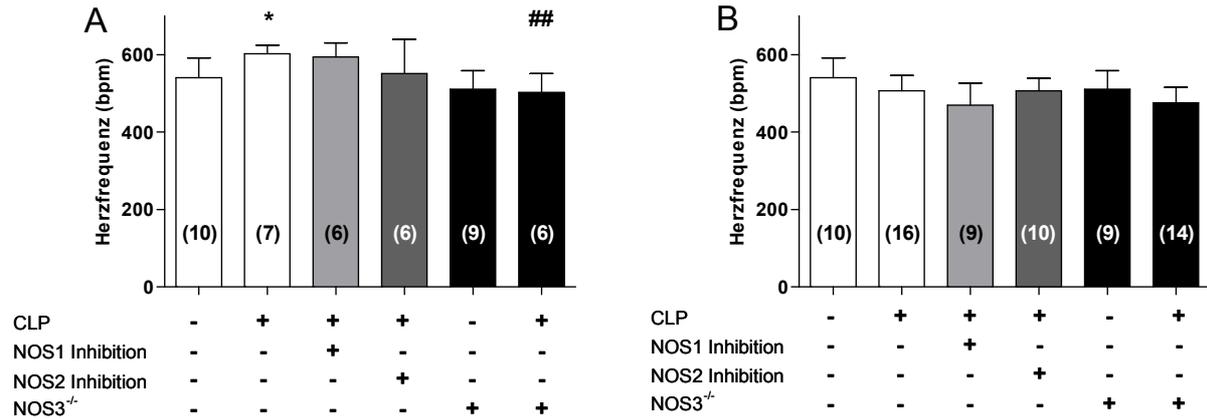


Abbildung 24: Herzfrequenz 6 (A) bzw. 12 (B) Stunden nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$ vs. basal; ### $p < 0,001$ vs. Unbehandelte CLP; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.8 Untersuchungen WT versus NOS3^{-/-} Mäuse

Der größte Überlebensvorteil nach Sepsis Induktion konnte in den NOS3 depletierten Tieren beobachten werden. Dies scheint mit verschiedenen Faktoren zusammenzuhängen: 1. verringerte Nitrat Konzentrationen im Plasma, 2. modifizierte Einwanderung von Entzündungszellen in das Herzgewebe und 3. verbesserte Herzfunktion. Die pharmakologische Inhibition der NOS2 und NOS1 führte zwar ebenso zu einem Überlebensvorteil gegenüber unbehandelten Mäusen, wiesen aber in der Hämodynamik keinen Vorteil gegenüber den WT auf. Die weiteren Untersuchungen wurden nun in den beiden Versuchstiergruppen WT und NOS3^{-/-} Mäuse durchgeführt um darstellen zu können, ob ein kardiales oder vaskuläres Problem vorliegt und ob sich die Mausstämme nach Sepsis Induktion in der Genexpression, Gewebe Nitrit/Nitrat und bioaktives NO unterscheiden.

3.8.1 Langendorff

Die Langendorff-Apparatur wurde in diesem Versuchsaufbau dazu genutzt, um das Herz als isoliertes Organ betrachten zu können. Dadurch war es möglich den Linksventrikulären entwickelten Druck, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} ohne Einfluss von Blut und Gefäßsystem zu betrachten. Alle bestimmten Parameter sind auf das Herzgewicht der einzelnen Versuchstiere bezogen (pro Gramm Herzgewicht).

3. Ergebnisse

3.8.1.1 Linksventrikulärer entwickelter Druck

Die invasive Bestimmung der Herzfunktion mittels Katheter in vivo zeigten eine Fehlfunktion des LVDP bereits nach 6 Stunden Sepsis-Induktion. Die ex vivo Versuche sollten aufzeigen, welcher Anteil der linksventrikulären Fehlfunktion vom Herzen selbst verursacht wurde. Die Versuche zeigten in den Wildtyp-Mäusen eine Fehlfunktion der linken Herzkammer bereits 6 Stunden nach Sepsis-Induktion ($510,2 \pm 124$ vs. $627,8 \pm 34,35 \text{ mmHg/g}$; $p > 0,05$), welche zu diesem Zeitpunkt keine Signifikanz erreichte (Abb. 25). 12 Stunden nach Sepsis-Induktion konnte eine signifikante Abnahme des linksventrikulären Druckes gegenüber der Kontrolle festgestellt werden ($358,8 \pm 63,65$ vs. $627,8 \pm 34,35 \text{ mmHg/g}$; $p < 0,01$). Die $\text{NOS3}^{-/-}$ Mäuse zeigten weder 6 noch 12 Stunden nach Sepsis Induktion ($579,5 \pm$ bzw. $584 \pm 194,9$ vs. $678,2 \pm 133,1 \text{ mmHg/g}$; $p > 0,05$) eine linksventrikuläre Fehlfunktion. In den WT-Mäusen liegt 12 Stunden nach Sepsis-Induktion eine ausgeprägte Fehlfunktion des linken Ventrikels vor, der in den $\text{NOS3}^{-/-}$ Tieren nicht nachgewiesen werden konnte. Die linksventrikuläre Fehlfunktion zum Zeitpunkt 12 Stunden in den WT-Mäusen ist nicht auf eine schlechtere Gefäßfunktion zurückzuführen, es liegt ein kardiales Problem vor.

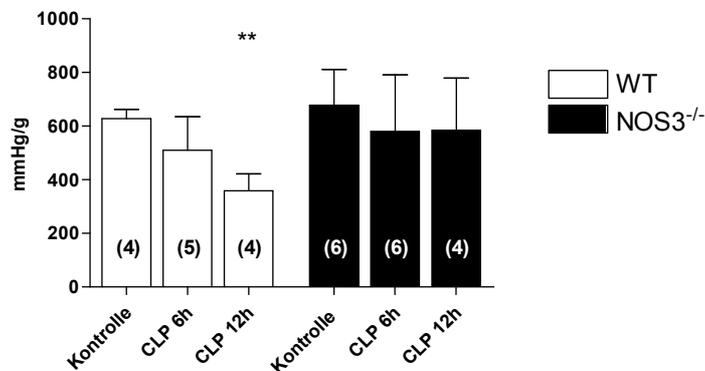


Abbildung 25: Linksventrikulärer entwickelter Druck pro g Herzgewebe basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert \pm SD, $**p < 0,01$ vs. Kontrolle; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.8.1.2 dP/dt_{\max}

Als weiterer Parameter der Herzfunktion wurde, wie auch in vivo, der dP/dt_{\max} am isolierten Herzen betrachtet (siehe Abb. 26). 6 Stunden nach Sepsis-Induktion kam es zu einer tendenziellen Abnahme des dP/dt_{\max} Wertes in den Herzen der WT-Mäusen (22613 ± 6039 vs. $27238 \pm 1606 \text{ mmHg/s/g}$; $p > 0,05$), welcher 12 Stunden nach Induktion Signifikanz erreichte (15687 ± 3128 vs. $27238 \pm 1606 \text{ mmHg/s/g}$; $p < 0,05$). Die $\text{NOS3}^{-/-}$ Tiere wiesen 6 und 12 Stunden nach CLP Induktion (25864 ± 8841 bzw.

3. Ergebnisse

25663±8398 vs. 29760±6575mmHg/s/g; $p>0,05$) keinerlei signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Die Ergebnisse des dP/dt_{max} sprechen für eine Abnahme des Kontraktionsvermögens der Herzen in den ersten 12 Stunden einer Sepsis, und sind somit homolog zu den in vivo erhobenen Daten.

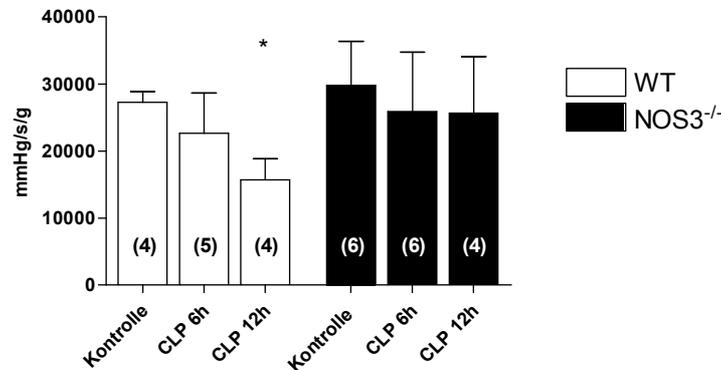


Abbildung 26: Änderungen des dP/dt_{max} pro g Herzgewebe basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion. (Mittelwert ± SD, * $p<0,05$ vs. basal; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.8.1.3 dP/dt_{min}

Der dP/dt_{min} spiegelt die Relaxtionsfähigkeit des linken Ventrikels wider. Die in vivo Messungen ergaben eine signifikante Abnahme dieses Wertes bereits 6 Stunden nach Sepsis-Induktion. Ex vivo konnte in WT Mäusen zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Induktion eine tendenzielle Abnahme (Abb. 27) gemessen werden (-16094±5268 vs. -21647±1808mmHg/s/g; $p>0,05$). 12 Stunden nach Sepsis-Induktion zeigten die Herzen der WT Mäuse eine ausgeprägte Fehlfunktion in der Relaxtion (-10183±2079 vs. -21647±1808mmHg/s/g). Die NOS3^{-/-} Tiere zeigten zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (-19677±7811 bzw. -19220±8218 vs. -24397±6543; $p>0,05$).

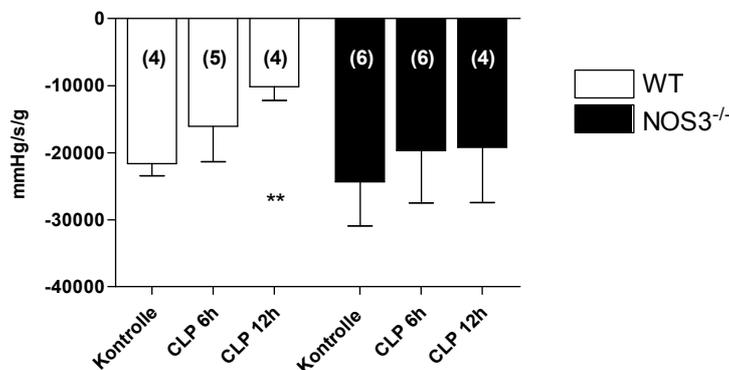


Abbildung 27: Änderungen des dP/dt_{min} pro g Herzgewebe basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert ± SD, ** $p<0,01$ vs. basal; einfaktorielle ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.8.2 Aortenringanlage

Zur Überprüfung, ob es zu einer endothelialen Dysfunktion im Hauptleitungssystem der Mäuse nach Sepsis-Induktion kommt, wurden die Aorten der Versuchstiere Basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion untersucht. Die Fähigkeit der Aorten auf einen endothelabhängigen Dilatator (Acetylcholin), einen endothelabhängigen Kontraktor (Phenylephrin) und auf einen NO-Donor (SNP) zu reagieren, wurde überprüft.

3.8.2.1 Vitalitätsprüfung durch KCl

Alle untersuchten Aorten wurden zu Beginn des Experimentes auf ihre Vitalität überprüft. Zu diesem Zweck wurde KCl in einer Konzentration von 80mM in das Organbad der Aorten gegeben und die folgende Kontraktion gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Reaktion auf KCl in den verschiedenen Versuchsgruppen festgestellt werden (Abb. 28). Alle untersuchten Aorten waren somit vital und konnten in die Auswertung eingeschlossen werden. Die geringfügigen Unterschiede in der Ausprägung der Kontraktion konnte von einer unterschiedlichen Länge der Aortenstücke hervorgerufen worden sein.

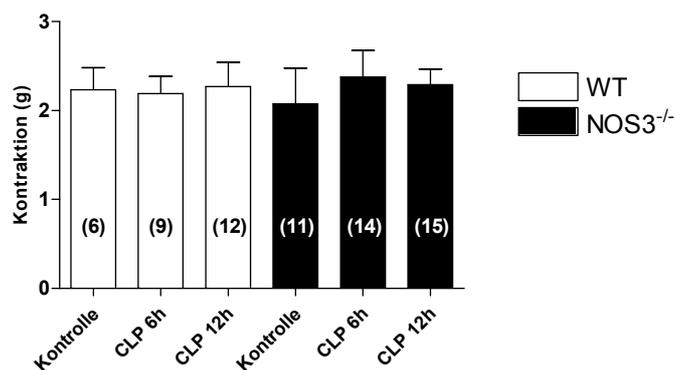


Abbildung 28: Kontraktion der Aorten nach KCl-Gabe basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion. (Mittelwert \pm SD, $p > 0,05$; einfaktorielles ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.8.2.2 Dosis-Wirkung Acetylcholin

Zur Untersuchung der endothelabhängigen Dilatation wurde den Aorten nach Vorkontraktion mit Phenylephrin ($0,1\mu\text{M}$) kumulativ Acetylcholin verabreicht. Die entstandene Dosis-Wirkung-Kurve ist in Abbildung 29 für die Wildtypen dargestellt. 6 Stunden nach Sepsis-Induktion lag kein signifikanter Unterschied im EC_{50} zu den Basal Tieren vor ($5,35 \times 10^{-8}$ vs. $2,83 \times 10^{-8}\text{M}$; $p > 0,05$). Zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Sepsis-Induktion konnte ein signifikanter Unterschied in der Konzentration für die halbmaximale Dilatation (EC_{50}) nachgewiesen werden ($5,86 \times 10^{-8}$ vs. $2,83 \times 10^{-8}\text{M}$; $p < 0,05$). Die $\text{NOS}3^{-/-}$ Aorten reagierten nicht auf die Gabe von Acetylcholin und wurden nicht dargestellt.

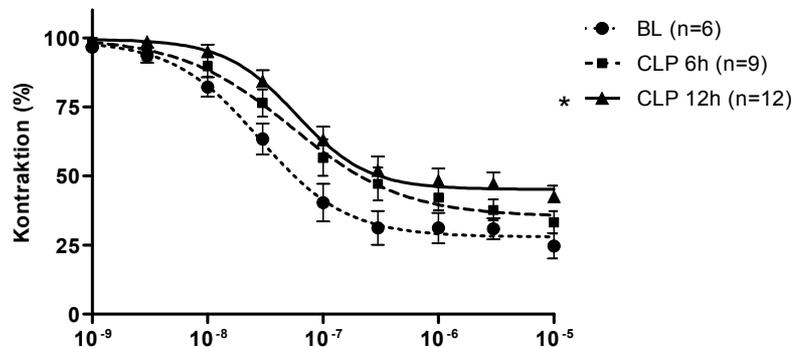


Abbildung 29: Acetylcholin induzierte Dilatation der Aortenringe von Wildtyp Mäusen basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion in Prozent für den Konzentrationsbereich $1\text{nm} - 10\mu\text{M}$ (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; F-Test).

3.8.2.3 Dosis-Wirkungs-Kurve Phenylephrin

Phenylephrin wurde im zweiten Versuchsansatz eingesetzt um eine endothelabhängige Kontraktion der Aorten zu erreichen. Wie schon im Versuchsteil mit Acetylcholin wurde das Phenylephrin kumulativ bis zu einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ auf die Aorten gegeben. Die resultierenden Dosis-Wirkungskurven sind in Abbildung 30 dargestellt. In Teilabbildung A sind die Reaktionen der WT Aorten dargestellt. Der EC_{50} der Aorten der Basal Tiere unterschied sich nicht signifikant zu den EC_{50} Werten der 6 Stunden Sepsis Tiere ($7,54 \times 10^{-8}$ vs. $7,86 \times 10^{-8}\text{M}$). 12 Stunden nach Sepsis-Induktion zeigten die Aorten eine signifikante Rechtsverschiebung der Kurve, welches für einen erhöhten EC_{50} Wert steht ($7,54 \times 10^{-8}$ vs. $1,12 \times 10^{-7}\text{M}$; $p < 0,001$).

3. Ergebnisse

In den NOS3^{-/-} Aorten war ein ähnliches Bild zu erkennen (Abb. 30 B). 6 Stunden nach Sepsis-Induktion war kein Unterschied gegenüber den basalen Aorten festzustellen ($6,97 \times 10^{-8}$ vs. $7,60 \times 10^{-8}$ M; $p > 0,05$). Zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Induktion konnte in den NOS3^{-/-} Aorten eine signifikante Erhöhung des EC50 für Phenylephrin im Vergleich zu den Aorten der Basal Tiere festgestellt werden ($1,08 \times 10^{-7}$ vs. $7,60 \times 10^{-8}$ M; $p < 0,001$). 12 Stunden nach Sepsis Induktion konnte in beiden Mausgruppen eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve festgestellt werden, was für eine endotheliale Dysfunktion im Hauptleitungsgefäß spricht.

