

Institut für Anaesthesiologie der Technischen Universität München,
Klinikum rechts der Isar (Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

**Die kognitiven Defizite in einem Sepsismodell bei
Ratten sind auf eine Herunterregulierung der nNOS
zurückzuführen**

Astrid Eisenhauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. M. Blobner
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 12.06.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.10.2003 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Vorbemerkung	4
1.2 Sepsis und septische Enzephalopathie	6
1.2.1 Definitionen	6
1.2.2 Pathogenese des Organversagens bei Sepsis	8
1.2.2.1 Reaktion des Wirts auf Endotoxin gramnegativer Bakterien	8
1.2.2.2 Exotoxin-induzierte Mechanismen	8
1.2.2.3 Sepsis-assoziierte Immunsuppression durch Abnahme von HLA-Präsentationsmolekülen auf Monozyten	9
1.2.3 Pathogenese der septischen Enzephalopathie	10
1.2.3.1 Metabolische Störungen und verändertes Neurotransmitterprofil	10
1.2.3.2 Zentrale Effekte proinflammatorischer Zytokine	11
1.2.3.3 Gestörte Blut-Hirn-Schranke	11
1.2.3.4 Ischämie	12
1.2.4 Therapie der Sepsis	12
1.3 Stickoxid	14
1.3.1 NO historisch	14
1.3.2 NO-Biochemie	15
1.3.3 NO-Synthese und –abbau	16
1.3.4 NO - biologische Wirkung	18
1.3.4.1 NO im Gefäßsystem	18
1.3.4.2 NO als Neurotransmitter	19
1.3.4.3 NO als Immunmodulator	21
1.3.4.4 NO-Produktion durch die iNOS	21
1.3.4.4.1 iNOS-Induktion und –Synthese	21
1.3.4.4.2 Negative Auswirkungen der vermehrten NO-Synthese durch die iNOS und mögliche Therapieansätze der Sepsis durch Hemmung der iNOS	23
1.3.4.4.3 Mögliche positive Auswirkungen der vermehrten NO-Synthese durch die iNOS	26

1.3.4.4.4 Überflutung des Gehirns mit NO durch eine hochregulierte iNOS als mögliche Ursache der septischen Enzephalopathie	27
<u>2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</u>	<u>29</u>
<u>3 Methoden</u>	<u>30</u>
3.1 Studiendesign und Versuchstiere	30
3.2 Labormethoden	
3.2.1 Probenaufbereitung	31
3.2.2 Westernblot-Analyse	32
3.2.2.1 Standardherstellung	32
3.2.2.2 Durchführung des Westernblots	32
3.2.3 NOS-Assay	35
3.2.3.1 Säulenherstellung	35
3.2.3.2 Bestimmung der Säulenausbeute	36
3.2.3.3 Hochreinigung des Arginin	36
3.2.3.4 Durchführung des NOS-Assay	37
3.2.4 Nitrit/Nitrat-Bestimmung mittels ELISA	38
3.2.5 Methämoglobinbestimmung	39
3.3 Statistik	39
<u>4 Ergebnisse</u>	<u>40</u>
4.1 Nitrit/Nitrat	40
4.2 Methämoglobin	40
4.3 nNOS-Protein im Gehirn (Westernblot)	41
4.4 iNOS-Protein und –aktivität im Gehirn (Westernblot, NOS-Assay)	42
4.5 cNOS-Aktivität (NOS-Assay)	42
<u>5 Diskussion</u>	<u>43</u>
<u>6 Zusammenfassung</u>	<u>47</u>
<u>7 Anhang: Puffer und Mischungen</u>	<u>48</u>
<u>8 Literaturverzeichnis</u>	<u>51</u>
<u>9 Danksagung</u>	<u>61</u>
<u>Lebenslauf</u>	<u>62</u>
<u>Erklärung</u>	<u>63</u>

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkungen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein sehr instabiles, farbloses Gas, das schnell zu seinen Abbauprodukten Nitrit/Nitrat konvertiert wird.

Seit den 1980er Jahren ist NO als physiologischer Messenger bekannt. Es stellt einen der Hauptregulatoren im Nerven-, Immun- und kardiovaskulären System dar. Neben dieser physiologischen Rolle wurde zunehmend eine Rolle bei der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen, wie septischen Schock, Bluthochdruck, Schlaganfall und neurodegenerativen Erkrankungen vermutet.

Im Körper wird NO durch die Stickstoffmonoxidsynthase (NO-Synthase) gebildet, von der es drei Isoenzyme gibt. Nach ihrer Lokalisation werden neuronale und endotheliale NO-Synthase unterschieden, die beide immer vorhanden sind und deswegen als konstitutive NO-Synthase (cNOS) zusammengefasst werden. Für die Aktivierung der dritten Isoform ist dagegen erst eine de-novo-Proteinsynthese nötig, weswegen sie als „induzierbare“ NO-Synthase (iNOS) bezeichnet wird.

Ein wichtiger Forschungsschwerpunkt fällt auf die Rolle von NO bei Sepsis. Mit Zunahme der Therapiemöglichkeiten für Schwerkranke und Immungeschwächte hat die Inzidenz der Sepsis stark zugenommen. In den USA liegt sie bei etwa einer halben Millionen Fälle pro Jahr, etwa 25% der Sepsis-Syndrome verlaufen tödlich. Entsteht im Rahmen einer Sepsis ein Multiorganversagen, u.a. mit zerebralen Veränderungen im Sinne einer septischen Enzephalopathie, verringert sich die Überlebenschance um bis zu 50%. Die Hoffnung auf eine Optimierung der Therapie bei Sepsis, die immer noch konventionell mit Herdsanierung und Antibiose angegangen wird, liegt in der genauen Erforschung der Pathophysiologie.

Es konnte gezeigt werden, daß bei Infektionen regelmäßig die Induktion der normalerweise nicht vorhandenen NO-Synthase, der iNOS, stattfindet. Diese produziert innerhalb von Stunden große Mengen an NO. Die möglichen Folgen davon könnten im Vollbild einer Sepsis sichtbar werden. So könnte die eintretende Hypotension auf die gefäßdilatierende Wirkung von NO zurückgeführt werden.

Außerdem hat NO Einfluß auf die Gerinnung, auf die Gefäßpermeabilität und andere Effekte.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in einem Tiermodell mit septischen Ratten mit den Veränderungen des Stickstoffmonoxidmetabolismus bei der septischen Enzephalopathie.

Als Teil einer größeren Studie mit insgesamt 120 Tieren wurde in einem Vorversuch (Doktorarbeit von Marcia Manns, Anästhesiologie, Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland) das Maximum der septischen Enzephalopathie mittels eines Verhaltenstests bestimmt: Auf einem Lochbrett mit versteckter Futterbelohnung wurde die Zeit bis zum Auffinden des Futters bestimmt. Die Tiere wurden nach einer Phase der Akklimatisation mit *Corynebakterium parvum* infiziert und 10 Tage vor und 16 Tage nach der Infektion täglich dem Verhaltenstest unterzogen. Als Kontrollgruppe diente eine gleich große Gruppe nicht infizierter Ratten. Das maximale kognitive Defizit als Maximum der septischen Enzephalopathie wurde als Kriterium betrachtet und lag am 3.Tag post infectionem. Aus der Auswertung des Vorversuchs ergab sich der Tötungszeitpunkt für den Hauptversuch.

Für vorliegende Untersuchung wurden demnach Gehirn und Serum infizierter Ratten am dritten Tag nach der Infektion im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht. Über indirekte Messung von NO über die stabilen Abbauprodukte Nitrit/Nitrat im Serum in einem enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA), Bestimmung von n- und iNOS-Protein im Gehirn über Westernblot und Berechnung von c- und iNOS-Aktivität im Gehirn mit Hilfe eines Citrullin-Assays mit radioaktiv markiertem Arginin soll Aufschluß über die gegenseitige Beeinflussung von induzierter NO-Synthase mit starker NO-Ausschüttung und nNOS erlangt werden. Zusätzlich wurde der Anteil des Methämoglobin am Gesamthämoglobin im Blut (EDTA-Blut) bestimmt.

1.2 Sepsis und septische Enzephalopathie

Sepsis, septischer Schock und septisches Organversagen sind einzelne Stationen eines dynamischen Ablaufs, der durch Infektionen ausgelöst werden kann [10].

1.2.1 Definitionen

Es werden folgende Definitionen unterschieden [2]:

Bakteriämie:

Anwesenheit von Erregern in der Blutbahn ohne systemische Entzündungsreaktion.

Sepsis:

Anwesenheit von Erregern in der Blutbahn mit systemischer Entzündungsreaktion: kardiovaskuläre Zeichen (Hypotension, Tachykardie), Immunphänomene (Fieber oder Hypothermie, Leukozytose oder -penie), Tachypnoe, Organversagen (z.B. Nierenversagen, Leberversagen).

Septischer Schock:

Sepsis mit unzureichender Gewebepfusion trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr.

Sepsis-Syndrom:

Sepsis mit Zeichen des Endorganversagens (Nierenversagen, respiratorische Insuffizienz, Leberversagen, Herzinsuffizienz, disseminierte intravasale Koagulopathie).

Das klinische Syndrom der Sepsis spiegelt eine durch Erreger ausgelöste systemische Entzündungsreaktion wider. Diese kann aber auch durch andere pathogenetische Mechanismen, z.B. Verbrennungen, schweres Trauma oder bestimmte Toxine ausgelöst werden. Eine auf diese Art zustandekommende systemische Reaktion ist klinisch nicht von einer Sepsis zu unterscheiden, da die einmal aktivierte Entzündungskaskade unabhängig von der Ursache abläuft. Aus

diesem Grund wurde der Oberbegriff „systemic inflammatory response syndrom (SIRS)“ für alle entzündungsbedingten Endorganschädigungen vorgeschlagen. Sepsis ist die weitaus häufigste Ursache des SIRS.

Systemic inflammatory response syndrom (SIRS):

systemische Entzündungsreaktion als Antwort auf eine Vielzahl verschiedener starker klinischer Noxen mit zwei oder mehr der folgenden Bedingungen [6]:

- Hypothermie $< 35,1^{\circ}\text{C}$ oder Hyperthermie $>38,3^{\circ}\text{C}$
- Tachykardie $> 90/\text{min}$ bei Ausschluß einer Hypovolämie
- Tachypnoe $> 20/\text{min}$ oder Hypokapnie ($\text{pCO}_2 \leq 32\text{mmHg}$)
- Leukozytenzahl $> 12000/\text{nl}$ oder $< 4000/\text{nl}$ oder $> 10\%$ unreife Vorstufen

Compensatory anti-inflammatory response syndrom (CARS):

Obwohl die meisten Patienten das „SIRS“ überleben, besteht ein erhöhtes Risiko, an sekundären und opportunistischen Infektion zu erkranken. Diese erklärt sich durch das Auftreten einer kompensatorischen anti-inflammatorischen Antwort, dem „compensatory anti-inflammatory response syndrom“ (CARS): Der initialen Aktivierung des angeborenen Immunsystems folgt eine Deaktivierung von Makrophagen, ein T-Zellen-Funktionsverlust und der schnelle apoptotische Verlust von Lymphgewebe. Dies führt zur Entwicklung des CARS, welches mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht [97].

Multiorganversagen:

Gleichzeitig oder rasch aufeinanderfolgendes Versagen von zwei oder mehr vitalen Organfunktionen. Der Schweregrad korreliert mit der Anzahl und dem Schädigungsausmaß der betroffenen Organe.

Mit 13-90% Mortalität ($\leq 51\%$ [127]) und damit der 13.häufigsten Todesursache in den USA [9] und einem Kostenaufwand von jährlich 5-10 Milliarden Dollar [3] ist das Verständnis und die Therapie von Sepsis und Organversagen von herausragender medizinischer Bedeutung.

1.2.2 Pathogenese des Organversagens bei Sepsis

Als Pathogenese des Organversagens bei Sepsis werden folgende Mechanismen angenommen [4]:

1.2.2.1. Reaktion des Wirts auf Endotoxin gramnegativer Bakterien:

Bei Eintritt des Keimes aktiviert die Lipopolysaccharid(LPS)-Komponente in der äußeren Membran gramnegativer Erreger einerseits die Gerinnungskaskade [5], was weitere Entzündungsmechanismen, wie Freisetzung von Bradykinin oder Arachidonsäurederivaten in Gang setzt [105]. Andererseits löst sie bei Makrophagen und Lymphozyten die Produktion von Mediatoren aus. Hier spielen vor allem 2 Substanzgruppen eine große Rolle: Proteine [Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL)-1, IL-6] und Lipide [Prostaglandin E2, Thromboxan A2, Plättchenaktivierender Faktor (PAF)], die in einer lokalen Entzündungsreaktion Mikroorganismen zerstören und Toxine neutralisieren sollen. Zytokine und sekundäre Mediatoren wie Stickstoffmonoxid, Prostaglandine, Adhäsionsmoleküle und die entstehenden Sauerstoffradikale sind einerseits essentiell für die Kontrolle lokaler Infektionen, andererseits verursachen insbesondere hohe Zytokinspiegel nach längerer Exposition Endothelschäden mit Folgen wie erhöhter Kapillarpermeabilität und Gewebsödemen, Störungen der Makro- und Mikrozirkulation und haben Auswirkungen auf den Gewebsstoffwechsel [100]. Diese Effekte führen bei schweren systemischen Infektionen zum Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und bei Fortdauer der Erkrankung zum Multiplen Organversagen [96].

1.2.2.2. Exotoxin-induzierte Mechanismen:

Exotoxin grampositiver Bakterien (Superantigen) führt zur selektiven T-Zell-Aktivierung und damit zur hyperakuten Freisetzung von TNF, der ebenfalls am Endothel angreift und zu oben beschriebenem Mechanismus führt. Auch TNF-unabhängige Mechanismen (u.a. E. coli alpha-Toxin, Clostridium perfringens alpha-Toxin), sogenannte „alternative pathways“, konnten nachgewiesen werden: hierbei werden die Wirtszellen u.a. über eine Aktivierung zellulärer Phospholipasen [63] oder eigene Phospholipaseaktivität beeinflusst.

1.2.2.3. Sepsis-assoziierte Immunsuppression durch Abnahme von HLA-Präsentationsmolekülen auf Monozyten:

Monozyten lagern Fragmente des phagozytierten Bakteriums als Antigen ihren HLA-Präsentationsmolekülen an, was die Voraussetzung für die T-Helferzellen-vermittelte spezifische Immunantwort darstellt [36]. Bei Sepsis kann die Anzahl der HLA-Moleküle je Monozyt verringert sein, was zu einer Immunsuppression führt.

Im Rahmen einer Sepsis treten häufig akute ZNS-Schädigungen im Sinne einer septischen Enzephalopathie auf. Wie oft bei einer Sepsis dieses Krankheitsbild entsteht, wird je nach Verständnis des Begriffes „septische Enzephalopathie“ und der Möglichkeit der Diagnostik mit einer Inzidenz von 9-100% beziffert.

Laut Bogdanski [6] wird mit septischer Enzephalopathie eine „akute, reversible generalisierte Einschränkung zerebraler Funktionen“ mit „Veränderungen in der Vigilanz in Zusammenhang mit einer Sepsis“ bezeichnet. Im Rahmen einer schweren systemischen Infektion geht die septische Enzephalopathie anderen Symptomen häufig voraus, so daß ihr als „Leitsymptom“ eine besondere Bedeutung zukommt. Die Symptome reichen von Konzentrationsstörungen über Somnolenz, zeitliche/örtliche Desorientiertheit und Stupor, Krampfanfälle, Hemiparesen bis hin zum Koma [6]. Je ausgeprägter das Krankheitsbild erscheint, desto höher ist auch die Mortalität [129]. Young und Mitarbeiter zeigten, daß in einem Patientengut mit systemischer Infektion 55,3% der Patienten mit neurologischer Symptomatik im Vergleich zu 28,5% ohne neurologischer Symptomatik verstarben [130]. Diese epidemiologischen Untersuchungen machen deutlich, daß bei einer Mitbeteiligung des zentralen Nervensystems die Prognose des Patienten mit einer systemischen Infektion deutlich schlechter ist [6].