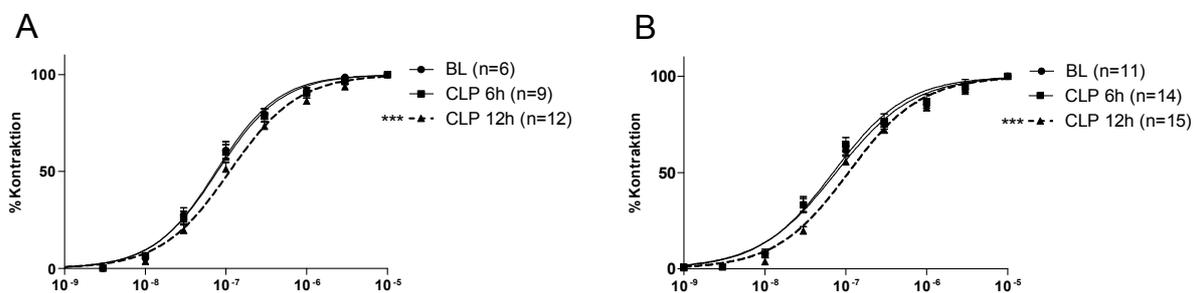


Abbildung 30: Phenylephrin induzierte Kontraktion der Aortenringe von Wildtyp (A) und NOS3^{-/-} (B) Mäusen basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion in Prozent für den Konzentrationsbereich 1nm - 10µM (Mittelwert ± SD, *** $p < 0,001$; F-Test)

3.8.2.4 Dosis-Wirkung SNP

Die Dilatation der Gefäße unabhängig vom Endothel wurde mit Hilfe des NO Donors SNP gemessen. Die Aorten wurden für diesen Versuchsaufbau mit Phenylephrin (1µM) vorkontrahiert. Das SNP wurden kumulativ in einer Konzentrationsspanne von 0,1nm-10µM auf die Aorten gegeben. 6 Stunden nach Sepsis-Induktion (siehe Abb. 31 A) konnte kein signifikanter Unterschied zu den Aorten der basalen Wildtypen festgestellt werden ($4,88 \times 10^{-9}$ vs. $4,53 \times 10^{-9}$ M; $p > 0,05$). Die Induktion der Sepsis führte nach 12 Stunden zu einer signifikanten Zunahme des EC50 ($1,21 \times 10^{-8}$ vs. $4,53 \times 10^{-9}$ M; $p < 0,001$).

In den Aorten der NOS3^{-/-} Tieren (siehe Abb. 31 B) kam es weder nach 6 ($1,59 \times 10^{-9}$ M; $p > 0,05$) noch nach 12 Stunden ($1,67 \times 10^{-9}$ M; $p > 0,05$) Sepsis-Induktion zu einem signifikanten Unterschied in der Reaktion auf SNP gegenüber den Aorten der Basaltiere ($1,90 \times 10^{-9}$ M).

3. Ergebnisse

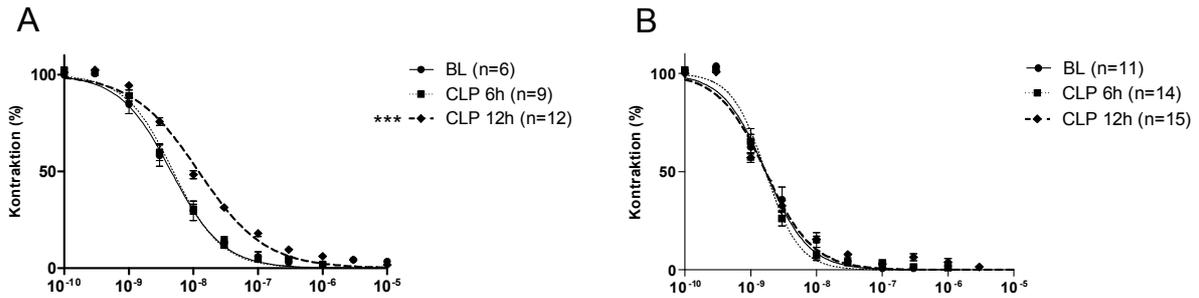


Abbildung 31: SNP induzierte Dilatation in den Aortenringen der Wildtypen- (A) und NOS3^{-/-} (B) - Mäusen basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion in Prozent für den Konzentrationsbereich 0,1nm-10µM (Mittelwert ± SD, ***p<0,001; F-Test).

Werden die Dosis-Wirkungs-Kurven der Aorten der Basal Wildtypen und der NOS3^{-/-} Tiere gegenüber gestellt (Abb. 32), reagieren die NOS3^{-/-} Aorten signifikant früher auf SNP, auch unabhängig von der Sepsis-Induktion. Die NOS3^{-/-}-Tiere wiesen einen geringeren EC50-Wert auf im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ($1,90 \times 10^{-9}$ vs. $4,53 \times 10^{-9}$ M; p<0,001). Wurde der Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsis-Induktion in den Wildtyp Aorten und NOS3^{-/-} Aorten betrachtet, bleibt die Signifikanz bestehen ($4,88 \times 10^{-9}$ vs. $1,59 \times 10^{-9}$ M; p<0,001). Gleiches zeigte sich bei der Betrachtung der 12 Stunden Daten ($1,21 \times 10^{-8}$ vs. $1,67 \times 10^{-9}$ M; p<0,001). Der Zeitpunkt 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion wurde nicht bildlich dargestellt.

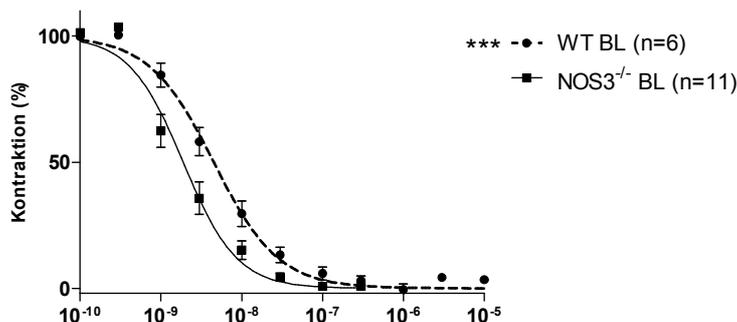


Abbildung 32: SNP induzierte Dilatation in den Aortenringen der Wildtypen und NOS3^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt Basal (Mittelwert± SD, ***p<0,001; F-Test).

3.8.4 Nitrit/Nitrat Konzentrationen im Herz Gewebe

Der Nachweis der Nitrit/Nitrat Konzentrationen im Herzgewebe sollte Aufschluss über deren Anreicherung im Herzgewebe nach Sepsis Induktion liefern.

3. Ergebnisse

3.8.4.1 Nitrit Konzentrationen

Die Nitrit Konzentrationen im Herzgewebe wurden zu den Zeitpunkten basal, 6 Stunden und 12 Stunden nach Sepsis Induktion in WT und NOS3^{-/-} Mäusen erhoben. Die Nitrit Konzentrationen im Herzgewebe (Abb. 33) zeigten in keiner der untersuchten septischen Gruppe einen signifikanten Unterschied. Tendenziell stiegen die Nitrit Konzentrationen von basal zum 12 Stunden Zeitpunkt in den NOS3^{-/-} Mäusen an (0,781±0,387 vs. 1,201±0,682µM; p>0,05). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den WT Kontrolltieren und den NOS3^{-/-} Kontrolltieren. Die Daten aus dem Herzgewebe spiegeln die Nitrit Konzentration im Plasma wider, da im Plasma die Sepsis-Induktion ebenfalls keine Auswirkungen auf die Nitrit Konzentrationen zeigte.

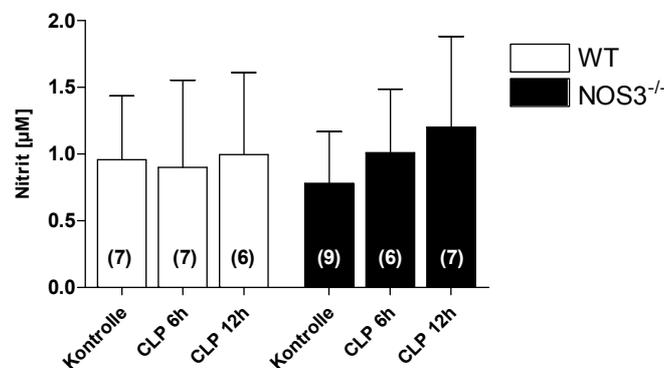


Abbildung 33: Nitrit Konzentrationen im Herzgewebe 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion in Wildtyp und NOS3^{-/-} Herzen. (Mittelwert ± SD, p>0,05; einfaktorielles ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.8.5.2 Nitrat Konzentrationen

Der schon beobachtete Anstieg der Nitratkonzentration 6 Stunden nach Sepsis Induktion im Plasma der Wildtypen, konnte auch im Herzgewebe nachgewiesen werden (27,01±17,46 vs. 7,32±3,06µM; p<0,01; siehe Abb. 34). Zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Sepsis-Induktion erreichte die Nitrat Konzentration in den Wildtypen keine Signifikanz (20,54±8,41 vs. 7,32±3,06; p>0,05). Die NOS3^{-/-} Tiere zeigten einen tendenziellen Anstieg der Nitrat Konzentration nach 6 und 12 Stunden (19,54±8,8 bzw. 20,83±9,37 vs. 9,07±3,39µM; p>0,05) Sepsis Induktion. Die Ergebnisse der Nitrat Konzentrationen im Plasma finden sich zum Teil im Gewebe wieder.

3. Ergebnisse

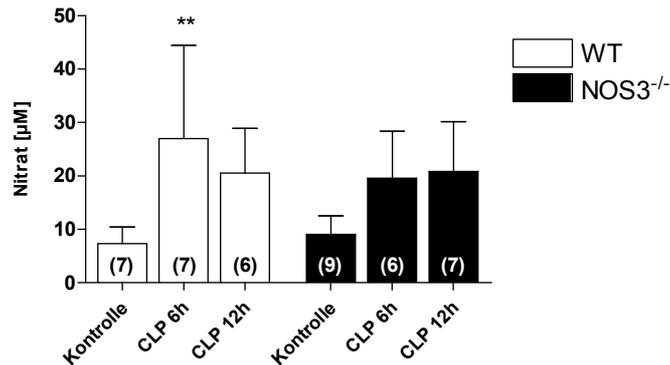


Abbildung 34: Nitrat Konzentrationen im Herzgewebe 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion in Wildtyp und NOS3^{-/-} Herzen. (Mittelwert \pm SD, **p<0,01 vs. basal; einfaktorische ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.8.6 Bioaktives NO im Herzgewebe

Da die Nitrat Konzentrationen im Plasma und im Gewebe in den Wildtyp Mäusen 6 Stunden nach Sepsis Induktion anstiegen, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die erhöhten Nitrat Konzentrationen mit einer Zunahme des bioverfügbaren NO gleichzusetzen ist. Das bioverfügbare NO in den Wildtyp Tieren war 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion signifikant erhöht (siehe Abb. 35) gegenüber der Kontrolle ($0,895 \pm 0,137$ bzw. $0,628 \pm 0,053$ vs. $0,310 \pm 0,037$; $p < 0,001$). Die Konzentration an NO war zum Zeitpunkt 6 Stunden ebenfalls signifikant erhöht gegenüber dem Zeitpunkt 12 Stunden ($0,895 \pm 0,137$ vs. $0,628 \pm 0,053$; $p < 0,001$). Zum Zeitpunkt 6 Stunden wiesen die NOS3^{-/-} Tiere signifikant erhöhte NO Konzentrationen gegenüber der Kontrolle auf ($0,475 \pm 0,033$ vs. $0,253 \pm 0,046$; $p < 0,01$) und stiegen zum Zeitpunkt 12 Stunden weiter an ($0,533 \pm 0,042$ vs. $0,253 \pm 0,046$; $p < 0,001$). 6 Stunden nach Sepsis-Induktion wiesen die Herzen der NOS3^{-/-} Tiere signifikant geringere NO Konzentrationen auf als die entsprechenden Wildtyp Herzen ($0,895 \pm 0,137$ vs. $0,475 \pm 0,033$; $p < 0,001$).

3. Ergebnisse

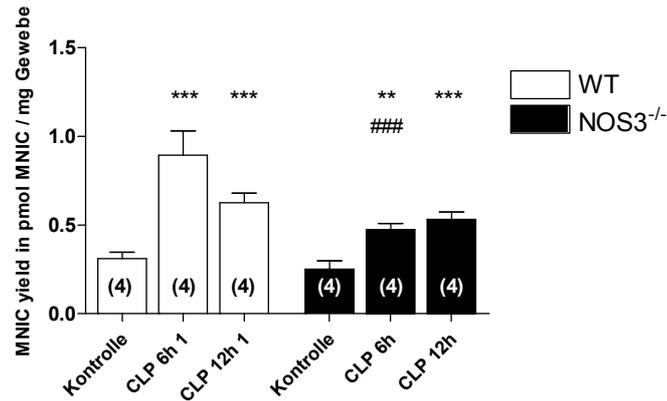


Abbildung 35: Bioaktives NO im Herzgewebe nach 6 und 12 Stunden Sepsis Induktion in den WT Mäusen und NOS3^{-/-} (Mittelwert \pm SD, **p<0,01; ***p<0,001 vs. basal; ###p<0,001 vs. WT CLP 6h; einfaktorische ANOVA und Dunns Post Hoc Test).

3.8.7 Genexpression im Herzgewebe

Der Anstieg der Nitrat Konzentration und des bioaktiven NO im Herzgewebe legt die Annahme nah, dass dieses NO bzw. Nitrat auch in diesem Gewebe produziert wurde. Zur Untersuchung dieser Annahme wurde die Genexpression, als erster Schritt zur Erhöhung der Produktion, der verschiedenen NO-Synthasen (NOS1, NOS2 und NOS3) im Herzgewebe der verschiedenen Untersuchungsgruppen untereinander verglichen.

3.8.7.1 Gen-Expression der NOS3 (endotheliale NO-Synthase) im Herzgewebe

Da die NOS3^{-/-} Mäuse kein funktionsfähiges NOS3 Protein besitzen wurde die Genexpression der endothelialen NO-Synthase nur in den Herzen der Wildtyp-Mäuse untersucht. Die Expressionsunterschiede (siehe Abb. 36) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten erreichten keine Signifikanz (Kontrolle: $1,0 \pm 0,2$; CLP 6h: $0,8 \pm 0,5$; CLP 12h: $1,1 \pm 0,2$; $p > 0,05$).

3. Ergebnisse

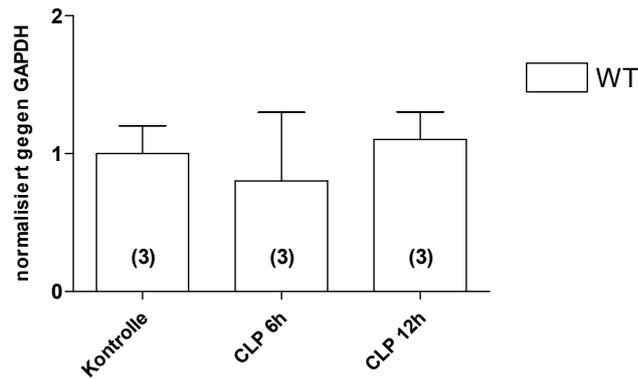


Abbildung 36: Genexpression der NOS3 im Herzgewebe basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion. ($p > 0,05$, REST Software 2009)

3.8.7.2 Gen-Expression der NOS2 (induzierbaren NO-Synthase) im Herzgewebe

Die NOS2 gilt als ein Haupt-Produzent von NO während Inflammationsprozessen. Die Expression der NOS2 im Herzgewebe (Abb. 37) sank in den WT Herzen 6 Stunden nach Sepsis-Induktion tendenziell ab ($0,4 \pm 0,9$ vs. $1,0 \pm 0,3$; $p > 0,05$) und zeigte nach 12 Stunden Sepsis Induktion die gleiche Tendenz ($0,4 \pm 0,3$; $p > 0,05$). Die NOS3^{-/-} Herzen wiesen basal eine erhöhte Expression an NOS2 gegenüber den WT Herzen auf, dieser Unterschied war signifikant ($1,7 \pm 0,8$ vs. $1,0 \pm 0,3$; $p < 0,01$). 6 Stunden nach Sepsis Induktion zeigten die NOS3^{-/-} Herzen eine signifikante Erniedrigung der NOS2 Expression ($0,7 \pm 0,4$ vs. $1,7 \pm 0,8$; $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle NOS3^{-/-}. Zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Induktion zeigte die NOS2 Expression der NOS3^{-/-} Herzen keine signifikanten Unterschiede ($1,0 \pm 0,03$; $p > 0,05$) auf. Auch die NOS2 ist nicht für den Anstieg des bioaktiven NO's und der Nitrat Konzentration im Herzen verantwortlich.

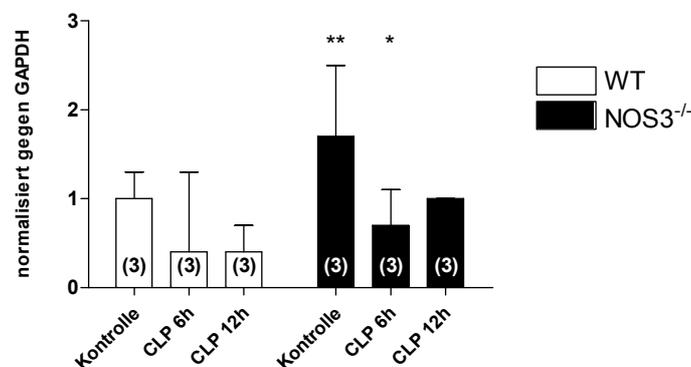


Abbildung 37: Genexpression der NOS2 im Herzgewebe basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion. (Mittelwert \pm SD, ** $p < 0,01$ vs. WT basal; * $p < 0,05$ vs. Basal; REST Software 2009).

3.8.7.3 Gen-Expression der NOS1 (neuronalen NO-Synthase) im Herzgewebe

Die letzte zu untersuchende NO-Synthase ist die NOS1. Sie gehört wie die NOS3 zu den konstitutiven NO-Synthasen. Die Expressionsanalyse (Abb. 38) erbrachte einen signifikanten Anstieg der NOS1 Expression im Herzgewebe der WT Mäuse 6 Stunden nach Sepsis Induktion ($2,4 \pm 1,9$ vs. $1,0 \pm 0,3$; $p < 0,05$). 12 Stunden nach Sepsis Induktion sank die Expression der NOS1 unter die Basalwerte der Kontrolle ab ($0,5 \pm 0,2$; $p > 0,05$). Die NOS3^{-/-} Herzen reagierten auf die Sepsis Induktion mit keinem signifikanten Unterschied nach 6 ($1,3 \pm 0,3$; $p > 0,05$) bzw. 12 Stunden ($0,4 \pm 0,3$; $p > 0,05$) in der NOS1 Expression.

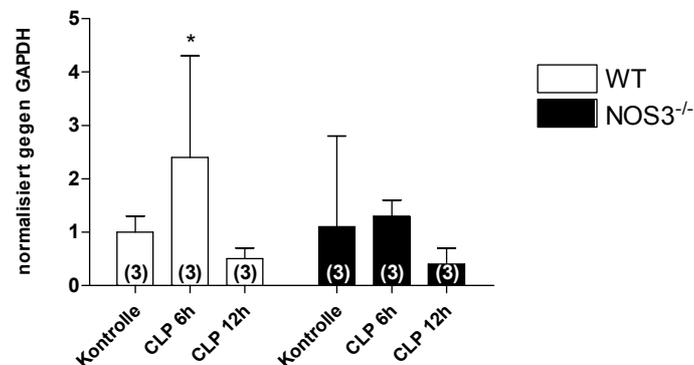


Abbildung 38: Genexpression der NOS1 im Herzgewebe basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion. (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$ vs. WT basal; REST Software 2009).

3.8.7.4 Gen-Expression von Interleukin 6 (IL-6) im Herzgewebe

IL-6 gilt als Proinflammationsmarker in Inflammationsprozessen. Die Genexpression von IL-6 wurde in den Herzgeweben aus Wildtyp und NOS3^{-/-} Mäusen basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion untersucht (siehe Abb. 39). Beide untersuchten Mausstämmen reagierten mit einem signifikanten Anstieg der Genexpression von IL-6 im Herzgewebe auf die Sepsis-Induktion nach 6 Stunden (WT: $81,0 \pm 99,7$; $p < 0,001$; NOS3^{-/-}: $79,1 \pm 48,5$; $p < 0,001$). In den Wildtyp-Herzen blieb die Genexpression 12 Stunden nach Sepsis-Induktion signifikant erhöht ($16,7 \pm 35,9$; $p < 0,001$), in den NOS3^{-/-} Tieren war zu diesem Zeitpunkt keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle vorhanden ($6,7 \pm 2,8$; $p > 0,05$). Es zeigte sich ein Höhepunkt der IL-6 Expression zum Zeitpunkt 6 Stunden in beiden untersuchten Mausstämmen.

3. Ergebnisse

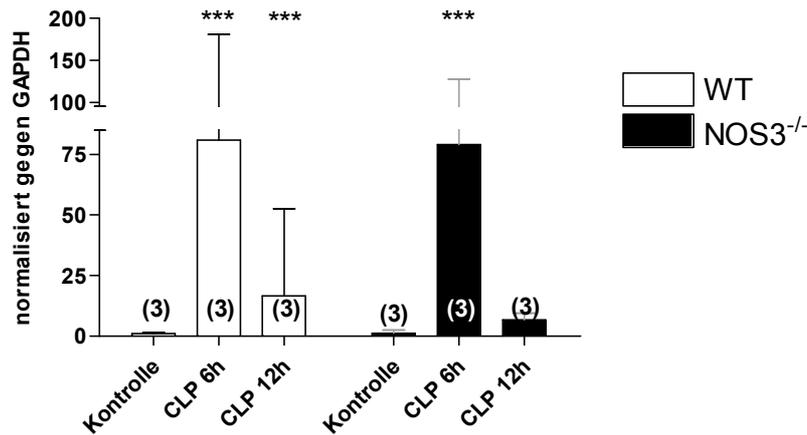


Abbildung 39: Genexpression von IL-6 im Herzgewebe basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert \pm SD, *** $p < 0,001$ vs. basal; REST Software 2009).

3.8.7.5 Gen-Expression von Tumor Nekrose Faktor (TNF) im Herzgewebe

TNF spielt in Inflammationsprozessen eine große Rolle. Zur Feststellung von Unterschieden in der Genexpression wurden die Herzgewebe von WT und NOS3^{-/-} Mäusen basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion untersucht (siehe Abb. 40). 6 Stunden nach Sepsis-Induktion stiegen die Expressionslevel in der Wildtyp- wie auch in der NOS3^{-/-} Gruppe signifikant an. Eine Erhöhung der Expression war nach 12 Stunden in den Wildtypen nicht mehr nachweisbar, während die NOS3^{-/-} Tiere eine weitere Steigerung der Expression aufwiesen. Dieser Unterschied zum Zeitpunkt 12 Stunden war signifikant erhöht gegenüber den Wildtyp-Mäusen. Die Inflammationsprozesse in den NOS3^{-/-} und den Wildtyp Tieren verläuft unterschiedlich.

3. Ergebnisse

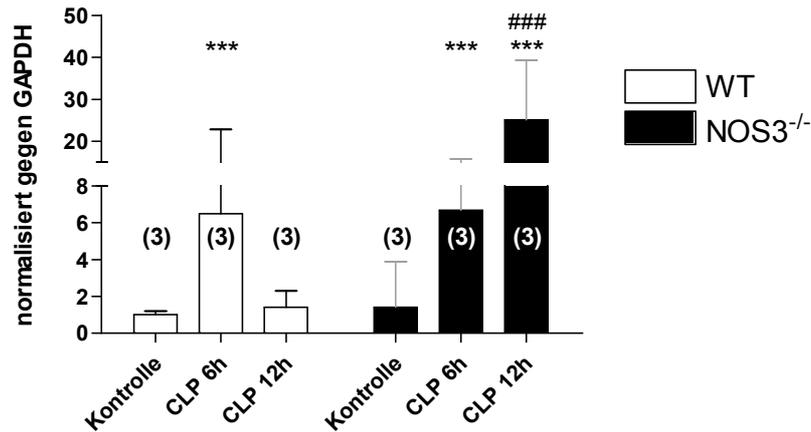


Abbildung 40: Genexpression von TNF im Herzgewebe basal, 6 und 12 Stunden nach Sepsis-Induktion. (Mittelwert \pm SD, *** p <0,001 vs. basal, ### p <0,001 vs. CLP 12h; REST Software 2009).

3.8.8 Nitrotyrosin

Der Nachweis von Nitrotyrosin wurde über die Histochemie erstellt. Es konnte nur semiquantitativ ausgewertet werden. In den Herzgeweben der Basaltiere konnte kein Nitrotyrosin nachgewiesen werden (siehe Abb. 41). 6 Stunden nach Sepsis-Induktion konnte in den Herzgeweben der WT-Mäuse starke Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden, die Herzen der NOS3^{-/-} Mäuse zeigten dieses nicht. In den NOS3^{-/-} kam es zum Zeitpunkt 12 Stunden zu einer Anreicherung von Nitrotyrosin, in den WT Herzen sank der Anteil an Nitrotyrosin wieder ab. Die WT Herzen zeigten somit einen Höhepunkt an Nitrotyrosin zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsis-Induktion, die Herzen der NOS3^{-/-} Tiere zeigten zum Zeitpunkt 12 Stunden die höchsten Fluoreszenz.

3. Ergebnisse

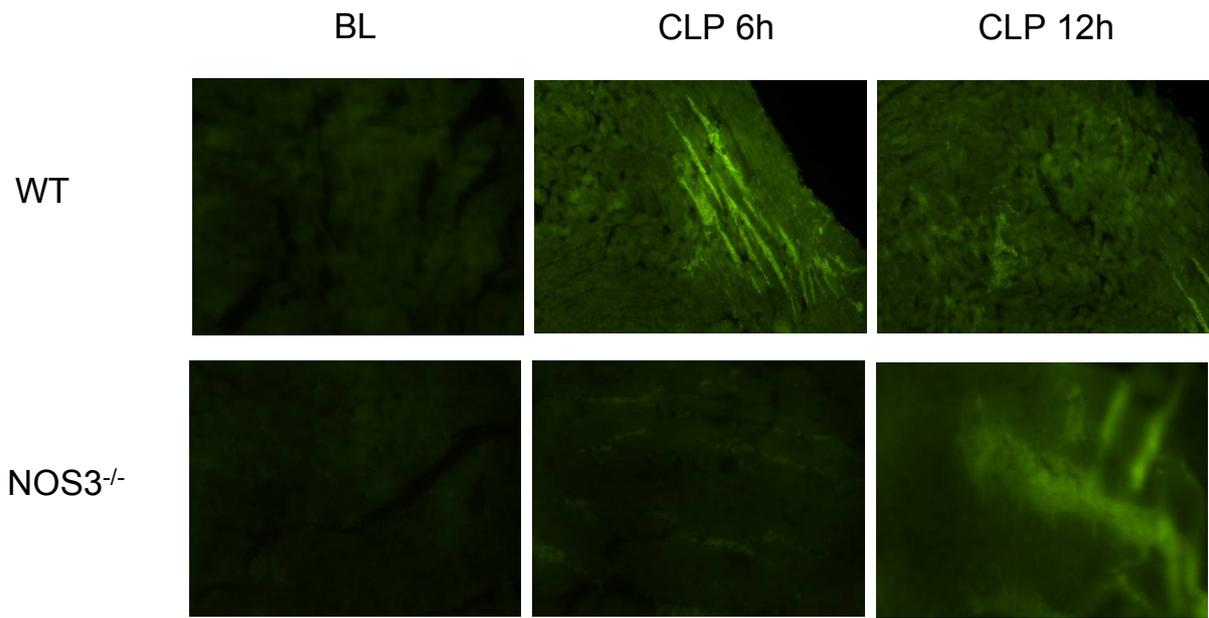


Abbildung 41: Fluoreszenznachweis von Nitrotyrosin im Herzgewebe

4. Diskussion

Die Hauptaussage der vorliegenden Arbeit ist, dass die NOS3 eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Sepsis spielt. Durch Inhibition der NOS1 und NOS2 wird die Überlebenszeit der Mäuse nach Sepsis Induktion verlängert, der Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes und die verschlechterte linksventrikuläre Funktion der Herzen aber nicht verhindert. Die NOS3 führt in den WT Mäusen zu einem Abfall des mittleren arteriellen Druckes und einer hyperdynamen Phase mit zeitgleich eingeschränkter linksventrikulärer Funktion, die zu einer verkürzten Überlebenszeit beitragen. Im Gegensatz dazu weisen die NOS3^{-/-} Mäuse einen stabilen mittleren arteriellen Blutdruck und eine stabile linksventrikuläre Funktion, sowie eine um mehr als das zweifache verlängerten Überlebenszeit auf. Mögliche zu Grunde liegende Mechanismus stellen hierbei die erniedrigten endogenen NO_x-Spiegel und die verringerte myokardiale Inflamationsantwort in der frühen Phase der polymikrobiellen Sepsis dar.

4.1 Sepsisinduktion mittels Coecum-Ligatur und Punktion

Für Untersuchungen der Sepsis bei Versuchstieren existieren verschiedenste Modelle. Das am häufigsten verwendete stellt die Gabe von LPS dar, bei dem den Tieren das Endotoxin Gram-negativer Bakterien verabreicht wird. Weitere Ansätze nutzen zum Auslösen einer generalisierten Infektion lebende Organismen [170]. Das Endotoxin-Modell spiegelt nicht den Sepsisverlauf wider, wie er in Patienten anzutreffen ist. So ist LPS lediglich Bestandteil Gram-negativer Bakterien, welche nur für rund 50% der humanen Infektionen verantwortlich sind [2]. Mit Ausnahme der Meningokokkämie [171] treten in septischen Patienten mit Gram-negativen Infektionen lediglich niedrige oder nicht messbare LPS Level auf [172]. Es ist ebenfalls bekannt, das Nager im Vergleich zum Menschen eine höhere Resistenz gegen Endotoxin aufweisen und somit die hämodynamische Antwort dosisabhängig stark variiert [170]. Die komplexe Pathogenese und Immunreaktion der Sepsis sind von diversen Stimuli anhängig und nicht von einem einzelnen Toxin. Zudem liegt im LPS Model eine stark unterschiedliche Zytokinantwort im Vergleich zur klinischen Sepsis vor [173, 174].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der Sepsis Induktion mit lebenden Organismen nach Wichterman et al. gilt als Goldstandard der

4. Diskussion

experimentellen Sepsis [175]. Dieses Modell ahmt die Pathophysiologie und den Krankheitsverlauf der humanen Sepsis am ähnlichsten nach [170, 173]. Es ist ein polymikrobielles Modell und beinhaltet die Infektion durch Gram-positive und – negative Bakterien, Aerobier sowie Anaerobier. Dies wird durch den Nachweis positiver Kulturen aus Blut und Lavageflüssigkeit in dieser Arbeit bestätigt. 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 [176]. Auch die Zytokinantwort gleicht der einer humanen Sepsis weit mehr als im LPS-Modell [173]. Die Methode ist zudem einfach durchzuführen und liefert durch die Standardisierung bekannter Einflussfaktoren (Nadeldicke, Anzahl der Punktionen, Alter und Geschlecht der Tiere, Diät [175], sowie der Länge des abgebundenen Coecums [177]) eine hohe Reproduzierbarkeit.

Auch aus hämodynamischer Sicht spiegelt das CLP-Modell die Verhältnisse der humanen Sepsis am besten wider. 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 systemischem Widerstand nachgewiesen werden. Nach etwa 20 Stunden sank das Herzzeitvolumen wieder signifikant ab [178]. 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 [33].

Insgesamt ist das in dieser Arbeit verwendete CLP-Sepsismodell etabliert und auch speziell die Hämodynamik betreffend klinisch sehr relevant.