Die Diagnose einer septischen Enzephalopathie kann erst dann gestellt werden, wenn organische Ursachen einer Enzephalopathie oder Erkrankungen des Gehirns, wie z.B. schwere Leberfunktionsstörungen, eine bakterielle Meningitis, Virusenzephalitis, das maligne neuroleptische Syndrom, das akute Nierenversagen, die thyreotoxische Krise, die Sinusvenenthrombose oder durch Medikamente induzierte Zustände ausgeschlossen werden können [6].

Die Computertomographie und andere bildgebende Verfahren zeigen meist einen Normalbefund, nur einzelne Fälle berichten von pathologischen Befunden:

reversibles generalisiertes Marklagerödem [74], einzelne, hypodense Läsionen in der parieto-occipitalen Region [62]. Auch die Laborparameter zeigen keine für die septische Enzephalopathie spezifischen Veränderungen, sondern sind Ausdruck der multiplen Organdysfunktionen bei schweren Krankheitsverläufen [130]. Neben den klinischen Zeichen wie Konzentrationsstörungen, Somnolenz, Stupor, Krampfanfälle bis hin zum Koma, gilt vor allem das EEG als sensitiver Parameter: es kommt zu einer Reduktion schnellerer und einer Zunahme langsamerer Frequenzen, das Ausmaß der auftretenden EEG-Veränderungen nimmt parallel mit der Verschlechterung des klinischen Verlaufs zu [131].

Da die Enzephalopathie schon früh im Verlauf einer Sepsis auftritt, kann sie nicht ausschließlich als Folge diverser Organversagen erklärt werden. Es werden mehrere Schädigungsmechanismen angenommen, die bei schweren Allgemeininfektionen isoliert, aber auch kombiniert eine Enzephalopathie auslösen können.

1.2.3 Pathogenese der septischen Enzephalopathie

Mögliche Ursachen für das Entstehen einer septischen Enzephalopathie im Rahmen einer Sepsis:

1.2.3.1 Metabolische Störungen und verändertes Neurotransmitterprofil:

Unter anderem durch den vermehrten Muskelabbau kommt es bei septischen Patienten zu einer Freisetzung grösserer Mengen Aminosäuren [41] und damit zu einer Veränderung der Aminosäurenkonzentration im Serum und Gehirn. Es besteht eine deutliche Erhöhung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan, sowie eine Verminderung der verzweigtkettigen Aminosäure Isoleucin [85, 117]. Einer portosystemischen Enzephalopathie bei Leberfunktionsstörung ähnlich, kumulieren die von der Leber metabolisierten aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren. Dieser vermehrte Anfall verschiedener Aminosäuren ist zumindest teilweise für die septische Enzephalopathie verantwortlich [64]. Allerdings treten bei der septischen Enzephalopathie keine erhöhten Ammoniakwerte auf, die bei der Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie pathogenetisch bedeutsam sind [85].

Da Aminosäuren die Grundlage für die Bildung von Neurotransmittern (z.B. Dopamin) sind, hat eine veränderte Aminosäurenkonzentration im Gehirn auch ein verändertes Neurotransmitterprofil zur Folge. Freund et. al. [39] konnten z.B. zeigen, daß bei Ratten mit septischer Enzephalopathie zerebral eine deutlich erniedrigte Konzentration von Noradrenalin, Dopamin und 5-Hydroxytryptamin im Vergleich zu gesunden Ratten besteht.

Neben dieser Aktivitätsabnahme des noradrenergen Systems besteht eine Aktivitätszunahme des serotonergen Systems [39, 40, 55] und Veränderungen im Glukosestoffwechsel einzelner Gehirnregionen im Sinne einer verminderten Glucoseausschöpfung im Gehirn septischer Ratten [116].

1.2.3.2 Zentrale Effekte proinflammatorischer Zytokine:

Die Zytokine IL-1 und TNF- α werden über ein aktives Transportsystem in das ZNS aufgenommen [53, 101] und aktivieren dort Astrozyten und Mikroglia zur Ausschüttung weiterer Zytokine.

Zerebrale Gefäße reagieren auf Zytokine mit dem Ausfall der metabolisch adaptierten Perfusionssteuerung, so daß es zu einer homogenen druckpassiven Perfusionsverteilung unabhängig vom Sauerstoffbedarf des jeweiligen Gewebes kommt [58].

Wahrscheinlich besteht auch eine direkte Zytokinwirkung auf neuronale Funktionen, da Neurone ebenfalls Zytokinrezeptoren aufweisen [73].

1.2.3.3 Gestörte Blut-Hirn-Schranke

Eine Störung der Blut-Hirn-Schranke, beispielsweise durch IL-6 induziert, äußert sich in einer erhöhten Permeabilität, u.a. für die Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin [64]. Dies führt zu einer vermehrten Ansammlung ihrer Abbauprodukte Tyramin und Phenylethylenamin. Die ss-hydroxylierten Derivate dieser beiden Substanzen (z.B. ss-Phenylethylenamin und Octopamin) sind sogenannte „falsche Transmitter“ und verdrängen Dopamin und Noradrenalin an den neuronalen Synapsen [38]. Die erhöhte Permeabilität kann von vorübergehender Dauer sein, aber bei weiterer Exposition so stark ausgeprägt sein, daß nicht nur Störungen des Stoffwechsels und des chemischen Milieus auftreten, sondern auch der Übertritt von Mikroorganismen

aus dem Blut in das zentrale Nervensystem und damit die Gefahr der Bildung von Mikroabszessen begünstigt wird [6].

1.2.3.4 Ischämie

Da bei Autopsien von Sepsispatienten zerebral ischämische Nekrosen festgestellt wurden, wäre eine zerebrale Ischämie als Ursache der septischen Enzephalopathie denkbar [126]. Nach Maekawa [82] zeigt sich bei längerem Bestehen einer Infektion ein signifikant verringerter zerebraler Blutfluß und eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs des Gehirns. Ursache kann ein vermindertes Sauerstoffangebot, eine verminderte Hirnfunktion oder eine Verschlechterung der Sauerstoffutilisation auf zellulärer Ebene sein. Da jedoch auch bei einer Steigerung des Sauerstoffangebots keine Steigerung des zerebralen Sauerstoffverbrauchs eintritt, ist der Grund wohl eher auf zellulärer Ebene zu sehen [11]. Eine mögliche Ursache ist die durch NO vermittelte Störung der Sauerstoffutilisation [100]: Durch Endotoxine und Zytokine wird die induzierbare NO-Synthase stimuliert, die nachfolgend unphysiologisch erhöhten Mengen an NO wirken zytotoxisch: die Interaktion des NO mit Fe^{2+} -Gruppen in Proteinen bewirkt eine Oxidation des Eisens und damit eine Inaktivierung des Proteins. So kann die zelluläre Atmungskette durch NO unterbrochen werden, was zu Störungen in der Zellhomöostase und zum Zelluntergang führen kann. Eine Wiederherstellung ist nur durch eine Neusynthese möglich [6].

Zusätzlich kommt es bei einem Anstieg des NO zur Abnahme des Vasomotorentonus und Vasodilatation [96]. Dadurch nimmt der systemische Blutdruck ab, es resultiert eine Verminderung des zerebralen Perfusionsdrucks.

1.2.4 Therapie der Sepsis

Therapeutisch wird das Krankheitsbild Sepsis/septisches Organversagen/septische Enzephalopathie noch immer mit chirurgischer Herdsanierung und aggressiver Intensivtherapie angegangen. In 90% der Fälle führt dieses Vorgehen auch zum Erfolg [4]. Die Zukunft könnte zusätzlich folgende Interventionsmöglichkeiten bringen:

- „Antisepsiscocktail“: monoklonale Antikörper gegen Endotoxin, TNF- und IL-1-Rezeptorantagonisten [10]
- Unspezifische Elimination von Endo- und Exotoxinen (extrakorporale Ultrafiltration und Plasmapherese) [4]
- Inhibition von Stickoxidsynthetasen (z.B. L-Arginin-Analoga) → Eingriff in NO-Synthese [4]
- Interferon-Gamma, Inhibition der Prostaglandinsynthese mit Zykllooxygenasehemmern → Verstärkung der HLA-DR-Expression auf den Makrophagen → Beeinflussung der sepsisinduzierten Immunsuppression [4]
- Antikörper (molekularbiologisch), die die Bindung von Endotoxin an Makrophagen und die Adhärenz an Endothelzellen verhindern sollen

Alles spricht dafür, daß es sich bei der Ätiologie der septischen Enzephalopathie um ein multifaktorielles Geschehen handelt, dessen genauer Mechanismus noch nicht bekannt ist. Sicher ist, daß ihr Auftreten im Rahmen einer schweren Infektion mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist.

Sollte sich ein früher Marker für eine septische Enzephalopathie finden lassen, der somit eine Sepsis schon in der Anfangsphase erkennen ließe, wäre dies ein großer Vorteil bei der Behandlung der Sepsis. Die stufenweise Ausbildung des Krankheitsverlaufs könnte schon frühzeitig unterbrochen werden und somit der oftmals verhängnisvolle Ausgang einer Sepsis eingedämmt oder verhindert werden. Ein interessanter Ansatzpunkt liegt hierbei in der Erforschung der induzierbaren NO-Synthese, die eine wichtige Rolle im Sepsisgeschehen zu spielen scheint.

1.3 Stickoxid

Nicht nur bei pathologischen, sondern auch bei physiologischen Vorgängen spielt das Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle. Zunächst soll eine Übersicht über die Geschichte, die Biochemie, die Synthese und den Abbau des Moleküls gegeben werden, ehe auf die biologische Wirkung eingegangen wird.

1.3.1 NO historisch

Lange Zeit wurde angenommen, daß die NO-Synthese ausschließlich Mikroorganismen vorbehalten sei [27]. Aufgrund seiner hohen Reaktivität konnte man sich nicht vorstellen, daß NO in Säugetieren vitale Funktionen habe [12]. NO war außerdem als Bestandteil von Autoabgasen und Mitverursacher von photochemischem Smog bekannt [35].

1981 fiel Steven Tannenbaum et al. jedoch auf, daß Menschen und Ratten trotz einer nitratarmen Diät beträchtliche Nitratmengen im Urin ausscheiden [50,51,124]. Ein Schlüssel zu dieser Quelle kam von Studien, die zeigten, daß der Nitratspiegel im Urin bei Patienten mit Diarrhoe und Fieber erhöht war [56]. Marletta und Stuehr konnten 1987 nachweisen, daß eine Kombination von LPS und Interferon- γ in Makrophagen die Bildung von Nitraten bewirkte [119,120] und daß diese Bildung nach Entfernen von Arginin aus dem Inkubationsmedium geringer war. Dies führte zu der Annahme, daß ein spezifisches Enzym in Makrophagen aus Arginin ein Intermediärprodukt, das sich als NO erwies [84], bildete, welches wiederum zu Nitrit und Nitrat transformiert wird. Unabhängig davon fiel Hibbs die Fähigkeit von Makrophagen auf, Tumorzellen und Bakterien zu töten, dieser Effekt wurde geringer, wenn L-Arginin aus dem Medium entfernt wurde [54]. Alle diese Entdeckungen wiesen auf eine Funktion des endogenen NO als Immunmediator hin.

Eine andere Wirkung von NO ist die Gefäßdilatation. Schon im späten neunzehnten Jahrhundert war der therapeutische Effekt von Nitroglycerin bei Angina pectoris bekannt. So schrieb Alfred Nobel, der Erfinder des Dynamits, das als aktive chemische Substanz Nitroglycerin enthält, 1885 an einen Freund folgende Worte:

„Es klingt wie eine Ironie des Schicksals, daß ich auf Anraten meines Arztes Nitroglycerin einnehmen solle.“ [12]

In den späten 1970er Jahren konnten Murad und Ignarro nachweisen, daß Nitroglycerin und organische Nitrate selber inaktiv sind, sie jedoch nach Umwandlung in ein aktives metabolisches Produkt, nämlich NO, eine Blutgefäßrelaxation bewirken [3,61]. Außerdem zeigte Murad, daß die Relaxation nach Stimulation der cGMP-Bildung durch NO zustande kommt [108].

Unabhängig davon beschrieben Furchgott und Zawadzki 1980 [43] erstmals die Existenz eines vom Endothel freigesetzten Faktors, der nach Stimulation durch Acetylcholin eine Dilatation der dazugehörenden glatten Gefäßmuskulatur bewirkt. Davor wurde allgemein angenommen, Acetylcholin würde direkt an der glatten Gefäßmuskulatur angreifen und eine Relaxation verursachen. Sie bezeichneten diesen Faktor als „endothelium-derived relaxing factor“(EDRF), der über einige Jahre wegen seiner extremen Kurzlebigkeit nicht genauer identifiziert werden konnte.

Erst gegen Ende der 80er Jahre gelang es drei Forschergruppen unabhängig voneinander, darunter auch Furchgott, EDRF als Stickstoffmonoxid zu identifizieren [42,59,99]

Daß NO auch eine neuronale Rolle spielt, zeigte sich erstmals 1977, als Deguchi auffiel, daß zur cGMP-Aktivierung im Gehirn die Aminosäure Arginin benötigt wird [31,32]. Moncada konnte ein NO-bildendes Enzym (NO-Synthase, NOS) im Gehirn nachweisen [72]. Bredt und Snyder zeigten, daß die NOS-Aktivität nach NMDA-Rezeptor-Stimulation um 300% gesteigert wird [14].

1.3.2 NO-Biochemie

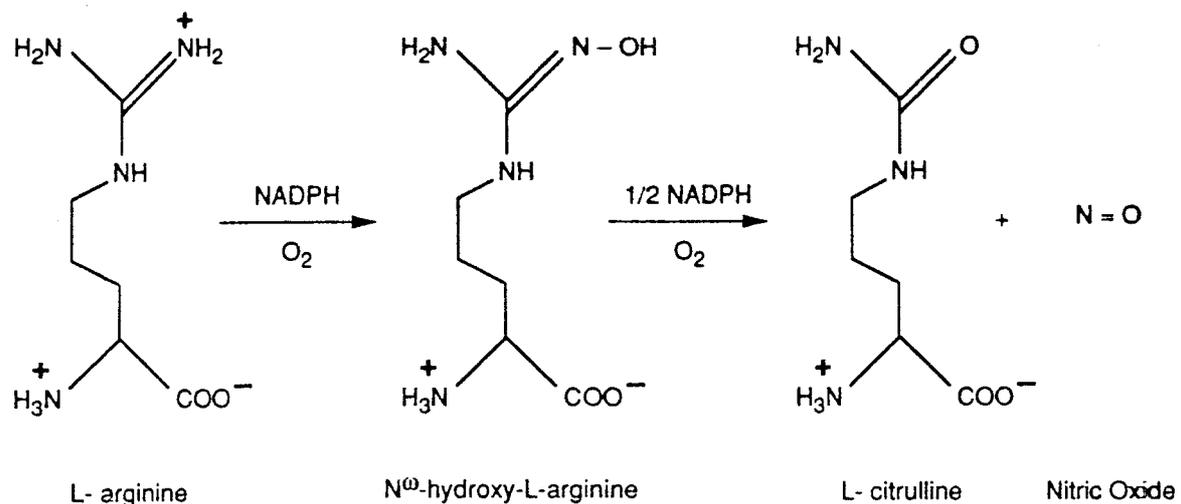
Stickstoffmonoxid, chemisch „NO•“ und mit dem freien Elektron hochreaktiv [35], ist ein farbloses Gas, das unter Ausschluß von Sauerstoff in Wasser löslich und unter diesen Bedingungen sehr stabil ist. In Luft reagiert NO sehr schnell mit Sauerstoff, es entsteht NO₂, ein braunes Gas, das Gewebeschäden induzieren kann [87]. In Blut wird NO innerhalb von 3-5 Sekunden [12] durch Interaktion mit der Hämgruppe des Hämoglobins [69] zu Nitrit (NO₂-) oxidiert, das schnell zu Nitrat (NO₃-) konvertiert wird. Demnach ist die Nitratkonzentration im Blut mit 30µmol/l etwa 100mal höher als die Nitritkonzentration [87].