4.2 Auswirkungen der Inhibition der NO-Synthasen auf die NO_x Konzentrationen

Die Konzentrationen an Nitrit und Nitrat im Plasma liegen schon lange im Fokus der Sepsis Forschung. Studien mit Nutzung des CLP Modells ist gemein, das auf eine Differenzierung von Nitrit und Nitrat Konzentrationen als Einzelwert verzichtet wird. Vielmehr werden die Nitrit und Nitrat Konzentrationen als Gesamtwert, die sogenannten NO_x Konzentrationen, dargestellt [179-181]. In diesen Studien konnte nach CLP Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten ein Anstieg der NO_x Konzentration

4. Diskussion

im Plasma nachgewiesen werden. Der Anstieg ist auf eine Erhöhung der Nitrat Konzentration zurückzuführen, da es im Gegensatz zu Nitrit, welches in nanomolaren Konzentrationen im Plasma vorliegt [107], in mikromolaren Konzentrationen vorkommt. Der Anteil des Nitrits an den NO_x Konzentrationen ist somit verschwindend gering. Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass in der vorliegenden Studie die Nitrit Konzentrationen im Plasma nach Sepsis Induktion keine Erhöhung aufweisen. Die Nitrat Konzentrationen im Plasma zeigen in den unbehandelten septischen WT Mäusen in der vorliegenden Studie einen signifikanten Anstieg. Dies entspricht dem Anstieg der NO_x Konzentration im Plasma der älteren Studien [179-181]. Die Gabe von LPS in WT Mäusen führte zu einer starken Zunahme der Plasma NO_x Konzentration. Diese Antwort auf LPS war um das zweifache erhöht gegenüber den gleich behandelten $\text{NOS3}^{-/-}$ Mäusen [182, 183]. Die Inhibition der NOS2 mit dem selektiven Inhibitor 1400W führte in LPS behandelten Mäusen zu einer Abnahme der NO_x Spiegel vergleichbar mit der globalen Hemmung der NO-Synthasen [184]. Durch die erniedrigten Nitrat Konzentrationen im Plasma der NOS2 inhibierten und $\text{NOS3}^{-/-}$ Mäuse 6 Stunden nach Sepsis Induktion stellt die vorliegende Studie in Übereinstimmung zu oben genannten Studien fest, dass das von der NOS2 und NOS3 gebildete NO in der sich entwickelnden Sepsis zur endogenen NO Produktion beiträgt. Da sich die Konzentrationen in den NOS2 inhibierten und $\text{NOS3}^{-/-}$ Mäusen auf dem gleichen Niveau bewegen, kann geschlussfolgert werden, dass die NOS3 zur Induktion der NOS2 beitragen könnte. Von Patienten, die einen septischen Schock entwickeln und nicht überleben, ist bekannt, dass sie höhere NO_x Konzentrationen im Plasma aufweisen als die Überlebenden [185]. Skelett Biopsien von kritisch kranken Sepsis-Patienten wiesen eine Verbindung zwischen Stickstoffmonoxid Überproduktion, mitochondrialer Dysfunktion und verringerte ATP Konzentration auf, was mit dem Organversagen zusammenhängt [186]. In der Überlebenskurve (siehe Abb. 9) wird deutlich, dass die Tiere ohne Inhibition oder genetischer Depletion die kürzeste Überlebenszeit aufweisen.

4.3 GSH Depletion

Während der Sepsis kommt es durch die Zunahme an oxidativen Stress zu einer Senkung der GSH Konzentrationen im Gewebe [187]. Es wird angenommen, dass

4. Diskussion

eine Steigerung der NO Produktion zu einer Verringerung der Leber GSH Konzentrationen während Endotoxämie führen, ausgelöst durch die Inhibition der Glutamatcysteinylasen Aktivität und Expression [188, 189]. Diese inhibierende Wirkung des Stickstoffmonoxids kommt in der vorliegenden Arbeit 12 Stunden nach Sepsis Induktion zum Tragen. Die GSH Konzentration im Vollblut weist in den unbehandelten WT Mäusen den geringsten Wert auf und ist korreliert mit den höchsten Nitrat Konzentrationen im Plasma. Eine Verringerung der GSH Konzentration im Lebergewebe konnte als Ursache für eine verringerte Einwanderung von Leukozyten in betroffenes Gewebe nach Sepsis Induktion und einer damit verbundenen Verschlechterung der Sepsis zurückgeführt werden [190]. Die Inhibition der NOS1 führte im Gehirngewebe von Ratten zu einem der Kontrolltiere entsprechenden GSH Wert nach Sepsis Induktion mittels CLP [191]. Übereinstimmend kann die NOS1 Inhibition in der vorliegenden Arbeit ein Absinken der GSH Konzentration im Vollblut verhindern. Der NOS1 kommt somit eine oxidative Aktivität in der Frühphase der Sepsis zu.

4.4 Verformbarkeit der Erythrozyten

Mikrovaskuläre Schäden spielen eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung der Unterversorgung der Gewebe, was zum Multiorganversagen und Tod führen kann [192]. Zu den Mikrozirkulationsstörungen während der Sepsis zählt unter anderem der Rückgang der Verformbarkeit der Erythrozyten [193]. 24 Stunden nach der Sepsis Induktion konnten Condon et al. eine Zunahme des nötigen Scherstresses für die halbmaximale Verformbarkeit bei Erythrozyten feststellen und argumentierten mit Veränderungen des Zytoskeletts oder der Membranbestandteile der Erythrozyten [161]. Eine Abnahme der Anzahl an zirkulierenden Leukozyten führte ebenfalls zu einer Abnahme der Verformbarkeit der Erythrozyten und die Gabe eines NO-Donors hob diesen Effekt wieder auf [194]. Stickstoffmonoxid ist somit essentiell für die Verformbarkeit der Erythrozyten. In der vorliegenden Arbeit zeigen die Inhibition der NOS1, NOS2 und die Defizienz der NOS3 eine Abnahme der Verformbarkeit 6 Stunden nach Sepsis Induktion im Vergleich zu den septischen WT. Das durch die Inhibitionen bzw. Defizienz fehlende NO beeinträchtigt die Verformbarkeit der Erythrozyten. Nach 12 Stunden Sepsis Induktion liegt ausschließlich in der NOS2 Inhibierten Versuchstiergruppe eine verminderte Verformbarkeit vor. Die Inhibition der NOS2 der Leukozyten führt in diesem Zusammenhang zu einer Abnahme des für

die Verformbarkeit nötigen NO's. Die Änderungen der Verformbarkeit sind somit nur auf NO zurückzuführen, zu Schädigungen des Zytoskelett und/oder der Membran der Erythrozyten kommt es zu den untersuchten Zeitpunkten nicht.

4.5 Myokardiale Immunantwort

Als intrazellulärer Botenstoff gehört NO zu den vielseitigsten Stoffen im Immunsystem [195]. Die Aktivierung und Rekrutierung der inflammatorischen Zellen in das Herzgewebe ist ein frühes Ereignis in der Entwicklung einer kardialen Dysfunktion verursacht durch die Sepsis [195]. Unkontrollierte Leukozyten Aktivierung, Adhäsion und Sekretion führt zur Entlassung von toxischen Produkten wie Elastase und Superoxide [196]. Die exzessive Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies von aktivierten neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen wurde im Zusammenhang mit der direkten Zytotoxizität und veränderten Zellsignalwegen untersucht und führt zu Gewebsschädigung und schlussendlich zum Organversagen in der Sepsis [197]. Das Auslösen einer sublethalen Sepsis in NOS2^{-/-} Mäuse führte zur Migration der gleichen Anzahl an neutrophilen Granulozyten in das Peritoneum im Vergleich zur Kontrollgruppe [198]. Vor diesem Hintergrund ist die Anzahl eingewanderter Leukozyten im Herzgewebe in allen untersuchten Mäusen nach Sepsis Induktion erhöht. Während in den unbehandelten und NOS2 inhibierten Tieren die Anzahl an neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt 12 Stunden weiter zunimmt, kommt es in den NOS3^{-/-} und NOS1 inhibierten Tieren zu einer Stagnation im Vergleich zum Zeitpunkt 6 Stunden.

Studien belegen, das NO inhibierend auf die Migration von Monozyten wirkt. Die Gabe von exogenen NO-Donoren inhibierte die fMLP induzierte Monozyten Migration, erhöhte die cGMP Konzentration [199] und die Inhibition der Zell Proliferation und Zytokin Ausschüttung [129]. Das von den zirkulierenden Leukozyten über die NOS2 freigesetzte NO spielt eine wichtige Rolle bei der Migration in das Gewebe [198]. In der späteren Phase der Sepsis kommt es zu einer, auch durch das NO medierte, Abnahme der Migration [130]. Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, ist die NOS1 und die NOS3 an der Migration der Monozyten nach Sepsis Induktion beteiligt. In der frühen Phase der Sepsis wandern weniger Monozyten in das Herzgewebe dieser Tiere ein, wobei die Inhibition der NOS2 keine Auswirkungen auf diese Immunantwort hat. Die Inhibition der NOS1 bzw. die NOS3 Defizienz führte

4. Diskussion

zu einer abgeschwächten Einwanderung von Monozyten zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsis Induktion. In diesen beiden Tierversuchsgruppen liegt die NOS2 ungehemmt in den zirkulierenden Leukozyten vor. Somit ist die verringerte Einwanderung an neutrophilen Granulozyten und Monozyten in das Herzgewebe der NOS1 inhibierten und NOS3^{-/-} Mäuse durch das NOS2 gebildete NO in den Leukozyten erklärbar.

In der Literatur gibt es bis zum heutigen Stand keine Erkenntnisse über die Effekte von NO auf die Lymphozyten Funktion. Während der Sepsis ist eine hohe Apoptose dieser Immunzellen [24] und einer daraus resultierenden Immunsuppression nachgewiesen [25]. In der vorliegenden Arbeit ist eine Erhöhung der Anzahl an eingewanderten Lymphozyten in das Herzgewebe septischer Mäuse nach 6 und 12 Stunden nachweisbar. Die NOS1 Inhibition führt zum Zeitpunkt 6 und 12 Stunden nach Sepsis zu keinem Anstieg der Migration. Eine Beteiligung des von der NOS3 gebildeten Stickstoffmonoxids an der Migration der Lymphozyten liegt nicht vor.

4.6 Hämodynamische Auswirkungen der NO-Synthase Inhibition in vivo

Die beobachteten hämodynamischen Veränderungen dieser Studie in den WT Mäusen sind typisch für den Verlauf einer Sepsis in Patienten, eine hyperdynamische Phase mit erhöhter Herzfrequenz wird gefolgt von einer hypodynamischen Phase. In diesem Kontext ist der reduzierte vaskuläre Tonus und Vasodilatation in der sich entwickelnden Sepsis ein ausschlaggebender Befund. Übereinstimmend ist in der vorliegenden Arbeit ein Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes in den WT Mäusen 6 Stunden nach Sepsis Induktion nachweisbar. Die NOS2 wird im Allgemeinen als Ursache für die Hypotension und Verlust des vaskulären Tonus in der sich entwickelnden Sepsis angesehen. WT Mäuse wiesen nach der Gabe von LPS einen Abfall des Blutdruckes auf, wohingegen in NOS2^{-/-} Mäuse kein Abfall festzustellen war [200]. Die Gabe von selektiven NOS2 Inhibitoren führte zu einer Zunahme des mittleren arteriellen Druckes [201] und aufgehobenen LPS induzierten Verlust des vaskulären Tonus [202]. Die NOS2 ist für die Entwicklung der Hypotension in der LPS induzierten Sepsis essentiell. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen mit einem selektiven NOS2 Inhibitor einen Abfall des mittleren arteriellen Druckes, gleich den unbehandelten septischen WT Mäusen. Die Ausbildung der septischen Kardiomyopathie ist im CLP Sepsis Modell nicht mit der NOS2 assoziiert.

4. Diskussion

In diesem Zusammenhang stellt der stabile mittlere arterielle Blutdruck in den septischen NOS3^{-/-} im Vergleich zu den WT Mäusen eine zuvor in dem verwendeten Sepsis Modell nicht beobachtete Erkenntnis dar. Das von der NOS3 gebildete NO spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des vaskulären Tonus und Blutflusses und die konstante, niedrige NO Produktionsrate der konstitutiven NO-Synthasen kann für eine kurze Zeit erhöht werden als ein Teil der akuten Inflammationsantwort [183]. Die Aktivität der NOS3 ist erforderlich für die Induktion der NOS2: es konnte ein zeitlich begrenzter Abfall der NOS2 expression in NOS3^{-/-} Mäusen nach LPS Gabe nachgewiesen werden [183]. Wie in der vorliegenden Studie gezeigt, konnte ein stabiles Blutdruck-Profil in NOS3^{-/-} Mäusen während Endotoxämie nachgewiesen werden [183]. Übereinstimmend mit dem stabilen Blutdruck weisen die NOS3^{-/-} Mäuse eine erhaltenen LVDP, $+dP/dt_{max}$ und $-dP/dt_{min}$ auf, während die Herzfunktionen in den septischen WT Mäusen mit und ohne NOS2 Inhibition bereits 6 Stunden nach Sepsis Induktion beeinträchtigt sind. Dieser Zeitpunkt trifft mit dem Beginn der hyperdynamen Phase in WT Mäusen nach Sepsis Induktion mit CLP zusammen [203]. Der damit verbundene Anstieg der Herzauswurfrate in den septischen WT Mäusen ist hauptsächlich auf den Rückgang des systemischen vaskulären Widerstandes durch die Sepsis induzierte Vasodilatation zurückzuführen und verschleiert die myokardiale Dysfunktion [33], welche später offensichtlich wird. Die Komplex 1 Aktivität in den Mitochondrien des Myokards wiesen eine inverse Korrelation mit Norepinephrine Bedarf und Nitrit/Nitrat Konzentrationen auf [186]. Dies entspricht dem Ergebnis der vorliegenden Studie, in der die NOS3^{-/-} Tiere eine gesteigerte Antwort auf Norepinephrin aufweisen und dies zum Teil auf die reduzierte endogene NO Produktion zurückzuführen ist. NO weist einen gut beschriebenen anti-adrenergic Effekt im Herzen [204, 205] auf und ist somit im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen.

Die Inhibition der NOS2 führte zu keinem Zeitpunkt zu einer verbesserten kardialen Funktion und spielt in der Frühphase der Sepsis keine Rolle bei der Entwicklung einer septischen myokardialen Dysfunktion. Während der ersten 6 Stunden kann eine Beteiligung der NOS1 an der Entwicklung einer kardialen Dysfunktion nach den Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen werden. Der protektive Effekt der Inhibition ist 12 Stunden nach Sepsis Induktion aufgehoben, somit beschränkt sich die Beteiligung der NOS1 an der Ausprägung der septischen Kardiomyopathie auf die sehr frühe Phase der Sepsis. Aufgrund der vorliegenden

Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass in der sich entwickelnden Sepsis die NOS3 eine Schlüsselrolle einnimmt, da die Inhibitionen der NOS1 und NOS2 spätestens 12 Stunden nach Sepsis Induktion keine protektiven Effekte auf die Herzfunktion aufweisen. Die Untersuchungen weiterer Parameter wurde aus diesem Grund auf die NOS3^{-/-} Mäuse im Vergleich zu unbehandelten septischen WT Mäusen beschränkt.

4.7 Hämodynamische Auswirkungen der NOS3 Depletion ex vivo

Im gesunden Herzen stellt die NOS3 die Hauptisoform der NO-Synthasen dar und wird im vaskulären Endothel und Kardiomyozyten exprimiert [206]. Es wird vermutet, dass NO ein wichtiger Modulator der Kontraktilität des Herzens ist und führt in hohen Konzentrationen zur kardialen Depression [207, 208]. Erhöhte NOS3 Expression im Myokard herzinsuffizienter Patienten führt möglicherweise zu einer kontraktilen Dysfunktion [209]. Mausherzen mit einer Myozyten-spezifischen Überexpression an NOS3 besitzen eine reduzierte basale Kontraktilität, welche durch die Gabe von NOS-Inhibitoren partiell wieder hergestellt werden kann [210]. Die Infusion von LPS führte in Schweinen nach 30 Minuten zu einer starken Erhöhung der myokardialen NOS3 Aktivität und dies wiederum zu einem Abfall des Blutdruckes [211]. Die Funktion der isolierten Herzen von septischen WT Mäusen in der Langendorff Apparatur tritt 12 Stunden nach Sepsis Induktion mit verschlechterten LVDP, $+dP/dt_{max}$ und $-dP/dt_{min}$ auf. Zu diesem Zeitpunkt der Sepsis Ausbildung kommt es in vivo zu einer Abnahme der Reaktion auf Katecholamin Stimulation. Die septischen NOS3^{-/-} Mäuse zeigen keine Verschlechterung der Herzfunktionen und reagieren ohne Einschränkungen auf die Gabe von Katecholamin in vivo. Die NOS3 führt somit wahrscheinlich zu einer Verschlechterung der myokardialen Funktion speziell in der Frühphase der Sepsis.

4.8 Bioaktives NO der NOS3

Die Messung des bioaktiven NO's im Herzen zeigt einen signifikanten Anstieg der myokardialen MINC Ausbeute in WT Mäusen, während die NOS3^{-/-} Herzen geringere Ausbeuten aufweisen. Somit steuert die NOS3 einen signifikanten Anteil des in der entwickelten Sepsis produzierten NO's im Myokard bei. Unter hypoxischen und sauren Bedingungen, wie sie in der späteren Phase des septischen Schocks vorliegen, fungiert das desoxygenierte Myoglobin als Nitritreduktase und führt zu einer Erhöhung der NO-Häm Konzentration [110]. Das von der NOS2 gebildete NO

führt in der späteren Phase der Sepsis zu einer negativen Rückkopplung und inhibiert die Expression der NOS3, wobei die Expression der NOS 15 Stunden nach LPS Gabe in WT Mäusen reduziert ist, in NOS2^{-/-} Mäusen aber nicht diesen Rückgang aufweist [212]. Der Abfall der NO_x Konzentration im Plasma/Gewebe und des bioaktiven NO's im Gewebe 12 Stunden nach der Sepsis Induktion kann durch diese Ergebnisse erklärt werden.

4.9 Beteiligung der NOS3 an der vaskulären Dysfunktion

Eine Reduzierung der Relaxation als Antwort auf einen NO-Donor konnte in Aortenringen von LPS behandelten WT nachgewiesen werden, wobei die Aortenringe von NOS3^{-/-} Mäusen keine Einschränkungen aufwiesen [182]. Die Abnahme der Relaxation wurde in diesem Modell auf einen Rückgang der Guanylate Zykklase Aktivität als Antwort auf das von der NOS2 gebildete NO zurückgeführt [212]. Es ist des weiteren bekannt, das Aorten von NOS3^{-/-} Mäusen auf den NO-Donor SNP sensibler reagieren und somit eine höhere Konzentration an cGMP gebildet wird [213]. Als eine Konsequenz der signifikant erhöhten endogenen NO Produktion ist in der vorliegenden Arbeit in den Aortenringen von septischen WT Mäusen eine reduzierte Sensitivität auf den NO Donor SNP nachweisbar.

Als vom Endothel gebildeter Vasodilatator mediert NO die Relaxation als Antwort auf die Acetylcholin-Gabe in der Aorta [214]. In vorhergehenden Studien konnte ein Rückgang der Protein Expression und der NOS3 Aktivität in Aorten von Ratten nach CLP Induktion nachgewiesen werden [215]. Dieser Rückgang an Aktivität und Protein Expression wird im Allgemeinen als endotheliale Dysfunktion interpretiert. Wie in der vorliegenden Studie gezeigt, geht die Inhibition der ACH induzierten Relaxation in den WT Aorten mit einer verringerten endothelialen NO Produktion einher. Die Gabe des Endotoxins LPS und CLP Induktion führte in Ratten nach 18 Stunden zu einer ebensolcher Abnahme der Reaktionsfähigkeit auf Acethylcholin [216, 217], aber auch auf die Gabe von Phenylephrin [216]. Eine Erhöhung des EC50 Wertes für Phenylephrin ist in vorliegender Arbeit 12 Stunden nach Sepsis Induktion in WT wie auch in NOS3^{-/-} Aorten gegeben. Die verringerte NO Freisetzung in den NOS3^{-/-} Mäusen beeinflusst die vasokonstriktiven Fähigkeiten der Aorten somit nicht.

4.10 NOS3 induziert die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) spielt eine wichtige proinflammatorische Rolle in der Sepsis. In einer vorangegangenen Studie in Ratten konnte ein Höhepunkt der TNF Plasma Konzentration bereits zwei Stunden nach CLP Induktion und nach 20 Stunden einen Rückgang auf Basalwerte nachgewiesen werden [218]. In einer weiteren Studie konnte der direkte Nachweis erbracht werden, dass das von der NOS3 gebildete NO positive Auswirkungen auf die TNF Expression in Kardiomyozyten hat und eine Stimulation von NOS3^{-/-} Kardiomyozyten mit einem NO Donor die Expression auf WT Niveau erhöht [219]. Die Untersuchungen der Genexpression von TNF im Herzgewebe dieser Studie zeigt in den NOS3^{-/-} Herzen einen späteren Anstieg in Folge der Sepsis Induktion. Während die septischen WT bereits nach 12 Stunden das Niveau der basalen Messung aufweisen, erhöht sich die TNF Expression in den NOS3^{-/-} Herzen weiter. Somit könnte der Höhepunkt der Expression in den WT Mäusen bereits vor dem 6 Stunden Untersuchungszeitpunkt liegen. Das von der NOS gebildete NO führt zu einem frühen Ansteigen, aber auch Abfallen der TNF Expression im Herzgewebe.

Ein Maximum der IL-6 Konzentration im Plasma konnte nach 9 Stunden CLP Induktion nachgewiesen werden [218]. In der vorliegenden Arbeit ist ein Anstieg der IL-6 Genexpression 6 und 12 Stunden nach Sepsis Induktion in den WT Herzen mit einem Peak zum Zeitpunkt 6 Stunden nachgewiesen. Die NOS3 führt zu einer Erhöhung der IL-6 Genexpression über den Zeitpunkt 6 Stunden hinaus.

Von der NOS1 gebildetes NO konnte eine Funktion in der TNF Expressionsregulation im LPS Model nachgewiesen werden. So wurde in NOS1^{-/-} Kardiomyozyten und in vivo eine erhöhte Expression von TNF nach LPS Gabe festgestellt [220]. Die Genexpression der NOS1 zeigt in der vorliegenden Arbeit ausschließlich in den septischen WT 6 Stunden nach Induktion einen Anstieg. Die gesteigerte Genexpression der NOS1 im Herzgewebe der septischen WT Mäuse könnte somit zu einer vermehrten NO-Produktion der NOS1 führen und dieses NO die TNF Expression nach dem 6 Stunden Zeitpunkt inhibieren.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Erhöhung der NOS3 mRNA im Herzgewebe von WT Mäusen in der sich entwickelnden Sepsis vorliegt, wurde ein Anstieg der NOS3 Aktivität in der initialen Phase der Sepsis von anderen Autoren nachgewiesen [221, 222], gefolgt von der Induzierung der NOS2 in der späteren Phase der Sepsis

[223]. Eine weitere Studie wies ein Maximum an NOS2 Protein 24 Stunden nach der Sepsis Induktion mittels CLP auf [224]. In einem Schaf Sepsis Modell konnte ein Anstieg der Gesamtaktivität der NO-Synthasen 12 und 24 Stunden nach Induktion der Sepsis festgestellt werden, wobei die NOS2 Aktivität sich nicht signifikant veränderte. Dies wurde begleitet von einem frühen Anstieg an 3-Nitrotyrosin, ein Marker der Protein Nitrifikation [222], und lässt den Schluss zu, dass die konstitutiven NO-Synthasen den Hauptanteil an den erhöhten NO Konzentrationen in diesem Modell produzieren.

4.11 NOS3 produziertes NO führt zu vermehrter Nitrotyrosin Formation

Es ist bekannt, dass eine erhöhte Nitrotyrosin Formation während der Sepsis zur Entkopplung der NOS3 führen kann und einem Anstieg des oxidativen Stresses zur Folge hat [225]. Das von der NADPH Oxidase produzierte Superoxid kann mit NO reagieren und es entsteht Peroxynitrit. Peroxynitrit induziert zeitversetzt und irreversible Schäden am Herzen [226]. Die NOS3 kann selbst Superoxid produzieren und verursacht eine endotheliale Dysfunktion [227]. Es wurde gezeigt, dass das von der NOS3 produzierte NO in der Frühphase der Sepsis proinflammatorische Charakteristika aufweist, was die Produktion von schädlichen reaktiven Sauerstoff Spezies anbetrifft [228]. In Bezug auf die von Connelly et al. [148] postulierte Proinflammatorische Rolle der NOS3, passen die deutlich vermehrte Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten in das Herzgewebe von septischen WT Mäusen 12 Stunden nach Sepsis Induktion im Vergleich zu den NOS3^{-/-} Mäusen. In Übereinstimmung mit oben genannten Ergebnissen ist in der vorliegenden Arbeit nachweislich mehr 3-Nitrotyrosin in septischen WT Herzen 6 Stunden nach Sepsis Induktion im Vergleich zu den Herzen der NOS3^{-/-} Mäuse enthalten.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Studie die Annahme, dass die NOS3 eine Hauptquelle von endogenen NO in der sich entwickelnden Sepsis darstellt und zur myokardialen Dysfunktion führt.

5. Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) spielt in der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie eine zentrale Rolle. Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (NOS2) wird in diesem Zusammenhang als Hauptquelle des NO angesehen, ihre Inhibition führte jedoch zu widersprüchlichen experimentellen Ergebnissen: die globale NOS-Inhibition ging in einer klinischen Studie mit einer Übersterblichkeit in der verum Gruppe einher. Ziel der vorliegenden Studie ist es den Einfluss der NOS1, NOS2 und vor allem NOS3 auf die Herzfunktion, die Nitrit/Nitrat Konzentration (NO_x), das Überleben und die Inflamationsantwort in der Frühphase der Sepsis in einem klinisch relevanten, polymikrobiellen Sepsis Model zu klären. In C57/B6 Wildtyp und NOS3^{-/-} Mäusen erfolgte die Sepsisinduktion mittels Coecum-Ligatur und Punktion (CLP). Die Inhibition der NOS1 und NOS2 wurde pharmakologisch direkt nach der CLP-Induktion erreicht. Die NO_x -Konzentrationen und die endogene NO Produktion (Plasma/Herzgewebe) wurden gemessen. Zur Feststellung der Inflammation kam quantitative Immunochemie zum Einsatz. Aus dem Vollblut erfolgte die Bestimmung der Gesamt- Gluthation (GSH) Konzentration und die Erythrozyten Verformbarkeitsanalyse. 6 und 12 Stunden nach Sepsisinduktion wurden die hämodynamischen Eigenschaften der Herzen mittels Druckkatheter in vivo und ex vivo in einer Langendorff-Apparatur bestimmt. Die Genexpression der proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und IL-6 sowie der NOS1, NOS2 und NOS3 wurde mittels Realtime RT-PCR analysiert und die Nitrotyrosin Formierung mittels Immunhistochemie im Herzgewebe qualitativ nachgewiesen.

Eine pharmakologische Inhibition der NOS1 und NOS2 sowie eine genetische Defizienz für die NOS3 war im Vergleich zu Wildtypen mit einem Überlebensvorteil nach Sepsisinduktion assoziiert, wobei der Effekt bei NOS3^{-/-} Mäusen am stärksten ausgeprägt war. Der Überlebensvorteil war in den NOS2 inhibierten und NOS3^{-/-} Tieren mit einem Ausbleiben des Anstiegens der Nitrat Konzentrationen im Plasma verbunden. Im Unterschied zu Wildtypen wiesen NOS3^{-/-} Mäuse bereits in der sehr frühen Phase der Sepsis keine Beeinträchtigung der kardialen Funktion sowie eine Erhaltung des mittleren arteriellen Drucks auf. NOS1 und NOS2-inhibierte Mäuse entwickelten im Vergleich zu Wildtypen eine septische Kardiomyopathie gleicher Ausprägung, Neben verminderten endogenen NO-Spiegeln zeigten NOS3^{-/-} Mäuse eine verminderte myokardiale Infiltration von Entzündungszellen. Dieser Effekt war auch bei NOS1-inhibierten Tieren zu beobachten. Eine verminderte NO-Verfügbarkeit durch Inhibition bzw. Defizienz der NO-Synthasen führte bereits in der sehr frühen Phase der Sepsis zu einer beeinträchtigten Erythrozytenverformbarkeit. Im Unterschied zur pharmakologischen Inhibition der NOS1 und NOS2 entwickelten NOS3^{-/-} Mäuse keine Anzeichen einer septischen Kardiomyopathie. Die Durchführung von ex vivo Experimenten konnten diese Ergebnisse bestätigen und zeigten zudem, dass die NO-Synthese der NOS3 zusätzlich an der Funktionsstörung der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt ist und zu einer endothelialen Dysfunktion führt. Die reduzierten Nitrat Konzentration und reduzierten bioaktiven NO Spiegel im Herzgewebe sowie der geringere Gehalt an Nitrotyrosin bei den NOS3^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtypen verdeutlichte, dass die NOS3 in der Frühphase der Sepsis entscheidend zum endogenen NO-Pool beiträgt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die NOS3 in der Frühphase der Sepsis eine wichtige Rolle spielt in der Ausbildung der septischen Kardiomyopathie einschließlich einer Katecholaminresistenz sowie in der Ausbildung einer Sepsis typischen Vasoplegie. Zugrundeliegende Mechanismen hierfür könnten eine NO-Freisetzung durch die NOS3 und eine modifizierte Entzündungsantwort in der sich entwickelnden Sepsis sein. Die Entwicklung von Möglichkeiten zur selektiven NOS3 Modulation könnte einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz in der Frühphase der Sepsis darstellen.

5. Abstract

Nitric oxide (NO) plays a central role in the pathogenesis of septic cardiomyopathy. The inducible nitric oxide synthase (NOS2) is generally believed to be the high-capacity NO-producing enzyme in sepsis. However, its inhibition led to contradictory experimental results. In a clinical trial global NOS inhibition increased mortality in patients with septic shock. The aim of this study is to determine the role of NOS1, NOS2 and especially NOS3 on cardiac function, the nitrite / nitrate production (NO_x), inflammatory response and finally survival in the early phase of sepsis in a clinically relevant polymicrobial sepsis model. In C57/B6 wild-type and NOS3^{-/-} mice, sepsis was induced by cecum ligation and puncture (CLP). The inhibition of NOS1 and NOS2 was achieved pharmacologically immediately after CLP induction. 6 and 12 h after sepsis induction, cardiac function was analyzed by in vivo pressure and isolated heart measurements. NO_x levels and endogenous NO production (plasma / heart tissue) were measured. The inflammatory response in heart tissue was determined via quantitative immunochemistry. Total glutathione (GSH) concentration and erythrocyte deformability were quantified in whole blood. The gene expression of proinflammatory mediators TNF- α and IL-6 and NOS1, NOS2 and NOS3 was analyzed by real time RT-PCR and nitrotyrosine formation was detected in cardiac tissue by immunohistochemical staining.

Pharmacological inhibition of NOS1 and NOS2 and genetic deficiency of NOS3 were associated with a survival benefit compared to septic wildtype mice, while NOS3^{-/-} mice survived longest. The survival benefit was associated with decreased nitrate concentrations in plasma after pharmacological NOS-inhibition and in NOS3^{-/-} mice. In contrast to wildtype mice, NOS3^{-/-} mice showed no impairment of cardiac function as well as a preservation of mean arterial blood pressure already at the very early phase of sepsis. NOS1 and NOS2-inhibited mice developed signs of septic cardiomyopathy similar to uninhibited septic wildtype mice. In addition to decreased endogenous NO levels NOS3^{-/-} mice exhibited an abrogated inflammatory response with decreased myocardial infiltration of inflammatory cells. This effect was also observed in NOS1-inhibited animals. A reduced NO availability due to inhibition or deficiency of NO synthase resulted in an impaired erythrocyte deformability already in the very early phase of sepsis. This effect seemed not to be detrimental regarding the survival especially of NOS3^{-/-} mice. In contrast to the pharmacological inhibition of NOS1 and NOS2 NOS3^{-/-} mice developed no signs of septic cardiomyopathy. Ex vivo experiments confirmed these findings and also showed that NO synthesis of NOS3 is involved in the impairment of the vascular smooth musculature leading to endothelial dysfunction. Decreased nitrate concentration in plasma and heart tissue, reduced bioactive NO levels in the heart tissue as well as lower levels of nitrotyrosine in the heart tissue of NOS3^{-/-} mice yields to our conclusion that NOS3 decisively contributes to the endogenous NO pool in the early phase of sepsis.

Our results indicate that NOS3 plays an important role in the development of septic cardiomyopathy with catecholamines resistance and accompanying vasoplegia in the early phase of sepsis. As possible contributing mechanisms we demonstrate increased endogenous NO_x -levels and a modified myocardial inflammatory response in the early stage of polymicrobial sepsis. Thus, eNOS inhibition might be a promising therapeutic target for early sepsis therapy.