Trotz seiner hohen Diffusibilität [44], die theoretisch ein Erreichen jeden Ortes innerhalb von Zellen und Geweben möglich machen würde, wird die Reichweite durch oben beschriebene hohe Reaktionsbereitschaft und kurze Halbwertszeit auf etwa ein bis zwei Zelllinien beschränkt [60].

1.3.3 NO-Synthese und -abbau

NO wird von dem Enzym NO-Synthase (NOS, 130-150 KD [87]) in einer 5-Elektronen-Oxidation einer Guanidinogruppe der Aminosäure L-Arginin aus L-Arginin gebildet, es entsteht in zwei aufeinanderfolgenden Schritten neben NO auch L-Citrullin. Als Intermediärprodukt wird N^ω-Hydroxyarginin gebildet, das eng an die NO-Synthase gebunden ist. Für die gesamte Reaktion werden die Kofaktoren NADPH, Tetrahydrobiopterin (THB), Flavinadeninmononucleotid (FMN), Flavinadenindinucleotid (FAD), Calmodulin und Kalzium benötigt. Man geht bei der Rolle des THB davon aus, daß es durch Stabilisierung der NO-Synthase die Bindung des L-Arginin erleichtert [47,57,83].

Der Sauerstoff im NO stammt von molekularem Sauerstoff (O₂).



NO-Biosynthese [27]

Es werden drei Isoenzyme der NO-Synthase unterschieden:

Die neuronale NOS (nNOS oder NOS1), die v.a. in zentralen und peripheren Gehirnzellen vorkommt, die endotheliale NOS (eNOS oder NOS3), die v.a. in Endothel- und Epithelzellen lokalisiert ist, und die induzierbare NOS (iNOS oder

NOS2) [25]. Neuronale und endotheliale NOS werden als „konstitutive“ NOS („cNOS“) zusammengefaßt, da für ihre Aktivierung keine neue Proteinsynthese nötig ist, d.h. sie sind immer exprimiert [91]. Zwischen cNOS und iNOS gibt es einige wichtige Unterschiede, die nachfolgend näher erörtert werden sollen [69]:

Die membrangebundene cNOS ist neben Endothelzellen und Neuronen auch in Thrombozyten lokalisiert, sie ist permanent vorhanden und bei Kalziumeinstrom aktiv. Die NO-Freisetzung erfolgt schnell und vorübergehend, die freigesetzten NO-Konzentrationen bewegen sich im picomolaren Bereich. Dagegen wird die zytosolische iNOS (Vorkommen: Makrophagen, Leukozyten, Kupffer-Zellen, mesangiale Zellen, verschiedene Parenchymzellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen) erst nach Induktion durch proinflammatorische Stimuli wie Endotoxin, Zytokine u.a. aktiv. Die Aktivität ist unabhängig von Kalzium, die Freisetzung des NO geschieht verzögert und hält lange an, wobei die NO-Konzentrationen im nanomolaren Bereich liegen.

Characteristics of the constitutive (cNOS) and the inducible (iNOS) nitric oxide synthase.		
Characteristics	cNOS	iNOS
Site	endothelial cell, platelets, neurons	leucocytes, macrophages, Kupffer cells, mesangial cells, different parenchymal cells, endothelial cells, smooth muscle cells
Activity	permanent	induced by inflammatory stimuli; endotoxin, cytokines
Calcium-influx	dependent	independent
Membrane binding	yes	no
Release	short-lived and rapid	delayed and sustained
Concentration	picomoles (physiology)	nanomoles (pathophysiology)
Inhibitors	L-argininanalogue glucocorticoides -	L-argininanalogue glucocorticoides +

Charakteristika der cNOS und iNOS [69]

Wegen seiner Neuro- und Zelltoxizität ist es wichtig, daß NO schnell, lokal und sofort seine Wirkung beendet. Da NO nicht konventionell gespeichert, freigesetzt oder inaktiviert werden kann, ist die Biosynthese der NO-Synthase für die Regulation der NO-Ausschüttung von besonderer Bedeutung. Tatsächlich ist die NO-Synthase eines der meist-regulierten Enzyme in der Biologie [12].

Insbesondere die Aktivität der nNOS wird über das intrazelluläre Kalziumangebot gesteuert: Kalzium bewirkt durch Interaktion mit Calmodulin eine NOS-Aktivierung: Im myenterischen Nervensystem, wo NO als Neurotransmitter wirkt, wird der Kalziumeinstrom über spannungsabhängige Kalziumkanäle vermittelt. Im Gehirn findet der Einstrom über NMDA-Rezeptoren, die durch Glutamat stimuliert werden,

statt. Auch im Skelettmuskel kann eine nNOS nachgewiesen werden, hier geschieht der Kalziumeinstrom während der Depolarisation [12].

Die Regulation der iNOS, die Calmodulin fest gebunden hat und so kalziumunabhängig ist, findet vor allem auf der Ebene der Biosynthese statt: Eine kurzfristige Kontrolle wird durch allosterische Regulation, posttranslationale Modifikation und subzelluläres Targeting ermöglicht, langfristiger ist die Regulation durch Gentranskription [94].

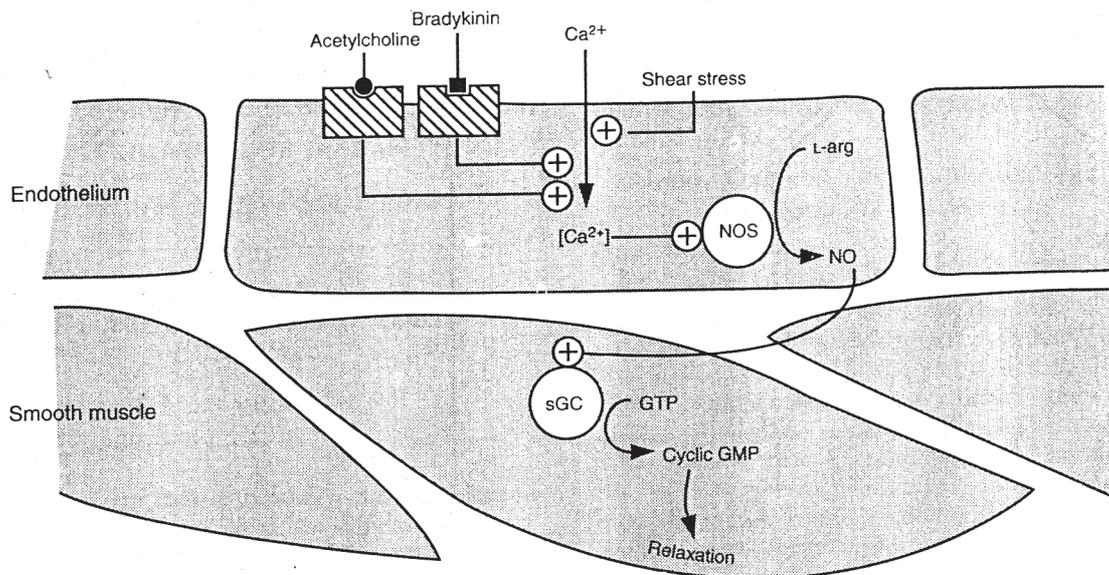
Auch die Änderung der Konzentration von Substraten und Kofaktoren kann die NO-Produktion regulieren.

1.3.4 NO - biologische Wirkung

Die nachfolgend aufgeführten Effekte des NO werden über eine Aktivierung des löslichen, häm-enhaltenden zytosolischen Enzyms Guanylatzyklase (GC) in der Zielzelle durch Reaktion des NO mit der prosthetischen Hämgruppe vermittelt [87]. Die GC wiederum produziert als second messenger Guanosin 3',5'-cyclisches Monophosphat (cGMP), welches unter Verminderung des intrazellulären Calciumspiegels eine Kaskade intrazellulärer Ereignisse auslöst, die schließlich in der eigentlichen NO-Wirkung wie Vasodilatation, verminderte Thrombozytenaggregation und -adhäsion u.a. (siehe unten) mündet [69].

1.3.4.1 NO im Gefäßsystem

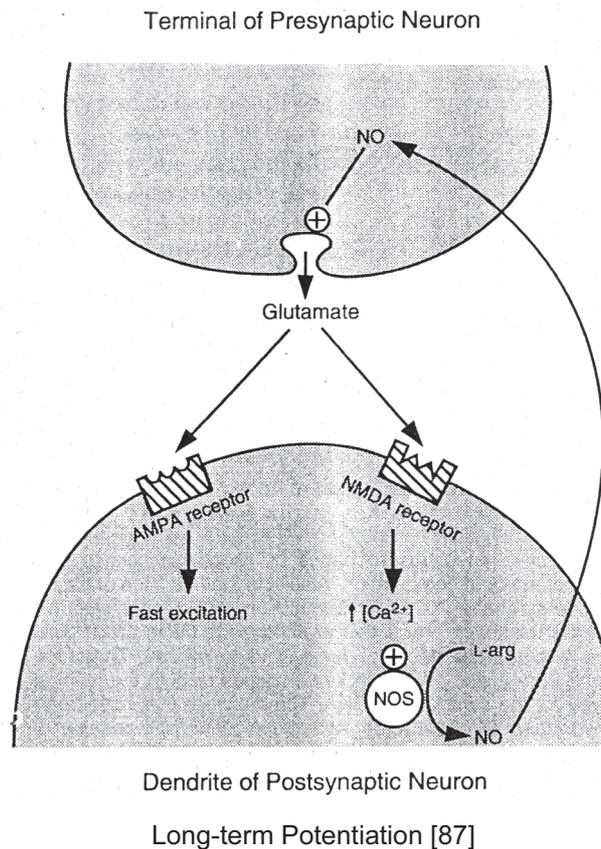
Das vom Gefäßendothel freigesetzte NO (produziert durch die endotheliale NO-Synthase) wirkt durch Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle vasodilatatorisch und ist an der Regulation des Gefäßtonus in verschiedenen Organen beteiligt [67,68,93]. Es spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulierung und Blutflußverteilung [18]. Stimuliert wird die Freisetzung durch rezeptorabhängige Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin, Histamin, Adeninnukleotide und Serotonin, rezeptorunabhängig durch freie Fettsäuren [69]. Außerdem wird die Produktion durch Viskosität, Pulsatilität und Fluß des Blutes („flow-mediated vasodilation“) [26] und durch Scherkräfte am Gefäß [87] beeinflusst.



NO-Physiologie im Endothel [87]

1.3.4.2 NO als Neurotransmitter

Im ZNS machen NOS-haltige Neurone nur 1-2% aller Neurone aus, sie kommen u.a. im cerebralen Kortex, im Hippokampus, im Corpus striatum und im Kleinhirn vor [27]. Die Verteilung zeigt dabei kein bestimmtes Muster [27]. Die Stimulation von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren durch Glutamat triggert einen Kalziumeinstrom, Kalzium bindet sich an Calmodulin und aktiviert so die NO-Synthase, was zur Freisetzung von NO innerhalb von Sekunden führt [15]. Im ZNS scheint NO an der Gedächtnisbildung beteiligt zu sein [7,98,112]. Es ist hierbei essentiell für zwei Formen der neuronalen Plastizität, also dem Modell des Lernens: Die long-term Potentiation (LTP) im Hippokampus [113] und long-term Depression (LTD) im Kleinhirn [114]. Die LTP bezeichnet den Effekt, daß eine wiederholte, geringe im Gegensatz zur einmaligen, starken Synapsenaktivierung zu einer effektiveren und langanhaltenderen Neurotransmission führt: Im Sinne eines retrograden Transmitters mit positivem feed-back kann postsynaptisch freigesetztes NO zum präsynaptischen Neuron diffundieren und dort zu einer vermehrten Glutamatfreisetzung mit nachfolgender NMDA-Aktivierung und damit verstärkten NO-Freisetzung führen [23].



Außerdem scheint NO Einfluß auf die Freisetzung anderer Neurotransmitter zu haben: einige Versuche zeigten, daß NOS-Inhibitoren, wie Nitroarginin, die Freisetzung von Neurotransmittern verhinderten [34, 54, 78, 134]. Weitere, noch nicht abschließend erforschte Wirkungen des NO im ZNS sind seine Rolle beim Sehvorgang [122], beim Freßverhalten [90], bei Nozizeption [89] und beim Riechvorgang [16].

In der Peripherie gibt es ein weit verbreitetes Netzwerk von Nerven mit ehemals als non-adrenerger-non-cholinerg (NANC) bezeichneter Erregungsübertragung, das durch einen NO-abhängigen Mechanismus zu neurogener Vasodilatation und Regulation verschiedener gastrointestinaler, respiratorischer und genitouritaler Funktion führt [87]. Im Intestinum ist die neuronale NO-Synthase in Axonenfortsätzen myenterischer Neurone lokalisiert [13]. Die während der Peristaltik ablaufenden Aktionspotentiale bewirken einen Kalziumeinstrom, wodurch Calmodulin aktiviert wird, was wiederum die nNOS stimuliert. Die entsprechenden glatten Gefäßmuskelzellen enthalten als NO-Rezeptor die lösliche Guanylyzyklase. NO bewirkt über Bindung an diesen Rezeptor einen Anstieg des cGMP und vermittelt so die intestinale Relaxation [12].

1.3.4.3 NO als Immunmodulator

Ein weiterer NO-Effekt ist seine Wirkung auf Thrombozyten und Leukozyten: NO reduziert die Aggregation, Adhäsion und Aktivierung [18,88,107].

Über eine negative Rückkopplung durch NO, das Thrombozyten auch selber bilden, kann die Plättchenaktivierung gehemmt werden [106]. Die NOS-Induktion in Makrophagen scheint ein wichtiger Beitrag zur unspezifischen körpereigenen Abwehr zu sein: Das in Makrophagen synthetisierte NO wirkt zytotoxisch gegen Bakterien, Protozoen und Tumorzellen [1,76]. Wie diese Wirkung zustande kommt, ist noch unklar, möglicherweise spielt die Produktion von Antioxidantien wie Hydroxide (OH-) und Nitrite (NO₂-) aus Peroxynitrit eine Rolle [69]. Eine andere Erklärung könnte in der Bindung des NO an die Eisen-Sulfhydril Gruppen der mitochondrialen Atmungskette und damit des Zelluntergangs liegen [69].

Es gibt Anzeichen, daß NO auch eine Rolle bei der spezifischen Abwehr spielt: durch Effekte auf Lymphozyten und T-Helferzellen wirkt es mit an der Antwort auf Fremdgewebe und damit bei der Transplantatabstoßung [69]. Es scheint zur Verhinderung der zellvermittelten Abstoßung beizutragen [128]. Genaue Daten liegen allerdings noch nicht vor.