6. Literaturverzeichnis

1. Schottmüller, H., in *Verhandlungen des 31. Deutschen Kongresses für innere Medizin* 1914. p. 257-280.
2. Engel, C., F.M. Brunkhorst, H.G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, and K. Reinhart, *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. *Intensive Care Med*, 2007. 33(4): p. 606-18.
3. Vincent, J.L., Y. Sakr, C.L. Sprung, V.M. Ranieri, K. Reinhart, H. Gerlach, R. Moreno, J. Carlet, J.R. Le Gall, and D. Payen, *Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study*. *Crit Care Med*, 2006. 34(2): p. 344-53.
4. Granucci, F., M. Foti, and P. Ricciardi-Castagnoli, *Dendritic cell biology*. *Adv Immunol*, 2005. 88: p. 193-233.
5. Liew, F.Y., M. Patel, and D. Xu, *Toll-like receptor 2 signalling and inflammation*. *Ann Rheum Dis*, 2005. 64 Suppl 4: p. iv104-5.
6. Armstrong, L., A.R. Medford, K.J. Hunter, K.M. Uppington, and A.B. Millar, *Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis*. *Clin Exp Immunol*, 2004. 136(2): p. 312-9.
7. Tsujimoto, H., S. Ono, T. Majima, N. Kawarabayashi, E. Takayama, M. Kinoshita, S. Seki, H. Hiraide, L.L. Moldawer, and H. Mochizuki, *Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis*. *Shock*, 2005. 23(1): p. 39-44.
8. Williams, D.L., T. Ha, C. Li, J.H. Kalbfleisch, J. Schweitzer, W. Vogt, and I.W. Browder, *Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality*. *Crit Care Med*, 2003. 31(6): p. 1808-18.
9. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. *Oncogene*, 1999. 18(49): p. 6853-66.
10. Vallejo, J.G., *Role of toll-like receptors in cardiovascular diseases*. *Clin Sci (Lond)*, 2011. 121(1): p. 1-10.
11. Jean-Baptiste, E., *Cellular mechanisms in sepsis*. *J Intensive Care Med*, 2007. 22(2): p. 63-72.
12. Bochud, P.Y. and T. Calandra, *Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment*. *BMJ*, 2003. 326(7383): p. 262-6.
13. Kansas, G.S. and F.M. Pavalko, *The cytoplasmic domains of E- and P-selectin do not constitutively interact with alpha-actinin and are not essential for leukocyte adhesion*. *J Immunol*, 1996. 157(1): p. 321-5.
14. Luo, X.G., Y. Ding, Q.F. Zhou, L. Ye, S.Z. Wang, and T. Xi, *SET and MYND domain-containing protein 3 decreases sensitivity to dexamethasone and stimulates cell adhesion and migration in NIH3T3 cells*. *J Biosci Bioeng*, 2007. 103(5): p. 444-50.
15. Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C.M. Ballantyne, and P. Kubes, *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. *J Exp Med*, 2006. 203(12): p. 2569-75.
16. Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann, *Monitoring of blood vessels and tissues*

- by a population of monocytes with patrolling behavior.* Science, 2007. 317(5838): p. 666-70.
17. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections.* J Immunol, 2008. 181(6): p. 3733-9.
 18. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities.* Nat Rev Immunol, 2006. 6(3): p. 173-82.
 19. Goya, T., T. Morisaki, and M. Torisu, *Immunologic assessment of host defense impairment in patients with septic multiple organ failure: relationship between complement activation and changes in neutrophil function.* Surgery, 1994. 115(2): p. 145-55.
 20. Welbourn, C.R., G. Goldman, I.S. Paterson, C.R. Valeri, D. Shepro, and H.B. Hechtman, *Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil.* Br J Surg, 1991. 78(6): p. 651-5.
 21. Windsor, A.C., P.G. Mullen, A.A. Fowler, and H.J. Sugerman, *Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome.* Br J Surg, 1993. 80(1): p. 10-7.
 22. Alves-Filho, J.C., A. de Freitas, M. Russo, and F.Q. Cunha, *Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis.* Crit Care Med, 2006. 34(2): p. 461-70.
 23. Otsuka, Y., K. Nagano, K. Hori, J. Oh-ishi, H. Hayashi, N. Watanabe, and Y. Niitsu, *Inhibition of neutrophil migration by tumor necrosis factor. Ex vivo and in vivo studies in comparison with in vitro effect.* J Immunol, 1990. 145(8): p. 2639-43.
 24. Le Tulzo, Y., C. Pangault, A. Gacouin, V. Guilloux, O. Tribut, L. Amiot, P. Tattevin, R. Thomas, R. Fauchet, and B. Drenou, *Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome.* Shock, 2002. 18(6): p. 487-94.
 25. Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, and I.E. Karl, *Role of apoptotic cell death in sepsis.* Scand J Infect Dis, 2003. 35(9): p. 585-92.
 26. Enoch, V.T., S.H. Lin, C.Y. Lin, T. Toliver-Kinsky, E.D. Murphey, T.K. Varma, and E.R. Sherwood, *Mice depleted of alphabeta but not gammadelta T cells are resistant to mortality caused by cecal ligation and puncture.* Shock, 2007. 27(5): p. 507-19.
 27. van Schaik, S.M. and A.K. Abbas, *Role of T cells in a murine model of Escherichia coli sepsis.* Eur J Immunol, 2007. 37(11): p. 3101-10.
 28. Kumar, A., V. Thota, L. Dee, J. Olson, E. Uretz, and J.E. Parrillo, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum.* J Exp Med, 1996. 183(3): p. 949-58.
 29. Maass, D.L., D.P. Hybki, J. White, and J.W. Horton, *The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction.* Shock, 2002. 17(4): p. 293-9.
 30. Frantz, S., L. Kobzik, Y.D. Kim, R. Fukazawa, R. Medzhitov, R.T. Lee, and R.A. Kelly, *Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium.* J Clin Invest, 1999. 104(3): p. 271-80.
 31. Frantz, S., G. Ertl, and J. Bauersachs, *Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease.* Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007. 4(8): p. 444-54.
 32. Nemoto, S., J.G. Vallejo, P. Knuefermann, A. Misra, G. Defreitas, B.A. Carabello, and D.L. Mann, *Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 282(6): p. H2316-23.

33. Merx, M.W. and C. Weber, *Sepsis and the heart*. *Circulation*, 2007. 116(7): p. 793-802.
34. Opie, L.H., *Receptors and Signal Transduction*, in *Heart Physiology. From Cell to Circulation*, L.H. Opie, Editor. 2004, Lippincott Williams & Wilkins: London. p. 186-220.
35. Bernardin, G., A.D. Strosberg, A. Bernard, M. Mattei, and S. Marullo, *Beta-adrenergic receptor-dependent and -independent stimulation of adenylate cyclase is impaired during severe sepsis in humans*. *Intensive Care Med*, 1998. 24(12): p. 1315-22.
36. Hahn, P.Y., P. Wang, S.M. Tait, Z.F. Ba, S.S. Reich, and I.H. Chaudry, *Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis*. *Shock*, 1995. 4(4): p. 269-73.
37. Tang, C. and M.S. Liu, *Initial externalization followed by internalization of beta-adrenergic receptors in rat heart during sepsis*. *Am J Physiol*, 1996. 270(1 Pt 2): p. R254-63.
38. Gulick, T., M.K. Chung, S.J. Pieper, L.G. Lange, and G.F. Schreiner, *Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(17): p. 6753-7.
39. Suliman, H.B., K.E. Welty-Wolf, M. Carraway, L. Tatro, and C.A. Piantadosi, *Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis*. *Cardiovasc Res*, 2004. 64(2): p. 279-88.
40. Watts, J.A., J.A. Kline, L.R. Thornton, R.M. Grattan, and S.S. Brar, *Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. 36(1): p. 141-50.
41. Soriano, F.G., A.C. Nogueira, E.G. Caldini, M.H. Lins, A.C. Teixeira, S.B. Cappi, P.A. Lotufo, M.M. Bernik, Z. Zsengeller, M. Chen, and C. Szabo, *Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock*. *Crit Care Med*, 2006. 34(4): p. 1073-9.
42. Taylor, D.E., A.J. Ghio, and C.A. Piantadosi, *Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. 316(1): p. 70-6.
43. Brealey, D., S. Karyampudi, T.S. Jacques, M. Novelli, R. Stidwill, V. Taylor, R.T. Smolenski, and M. Singer, *Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. 286(3): p. R491-7.
44. Levy, R.J., *Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis*. *Shock*, 2007. 28(1): p. 24-8.
45. Bergmann, M.W., P. Loser, R. Dietz, and R. von Harsdorf, *Effect of NF-kappa B Inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis and downstream pathways in cardiomyocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. 33(6): p. 1223-32.
46. Fauvel, H., P. Marchetti, C. Chopin, P. Formstecher, and R. Neviere, *Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(4): p. H1608-14.
47. Kumar, A., P. Michael, D. Brabant, A.M. Parissenti, C.V. Ramana, X. Xu, and J.E. Parrillo, *Human serum from patients with septic shock activates transcription factors STAT1, IRF1, and NF-kappaB and induces apoptosis in human cardiac myocytes*. *J Biol Chem*, 2005. 280(52): p. 42619-26.
48. Lancel, S., O. Joulin, R. Favory, J.F. Goossens, J. Kluza, C. Chopin, P. Formstecher, P. Marchetti, and R. Neviere, *Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction*. *Circulation*, 2005. 111(20): p. 2596-604.

49. Parrillo, J.E., M.M. Parker, C. Natanson, A.F. Suffredini, R.L. Danner, R.E. Cunnion, and F.P. Ognibene, *Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy*. Ann Intern Med, 1990. 113(3): p. 227-42.
50. Danai, P. and G.S. Martin, *Epidemiology of sepsis: recent advances*. Curr Infect Dis Rep, 2005. 7(5): p. 329-34.
51. Annane, D., E. Bellissant, and J.M. Cavallion, *Septic shock*. Lancet, 2005. 365(9453): p. 63-78.
52. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states*. Crit Care Med, 2000. 28(4 Suppl): p. N3-12.
53. Lopez, A., J.A. Lorente, J. Steingrub, J. Bakker, A. McLuckie, S. Willatts, M. Brockway, A. Anzueto, L. Holzapfel, D. Breen, M.S. Silverman, J. Takala, J. Donaldson, C. Arneson, G. Grove, S. Grossman, and R. Grover, *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): p. 21-30.
54. Ignarro, L.J., *Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties*. FASEB J, 1989. 3(1): p. 31-6.
55. Lancaster, J.R., Jr., *A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide*. Nitric Oxide, 1997. 1(1): p. 18-30.
56. Star, R.A., *Nitric oxide*. Am J Med Sci, 1993. 306(5): p. 348-58.
57. Gryglewski, R.J., S. Moncada, and R.M. Palmer, *Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells*. Br J Pharmacol, 1986. 87(4): p. 685-94.
58. Ignarro, L.J., *Physiological significance of endogenous nitric oxide*. Semin Perinatol, 1991. 15(1): p. 20-6.
59. Huie, R.E. and S. Padmaja, *The reaction of NO with superoxide*. Free Radic Res Commun, 1993. 18(4): p. 195-9.
60. Braughler, J.M., C.K. Mittal, and F. Murad, *Effects of thiols, sugars, and proteins on nitric oxide activation of guanylate cyclase*. J Biol Chem, 1979. 254(24): p. 12450-4.
61. Ignarro, L.J., R.G. Harbison, K.S. Wood, and P.J. Kadowitz, *Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid*. J Pharmacol Exp Ther, 1986. 237(3): p. 893-900.
62. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. 288(5789): p. 373-6.
63. Furchgott, R.F., P.D. Cherry, J.V. Zawadzki, and D. Jothianandan, *Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries*. J Cardiovasc Pharmacol, 1984. 6 Suppl 2: p. S336-43.
64. Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, and G. Chaudhuri, *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(24): p. 9265-9.
65. Green, L.C., K. Ruiz de Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young, and S.R. Tannenbaum, *Nitrate biosynthesis in man*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(12): p. 7764-8.
66. Green, L.C., S.R. Tannenbaum, and P. Goldman, *Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat*. Science, 1981. 212(4490): p. 56-8.

67. Stuehr, D.J. and M.A. Marletta, *Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(22): p. 7738-42.
68. Iyengar, R., D.J. Stuehr, and M.A. Marletta, *Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(18): p. 6369-73.
69. Marletta, M.A., P.S. Yoon, R. Iyengar, C.D. Leaf, and J.S. Wishnok, *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. Biochemistry, 1988. 27(24): p. 8706-11.
70. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. 333(6174): p. 664-6.
71. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. 357(Pt 3): p. 593-615.
72. Brecht, D.S. and S.H. Snyder, *Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(2): p. 682-5.
73. Brecht, D.S., P.M. Hwang, C.E. Glatt, C. Lowenstein, R.R. Reed, and S.H. Snyder, *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. Nature, 1991. 351(6329): p. 714-8.
74. Garthwaite, J., S.L. Charles, and R. Chess-Williams, *Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain*. Nature, 1988. 336(6197): p. 385-8.
75. Nakane, M., H.H. Schmidt, J.S. Pollock, U. Forstermann, and F. Murad, *Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle*. FEBS Lett, 1993. 316(2): p. 175-80.
76. Kobzik, L., M.B. Reid, D.S. Brecht, and J.S. Stamler, *Nitric oxide in skeletal muscle*. Nature, 1994. 372(6506): p. 546-8.
77. Silvagno, F., H. Xia, and D.S. Brecht, *Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle*. J Biol Chem, 1996. 271(19): p. 11204-8.
78. Xu, K.Y., D.L. Huso, T.M. Dawson, D.S. Brecht, and L.C. Becker, *Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(2): p. 657-62.
79. Lowenstein, C.J., C.S. Glatt, D.S. Brecht, and S.H. Snyder, *Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(15): p. 6711-5.
80. Lyons, C.R., G.J. Orloff, and J.M. Cunningham, *Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line*. J Biol Chem, 1992. 267(9): p. 6370-4.
81. Xie, Q.W., H.J. Cho, J. Calaycay, R.A. Mumford, K.M. Swiderek, T.D. Lee, A. Ding, T. Troso, and C. Nathan, *Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages*. Science, 1992. 256(5054): p. 225-8.
82. Cho, H.J., Q.W. Xie, J. Calaycay, R.A. Mumford, K.M. Swiderek, T.D. Lee, and C. Nathan, *Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages*. J Exp Med, 1992. 176(2): p. 599-604.
83. Xie, Y.W., P.M. Kaminski, and M.S. Wolin, *Inhibition of rat cardiac muscle contraction and mitochondrial respiration by endogenous peroxynitrite formation during posthypoxic reoxygenation*. Circ Res, 1998. 82(8): p. 891-7.
84. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. Cell, 1994. 78(6): p. 915-8.
85. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Regulation of biosynthesis of nitric oxide*. J Biol Chem, 1994. 269(19): p. 13725-8.

86. Bogdan, C., M. Rollingshoff, and A. Diefenbach, *The role of nitric oxide in innate immunity*. Immunol Rev, 2000. 173: p. 17-26.
87. Xie, Q.W., R. Whisnant, and C. Nathan, *Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1993. 177(6): p. 1779-84.
88. Freeswick, P.D., Y. Wan, D.A. Geller, A.K. Nussler, and T.R. Billiar, *Remote tissue injury primes hepatocytes for nitric oxide synthesis*. J Surg Res, 1994. 57(1): p. 205-9.
89. Schmidt, N., A. Pautz, J. Art, P. Rauschkolb, M. Jung, G. Erkel, M.B. Goldring, and H. Kleinert, *Transcriptional and post-transcriptional regulation of iNOS expression in human chondrocytes*. Biochem Pharmacol, 2010. 79(5): p. 722-32.
90. Pfeilschifter, J., D. Kunz, and H. Muhl, *Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells*. Nephron, 1993. 64(4): p. 518-25.
91. Ischiropoulos, H., L. Zhu, and J.S. Beckman, *Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide*. Arch Biochem Biophys, 1992. 298(2): p. 446-51.
92. Janssens, S.P., A. Shimouchi, T. Quertermous, D.B. Bloch, and K.D. Bloch, *Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1992. 267(21): p. 14519-22.
93. Lamas, S., P.A. Marsden, G.K. Li, P. Tempst, and T. Michel, *Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(14): p. 6348-52.
94. Sessa, W.C., J.K. Harrison, C.M. Barber, D. Zeng, M.E. Durieux, D.D. D'Angelo, K.R. Lynch, and M.J. Peach, *Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1992. 267(22): p. 15274-6.
95. Feron, O., L. Belhassen, L. Kobzik, T.W. Smith, R.A. Kelly, and T. Michel, *Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells*. J Biol Chem, 1996. 271(37): p. 22810-4.
96. Sase, K. and T. Michel, *Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase*. Trends Cardiovasc Med, 1997. 7(1): p. 28-37.
97. Corson, M.A., N.L. James, S.E. Latta, R.M. Nerem, B.C. Berk, and D.G. Harrison, *Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress*. Circ Res, 1996. 79(5): p. 984-91.
98. Fisslthaler, B., S. Dimmeler, C. Hermann, R. Busse, and I. Fleming, *Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress*. Acta Physiol Scand, 2000. 168(1): p. 81-8.
99. Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, and A.M. Zeiher, *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. 399(6736): p. 601-5.
100. Fulton, D., J.P. Gratton, T.J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T.F. Franke, A. Papapetropoulos, and W.C. Sessa, *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. 399(6736): p. 597-601.
101. McCabe, T.J., D. Fulton, L.J. Roman, and W.C. Sessa, *Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation*. J Biol Chem, 2000. 275(9): p. 6123-8.
102. Forstermann, U., J.P. Boissel, and H. Kleinert, *Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)*. FASEB J, 1998. 12(10): p. 773-90.