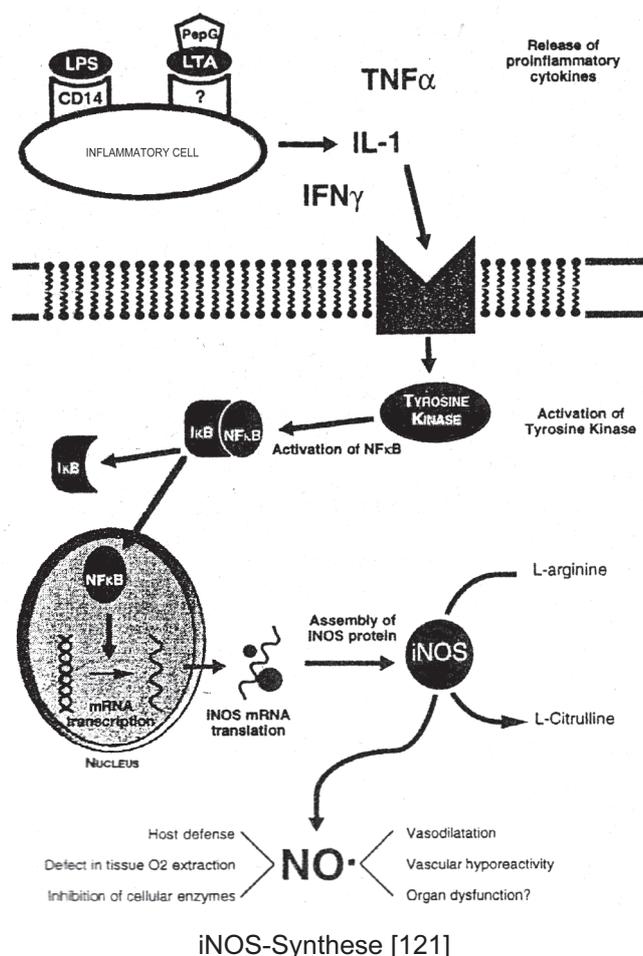
Im weitesten Sinn kann man bei vorbeschriebenen Wirkungen des durch die konstitutive NO-Synthase produzierten Stickstoffmonoxids von „physiologischen“ Vorgängen sprechen. Um auf die Rolle des Stickstoffmonoxid speziell bei Sepsis/bei der septischen Enzephalopathie zurückzukommen, soll nun die oben bereits erwähnte induzierbare NO-Synthase, die zur Synthese wesentlich größerer Mengen an NO fähig ist, wiederaufgegriffen werden.

1.3.4.4 NO-Produktion durch die iNOS

1.3.4.4.1 iNOS-Induktion und -Synthese

Wie schon unter „NO-Synthese und Abbau“ beschrieben, können sepsisassoziierte Mediatoren wie Endotoxin und die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor (TNF) und Interferon- γ (IF- γ) in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Monozyten,

Mastzellen, Makrophagen, Kupffer-Zellen und Neutrophilen [25, 110] eine kalziumunabhängige Isoform der NO-Synthasen induzieren, die iNOS [94]. LPS oder Endotoxin bindet an den CD14-Rezeptor inflammatorischer Zellen, z.B. Makrophagen, was zur Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und $\text{IFN-}\gamma$ führt. Über einen noch nicht genauer bekannten Rezeptor können auch Wandfragmente grampositiver Bakterien eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bewirken. Bindung dieser Zytokine an Zellen, die iNOS exprimieren können, führt über eine Aktivierung der Tyrosinkinase zur proteolytischen Abspaltung des Inhibitors $\text{I}\kappa\text{B}$ vom nuklearem Transskriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$. Der nun aktivierte Transskriptionsfaktor kann im Zellkern an die Promotorregion des iNOS-Gens binden und die Transskription starten. Die Translation der iNOS-mRNA führt zur Bildung von iNOS-Protein und damit zu gesteigerter NO-Synthese [121].



Für die Expression der iNOS sind einige Stunden nötig: Werden Makrophagen mit $\text{IF-}\gamma$ und LPS stimuliert, ist die iNOS-mRNA nach zwei Stunden und das iNOS-

Protein nach vier Stunden vorhanden. Das iNOS-Protein bleibt für einige Tage nachweisbar [133].

Die Induktion des iNOS-Proteins im Gehirn kann verschiedene Ursachen haben: ein primäres Geschehen wie Ischämie, Trauma, Infektionen o.a. oder Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose oder periphere Geschehen wie systemische oder lokale Entzündung [75, 91]. Normalerweise ist iNOS-Protein im Gehirn nicht nachweisbar, so daß diese Isoform bei der akuten Phase nach einem derartigen Ereignis noch keine Rolle spielt [12]. Durch Endotoxine und/oder proinflammatorische Zytokine (s.o.) wird in reaktiven Astrozyten und infiltrierten Neutrophilen das iNOS-Protein induziert, der iNOS-Peak tritt innerhalb von 48 Stunden auf [12].

1.3.4.4.2 Negative Auswirkungen der vermehrten NO-Synthese durch die iNOS und mögliche Therapieansätze der Sepsis durch Hemmung der iNOS

Eine erhöhte NO-Synthese im ZNS wirkt neurotoxisch: Viele Nervenschäden, darunter solche, die mit Apoplex oder Neurotoxinen assoziiert sind, können auf eine exzessive Glutamatfreisetzung und damit NMDA-Rezeptoraktivierung zurückgeführt werden [20]. Dawson und Mitarbeiter konnten nachweisen, daß die Behandlung mit NOS-Inhibitoren, die Entfernung von L-Arginin oder die Zugabe von reduziertem Hämoglobin, einem NO-Fänger, diese Form der Toxizität blockieren [29]. Simon et al. zeigten in einem Tiermodell, daß NMDA-Rezeptorantagonisten protektiv bei zerebraler Ischämie wirken [115]. nNOS knockout-Mäuse sind resistent gegenüber NMDA-Neurotoxizität [30]. Diese glutamat-vermittelte Neurotoxizität spielt auch eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M.Alzheimer, Chorea Huntington und Multiple Sklerose [15]. (Allerdings zeigten einige Studien keinen Zusammenhang von NO und Glutamatneurotoxizität [33,103,109]) Die NOS-Neurone selber werden jedoch von dieser Neurotoxizität verschont [15]. Ein Grund dafür könnte das Vorhandensein einer Superoxiddismutase sein, die in den NOS-Neuronen die Bildung des toxischen Peroxynitrit verhindert [49]. Abhängig von seinem Oxidations-Reduktionsstatus hat NO auch eine neuroprotektive Wirkung: NO⁻ wirkt neurodestruktiv und NO⁺ neuroprotektiv [77]. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß NO⁺ im Sinne einer negativen feed-back-Hemmung durch Bindung

an die Thiolgruppe des NMDA-Rezeptors die weitere Bildung von NO- unterbindet [35].

Die gängige Meinung über zytokininduziertes NO ist, daß die exzessive NO-Produktion durch die iNOS schädliche Effekte wie Hypotension [66] und myokardiale Depression [37] zur Folge hat. Die am besten untersuchten Rollen von NO bei Entzündungen sind die Vasodilatation und Migration und Aktivierung von Leukozyten [69]. Offensichtlich trägt die stark gesteigerte NO-Synthese dadurch zu einigen der pathophysiologischen Erscheinungen einer Entzündungsreaktion bei: Vasodilatation, erhöhte Gefäßpermeabilität und Extravasation, Migration und Aktivierung von Leukozyten [69]. Das bei septischem Schock in großen Mengen gebildete NO [87] kann demnach für die systemischen Auswirkungen einer Sepsis verantwortlich gemacht werden: das Kreislaufversagen, das mit einem Schock unterschiedlicher Genese assoziiert ist, ist durch starken Blutdruckabfall (periphere Vasodilatation), Hyporeaktivität der Gefäße gegenüber Vasokonstriktoren wie Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, myokardiale Dysfunktion, Veränderung der Blutvolumenverteilung zu den Organen und verminderte Sauerstoffausschöpfung des Gewebes gekennzeichnet.

Experimente mit iNOS knockout-Mäusen weisen auf eine entscheidende Rolle von NO bei LPS-induziertem Tod hin: iNOS knockout-Mäuse zeigen bei LPS-induzierter Sepsis nur minimale Symptome, wohingegen wild-typ-Mäuse starke Symptome aufweisen und eine 60% Mortalität haben [81,125]. Die Hemmung der iNOS könnte also einen positiven Ansatz bei der Therapie der hochletalen Sepsis darstellen [21]. In einer Studie mit 15 Patienten mit Sepsissyndrom, die eine Behandlung mit dem NOS-Inhibitor N ω -nitro-L-Arginin erhielten, beschrieben Lorente und Mitarbeiter [79] einen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks, des zentralvenösen Drucks, des pulmonalarteriellen Verschußdrucks, des systemischen und pulmonalvaskulären Gefäßwiderstands. Es wurde jedoch auch eine Senkung der Herzrate, des kardialen Index (~1l/min oder 20-30% [69]) und der Sauerstoffverteilung beobachtet. Durch Gabe von L-Arginin konnten diese Effekte wieder aufgehoben werden. Andere Untersuchungen mit septischen Patienten [46,104] und Tiermodellen [22,66,71] bestätigen diese Ergebnisse. Sie unterstützen die Hypothese, daß NO zumindest für die Vasodilatation im septischen Schock verantwortlich ist. N ω -nitro-L-Arginin verhindert reversibel eine exzessive NO-Produktion und scheint positiv auf die vasopressorrefraktäre Hypotension und die abnorme Vorlast, die charakteristisch für

den septischen Schock sind, zu wirken [21]. Mehr als 50% der Patienten, die am septischen Schock versterben, haben eine Hypotension mit hohem kardialen Auswurf, die refraktär auf Vasopressoren ist [102]. In diesem Fall ist die Gabe von NOS-Inhibitoren eine verlockende Therapiemöglichkeit. Jedoch lassen Lorentes und andere Studien im unklaren, ob die NO-Produktion gehemmt oder verstärkt werden soll: der antivasodilatatorische Effekt von N ω -nitro-L-Arginin-Gabe bei Sepsis wurde gleichzeitig von einem Abfall des kardialen Index und der Sauerstoffverteilung begleitet [21]. Cobb [22] betont, daß es keinen Tierversuch gibt, der eindeutig eine positive Wirkung von NOS-Inhibitoren bestätigt. Es gibt auch einige experimentelle Studien, die entweder keinen Effekt einer Hemmung der NO-Synthase oder sogar schädliche Effekte feststellten [69]: Strand und Mitarbeiter [118] konnten keinen Einfluß von NG-monomethyl-L-Arginin oder dem selektiven iNOS-Inhibitor S-(2-aminoethyl)-isothiourea auf die Mortalität bei Sepsis feststellen. Entsprechend brachte NG-monomethyl-L-Arginin keine Verbesserung einer endotoxin-induzierten Hypotension bei Hunden [70]. Auch Vromen und Mitarbeiter [123] zeigten, daß eine selektive iNOS-Hemmung durch Merkaptoethylguanidin bei septischen Ratten keinen Effekt auf die Gefäßhyporeaktivität oder Mortalität hat. Minnard und Mitarbeiter [86] beschrieben in einem Mäusemodell mit LPS-induzierter Sepsis sogar eine erhöhte Mortalität und Verschlechterung der Lungenfunktion nach NG-monomethyl-L-Arginin. Kirkeboen [69] vertritt die Ansicht, daß es für den positiven Effekt von NOS-Inhibitoren ein therapeutisches Fenster gebe, das wohl eher in der mittleren bis späten Phase eines septischen Schocks liege. Allerdings ist dieses Fenster noch nicht genau definiert. Außerdem scheint eine kontinuierliche, niedrig dosierte Infusion günstiger zu sein, als eine Bolusgabe mit hoher Konzentration [69].

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Versuchskandidaten (junge, gesunde Versuchstiere versus hospitalisierte Patienten mit oft präexistenter koronarer oder endothelialer Dysfunktion) und Modellen, der Art und Dosierung der NOS-Inhibitoren und im Zeitpunkt der Gabe liegen [69]. Die bis jetzt durchgeführten Studien fanden nur mit relativ unspezifischen NOS-Hemmern statt, so daß evtl. selektive iNOS-Hemmer einen größeren therapeutischen Index haben [69]. Ein Problem unselektiver NOS-Hemmer liegt sicher im Problem der irreversiblen Vasokonstriktion [125].

1.3.4.4.3 Mögliche positive Auswirkungen der vermehrten NO-Synthese durch die iNOS

Betrachtet man die Widersprüchlichkeit einer Therapie mit NOS-Inhibitoren, kann auch die Rolle von NO selbst während Infektion und Sepsis nicht eindeutig sein. Bis jetzt wurde vor allem auf die schädlichen Wirkungen einer exzessiven NO-Bildung nach Induktion der iNOS eingegangen. In der Literatur finden sich fast ausschließlich Artikel mit den bekannten negativen Effekten von NO bei Sepsis, wie Hypotension durch Vasodilatation und Herzversagen, erhöhte Gefäßpermeabilität und Hyporeaktivität auf Vasopressoren wie Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin [8]. „Ist zytokin-induziertes NO einfach nur der böse Zwillingsbruder des konstitutiven NO?“ [65]. Es erscheint angesichts der weitverbreiteten Angriffsmöglichkeiten zu einfach, der zytokin-induzierten NO-Produktion ausschließlich schädliche Effekte zuzuschreiben. Nach Lowenstein spielt es eine wichtige Rolle bei der normalen Körperantwort auf Infektionen [80]. Dazu gehört die Zerstörung von Mikroorganismen und Tumoren [95]. Dawson [27] vermutet durch die weite Verteilung der iNOS im Körper (Gehirn [92], Hepatozyten [45], Chondrozyten [19], Makrophagen, verschiedene andere Zellen) eine primitive Art der Immunantwort auf die Invasion mikrobieller pathogener Keime. Auch scheint eine kardioprotektive Wirkung bei Ischämie zu bestehen: Brown und Mitarbeiter [17] zeigten, daß eine Vorbehandlung mit LPS eine Verbesserung der kontraktilen myokardialen Dysfunktion nach Ischämie bewirkte. Dieser Effekt ist dosisabhängig und wird durch Hämoglobin außer Kraft gesetzt. Von Hämoglobin ist bekannt, daß es durch Bindung an NO dessen Wirkung beendet [80]. Auch Xi [132] beschreibt bei Ischämie einen kardioprotektiven Effekt bei Vorbehandlung mit LPS. Demnach kann LPS und/oder Ischämie eine zytokin-vermittelte Antwort auf Schaden durch Stimulation von Myozyten in Gang setzen, die wiederum NO bilden und so das Herz vor einer weiteren Mangel durchblutung schützen [65]. Auch im Gehirn scheinen positive iNOS-Effekte während Sepsis zu bestehen: Es findet eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse durch NO-induzierten Anstieg des Corticotropin-releasing-Hormon-Spiegels im Nucleus paraventricularis [24] statt. Kirkeboen [69] faßt die möglichen negativen Auswirkung einer systemischen NO-Hemmung bei Sepsis zusammen: verminderte Leber- und Nierenfunktion, erhöhter Lungenhochdruck, verminderter koronarer

Blutfluß, verminderte Gewebedurchblutung, erhöhte Leukozytenadhäsion an das Endothel und erhöhte Thrombosegefahr.

Trotz einem starken Hinweis auf diverse negative Auswirkungen einer exzessiven NO-Bildung, darf man auch die positiven Effekte bei der weiteren Forschung von NO bei Sepsis nicht unberücksichtigt lassen.