103. Geller, D.A. and T.R. Billiar, *Molecular biology of nitric oxide synthases*. *Cancer Metastasis Rev*, 1998. 17(1): p. 7-23.
104. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*. *N Engl J Med*, 1993. 329(27): p. 2002-12.
105. Gladwin, M.T., *Nitrite as an intrinsic signaling molecule*. *Nat Chem Biol*, 2005. 1(5): p. 245-6.
106. Shiva, S., X. Wang, L.A. Ringwood, X. Xu, S. Yuditskaya, V. Annavajjhala, H. Miyajima, N. Hogg, Z.L. Harris, and M.T. Gladwin, *Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis*. *Nat Chem Biol*, 2006. 2(9): p. 486-93.
107. Kleinbongard, P., A. Dejam, T. Lauer, T. Rassaf, A. Schindler, O. Picker, T. Scheeren, A. Godecke, J. Schrader, R. Schulz, G. Heusch, G.A. Schaub, N.S. Bryan, M. Feelisch, and M. Kelm, *Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals*. *Free Radic Biol Med*, 2003. 35(7): p. 790-6.
108. Cosby, K., K.S. Partovi, J.H. Crawford, R.P. Patel, C.D. Reiter, S. Martyr, B.K. Yang, M.A. Waclawiw, G. Zalos, X. Xu, K.T. Huang, H. Shields, D.B. Kim-Shapiro, A.N. Schechter, R.O. Cannon, 3rd, and M.T. Gladwin, *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. *Nat Med*, 2003. 9(12): p. 1498-505.
109. Nagababu, E., S. Ramasamy, D.R. Abernethy, and J.M. Rifkind, *Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction*. *J Biol Chem*, 2003. 278(47): p. 46349-56.
110. Hendgen-Cotta, U.B., M.W. Merx, S. Shiva, J. Schmitz, S. Becher, J.P. Klare, H.J. Steinhoff, A. Goedecke, J. Schrader, M.T. Gladwin, M. Kelm, and T. Rassaf, *Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(29): p. 10256-61.
111. Shiva, S., Z. Huang, R. Grubina, J. Sun, L.A. Ringwood, P.H. MacArthur, X. Xu, E. Murphy, V.M. Darley-Usmar, and M.T. Gladwin, *Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration*. *Circ Res*, 2007. 100(5): p. 654-61.
112. Rassaf, T., U. Flogel, C. Drexhage, U. Hendgen-Cotta, M. Kelm, and J. Schrader, *Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function*. *Circ Res*, 2007. 100(12): p. 1749-54.
113. Lundberg, J.O. and M. Govoni, *Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide*. *Free Radic Biol Med*, 2004. 37(3): p. 395-400.
114. Duncan, C., H. Dougall, P. Johnston, S. Green, R. Brogan, C. Leifert, L. Smith, M. Golden, and N. Benjamin, *Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate*. *Nat Med*, 1995. 1(6): p. 546-51.
115. Jansson, E.A., L. Huang, R. Malkey, M. Govoni, C. Nihlen, A. Olsson, M. Stensdotter, J. Petersson, L. Holm, E. Weitzberg, and J.O. Lundberg, *A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis*. *Nat Chem Biol*, 2008. 4(7): p. 411-7.
116. Kilbourn, R.G. and O.W. Griffith, *Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock*. *J Natl Cancer Inst*, 1992. 84(11): p. 827-31.
117. Janssens, U., *[Septic cardiovascular diseases]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2003. 128(15): p. 803-9.
118. Tsuneyoshi, I., Y. Kanmura, and N. Yoshimura, *Nitric oxide as a mediator of reduced arterial responsiveness in septic patients*. *Crit Care Med*, 1996. 24(6): p. 1083-6.

119. Muller-Werdan, U., [*Acute septic cardiomyopathy*]. *Internist (Berl)*, 1998. 39(5): p. 467-78.
120. Macarthur, H., M.B. Mattammal, and T.C. Westfall, *A new perspective on the inhibitory role of nitric oxide in sympathetic neurotransmission*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 216(2): p. 686-92.
121. Price, S., P.B. Anning, J.A. Mitchell, and T.W. Evans, *Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications*. *Eur Heart J*, 1999. 20(10): p. 715-24.
122. Bouloumie, A., J. Bauersachs, W. Linz, B.A. Scholkens, G. Wiemer, I. Fleming, and R. Busse, *Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production*. *Hypertension*, 1997. 30(4): p. 934-41.
123. Moens, A.L. and D.A. Kass, *Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(11): p. 2439-44.
124. Gryglewski, R.J., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor*. *Nature*, 1986. 320(6061): p. 454-6.
125. Ishida, H., K. Ichimori, Y. Hirota, M. Fukahori, and H. Nakazawa, *Peroxynitrite-induced cardiac myocyte injury*. *Free Radic Biol Med*, 1996. 20(3): p. 343-50.
126. Lancel, S., S. Tissier, S. Mordon, X. Marechal, F. Depontieu, A. Scherpereel, C. Chopin, and R. Neviere, *Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43(12): p. 2348-58.
127. Moffat, F.L., Jr., T. Han, Z.M. Li, M.D. Peck, W. Jy, Y.S. Ahn, A.J. Chu, and L.Y. Bourguignon, *Supplemental L-arginine HCl augments bacterial phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes*. *J Cell Physiol*, 1996. 168(1): p. 26-33.
128. Alves-Filho, J.C., B.M. Tavares-Murta, C. Barja-Fidalgo, C.F. Benjamim, A. Basile-Filho, S.M. Arraes, and F.Q. Cunha, *Neutrophil function in severe sepsis*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2006. 6(2): p. 151-8.
129. Fiorucci, S., A. Mencarelli, E. Distrutti, M. Baldoni, P. del Soldato, and A. Morelli, *Nitric oxide regulates immune cell bioenergetic: a mechanism to understand immunomodulatory functions of nitric oxide-releasing anti-inflammatory drugs*. *J Immunol*, 2004. 173(2): p. 874-82.
130. Rios-Santos, F., J.C. Alves-Filho, F.O. Souto, F. Spiller, A. Freitas, C.M. Lotufo, M.B. Soares, R.R. Dos Santos, M.M. Teixeira, and F.Q. Cunha, *Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. 175(5): p. 490-7.
131. Tyml, K., X. Wang, D. Lidington, and Y. Ouellette, *Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 281(3): p. H1397-406.
132. Wu, F., K. Tyml, and J.X. Wilson, *iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells*. *J Cell Physiol*, 2008. 217(1): p. 207-14.
133. Lam, C., K. Tyml, C. Martin, and W. Sibbald, *Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis*. *J Clin Invest*, 1994. 94(5): p. 2077-83.
134. Farquhar, I., C.M. Martin, C. Lam, R. Potter, C.G. Ellis, and W.J. Sibbald, *Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis*. *J Surg Res*, 1996. 61(1): p. 190-6.
135. Trzeciak, S., R.P. Dellinger, J.E. Parrillo, M. Guglielmi, J. Bajaj, N.L. Abate, R.C. Arnold, S. Colilla, S. Zanotti, and S.M. Hollenberg, *Early microcirculatory*

- perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival.* Ann Emerg Med, 2007. 49(1): p. 88-98, 98 e1-2.
136. Ellis, C.G., R.M. Bateman, M.D. Sharpe, W.J. Sibbald, and R. Gill, *Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O(2) extraction in sepsis.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 282(1): p. H156-64.
 137. Boyle, W.A., 3rd, L.S. Parvathaneni, V. Bourlier, C. Sauter, V.E. Laubach, and J.P. Cobb, *iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice.* Circ Res, 2000. 87(7): p. E18-24.
 138. Kumar, A., R. Brar, P. Wang, L. Dee, G. Skorupa, F. Khadour, R. Schulz, and J.E. Parrillo, *Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility.* Am J Physiol, 1999. 276(1 Pt 2): p. R265-76.
 139. Paulus, W.J., P.J. Vantrimpont, and A.M. Shah, *Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion.* Circulation, 1994. 89(5): p. 2070-8.
 140. Kilbourn, R.G., A. Jubran, S.S. Gross, O.W. Griffith, R. Levi, J. Adams, and R.F. Lodato, *Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis.* Biochem Biophys Res Commun, 1990. 172(3): p. 1132-8.
 141. Feihl, F., B. Waeber, and L. Liaudet, *Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock?* Pharmacol Ther, 2001. 91(3): p. 179-213.
 142. MacMicking, J.D., C. Nathan, G. Hom, N. Chartrain, D.S. Fletcher, M. Trumbauer, K. Stevens, Q.W. Xie, K. Sokol, N. Hutchinson, and et al., *Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase.* Cell, 1995. 81(4): p. 641-50.
 143. Wei, X.Q., I.G. Charles, A. Smith, J. Ure, G.J. Feng, F.P. Huang, D. Xu, W. Muller, S. Moncada, and F.Y. Liew, *Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase.* Nature, 1995. 375(6530): p. 408-11.
 144. Laubach, V.E., E.G. Shesely, O. Smithies, and P.A. Sherman, *Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(23): p. 10688-92.
 145. Cobb, J.P., R.S. Hotchkiss, P.E. Swanson, K. Chang, Y. Qiu, V.E. Laubach, I.E. Karl, and T.G. Buchman, *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice.* Surgery, 1999. 126(2): p. 438-42.
 146. Barth, E., P. Radermacher, C. Thiernemann, S. Weber, M. Georgieff, and G. Albuszies, *Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock.* Crit Care Med, 2006. 34(2): p. 307-13.
 147. Jones, S.P., J.J. Greer, R. van Haperen, D.J. Duncker, R. de Crom, and D.J. Lefer, *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(8): p. 4891-6.
 148. Connelly, L., M. Madhani, and A.J. Hobbs, *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): p. 10040-6.
 149. Lidington, D., F. Li, and K. Tyml, *Deletion of neuronal NOS prevents impaired vasodilation in septic mouse skeletal muscle.* Cardiovasc Res, 2007. 74(1): p. 151-8.
 150. Enkhbaatar, P., K. Murakami, K. Shimoda, A. Mizutani, R. McGuire, F. Schmalstieg, R. Cox, H. Hawkins, J. Jodoin, S. Lee, L. Traber, D. Herndon, and D. Traber, *Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole*

- attenuates acute lung injury in an ovine model. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 285(2): p. R366-72.
151. Sears, C.E., S.M. Bryant, E.A. Ashley, C.A. Lygate, S. Rakovic, H.L. Wallis, S. Neubauer, D.A. Terrar, and B. Casadei, *Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. Circ Res*, 2003. 92(5): p. e52-9.
 152. Godecke, A., U.K. Decking, Z. Ding, J. Hirchenhain, H.J. Bidmon, S. Godecke, and J. Schrader, *Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. Circ Res*, 1998. 82(2): p. 186-94.
 153. Erhardt, W., A. Hebestedt, G. Aschenbrenner, B. Pichotka, and G. Blumel, *A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). Res Exp Med (Berl)*, 1984. 184(3): p. 159-69.
 154. Janssen, B.J., T. De Celle, J.J. Debets, A.E. Brouns, M.F. Callahan, and T.L. Smith, *Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 287(4): p. H1618-24.
 155. Hara, K. and R.A. Harris, *The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. Anesth Analg*, 2002. 94(2): p. 313-8, table of contents.
 156. Garvey, E.P., J.A. Oplinger, E.S. Furfine, R.J. Kiff, F. Laszlo, B.J. Whittle, and R.G. Knowles, *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): p. 4959-63.
 157. Bretscher, L.E., H. Li, T.L. Poulos, and O.W. Griffith, *Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel N5-(iminoalkyl)- and N5-(iminoalkenyl)-ornithines. J Biol Chem*, 2003. 278(47): p. 46789-97.
 158. Babu, B.R. and O.W. Griffith, *N5-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. J Biol Chem*, 1998. 273(15): p. 8882-9.
 159. Tietze, F., *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem*, 1969. 27(3): p. 502-22.
 160. Pfafferoth, C., G.B. Nash, and H.J. Meiselman, *Red blood cell deformation in shear flow. Effects of internal and external phase viscosity and of in vivo aging. Biophys J*, 1985. 47(5): p. 695-704.
 161. Condon, M.R., J.E. Kim, E.A. Deitch, G.W. Machiedo, and Z. Spolarics, *Appearance of an erythrocyte population with decreased deformability and hemoglobin content following sepsis. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284(6): p. H2177-84.
 162. Bryan, N.S. and M.B. Grisham, *Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. Free Radic Biol Med*, 2007. 43(5): p. 645-57.
 163. Harrison, D.G., *Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest*, 1997. 100(9): p. 2153-7.
 164. Kalyanaraman, B., *Detection of nitric oxide by electron spin resonance in chemical, photochemical, cellular, physiological, and pathophysiological systems. Methods Enzymol*, 1996. 268: p. 168-87.
 165. Nedeianu, S. and T. Pali, *EPR spectroscopy of common nitric oxide - spin trap complexes. Cell Mol Biol Lett*, 2002. 7(1): p. 142-3.
 166. Lai, C.S. and A.M. Komarov, *Spin trapping of nitric oxide produced in vivo in septic-shock mice. FEBS Lett*, 1994. 345(2-3): p. 120-4.
 167. Vanin, A.F., *Iron diethyldithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection. Methods Enzymol*, 1999. 301: p. 269-79.

168. Vanin, A.F., D.A. Svistunenko, V.D. Mikoyan, V.A. Serezhenkov, M.J. Fryer, N.R. Baker, and C.E. Cooper, *Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves*. J Biol Chem, 2004. 279(23): p. 24100-7.
169. Stoclet, J.C., A. Kleschyov, E. Andriambeloson, M. Diebolt, and R. Andriantsitohaina, *Endothelial no release caused by red wine polyphenols*. J Physiol Pharmacol, 1999. 50(4): p. 535-40.
170. Poli-de-Figueiredo, L.F., A.G. Garrido, N. Nakagawa, and P. Sannomiya, *Experimental models of sepsis and their clinical relevance*. Shock, 2008. 30 Suppl 1: p. 53-9.
171. Brandtzaeg, P., P. Kierulf, P. Gaustad, A. Skulberg, J.N. Bruun, S. Halvorsen, and E. Sorensen, *Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease*. J Infect Dis, 1989. 159(2): p. 195-204.
172. Casey, L.C., R.A. Balk, and R.C. Bone, *Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome*. Ann Intern Med, 1993. 119(8): p. 771-8.
173. Buras, J.A., B. Holzmann, and M. Sitkovsky, *Animal models of sepsis: setting the stage*. Nat Rev Drug Discov, 2005. 4(10): p. 854-65.
174. Remick, D.G., D.E. Newcomb, G.L. Bolgos, and D.R. Call, *Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture*. Shock, 2000. 13(2): p. 110-6.
175. Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry, *Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal*. J Surg Res, 1980. 29(2): p. 189-201.
176. Fink, M.P. and S.O. Heard, *Laboratory models of sepsis and septic shock*. J Surg Res, 1990. 49(2): p. 186-96.
177. Singleton, K.D. and P.E. Wischmeyer, *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): p. 486-91.
178. Zhou, M., P. Wang, and I.H. Chaudry, *Cardiac contractility and structure are not significantly compromised even during the late, hypodynamic stage of sepsis*. Shock, 1998. 9(5): p. 352-8.
179. Zhang, Y.J., M. Li, M. Meng, M. Feng, and C.Y. Qin, *The effect of ulinastatin on the small intestine injury and mast cell degranulation in a rat model of sepsis induced by CLP*. Exp Toxicol Pathol, 2009. 61(5): p. 481-90.
180. Eum, H.A., D.H. Yeom, and S.M. Lee, *Role of nitric oxide in the inhibition of liver cytochrome P450 during sepsis*. Nitric Oxide, 2006. 15(4): p. 423-31.
181. Wu, F., J.X. Wilson, and K. Tyml, *Ascorbate protects against impaired arteriolar constriction in sepsis by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression*. Free Radic Biol Med, 2004. 37(8): p. 1282-9.
182. Vo, P.A., B. Lad, J.A. Tomlinson, S. Francis, and A. Ahluwalia, *autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function*. J Biol Chem, 2005. 280(8): p. 7236-43.
183. Hauser, B., H. Bracht, M. Matejovic, P. Radermacher, and B. Venkatesh, *Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies*. Anesth Analg, 2005. 101(2): p. 488-98.
184. Pullamsetti, S.S., D. Maring, H.A. Ghofrani, K. Mayer, N. Weissmann, B. Rosengarten, M. Lehner, C. Schudt, R. Boer, F. Grimminger, W. Seeger, and R.T. Schermuly, *Effect of nitric oxide synthase (NOS) inhibition on macro- and microcirculation in a model of rat endotoxic shock*. Thromb Haemost, 2006. 95(4): p. 720-7.

185. Ho, J.T., M.J. Chapman, S. O'Connor, S. Lam, J. Edwards, G. Ludbrook, J.G. Lewis, and D.J. Torpy, *Characteristics of plasma NOx levels in severe sepsis: high interindividual variability and correlation with illness severity, but lack of correlation with cortisol levels*. Clin Endocrinol (Oxf), 2010. 73(3): p. 413-20.
186. Brealey, D., M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N.A. Davies, C.E. Cooper, and M. Singer, *Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock*. Lancet, 2002. 360(9328): p. 219-23.
187. Villa, P. and P. Ghezzi, *Effect of N-acetyl-L-cysteine on sepsis in mice*. Eur J Pharmacol, 1995. 292(3-4): p. 341-4.
188. Payabvash, S., M.H. Ghahremani, A. Goliaei, A. Mandegary, H. Shafaroodi, M. Amanlou, and A.R. Dehpour, *Nitric oxide modulates glutathione synthesis during endotoxemia*. Free Radic Biol Med, 2006. 41(12): p. 1817-28.
189. Minamiyama, Y., S. Takemura, K. Koyama, H. Yu, M. Miyamoto, and M. Inoue, *Dynamic aspects of glutathione and nitric oxide metabolism in endotoxemic rats*. Am J Physiol, 1996. 271(4 Pt 1): p. G575-81.
190. Villa, P., A. Saccani, A. Sica, and P. Ghezzi, *Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense*. J Infect Dis, 2002. 185(8): p. 1115-20.
191. Ninkovic, M.B., Z.M. Malicevic, A. Jelenkovic, M.M. Dukic, M.D. Jovanovic, and I.D. Stevanovic, *Nitric oxide synthase inhibitors partially inhibit oxidative stress development in the rat brain during sepsis provoked by cecal ligation and puncture*. Gen Physiol Biophys, 2009. 28 Spec No: p. 243-50.
192. Hinshaw, L.B., *Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review*. Crit Care Med, 1996. 24(6): p. 1072-8.
193. Baskurt, O.K., D. Gelmont, and H.J. Meiselman, *Red blood cell deformability in sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. 157(2): p. 421-7.
194. Korbut, R. and R.J. Gryglewski, *Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability in vitro*. Eur J Pharmacol, 1993. 234(1): p. 17-22.
195. Tavener, S.A. and P. Kubes, *Cellular and molecular mechanisms underlying LPS-associated myocyte impairment*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 290(2): p. H800-6.
196. Parent, C. and P.Q. Eichacker, *Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules*. Infect Dis Clin North Am, 1999. 13(2): p. 427-47, x.
197. Pendyala, S., P.V. Usatyuk, I.A. Gorshkova, J.G. Garcia, and V. Natarajan, *Regulation of NADPH oxidase in vascular endothelium: the role of phospholipases, protein kinases, and cytoskeletal proteins*. Antioxid Redox Signal, 2009. 11(4): p. 841-60.
198. Benjamim, C.F., J.S. Silva, Z.B. Fortes, M.A. Oliveira, S.H. Ferreira, and F.Q. Cunha, *Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils*. Infect Immun, 2002. 70(7): p. 3602-10.
199. Bath, P.M., *The effect of nitric oxide-donating vasodilators on monocyte chemotaxis and intracellular cGMP concentrations in vitro*. Eur J Clin Pharmacol, 1993. 45(1): p. 53-8.
200. Hallemeesch, M.M., B.J. Janssen, W.J. de Jonge, P.B. Soeters, W.H. Lamers, and N.E. Deutz, *NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. 285(4): p. E871-5.

201. Kadoi, Y. and F. Goto, *Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats*. *Anesth Analg*, 2004. 99(1): p. 212-20.
202. Staehr, M., K. Madsen, P.M. Vanhoutte, P.B. Hansen, and B.L. Jensen, *Disruption of COX-2 and eNOS does not confer protection from cardiovascular failure in lipopolysaccharide-treated conscious mice and isolated vascular rings*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. 301(2): p. R412-20.
203. Merx, M.W., E.A. Liehn, J. Graf, A. van de Sandt, M. Schaltenbrand, J. Schrader, P. Hanrath, and C. Weber, *Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival*. *Circulation*, 2005. 112(1): p. 117-24.
204. Godecke, A., T. Heinicke, A. Kamkin, I. Kiseleva, R.H. Strasser, U.K. Decking, T. Stumpe, G. Isenberg, and J. Schrader, *Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts*. *J Physiol*, 2001. 532(Pt 1): p. 195-204.
205. Reinartz, M., A. Molojavyi, S. Moellendorf, T. Hohlfeld, J. Heger, and A. Godecke, *beta-Adrenergic signaling and response to pressure overload in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of inducible NO synthase*. *Nitric Oxide*, 2011. 25(1): p. 11-21.
206. Balligand, J.L., O. Feron, and C. Dessy, *eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues*. *Physiol Rev*, 2009. 89(2): p. 481-534.
207. Rassaf, T., L.W. Poll, P. Brouzos, T. Lauer, M. Totzeck, P. Kleinbongard, P. Gharini, K. Andersen, R. Schulz, G. Heusch, U. Modder, and M. Kelm, *Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans*. *Eur Heart J*, 2006. 27(14): p. 1699-705.
208. Kelm, M., S. Schafer, R. Dahmann, B. Dolu, S. Perings, U.K. Decking, J. Schrader, and B.E. Strauer, *Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation*. *Cardiovasc Res*, 1997. 36(2): p. 185-94.
209. Stein, B., T. Eschenhagen, J. Rudiger, H. Scholz, U. Forstermann, and I. Gath, *Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 32(5): p. 1179-86.
210. Brunner, F., P. Andrew, G. Wolkart, R. Zechner, and B. Mayer, *Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2001. 104(25): p. 3097-102.
211. Doursout, M.F., T. Oguchi, U.M. Fischer, Y. Liang, B. Chelly, C.J. Hartley, and J.E. Chelly, *Distribution of NOS isoforms in a porcine endotoxin shock model*. *Shock*, 2008. 29(6): p. 692-702.
212. Chauhan, S.D., G. Seggara, P.A. Vo, R.J. Macallister, A.J. Hobbs, and A. Ahluwalia, *Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice*. *FASEB J*, 2003. 17(6): p. 773-5.
213. Brandes, R.P., D. Kim, F.H. Schmitz-Winnenthal, M. Amidi, A. Godecke, A. Mulsch, and R. Busse, *Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase*. *Hypertension*, 2000. 35(1 Pt 2): p. 231-6.
214. Csanyi, G., I. Lepran, T. Flesch, G. Telegdy, G. Szabo, and Z. Mezei, *Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats*. *Pharmacol Rep*, 2007. 59(4): p. 447-55.

215. Scott, J.A., S. Mehta, M. Duggan, A. Bihari, and D.G. McCormack, *Functional inhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 165(10): p. 1426-32.
216. Alvarez de Sotomayor, M., S. Vega, C. Mingorance, E. Marhuenda, and M.D. Herrera, *Effects of HMG-CoA reductase inhibition by simvastatin on vascular dysfunction induced by lipopolysaccharide in rats*. Pharmacology, 2008. 82(2): p. 89-96.
217. Subramani, J., K. Kathirvel, M.D. Leo, G. Kuntamallappanavar, T. Uttam Singh, and S.K. Mishra, *Atorvastatin restores the impaired vascular endothelium-dependent relaxations mediated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factors but not hypotension in sepsis*. J Cardiovasc Pharmacol, 2009. 54(6): p. 526-34.
218. Song, X.M., J.G. Li, Y.L. Wang, Q. Zhou, Z.H. Du, B.H. Jia, and J.J. Ke, *Effects of ketamine on proinflammatory cytokines and nuclear factor kappaB in polymicrobial sepsis rats*. World J Gastroenterol, 2006. 12(45): p. 7350-4.
219. Peng, T., X. Lu, M. Lei, and Q. Feng, *Endothelial nitric-oxide synthase enhances lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha expression via cAMP-mediated p38 MAPK pathway in cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2003. 278(10): p. 8099-105.
220. Geoghegan-Morphet, N., D. Burger, X. Lu, V. Sathish, T. Peng, S.M. Sims, and Q. Feng, *Role of neuronal nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal mouse cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2007. 75(2): p. 408-16.
221. Salvemini, D., R. Korbut, E. Anggard, and J. Vane, *Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by Escherichia coli lipopolysaccharide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(7): p. 2593-7.
222. Lange, M., R. Connelly, D.L. Traber, A. Hamahata, Y. Nakano, A. Esechie, C. Jonkam, S. von Borzyskowski, L.D. Traber, F.C. Schmalstieg, D.N. Herndon, and P. Enkhbaatar, *Time course of nitric oxide synthases, nitrosative stress, and poly(ADP ribosylation) in an ovine sepsis model*. Crit Care, 2010. 14(4): p. R129.
223. Thiemermann, C., C. Szabo, J.A. Mitchell, and J.R. Vane, *Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(1): p. 267-71.
224. Fernandes, D., R. Sordi, L.K. Pacheco, G.M. Nardi, B.T. Heckert, C.G. Villela, A.R. Lobo, C. Barja-Fidalgo, and J. Assreuy, *Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. 328(3): p. 991-9.
225. Teng, R.J., T.J. Wu, C.G. Bisig, A. Eis, K.A. Pritchard, and G.G. Konduri, *Nitrotyrosine impairs angiogenesis and uncouples eNOS activity of pulmonary artery endothelial cells isolated from developing sheep lungs*. Pediatr Res, 2011. 69(2): p. 112-7.
226. Schulz, R., K.L. Dodge, G.D. Lopaschuk, and A.S. Clanachan, *Peroxyntirite impairs cardiac contractile function by decreasing cardiac efficiency*. Am J Physiol, 1997. 272(3 Pt 2): p. H1212-9.
227. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. 113(13): p. 1708-14.
228. Handa, O., J. Stephen, and G. Cepinskas, *Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 295(4): p. H1712-9.

7. Abkürzungsverzeichnis

7. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovines-Serum-Albumin
BL	basal
C57/BL6	Wildtypstamm der Mäuse
cDNA	complementary DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLP	Coecum-Ligatur und Punktion
CXCR2	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dP/dt_{\max}	maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
dP/dt_{\min}	maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESR	Elektronenspinresonanz
FAD	Flavinadenindinukleotid
$Fe(DETC)_2$	Eisen-Diethyldithiocarbamat
$Fe(MGD)_2$	Eisen-N-methyl-D-glucamin-Dithiocarbamat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IL-6	Interleukin 6
K_{EI}	Scherrate, die halbmaximale Elongation bewirkt

7. Abkürzungsverzeichnis

LORCA	Laser-assisted-optical rotational cell analysator
LPS	Lipopolysaccharide
LVDP	Left-Ventricular-Developed-Pressure
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NfκB	Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NOS1	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NOS2	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
NOS3	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
NO _x	Gesamtheit der Nitrit und Nitrat Konzentration
OP	Operation
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	Sodium Nitroprusside
TLR	Toll Like Receptors
TNF	Tumor Nekrose Factor
WT	Wildtyp
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PRR	Pathogen Recognition Receptors

8. Materialienliste

Medikamente

1400W	Alexis Biochemicals, Buttler Pike, USA
V-LNIO	Alexis Biochemicals, Buttler Pike, USA
Ketanest S®	Parke-Davis/Pfizer Pharma, Berlin
Xylazin 2%	Bernburg AG, Bernburg
Urethan	ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt a.M.
Betaisodona® Lösung	Mundipharma GmbH, Limburg
Arterenol®	Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt a.M.
Heparin Heparin-Natrium	B. Braun AG Melsungen
Acetylcholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenylephrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SNP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Osmotische Medikamentenpumpe

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

Spritzenpumpe

Precidor Infors AG, Basel, Schweiz

Chemikalien

NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe
KCl	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
MgSO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PBS	PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
Ethanol (96-100%)	Merck KGaA, Darmstadt
Citronensäure	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Tween®20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

8. Materialienliste

HPLC-Wasser Merck KGaA, Darmstadt

Instrumente:

Soweit nicht anders angegeben bezogen von: Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

- gebogene chirurgische Schere FST 14075-11
- gerade chirurgische Schere FST 14088-10
- Gefäßclip FST 18055-04
- Gerade Sprungschere FST 15003-08
- gebogene Mikropinzette BD333R Aesculap AG, Tuttlingen

Kleintierrasiergerät:

- Favorita II Aesculap AG, Tuttlingen

Nahtmaterial:

Bezogen von: Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt

- 5-0 PH-Seidenfaden, schwarz, geflochten
- 4-0 PH-Seidenfaden, schwarz, geflochten

Tuberkulinspritzen:

- Tuberculin Syringe BD, Franklin Lakes, USA

Mikroskope:

- Lichtmikroskop MZ 9.5 Leica Microsystems, Wetzlar
- Fluoreszenz-/Lichtmikroskop DML Leica Microsystems, Wetzlar

Druck-Volumen-Katheter:

- SPR 839 Millar Instruments, Houston, USA

Computer Hard- und Software:

- IOX emka Technologies s.a., Paris, Frankreich
- Analog Interface 16 emka Technologies s.a., Paris, Frankreich
- Euchrom Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
- Interfacebox Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
- Transducer Amplifier Modul TAM A (Analoge, universelle)

8. Materialienliste

Gleichspannungsmeßbrücke + ohmscher Meßwertaufnehmer)

Glas-auf-Glas Homogenisator:

- HomogenPlus Schütt-Biotec GmbH, Göttingen

HPLC – NO_x-Analysator:

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

qRT-PCR-Kits:

- RNeasy® Fibrous Tissue Kit Qiagen GmbH, Hilden
- Quanti Tect 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 7500 Applied Biosystems

Rheologie

- LORCA, Mechatronic, Niederlande

tGSH Kit

- GSH/GSSG Ratio Assay Kit, Calbiochem/Merck, Darmstadt

Histologie-Material:

Leukozyten-Kits Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

- α-Naphtyl-Acetate-Esterase, 91A
- Naphthol-AS-D-Chloracetate-Esterase, 91C
- α-Naphtyl-Butyrat-Esterase, 181-B

8. Materialienliste

3-Nitrotyrosin-Nachweis

- Primärantikörper: Rabbit Anti-Nitrotyrosine (nTyr), Biomol GmbH Hamburg
- Sekundärantikörper: DyLight™ 488 conjugated Affinity Purified Anti-Rabbit IgG (sheep), Rockland Gilbertsville, USA

Blockierlösungen

- BSA, SP-5050 Vector Laboratories
- Normal Horse Serum, S2000 Vector Laboratories

Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm, Direktor der Klinik B für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, für die Möglichkeit die experimentellen Arbeiten in den Räumen des Kardiologischen Labors durchführen zu dürfen und für die Anregungen für weitere experimentelle Ansätze.

Mein besonderer Dank geht an meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Marc W. Merx für die Bereitstellung des interessanten Themas und 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 Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Vlada Urlacher für ihre gutachterliche Tätigkeit und Ihre Teilhabe an der Promotionskommission.

Ich danke auch dem gesamten Team des kardiologischen Labors für die gute Zusammenarbeit und eine schöne Zeit. Insbesondere Rabia Taskesen danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz mir die Histologie näher zu bringen und das wir herrliche Unterhaltungen und Diskussionen über alle Alltäglichkeiten und Unmöglichkeiten führen konnten. Frau Stefanie Becher danke ich für die ausführliche und detaillierte Einführung in die Tierversuchsmethodik. Frau Dr. med. Annette van de Sandt und Frau Dr. rer. nat. Simone Zander danke ich für die großartige Unterstützung in jeder Hinsicht. Herrn Dr. rer. nat. Ernst van Faassen danke ich für die Übernahme der Durchführung der Messungen am ESR.

Frau Dr. vet. med. Peter danke ich für ihre Unterstützung bei allen mikrobiologischen Problemen, die auftraten.

Meinen Freunden Thomas, Marijke und Dominik danke ich für die schöne Zeit, die wir neben der Arbeit zusammen hatten, besonders in Aachen.

Meinen Eltern möchte ich für ihre liebevolle Unterstützung im Studium und bei dieser Promotion danken, wie auch dafür, dass sie mir ermöglichten meinen Traum vom Studium und der Promotion zu erfüllen.

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

Publikationen im Zusammenhang dieser Arbeit:

Annette M. van de Sandt, Rainer Windler, Axel Gödecke, Jan Ohlig, Simone Zander, Michael Reinartz, Jürgen Graf, Ernst E. van Faassen, Tienush Rassaf, Jürgen Schrader, Malte Kelm, Marc W. Merx. Endothelial NOS (NOS3) impairs myocardial function in developing sepsis. Basic Research in Cardiology. 2013 (im Druck).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Rainer Windler

Düsseldorf, den

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Rainer Windler

Wohnort: 40229 Düsseldorf

Geboren: 20.07.1978 in Zeven / Niedersachsen

Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1985-1989	Grundschule Horstedt
1989-1991	Orientierungsstufe in Sottrum
1991-1995	Realschule Sottrum, Abschluss: erweiterter Realschulabschluss
1995-1998	Wirtschaftsgymnasium der BBS Rotenburg (Wümme)
03/1998	Abitur
1998-1999	Zivildienst bei der Lebenshilfe in Rotenburg, Betreuung behinderter Menschen in den angegliederten Werkstätten

Studium:

10/1999-01/2007	Biologiestudium (Diplom) an der Georg August Universität Göttingen
02/06-11/06	Diplomarbeit, Thema: Intraspezifische und artspezifische Unterschiede in der ekto- und endoparasitären Belastung von zwei Rennmausarten, <i>Meriones unguiculatus</i> und <i>M. meridianus</i>
01/07	Studienabschluss: Diplom (gut)
05/07-06/09	Beginn Promotionsstudium an der RWTH Aachen
04/10-03/12	Fortsetzung des Promotionsstudiums an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Beruflicher Werdegang:

05/2007-06/2009	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Medizinischen Klinik I am Uniklinikum in Aachen
07/2009-	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie am Universitätsklinikum Düsseldorf

Düsseldorf, den 04.05.12