1.3.4.4 Überflutung des Gehirns mit NO durch eine hochregulierte iNOS als mögliche Ursache der septischen Enzephalopathie

Für die Auswirkungen einer Überflutung des Gehirns mit NO durch eine hochregulierte iNOS als mögliche Ursache der septischen Enzephalopathie lassen sich mehrere Theorien aufstellen. Anzunehmen ist, daß NO als sehr instabiles Molekül mit einer Reichweite von nur wenigen Zelllagen [60] im Wesentlichen nur dort wirkt, wo es produziert wird. Deshalb ist es möglich, daß selbst größte Mengen von NO, die von der iNOS produziert werden, keinen Einfluß auf die Neurotransmission haben. Eine andere Vorstellung ist folgende: Neurotransmitter wirken in der Regel über ihre Konzentrationsunterschiede. Die NO-Synthese wird durch verschiedene Zytokine, unter anderem auch durch NO reguliert. Dabei wirkt NO im Sinne eines negativen Feedbacks, d.h. große Mengen von NO hemmen die weitere Produktion von NO [28]. Die iNOS benötigt jedoch viel größere Mengen NO, um gehemmt zu werden als die nNOS [52]. Deshalb führt die exzessive Produktion des Neurotransmitters NO durch die iNOS zur Hemmung der Produktion des Neurotransmitters NO durch die nNOS. Durch einen konstant hohen NO-Spiegel kann damit die Neurotransmission aufgehoben sein, da die normalerweise minimalen Konzentrationsunterschiede aufgehoben werden. Dies in Zusammenhang mit dem negativen Feedback von NO auf die NOS könnte bei der Entwicklung einer septischen Enzephalopathie eine Rolle spielen, da durch verminderte Mengen von NO als Neurotransmitter die Vigilanz eingeschränkt ist. Unter einer verminderten nNOS-Aktivität könnten auch verschiedene kognitive Leistungen, u.a. das Gedächtnis, leiden und somit zum Bild der septischen Enzephalopathie beitragen. Eine andere Möglichkeit ist, daß NO als Neurotransmitter wirkt. Da es über Glutamat erregend wirkt, kann es zu Übererregbarkeit kommen, was zu einem Teil des klinischen Bildes der septischen Enzephalopathie passen würde, den zerebralen

Krampfanfällen. Möglich ist jedoch auch, daß alle Mechanismen an verschiedenen Orten gleichzeitig greifen und dadurch ein Chaos der Neurotransmission entsteht.

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In vorliegender Arbeit ging es darum, eine qualitative und quantitative Aussage über den Zusammenhang der iNOS, der nachfolgend erhöhten NO-Spiegel und der beobachteten septischen Enzephalopathie bei Sepsis zu finden. Dazu wurden infizierte Ratten auf dem Höhepunkt der begleitenden septischen Enzephalopathie, die mittels eines Vorversuchs (s. Einleitung) auf den dritten Tag post infectionem datiert wird, getötet und deren Gehirne auf den Proteingehalt und die Aktivität von nNOS und iNOS untersucht.

Die Arbeitshypothese war, daß die systemische iNOS-Induktion neben den bekannten peripheren Wirkungen (Hypotension, Resistenz gegenüber Vasokonstriktoren und erhöhte Gefäßpermeabilität) auch Einfluß auf die nNOS hat, bzw. ob nicht sogar im Gehirn selbst eine induzierbare NO-Synthase nachweisbar ist. Von Interesse war dabei eine mögliche Auswirkung auf die Enzymaktivität und auf den basalen Proteingehalt. Als Marker für den NO-Spiegel wurde im Serum Nitrit/Nitrat bestimmt, da die direkte Bestimmung des NO aufgrund seiner Kurzlebigkeit nicht möglich ist. Daneben wurde der Anteil des Methämoglobin am Gesamthämoglobin gemessen.

3 Methoden

3.1 Studiendesign und Versuchstiere

Es wurden 16 Ratten randomisiert in 2 Gruppen aufgeteilt: eine Gruppe aus 8 Tieren erhält am Tag 1 des Versuches in Inhalationsnarkose (Sevofluran) über die V.dorsalis penis eine Injektion mit 0,56mg/kg Körpergewicht corynebacterium parvum (Firma Roche; Penzberg, Deutschland) in 0,5ml NaCl. Die Kontrollgruppe, ebenfalls 8 Tiere, bekam statt corynebacterium parvum eine äquivalente Menge (0,5ml) 0,9% NaCl injiziert.

Die Gehirne der Tiere wurden auf Aktivität und Proteingehalt von nNOS und iNOS untersucht. Im Serum wurde der Nitrit/Nitrat-Spiegel bestimmt.

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley-Ratten der Firma Charles River (Kissleg, Deutschland). Am Tag 3 wurden die Tiere in Vollnarkose (Inhalationsnarkose mit Sevofluran) endotracheal intubiert und kontrolliert mit einem Lachgas/Sevofluran/Sauerstoffgemisch beatmet. Der FiO₂- betrug 0,4, das arterielle CO₂ 36-40mmHg. In tiefer Narkose wurde die Aorta abdominalis punktiert und das Tier entblutet. Sofort im Anschluß (innerhalb von 2 Minuten) wurde das Gehirn entnommen, auf Trockeneis gegeben und für die Laborversuche (Westernblot, NOS-Assay) bei -70°C tiefgefroren. Bei allen Tieren wurde zusätzlich direkt nach der Tötung Blut entnommen und daraus das Serum gewonnen. Als Vergleich diente Gehirn und Serum einer gesunden Kontrollgruppe von Ratten.

3.2 Labormethoden

Die verwendeten Puffer und Mischungen finden sich im Anhang („7 Anhang“).

3.2.1 Probenaufbereitung

Von den bei -70°C tiefgefrorenen Rattengehirnen wurden mittels Kryostat $3 \times 25 \mu\text{m}$ breite Transversalschnitte folgender 4 Ebenen gewonnen: präfrontaler Kortex, subfornikales Organ, nucleus paraventricularis und nucleus arcuatus. Die Regionen wurden durch Nissl-Färbung sichtbar gemacht.

Zur weiteren Verarbeitung wurde Lysispuffer mit Proteinaseinhibitor (Complete Mini™ EDTA free, Rosch, Deutschland) in einer Konzentration von einer Tablette auf 10ml Lysispuffer hergestellt. Die einzelnen Ebenen wurden in $350 \mu\text{l}$ hiervon unter Zugabe von 3-5 Mahl-Kügelchen (N 039, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) in einer Kugelmühle (MM 200, Retsch, Haan, Deutschland) bei einer Frequenz von 30000 Hertz und einer Umgebungstemperatur von 4°C über 30 Sekunden homogenisiert.

Anschließend wurde das feste Gewebe bei 13000 U/min über 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Von den Überständen wurde mit Bradfordreagens (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) im Photometer bei 595nm die Proteinkonzentration bestimmt. Bovines Serum Albumin (BSA, bovines Albumin, Fraktion V, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) in einer Verdünnungsreihe mit 8 Verdünnungsschritten, jeweils in 10% Glycerol in 1%PBS als Grundmedium, diente als Standard.

Für den Westernblot wurden die Homogenate der verschiedenen Schnittebenen eines Tieres anteilig mit Lysispuffer+Proteinaseinhibitor auf $60 \mu\text{l}$ mit einer gleichen Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$] gebracht, mit $60 \mu\text{l}$ handwarmen reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C gekocht und anschließend die letzten festen Bestandteile abzentrifugiert.

Für den NOS-Assay wurden $>240 \mu\text{l}$ der Überstände unverdünnt aufbewahrt.

Sowohl die Materialien für den Westernblot als auch für den NOS-Assay wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C tiefgefroren.

3.2.2 Westernblot-Analyse

3.2.2.1 Standardherstellung

Für den nNOS-Standard wurde das Gehirn einer gesunden Ratte in Lysispuffer+Proteinaseinhibitor (s. „3.2.1 Probenaufbereitung“) homogenisiert, das feste Gewebe bei 13000 U/min und 4°C abzentrifugiert und vom Überstand die Proteinmenge bestimmt. Es wurde nun die Verdünnung mit Lysispuffer errechnet, die zu einer Proteinmenge von 30µg/10µl führte, so daß nach der 1:1-Verdünnung mit reduzierendem Probenpuffer 30µg Protein je 20µl Gemisch vorlagen. Da wir später beim Westernblot nur 20µg Protein je Geltasche einpipettierten, verwendeten wir 13,3µl des Standardgemisches, was 20µg Protein entspricht.

Als iNOS Standard verwendeten wir gekaufte iNOS (LOT L 04695, 148µg/µl).

3.2.2.2 Durchführung des Westernblots

Zunächst wurden 7% SDS-PAGE Gele mit den Ausmaßen 12x15cm gegossen. Dazu wurden zwei Glasplatten der Größe 16x18cm mit seitlichen Abstandhaltern, die die Platten 1,5mm voneinander trennten, miteinander verschraubt. Nach senkrechtem Einspannen in eine spezielle Halterung, die ein Auslaufen des Geles vor der Auspolymerisation verhindert, wurden die unteren 2/3 mit Trenngel befüllt. Zum Glätten und Luftausschluß wurden 1000µl Butylalkohol darüber pipettiert. Nach vollständiger Auspolymerisation wurde der Alkohol abgegossen und das restliche, obere 1/3 mit Sammelgel aufgefüllt. Um das Gel später befüllen zu können, wurden während der Auspolymerisationsphase Käbme mit 15 Zacken von oben in das Sammelgel gesteckt, so daß 15 Taschen im Gel entstanden.

Nach folgendem Pipettierschema wurden nun die Taschen befüllt:

Gel A (nNOS-Standard, Inkubation mit nNOS-Antikörper)

Geltasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Geirnebenen Tier 1 und 2, nNOS-Standard, nNOS-Antikörper	SG	x	x	T1 PFK	T1 SFO	T1 NPV	T1 NA	SG	x	T2 PFK	T2 SFO	T2 NPV	T2 NA	SG	M
Menge [µg Protein]	20			20	20	20	20	20		20	20	20	20	20	

Gel B (iNOS-Standard, Inkubation mit iNOS-Antikörper)

Geltasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Geirnebenen Tier 1 und 2, iNOS-Standard, iNOS-Antikörper	SL	x	x	T1 PFK	T1 SFO	T1 NPV	T1 NA	SL	x	T2 PFK	T2 SFO	T2 NPV	T2 NA	SL	M
Menge [µg Protein]	20			20	20	20	20	20		20	20	20	20	20	

Legende: SG = Gehirnstandard (siehe „Standardherstellung für den Westernblot“)
für nNOS-Protein

SL = Leberstandard (kommerziell erworben) für iNOS-Protein

T1 = Tier 1

T2 = Tier 2

PFK = präfrontaler Kortex

SFO = subfornikales Organ

NPV = nucleus paraventricularis

NA = nucleus arcuatus

X = Befüllung mit restlichem Gehirnhomogenat, floß nicht in die
Auswertung mit ein

M = Rainbowmarker

Jeweils ganz rechts ließen wir einen Rainbowmarker mitlaufen, dessen farbige Banden das Proteinmolekulargewicht markieren [Rainbow™ coloured protein molecular weight markers, code RPN 756, amersham pharmacia biotech, USA].

In je zwei Gele wurden nacheinander die 4 einzelnen Gehirn-Ebenen (jeweils 20µg) von zwei Tieren (Im Schema z.B. Tier 1 und 2) einpipettiert. Jeweils Tasche Nr. 1, 8 und 14 wurden in ein Gel mit Gehirnstandard (nNOS) und in das andere Gel mit iNOS-Standard aufgefüllt (ebenfalls 20µg). Nach gleichem Schema wurden die übrigen Gehirnhomogenate der insgesamt 36 Tiere in Gele einpipettiert.

Unter Stromfluß (Electrophoresis power supply EPS 301, amersham pharmacy biotech: 50mV über 12 Stunden) wurden die einzelnen Proben aufgetrennt.

Als Laufpuffer verwendeten wir 1xSDS-Laufpuffer. Nach der Auftrennung wurden die Proteinbanden auf Nitrozellulose-Membranen (Immobilon-P (PVDF)-Transfermembran Millipore, Bedford, USA) transferiert. Dafür benutzten wir Blotgeräte der Firma Roth. In einem Sandwichverfahren schichteten wir von Anode zu Kathode vier in Anodenpuffer I, zwei in Anodenpuffer II getränkte Chromatographiepapiere (Whatman® Chromatographiepapiere, Fa. Schubert & Weiss, Meldstone, England), Membran, Gel und sechs in Kathodenpuffer getränkte Whatmanpapiere übereinander. Membran und Papiere hatten die Größe der Gele. Luftblasen wurden mechanisch mit Hilfe eines Glasröhrchens ausgerollt/ausgestrichen. Der Transfer fand über 2 Stunden bei 200mA je Gel und Druck über Feststellschrauben, die den Deckel (Kathode) richtung Boden (Anode) fixierten, statt.

Nach dem Transfer wurden die Membranen 2x15 Minuten in PBST gewaschen und 30 Minuten in Milch (10% Magermilchpulver aus dem Reformhaus in PBST = "Blockmilch") geblockt, bevor die Inkubation mit dem Primärantikörper (Gel A mit nNOS-AK, Gel B mit iNOS-AK) begann. Dafür wurden 10ml 10% Blockmilch mit 33,4µl Primärantikörper [NOS1(R-20) cat#sc-648, Lot#F041, rabbit polyclonal IgG, bzw. NOS2 (C11) cat#sc-7271, Lot#E180, mouse polyclonal IgG] versetzt und die Membranen darin 2 Stunden, eingeschweißt in paßgenauen Tütchen unter Luftausschluß inkubiert.

Nach 2 Stunden auf dem Schüttler (Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland) bei Raumluft wurden die Membranen aus den Tütchen entnommen und 40 Minuten unter 7xigem Flüssigkeitswechsel in PBST gewaschen.

Danach wurde für 90 Minuten mit dem Sekundärantikörper (5µl Anti-mouse, bzw. Anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase, linked whole antibody (from sheep), 1ml, NA 931, Fa. Amersham life science, Piscataway, USA in 10%Blockmilch) inkubiert. Auch hier wurden die Membranen luftblasenfrei in Tütchen eingeschweißt und bei Raumluft auf dem Schüttler bewegt. Nach erneutem gründlichem Waschen in PBST (40 Minuten, 7xPBST-Wechsel) wurden die Blots 1 Minute in ECL (ECL® Western Blotting Detection Reagents, Amersham Life Science, Piscataway, USA) entwickelt und digital in einer Kodak image station (440 CF, Eastman Kodak Company, Rochester NY 14650, New York, USA) mit der Software Kodak 1D, v.3.5.3, 4Science Park, New Haven analysiert. Die Ergebnisse werden in Prozent vom Standard angegeben, da die absoluten Dichtewerte von mehreren Faktoren (z.B. Alter des ECL) abhängig sind und nicht standardisiert werden können.

3.2.3 NOS-Assay

3.2.3.1 Säulenherstellung

Zur Herstellung von 80-100 Säulen wurde 100g Kationenaustauschharz (Resin Bio Rad AG® 50W-X8) 5x in 200ml Ethanol, 2x in 200ml Aqua dest. und 1x in 500ml NaOH suspendiert. Dann wurde es unter Rühren in 200ml 0,5M NaOH auf 80°C erhitzt und unter 3-4maliger Suspension mit 500ml Aqua dest. neutral gewaschen. Nun wurde das Harz 2x in 500ml 1M HCl suspendiert und wiederum in 3-4x 500ml Aqua dest. neutralisiert. Die letzten 500ml H₂O wurden nicht vollständig abdekantiert. Um eine homogene Befüllung der Plastiksäulen zu erreichen, wurde das Harz-Wasser-Gemisch unter Zuhilfenahme einer Rührplatte und eines Rührfisches in ständiger Bewegung gehalten. Unter diesen Bedingungen wurde nun gleichmäßig soviel Harz-Wasser-Gemisch in die Säulen pipettiert, bis nach Abtropfen des Wasser eine Harzsäule von 0,6-0,8ml bestand.

Vor dem erstmaligen Gebrauch und nach jedem Versuch wurden die Säulen mit 3x3ml 1M NaOH und anschließend mit 3x10ml Aqua dest. gespült.

3.2.3.2 Bestimmung der Säulenausbeute

Die Säulenausbeute wurde mit kommerziell hergestelltem L-[¹⁴H]-Citrullin bestimmt. Als Ausgangssubstanz wird eine Lösung mit L-[¹⁴H]-Citrullin (kommerziell erworben: L-[¹⁴H]-Citrullin, 250µCi=9,25MBq, Sigma) in Natriumacetatpuffer mit EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma) mit etwa 10.000cpm/ml hergestellt. 1ml dieser Lösung wird mit 1ml destilliertem Wasser vermischt, mit 2ml Szintiflüssigkeit (Betaplate Scint, EG&G Company, Wallac UK) versetzt und im Counter (Flüssigkeitsszintillationsspektrometer) die Radioaktivität bestimmt. Man erhält so die „totalen counts per minute“.

Ein weiterer Milliliter der Ausgangssubstanz wird über die Kationenaustauschchromatographiesäule, deren Ausbeute bestimmt werden soll, gegeben, mit 1ml Aqua dest. nachgespült, das Eluat mit 2ml Szintiflüssigkeit versehen und die cpm bestimmt. Diese cpm sind die „erwarteten counts per minute“. Um die Säulenausbeute zu erhalten, werden die „erwarteten cpm“ durch die „totalen cpm“ dividiert. Für ein aussagekräftiges Ergebnis ist es erforderlich, daß mehrfache Bestimmungen (mind. 3) einer Säulenpopulation durchgeführt werden, deren Mittelwert man ermittelt.

Wir bestimmten die Säulenausbeute sechs verschiedener Säulen doppelt und erhielten einen Mittelwert von 94±3%. Dieser Mittelwert stellt die Säulenausbeute unserer Säulen dar, mit der später die Berechnungen der NOS-Aktivität im Citrullin-Assay korrigiert wurden.

3.2.3.3 Hochreinigung des Arginin

Die Hochreinigung erfolgte in einem kommerziell erhältlichen „high pressure liquide chromatographie“ (HPLC)-System (Bischoff HPLC pump, Pharmacia LKB Redi Frac Fraktionensammler). Die HPLC-Säule muß vor Beginn mit 50mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,4 mit einer Flußrate von 0,1ml/min über 2-3 Stunden äquilibriert werden. Vor dem eigentlichen Hochreinigungsvorgang wurde die Flußrate auf 1,5ml/min hochgestellt. Der mit >120 Plastikröhrchen bestückte Fraktionensammler wurde so eingestellt, daß er alle 20 Sekunden weiterdreht, also Fraktionen von 0,5ml sammelt. Mit Injektion von 100µl [³H]-L-Arginin in die äquilibrierte Säule wurde der Sammelvorgang gestartet. Insgesamt wurden 120 Fraktionen à 500µl gesammelt.

Von jeder Fraktion wurden 10µl in ein mit 2ml Szintiflüssigkeit gefülltes Szintiröhrchen pipettiert und die Radioaktivität im [³H]-Counter (Flüssigkeitsszintillationsspektrometer) gemessen. Fraktionen mit einer Radioaktivität von mehr als 100 000cpm/10µl wurden gepoolt, so daß ein qualitativ sehr hochwertiges und reines [³H]-L-Arginin gewonnen wurde.

3.2.3.4 Durchführung des NOS-Assay

Zwei mal 60µl einer Probe (s. „Probenaufbereitung“) wurden jeweils mit 120µl Reaktionsansatz (s. „Anhang“) versetzt. Zur Unterscheidung der kalziumunabhängigen iNOS und kalziumabhängigen cNOS wurden außerdem einmal 20µl (30µM) EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, Sigma) zur Bindung von Kalzium und einmal 20µl (500µM) Calciumchlorid zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch gut gevortext und 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1ml eisgekühltem Stoppuffer beendet und erneut gut gemischt.

Zur Trennung des entstandenen L-[³H]-Citruillins vom L-[³H]-Arginin wurde je 1ml des Gemisches über Kationen-Austausch-Chromatographie-Säulen gegeben und mit 1ml Aqua dest. nachgespült. Das Eluat wurde in 5ml-Szintiröhrchen aufgefangen und mit 2ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Im Counter wurde die Radioaktivität bestimmt.

Als Leerwert wurde der Versuch statt mit Probe mit Aqua dest., sonst wie beschrieben, durchgeführt.

Für den 100%-Wert verwendeten wir ebenfalls Wasser statt Probe und gaben das Gemisch unter Umgehung der Trennung durch die Säulen direkt in die Szintiröhrchen.

Die NOS-Aktivität wurde nach K.Schmidt und B.Mayer [111] in fmol L-Citruillin, die pro Minute pro mg Protein gebildet werden berechnet.

Als Ausgangswert dienten die Counts per minute (cpm) je Eluat, die im Counter bestimmt wurden. Davon wurde der Leerwert [cpm] abgezogen, der erhaltene Wert wurde durch die Säulenausbeute (94±3%) dividiert.

Das Ergebnis wurde mit der Menge des eingesetzten L-Arginin [pmol] multipliziert und durch die Radioaktivität des [³H]L-Arginin [cpm] dividiert. So erhielten wir die

Menge [pmol] des entstandenen Citrullins. Das Ergebnis wurde zur besseren Veranschaulichung der Zahlen in [fmol] umgerechnet.

Um die spezifische NOS-Aktivität zu erhalten wurde dieser Wert durch die Inkubationszeit (10 Minuten) und den Proteingehalt [mg] der eingesetzten Probe geteilt.

3.2.4 Nitrit/Nitrat-Bestimmung mittels ELISA

Die Nitrit/Nitrat-Bestimmung wurde mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, R&D Systems™, Deutschland), der auf einer Griess-Reaktion mit den beiden Griess-Reagenzien Sulfanilamid (Griess-Reagens 1) und N-(1-naphthyl)ethylendiamin (Griess-Reagens 2) basiert, durchgeführt. Zunächst wurde das mitgelieferte Reaktionspufferkonzentrat 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und die Seren damit in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Um Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 10.000 zu eliminieren, wurde das Gemisch anschließend über einen entsprechenden Filter ultrafiltriert (5000g/20Minuten). Dann wurden die Reagenzien (NADH-Reagens und Nitrat-Reduktase) nach Anleitung vorbereitet und eine Verdünnungsreihe mit Natriumnitrat in Reaktionspuffer (100µmol/l, 50µmol/l, 25µmol/l, 12,5µmol/l, 6,25µmol/l, 3,12µmol/l) als Standard hergestellt.

Die mitgelieferte Mikroplatte wurde folgendermaßen bestückt: Zunächst wurden die einzelnen Vertiefungen mit jeweils 200µl Reaktionspuffer befüllt. Dazu wurde in der ersten Spalte jeweils 50µl der vorbereiteten Nitratverdünnungsreihe mit einem Nullwert bestehend aus 50µl Reaktionspuffer hinzupipettiert. In die nächsten Vertiefungen („wells“) wurden die vorverdünnten und ultrafiltrierten Seren (jeweils 50µl) einpipettiert. Nach Hinzufügen von jeweils 25µl NADH-Reagens und 25µl Nitrat-Reduktase zu allen Standards, ausgenommen der Nullwert, und Proben, wurde die Mikroplatte mit einer Haftfolie abgeklebt, gut geschüttelt und für 30 Minuten bei 37°C in einen Brutschrank gelegt. Durch diese Inkubation mit NADH und Nitratreduktase wird Nitrat zu Nitrit konvertiert. Anschließend wurde jeweils 50µl der Griess-Reagenzien 1 und 2 zu allen Standards (mit Ausnahme des Nullwertes) und allen Proben hinzupipettiert und wiederum gut gemischt. Nach einer 10-minütigen

Inkubationszeit bei Raumluft auf dem Schüttler wurde die Absorption bei 540nm spektrophotometrisch gemessen.

3.2.5 Methämoglobinbestimmung

In dem bei der Tötung entnommenen Blut (EDTA-Blut) wurde in einem automatischen Blutzellen-Zähl-Gerät (Serono System 900, Kalibrierung für Ratten) der Anteil des Methämoglobins am Gesamt-Hämoglobin bestimmt.

3.3 Statistik

In vier verschiedenen Gehirnregionen von Ratten, die entweder mit *Corynebacterium parvum* infiziert wurden oder einer Kontrollgruppe angehörten, wurde einmal nNOS- und iNOS-Protein, und einmal cNOS- und iNOS-Aktivität bestimmt. Die Werte wurden einer Zwei-Wege-Varianzanalyse mit dem Faktor "Bereich" innerhalb der Gruppe, dem Faktor "Gruppe" zwischen den Gruppen und ihrem Wechselwirkungsfaktor (Bereich x Gruppe) unterzogen. Wenn sich "Bereich x Gruppe" als signifikant erwiesen hat, wurden die Werte jedes Bereichs anhand eines unabhängigen t-Test analysiert ($p < 0,05/4 = 0,0125$ für multiple Vergleichskorrektur). Alle anderen Variablen wurden mit einem unabhängigen t-Test analysiert ($p < 0,5$). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit SPSS 10.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Nitrit/Nitrat im Serum (ELISA)

Von dem bei der Tötung entnommenen Blut wurde das Serum gewonnen und darin in einer spektrophotometrischen Messung, basierend auf der Griess-Reaktion, die Nitrit/Nitrat-Konzentration bestimmt.

Ergebnisse:

	Normalwerte	Kontrollgruppe	cp-Gruppe
Nitrit/Nitrat	nicht nachweisbar	17±8	1332±710

Normalwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen der Nitrit/Nitrat-Konzentration in [µmol/l]

4.2 Methämoglobin (Serono System 900, Kalibrierung für Ratten)

In dem bei der Tötung entnommenen Blut (EDTA-Blut) wurde in einem automatischen Blutzellen-Zähl-Gerät der Anteil des Methämoglobins am Gesamthämoglobin bestimmt.

Ergebnisse:

	Normalwerte	Kontrollgruppe	cp-Gruppe
Methämoglobin	0-0,3	0,3±0,2	9,7±7,5

Normalwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen des Anteils des Methämoglobins am Gesamthämoglobin in [%]

4.3 nNOS-Protein im Gehirn (Westernblot)

Der nNOS-Anteil wird in Prozent vom Standard angegeben. Als Standard diente das Gehirnhomogenat eines gesunden Tieres.

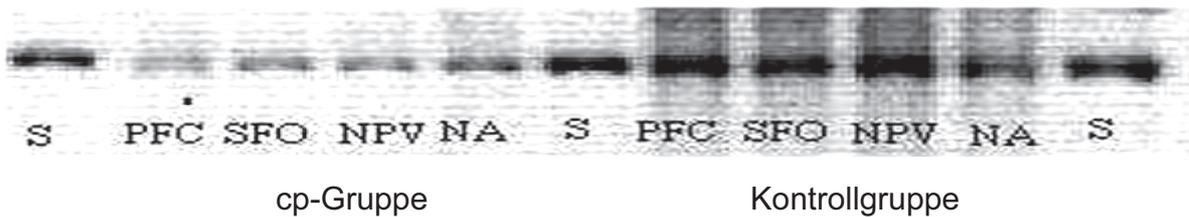
Im Präfrontalen Kortex zeigt die cp-Gruppe mit $6\pm 13\%$ einen signifikant geringeren nNOS-Gehalt als die Kontrollgruppe ($57\pm 19\%$).

Alle anderen Gehirnschnitte weisen keinen signifikanten Unterschied auf.

Ergebnisse:

	Präfrontaler Kortex	Subfornikales Organ	Nucleus paraventricularis	Nucleus arcuatus
Kontrollgruppe	57 ± 19	63 ± 21	62 ± 34	73 ± 27
cp-Gruppe	6 ± 13	55 ± 23	64 ± 19	77 ± 26

Mittelwert und Standardabweichung des nNOS-Proteingehalts in Prozent vom Standard



Repräsentativer Westernblot des nNOS-Proteingehalts der vier Schnittebenen PFC, SFO, NPV und NA im Gehirn, links die cp-Gruppe, rechts die Kontrollgruppe, S=Standard

4.4 iNOS -Protein und –aktivität im Gehirn (Westernblot und NOS-Assay)

In keiner Gehirnregion, weder in der Gruppe der gesunden noch in der Gruppe der infizierten Tiere, konnte iNOS-Protein oder iNOS-Aktivität nachgewiesen werden.

4.5 cNOS-Aktivität (NOS-Assay)

Im Präfrontalen Kortex ist die Aktivität der cNOS in der cp-Gruppe mit $14,4 \pm 12,4$ fmol/mg Protein gegenüber der Kontrollgruppe mit $29,2 \pm 15,3$ fmol/mg Protein signifikant vermindert.

In den übrigen Ebenen SFO, NPV und NA zeigt sich insgesamt ein Trend zur verminderten cNOS-Aktivität der cp-Tiere, es liegt allerdings keine Signifikanz vor.

Ergebnisse:

	Präfrontaler Kortex	Subfornikales Organ	Nucleus paraventricularis	Nucleus arcuatus
Kontrollgruppe	$29,2 \pm 15,3$	$42,5 \pm 17,9$	$35,4 \pm 18,6$	$50,4 \pm 17$
cp-Gruppe	$14,4 \pm 12,4$	$28,3 \pm 22,5$	$29,1 \pm 22,8$	$26,5 \pm 24,3$

Mittelwerte und Standardabweichungen der cNOS-Aktivität in [fmol/ μ g Protein]

5 Diskussion

Nach Infektion durch Injektion einer Lösung mit *Corynebacterium parvum* wurde bei Ratten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ein erhöhter Serumspiegel an Nitrit/Nitrat festgestellt. Daneben zeigten sich erhöhte Serum-Methämoglobinwerte der infizierten Gruppe. Die Messung der cerebralen NO-Synthase geschah über die Menge des Proteins an sich und über die Aktivität des Proteins. Dabei konnten wir eine signifikant verminderte Proteinaktivität der cNOS im präfrontalen Kortex der infizierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Die übrigen Gehirnschnitte wiesen keinen signifikanten Unterschied auf.

Wiederum im Präfrontalen Kortex ergab sich ein deutlich geringerer nNOS-Proteingehalt bei der cp-Gruppe als bei der Kontrollgruppe. In den übrigen Gehirnschnitten ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Beide Gruppen lagen mit ihrem nNOS-Proteingehalt unter dem des Standards. Auffällig ist, daß auch der nNOS-Proteingehalt der Kontrollgruppe nicht bei 100% lag. Eigentlich dürfte er sich nicht vom Standard unterscheiden, da sich die Kontrollgruppe, abgesehen von Injektion von 0,5ml NaCl nicht von dem gesunden, nicht-vorbehandelten Tier, aus dessen Gehirn der Standard hergestellt wurde, unterscheidet. Die Ursache dafür liegt in der Herstellung des Standards: Es wurde das gesamte Cerebrum inklusive Cerebellum, wo der nNOS-Gehalt sehr hoch ist, homogenisiert und keine Unterscheidung der Gehirnebenen wie bei den untersuchten Tieren vorgenommen. So kommt es insgesamt zu einem höheren nNOS-Proteingehalt. Als reines Unterscheidungskriterium zwischen der cp-Gruppe und der Kontrollgruppe ohne Absolutwerte sind die Daten trotzdem zulässig.

In keiner Gehirnregion, weder in der Gruppe der gesunden noch in der Gruppe der infizierten Tiere, konnte iNOS-Protein oder iNOS-Aktivität nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen interpretieren:

Betrachtet man zunächst den Serumspiegel an Nitrit/Nitrat, so fällt auf, daß dieser bei der Gruppe der infizierten Tiere signifikant höher lag als bei der Kontrollgruppe. Als Abbauprodukt des NO, das selber zu kurzlebig zur direkten Bestimmung ist, deutet dieses Ergebnis auf eine sehr hohe NO-Produktion bei den infizierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Die hohen Nitrit/Nitrat-Spiegel der infizierten

Versuchstiere entstehen demnach durch die vermehrte NO-Produktion durch die induzierbare NO-Synthase.

In keiner Gehirnregion, weder in der Gruppe der gesunden noch in der Gruppe der infizierten Tiere, konnte iNOS-Protein oder iNOS-Aktivität nachgewiesen werden. Der hohe Nitrit/Nitrat-Spiegel im Serum der infizierten Ratten als Ausdruck der vermehrten NO-Produktion kommt demnach ausschließlich durch eine periphere iNOS-Induktion zustande.

Theoretisch wäre neben der bekannten peripheren iNOS-Induktion auch zentral eine Induktion der iNOS denkbar. Zinetti z.B. konnte 4 Stunden nach LPS-Gabe in einem Mausmodell sowohl in der Leber als auch im Gehirn eine starke iNOS-mRNA-Induktion feststellen, dagegen war unter gleichen Bedingungen nach 16 Stunden weder in Leber noch im Gehirn iNOS-mRNA nachzuweisen [135]. Es besteht also die Möglichkeit, daß die iNOS im Gehirn zwar einige Stunden nach cp-Injektion ausgeprägt war, jedoch nicht mehr am dritten Tag danach.

Eine anderer Grund, daß die cerebrale iNOS nicht nachweisbar ist, könnte in einer feedback-Hemmung [52] der zentralen iNOS durch die hohe NO-Produktion der systemischen iNOS liegen. In diesem Fall wäre auch von einer Hemmung der peripheren iNOS auszugehen. Für ein Vorhandensein der peripheren iNOS sprechen jedoch die hohen Nitrit/Nitrat-Spiegel. Außerdem weiß man, daß wesentlich größere NO-Mengen für die Hemmung der iNOS als für die Hemmung der nNOS nötig sind [52]. Das würde bedeuten, daß die nNOS schon lange nicht mehr aktiv ist, wenn die iNOS gehemmt wird. In unserem Fall war jedoch eindeutig nNOS-Aktivität nachweisbar, so daß diese Erklärung ebenfalls wenig wahrscheinlich ist.

Möglicherweise liegt die Erklärung auch darin, daß die cerebrale iNOS vorhanden ist, sie jedoch mit unseren Meßmethoden nicht bestimmt werden kann.

Klinisch waren (im Vorversuch) bei den septischen Ratten Ausfälle in der kognitiven Leistungsfähigkeit als Zeichen einer septischen Enzephalopathie sichtbar.

Unsere Untersuchungen zeigten signifikant erhöhte Methämoglobinwerte in der cp-Gruppe gegenüber normalen Werten in der Kontrollgruppe. Dies ist als Hinweis auf die Interaktion des NO mit der Hämgruppe des Hämoglobins (Fe^{2+}) zu sehen, was zur Bildung von Methämoglobin (Fe^{3+}) führt [69]. Große Mengen an NO, wie sie bei den infizierten Tieren vorliegen, führen zu einer vermehrten Bildung von Methämoglobin. Eine Möglichkeit für die kognitive Beeinträchtigung der septischen Ratten könnte in eben dieser Methämoglobinbildung durch NO liegen: reduzierte

Hämoproteine (Fe^{2+}) wie Hämoglobin und Myoglobin können NO inaktivieren [52]. Dieser Schutz vor den (vermutlich) schädlichen hohen NO-Spiegeln während einer Sepsis wird bei Vorliegen eines hohen Prozentsatzes an Methämoglobin (Fe^{3+}), welches nicht, bzw. nur wesentlich geringer zur Inaktivierung des NO fähig ist, vermindert. Daneben ist Methämoglobin nicht mehr zum Sauerstofftransport fähig, so daß es zu einem generalisierten Sauerstoffmangel im Körper kommen kann. Allerdings sind die gemessenen Methämoglobinwerte noch zu niedrig für eine derartige Auswirkung. Menschliche Raucher können physiologisch schon Werte über 10% haben. Klinische Symptome wie Schwindel, Müdigkeit und Tachykardie werden erst bei einem Methämoglobingehalt von über 40% des Gesamthämoglobins manifest.

Wahrscheinlicher erscheint ein Einfluß auf die kognitive Leistungsfähigkeit durch den geänderten NO-Stoffwechsel.

Bei der Untersuchung der Gehirne auf die Aktivität der cNOS konnte im NOS-Assay keine weitere Differenzierung der beiden Isoformen eNOS und nNOS vorgenommen werden, da beide Isoformen kalziumabhängig sind. Die Messung der Aktivität im NOS-Assay beruht auf der Messung des entstehenden Citrullin bei der NO-Synthese, unabhängig davon, welche NOS-Isoform für die Bildung verantwortlich ist. Im Gehirn kann man jedoch von einem überwiegenden Anteil der nNOS an der konstitutiven NO-Synthase ausgehen, so daß die Ergebnisse als Werte der nNOS interpretiert werden. Es fällt eine deutlich reduzierte nNOS-Aktivität der cp-Gruppe im präfrontalen Kortex auf. Nach Griscavage [52] besteht eine negative feed-back-Hemmung durch NO auf cNOS- und iNOS-Aktivität. Es könnte also sein, daß die Überproduktion von NO durch die systemische iNOS-Induktion zu einer negativen feedback-Hemmung der zentralen nNOS-Aktivität führt.

Bei den Ergebnissen unserer Untersuchungen fällt zusätzlich eine Verminderung der nNOS-Proteinkonzentration auf. Wiederum im Präfrontalen Kortex lag ein signifikant verminderter nNOS-Proteingehalt der cp-Tiere vor. Eine Regulation der NO-Produktion auf Ebene der Biosynthese des Proteins ist vor allem bei der Regulation der iNOS bekannt [92]. Die hohen Nitrit/Nitrat-Spiegel der untersuchten septischen Ratten zusammen mit dem signifikant reduziertem nNOS-Proteingehalt im präfrontalem Kortex lassen jedoch auch eine negative feed-back-Hemmung der vermehrten NO-Produktion auf das Protein selber vermuten. Auf welchem Wege diese Hemmung zustande kommt, ist noch nicht näher bekannt.

Die Ergebnisse unserer Arbeit sprechen insgesamt für eine Überflutung des Gehirns infizierter Ratten mit großen NO-Mengen durch peripher von der iNOS produziertes NO mit nachfolgender feedback-Hemmung v.a. im präfrontalen Kortex von nNOS-Aktivität und sogar nNOS-Protein. Nicht ganz klar ist allerdings die nicht, bzw. deutlich geringere feed-back-Hemmung durch die vermehrte NO-Produktion der iNOS auf die übrigen untersuchten Gehirnregionen subfornikalen Organ, Nucleus paraventricularis und Nucleus arcuatus. Auch hier hätten unter der Annahme einer gleichmäßigen Überflutung des Gehirns mit NO deutlich geringere Werte für nNOS-Protein und nNOS-Aktivität gemessen werden müssen. Eine mögliche Schlußfolgerung kann sein, daß eben keine gleichmäßige NO-Verteilung im Gehirn bei Sepsis besteht, und vor allem der präfrontale Kortex von einer erhöhten NO-Konzentration betroffen ist, bzw. stärker auf Schwankungen im NO-Spiegel reagiert. Als Folge der v.a. im präfrontalen Kortex gehemmten nNOS tritt möglicherweise eine Beeinträchtigung im Arbeitsgedächtnis mit der Folge einer verminderten kognitiven Leistungsfähigkeit durch Änderung des Neurotransmitterprofils ein. Eine Verschlechterung des Arbeitsgedächtnisses durch Hemmung der nNOS konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden: Zou et al. [136] z.B. konnten nach Gabe eines spezifischen nNOS-Inhibitors (7-Nitroindazol) eine Verschlechterung des Arbeitsgedächtnisses bei Ratten feststellen. Insbesondere dem präfrontalen Kortex wird eine Beteiligung am Arbeitsgedächtnis zugeschrieben [48]. Dazu paßt auch, daß gerade in dieser Region in unserer Untersuchung eine signifikante Verminderung von nNOS-Aktivität und –Protein vorlag.

Inwiefern tatsächlich eine Änderung im Neurotransmitterprofil stattfindet und nachfolgend eine Änderung der kognitiven Fähigkeiten eintritt, die auf eine septische Enzephalopathie im Rahmen einer Sepsis hinweist, muß in weiteren Untersuchungen noch abgeklärt werden.

6 Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid, einer der Hauptregulatoren im Nerven-, Immun- und kardiovaskulären System, wird im Körper durch die Stickstoffmonoxidsynthase (NO-Synthase) gebildet, von der es drei Isoenzyme gibt: die neuronale und endotheliale NO-Synthase, zusammengefaßt als konstitutive NO-Synthase (cNOS), und die „induzierbare“ NO-Synthase (iNOS). Diese Induktion findet nach Stimulation durch sepsisassoziierte Mediatoren statt und führt zur Produktion großer Mengen an NO. Für vorliegende Arbeit wurde eine Änderung des NO-Stoffwechsels bei septischen Ratten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht.

Als Ausdruck der vermehrten NO-Produktion wiesen die septischen Tiere deutlich erhöhte Werte für Nitrit/Nitrat und Methämoglobin auf. Eine iNOS im Gehirn konnte weder in der Gruppe der gesunden noch in der Gruppe der infizierten Tiere nachgewiesen werden. Proteingehalt und Aktivität der nNOS war bei den infizierten Tieren vor allem im präfrontalen Kortex deutlich reduziert. Es scheint, als führe die NO-Überproduktion durch die (systemische) iNOS während einer Sepsis zu einer feed-back-Hemmung der nNOS-Aktivität und sogar nNOS-Proteinkonzentration v.a. im präfrontalen Kortex. Als Schlußfolgerung aus den Ergebnissen kann man zusammen mit der bei den septischen Tieren im Vorversuch beobachteten Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses, das seinen Sitz im präfrontalen Kortex hat, eine (Mit-) Ursache des veränderten NO-Stoffwechsels am Zustandekommen der septischen Enzephalopathie im Rahmen einer Sepsis vermuten.

7 Anhang: Puffer und Mischungen

Lysispuffer:

- 0,5% TritonX100 (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Tris-HCl pH 7,4
- 137mM NaCl
- 2mM EDTA

10% Glycerol in 1%PBS als Grundmedium für BSA-Verdünnungsreihe, für 2 Liter:

- 320g NaCl
- 57,6g NaHPO₄
- 9,6g KH₂PO₄
- 8g KCl ad 2000ml Aqua dest

Reduzierender SDS-Probenpuffer :

- 0,2 M Tris-HCl pH 6,8
- 6% SDS (Sodiumdodecylsulfat, Biorad Laboratories München, Deutschland)
- 20% Glycerol
- 10% DTT (Dithiothreitol, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 0,1mg/ml Bromphenolblau (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland)

Trenngel:

- 7ml Rotiphorese Gel 40% Acrylamid (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 10ml Trenngelpuffer
- 23ml dest. Wasser
- 240µl Ammoniumpersulfat (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 30µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Trenngelpuffer:

- 1,5M Tris-HCl pH8,8
- 0,4% SDS (Sodiumdodecylsulfat, Biorad Laboratories München, Deutschland)

Sammelgel:

- 2,5ml Rotiphorese Gel 40% Acrylamid (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 5ml Sammelgelpuffer
- 12,5ml dest. Wasser
- 160µl Ammoniumpersulfat (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 15µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Sammelgelpuffer:

- 0,5M Tris-HCl pH6,8
- 0,4% SDS (Sodiumdodecylsulfat, Biorad Laboratories München, Deutschland)

1xSDS-Laufpuffer:

- 3,028g Tris-HCl
- 14,4g Glycin
- 1,0g SDS (Sodiumdodecylsulfat, Biorad Laboratories München, Deutschland)
- ad 1000ml Aqua dest

Anodenpuffer I, 1l:

- 36,3g Tris-HCl-Feststoff
- 200ml Ethanol absolut
- ad Aqua dest. 1000ml

Anodenpuffer II, 1l:

- 3,28g Tris-HCl-Feststoff
- 200ml Ethanol absolut
- ad Aqua dest. 1000ml

Kathodenpuffer, 1l:

- 5,25g ε-Amino-n-Caproic ACID (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 200ml Ethanol absolut
- ad Aqua dest. 1000ml

PBST :

- 100ml PBS 20x
- 320g NaCl
- 57,6g NaHPO₄
- 9,6g KH₂PO₄
- 8g KCl ad 2000ml Aqua dest, auf pH7 einstellen
- 1000µl Tween 20 (Fa. Fluka Chemica, Buchs, Schweiz)
- ad 2000ml Aqua dest.

Reaktionsansatz für NOS-Assay:

- 20µl TEA (Tetraethylammonium, Sigma) 500mM
- 1µl Arginin 2mM
- 5µl L-[³H]-Arginin (L-[2,3,4,5-³H]-Arginine monohydrochloride, 250µCi, Amersham Pharmacia) mit etwa 10.000cpm
- 5µl Calmodulin (10µg/µl)
- 20µl NADPH (Nicotinamide adenin dinucleotide phosphate, reduziert, Sigma) (200µM)
- 20µl THB (Tetrahydrobiopterin, Sigma) (100µM)
- 20µl FAD/ FMN (Flavin-Adenosin-Di-Nukleotid/Flavinmononukleotid) (5/5µM)
- 29µl Aqua dest.

Stoppuffer für NOS-Assay

- 2mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma)
- 1mM Citrullin
- 20mM Natriumacetat

8 Literaturverzeichnis

1. Adams LB, Hibbs Jr JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL: Microstatic effect of murine macrophages for *Toxoplasma gondii*: role of synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 144 (1990): 2725-2729
2. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20 (1992): 864-874
3. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F: Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Nat Ac Sci USA* 74 (1977): 3203-3207
4. Bartels H, Stadler J, Barthlen W, Miedke T, Siewert JR: Ursachen des Organversagens bei Sepsis. *Zentralbl Chir* 119 (1994): 168-174
5. Bernard C, Tedgui A: Cytokine network and the vessel wall. Insights into septic shock pathogenesis. *Eur Cytokine Netw* 3 (1992): 19-33
6. Bogdanski R, Blobner M, Hänel F: Die septische Enzephalopathie. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 34 (1999): 123-130
7. Bohme GA, Bon C, Stutzman J-M, Doble A, Blanchard J-C: Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 199 (1991): 379-381
8. Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101 (1992): 1644-1655
9. Bone RC, Fischer CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA: Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med* 17 (1989): 389-393
10. Bone RC: Sepsis syndrome: New insights into its pathogenesis and treatment. *Intensive And Critical Care Digest* 10 (1991): 50-56
11. Bowton DL, Bertels NH, Prough DS, Stump DA: Cerebral blood flow is reduced in patients with sepsis syndrome (see comments): *Crit Care Med* 17 (1989): 399-403
12. Bredt DS: Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Rad Res*, Vol 31 (1999): 577-596
13. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH: Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. *Nature* 347 (1990): 768- 770

14. Brecht DS, Snyder: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1981): 9030-9033
15. Brecht DS, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63 (1994): 175-195
16. Breer H, Shepherd GM: Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends Neurosci* 16 (1993): 5-9
17. Brown JM, Grosso MA, Terada LS: Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemic reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989): 2516-2520
18. Calvier A, Collier J, Vallance P: Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol* 78 (1993): 303-326
19. Charles IG, Palmer MJ, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S: Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible NO synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993): 11419-11423
20. Choi DW: Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Progress in Brain Research* 100 (1994): 47-51
21. Cobb JP, Cunnion RE, Danner RL: Nitric oxide as a target for therapy in septic shock. *Crit Care Med* 21 (1993): 1261-1263
22. Cobb JP, Natanson C, Hoffman WD et al: N ω -amino-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake canines challenged with endotoxin. *J Exp Med* 176 (1992): 1175-1182
23. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H: Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 334 (1983): 33-46
24. Costa A, Trainer P, Besser M, Grossman A: Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro. *Brain Res* 605 (1993): 187-192
25. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO: Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 82 (1995): 1598-1610
26. Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanodestruction. *Physiol Rev* 75 (1995): 519-560
27. Dawson TM, Snyder SH: Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* (1994): 5147-5159
28. Dawson VL, Dawson TM: Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 34 (1995): 323-342

29. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991): 6368-6371
30. Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM: Resistance to neurotoxicity in cortical neuronal cultures from neuronal nitric oxide synthase deficient mice. *J Neurosci* 15 (1996):2479-2487
31. Deguchi T: Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal-soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem* 252 (1977): 7617-7619
32. Deguchi T, Yoshioka M: L-Arginine identified as endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 257 (1982): 10147-10151
33. Demerle-Pallardy D, Lonchamp MO, Chabrier PE, Braquet P: Absence of implication of L-arginine/nitric oxide pathway on neuronal cell injury induced by L-glutamate or hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 181 (1991): 456-464
34. Dicke BGM, Lewis MJ, Davies JA: NMDA-induced release of nitric oxide potentiates aspartate overflow from cerebellar slice. *Neurosci Lett* 138 (1992): 145-148
35. Farrell AJ, Blake DR: Nitric oxide. *Ann Rheum Dis* 55 (1996): 7-20
36. Feist E, Memes A, Strasser T: Alteration of monocyte function following major injury. *Arch Surg* 123 (1988): 287-292
37. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD et al: Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 257 (1992): 387-389
38. Fischer JE, Funovics JM, Aguirre A, James JH, Keane JM, Wesdorp RI, Yoshimura N, Westman T: The role of plasma amino acids in hepatic encephalopathy. *Surgery* 78 (1975): 276-290
39. Freund HR, Muggia-Sullam M, LaFranca R, Holroyde J, Fischer JE: Regional brain amino acid and neurotransmitter derangements during abdominal sepsis and septic encephalopathy in the rat. *Arch Surg* 121 (1986): 209-216
40. Freund HR, Muggia-Sullam M; Peiser J, Melamed E: Brain neurotransmitter profile is deranged during sepsis and septic encephalopathy in the rat. *J Surg Res* 38 (1985): 267-271
41. Freund HR, Ryan JE Jr, Fischer JE: Amino acid derangements in patients with sepsis: treatment with branched chain amino acid rich infusions. *Ann Surg* 188 (1978): 423-430
42. Furchgott RF: Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: basis for the proposal that the acid-activatable component of the inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrate and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide.

In: Vanhoutte PM, ed. Mechanisms of vasodilatation. New York: Raven Press (1988): 401-414

43. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nat* (1980): 373-376
44. Garthwaite J: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14 (1991): 60-67
45. Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, DiSilvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Biliar TR: Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993): 3491-3495
46. Geroulanos S, Schilling J, Cakmakei M et al : Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock. *Lancet* 339 (1992): 435
47. Giovanelli J, Campos KL, Kaufman S: Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase does not function as a reactant in the oxygenation of arginin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991): 7091-7095
48. Goldman-Rakic PS: Working memory (Das Arbeitsgedächtnis). *Gehirn und Bewußtsein*. 1994: 68-76
49. Gonzalez-Zulueta M, Ensz LM, Mukhin G, Zwacka RM, Engelhardt JF, Oberley LW, Dawson, VL, Dawson TM: Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide mediated neurotoxicity. (submitted)
50. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR: Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci* 78 (1981): 7764-7768
51. Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P: Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Sci* 212 (1981): 56-58
52. Griscavage JM, Hobbs AJ, Ignarro LJ: Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds. *Adv Pharmacol* 34 (1995): 215-234
53. Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ: Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mous. *J Neuroimmuno* 47 (1993): 167-176
54. Hanbauer I, Wink D, Osawa Y, Edelman GM, Gally JA: Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [³H]-dopamine from striatal slices. *Neurorep* 3 (1992): 409-412
55. Hasselgren PO, Fischer JE: Septic encephalopathy. Etiology and management. *Intens Care Med* 12 (1986): 13-16
65. Hegesh E, Shiloah: Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chem Act* 125 (1982): 107- 115

57. Hevel JM, Marletta MA: Macrophage nitric oxide synthase relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. *Biochem* 31 (1992): 7160-7165
58. Houtchens BA, Westenskow DR: Oxygen consumption in septic shock: collective review. *Circ Shock* 13 (1984): 361-384
59. Ignarro LJ, Buga GM, Woods KS, Byrns RE, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 84 (1987): 9265-9269
60. Ignarro LJ: Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *Faseb J* 3 (1989): 31-36
61. Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA: Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharm Exp Ther* 218 (1981): 739-749
62. Jackson AC, Gilbert JJ, Young GB, Bolton CT: The encephalopathy of sepsis. *Can J Neurol Sci* 12 (1985): 303-307
63. Jacobs RF, Kill DP, Balk RA: Alveolar macrophage function in a canine model of endotoxine-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* 134 (1986): 745-751
64. Jeppson B, Freund HR, Gimmon Z, James JH, Meienfeldt MFv, Fischer JE: Blood-brain barrier derangement in sepsis. Cause of septic encephalopathy? *Amer J Surg* 141 (1981): 136-142
65. Kan H, Finkel MS: Is big NO little NO's evil twin? *Crit Care Med* 28 (2000): 1669-1670
66. Kilbourn RG, Jubran A, Gross SS et al: Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 172 (1990): 1132-1138
67. Kirkeboen KA, Naess PA, Christensen G, Kiil F: Importance of nitric oxide in canine femoral circulation: comparison of two NO inhibitors. *Cardiovasc Res* 26 (1992): 357-361
68. Kirkeboen KA, Naess PA, Offstad J, Ilebeck A: Effects of regional inhibition of nitric oxide synthesis in intact porcine hearts. *Am J Physiol* 266 (1994): H1516-H1527
69. Kirkeboen KA, Strand OA: The role of nitric oxide in sepsis - an overview. *Acta Anaesthiol Scand* 43 (1999): 275-288
70. Klabunde RE, Helgren MC: Cardiovascular actions of NG-methyl-L-arginine are abolished in a canine shock model using high dose endotoxin. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 78 (1992): 57-68

71. Klabunde RE, Ritger RC: NG-monomethyl-L-arginine restores arterial blood pressure but reduces cardiac output in a canine model of endotoxic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 178 (1991): 1135-1140
72. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S: Formation of nitric oxide from L-Arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989): 5159-5162
73. Krueger JM, Walter J, Dinarello CA, Wolff SM, Chedid L: Sleep-promoting effects of endogenous pyrogen (interleukin-1). *Amer J Physiol* 246 (1984): R 994-R999
74. Kubes P, Granger DN: Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Amer J Physiol* 262 (1992): H611-H615
75. Licino J, Prolo P, McCann SM, Wong ML: Brain iNOS: current understanding and clinical implications. *Mol Med Today* 5 (1999): 225-232
76. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S: Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 144 (1990): 4794-4797
77. Lipton SA, Choi YB, Pan Z-H, Lei SZ, Vincent Chen H-S, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364 (1993): 626-632
78. Lonart G, Wang J, Johnson KM: Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 220 (1992): 271-272
79. Lorente JA, Landin L, De Pablo R et al: L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 21 (1993): 1287-1295
80. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: A physiologic messenger. *Annual Intern Med* 120 (1994): 227-237
81. MacMicking JD et al: Altered response to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81 (1995): 641-650
82. Maekawa T, Fujii Y, Sadamitsu D, Yokota K, Soejima Y, Ishikawa T, Miyauchi Y, Takeshita H: Cerebral circulation and metabolism in patients with septic encephalopathy. *Amer J Emerg Med* 9 (1991): 139-143
83. Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268 (1993): 12231-12234
84. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Bioch* 27 (1988): 8706-8711

85. Micoock BA, Sabelli HC, Dubin A, Javaid JI, Poulos A, Rackow EC: Septic encephalopathy. Evidence for altered phenylalanine metabolism and comparison with hepatic encephalopathy. *Arch Intern Med* 150 (1990): 443-449
86. Minnard EA, Shou J, Naama H, Cech A, Gallagher H, Daly JM: Inhibition of nitric oxide synthesis is detrimental during endotoxemia. *Arch Surg* 129 (1994): 142-148
87. Moncada S, Higgs A: The L-arginin-nitric oxide pathway. *New Engl J Med* (1993): 2002-2011
88. Moncada S, Palmer RKJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 (1991): 109-143
89. Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL: L-NG-nitro-arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 102 (1991): 298-202
90. Morley JE, Flood JF: Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Science* 49 (1991): 707-711
91. Morris SM, Jr., Biliar TR: New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 266 (1994): E829-839
92. Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Mince-Golomb D, Schwartz JP: Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trend Neurosci* 16 (1993): 323-328
93. Naess PA, Kirkeboen KA, Christensen G, Kiil F: Inhibition of renal nitric oxide synthesis with NG-monomethyl-L-arginine and NG-nitro-L-arginine. *Am J Physiol* 262 (1992): F939-F942
94. Nathan C, Xie QW: Nitric oxide synthesis: roles, tolls, controls. *Cell* 78 (1994): 915-918
95. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 (1992): 3051-3064
96. Neugebauer E, Dimmler S, Troidl H: Mediatorensysteme und Sepsis. *Chirurg* 66 (1995): 2-10
97. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL: Sepsis syndromes: understanding the role of innate and aquired immunity. *Shock* 16 (2001): 83-96
98. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O: Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991): 11285-11289
99. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nat* (1987): 524-526

100. Palmer RM: The discovery of Nitric oxide in the vessel wall. A unifying concept in the pathogenesis of sepsis. *Arch Surg* 128 (1993): 396-401
101. Pan W, Banks WA, Kastin AJ: Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons. *N Neuroimmunol* 76 (1997): 105-111
102. Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C et al: Serial cardiovascular variables in survivors and non-survivors of human septic shock. *Crit Care Med* 15 (1987): 923-929
103. Pauwels PJ, Leysen JE: Blockade of nitric oxide formation does not prevent glutamate-induced neurotoxicity in neuronal cultures from rat hippocampus. *Neurosci Lett* 143 (1993): 27-30
104. Petros A, Bennett D, Valance P: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 338 (1991): 1557-1558
105. Pinsky MR, Matuschac GM: A unifying hypothesis of multiple system organ failure. Failure of host defense homeostasis. *J Crit Care* 5 (1990): 108-114
106. Radomski MW, Moncada S: Biological role of nitric oxide in platelet function. In: Moncada S, Higgs EA, Berrazueta JR, eds. *Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system*. Madrid: EDICOMPLET (1991): 45-56
107. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S: Endogenous NO inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* (1987): 1057-1058
108. Rapaport RM, Murad F: Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 52 (1983): 352-357
109. Regan RF, Renn KE, Panter SS: NMDA neurotoxicity in murine cortical cell cultures is not attenuated by hemoglobin or inhibition of nitric oxide synthesis. *Neurosci Lett* 153 (1993): 53-56
110. Salvemini D, De Nucci G, Gryglewski RJ, Vane JR: Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci* 86 (1989): 6328-6332
111. Schmidt K, Mayer B: Assay of tissue activity of nitric oxide synthase. *Curr Prot Tox* (1999): 10.2.1-10.2.13
112. Schuman EM, Madison DV: A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254 (1991): 1503-1506
113. Schuman EM, Madison DV: Nitric oxide and synaptic function. *Annual Reviews of Neuroscience* 17 (1994): 153-183
114. Shibuki K, Okada D: Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349 (1991): 326-328

115. Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS: Blockade of N-methyl-D-aspartate-receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 266 (1984): 850-852
116. Soejima Y, Fujii Y, Ishikawa T, Takeshita H, Maekawa T: Local cerebral glucose utilization in septic rats. *Crit care Med* 18 (1990): 423-427
117. Sprung CL, Cerra FB, Freund Hr, Schein RM, Konstantinides FN, Marcial EH, Pena M: Amino acid alterations and encephalopathy in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 19 (1991): 753-757
118. Strand O, Kirkeboen KA, Giercksky KE: Inhibition of nitric oxide synthase does not affect survival in a rat model of abdominal sepsis. *Scand J Clin Lab Invest* 57 (1997): 105-110
119. Stuehr DJ, Marletta MA: Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. *J Imm* 139 (1987): 518-525
120. Stuehr DJ, Marletta MA: Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines, *Can Res* 47 (1987): 5590-5594
121. Thiemermann C: Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmac* 29 (1997): 159-166
122. Venturini CM, Knowles RG, Palmer RMJ, Moncada S: Synthesis of nitric oxide in the bovine retina. *Biochem Biophys Res Commun* 189 (1991): 920-925
123. Vromen A, Arkovitz MS, Zingarelli B, Salzman AL, Garcia VF, Szabo C: Low-level expression and limited role for the inducible isoform of nitric oxide synthase in the vascular hyporeactivity and mortality associated with cecal ligation and puncture in the rat. *Shock* 6 (1996): 248-253
124. Wagner DA, Young VR, Tannenbaum SR, Schutz DS, Deen WM: Mammalian nitrate biochemistry, metabolism and endogenous synthesis. *Sci Pub* 34 (1984): 247-253
125. Wei QW et al: Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375 (1995): 408-411
126. Wijdicks EF, Stevens M: The role of hypotension in septic encephalopathy following surgical procedures. *Arch Neurol* 49 (1992): 653-656
127. Wong M-L, Rettori V, Al-Shekhlee A, Bongiorno PB, Canteros G, McCann AM, Gold PW, Licinio J: Inducible nitric oxide synthase gene expression in the rat brain during systemic inflammation. *Nat Med* 2 (1996): 581-584
128. Worrall NK, Chang K, Suau GM et al: Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents myocardial and systemic vascular barrier dysfunction during early cardiac allograft rejection. *Circ Res* 78 (1996): 796-779

129. Young GB, Bolton CF, Austin TW, Archibald YM, Gonder J, Wells GA: The encephalopathy associated with septic illness. *Clin Invest Med* 13 (1990): 297-304
130. Young GB, Young GB, Bolton CF, Austin TW, Archibald YM, Gonder J, Wells GA: Neurologic complications of systemic critical illness. The encephalopathy associated with septic illness. *Neurol Clin* 13 (1995): 645-658
131. Young GB, Bolton CF, Archibald YM, Austin TW, Wells GA: The electroencephalogram in sepsis-associated encephalopathy. *J Clin Neurophysiol* 9 (1992): 145-152
132. Xi L, Jarrett NC, Hess ML et al: Essential role of inducible nitric oxide synthase in monophosphoryl lipid A-induced late cardioprotection: Evidence from pharmacological inhibition and gene knockout mice. *Circulation* 99 (1999): 2157-2163
133. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J et al: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256 (1992): 225-228
134. Zhu X-Z, Luo L-G: Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. *J Neurochem* 59 (1992): 932-935
135. Zinetti M, Benigni F, Sacco S, Minto M, Galli G, Salmona S, Andreoni G, Vezzani A, Ghezzi P, Fratelli M: Regional production of nitric oxide after a peripheral or central low dose of LPS in mice. *Neuroimmunomod* 3 (1996): 364-370
136. Zou L-B, Yamada K, Tanaka T, Kameyama T, Nabeshima T: Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharm* 37 (1998): 323-330

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen danken:

Hr. Prof. Dr. med. Kochs für das Ermöglichen dieser Arbeit in seinem Institut.

Hr. PD Dr. med. Blobner, meinem Doktorvater, für das Ermöglichen dieser Arbeit.

Fr. Dr. med Eckel für die intensive Betreuung und Unterstützung meiner Promotionsarbeit. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Hr. Prof. Dr. med. Gänsbacher für die Nutzung der Laboratorien.

Hr. Prof. Dr. med. Allescher für die Nutzung des Radioaktiv-Labors.

Fr. Frye für ihre medizinisch-technische Assistenz bei den Laborversuchen.

Fr. Dr. med. Sennefelder für ihre Hilfe bei der Hochreinigung des radioaktiven Arginins.

Hr. Schimitzek, meinem Lebensgefährten, für seine Unterstützung und stets optimistische Einstellung bezüglich der Fertigstellung dieser Arbeit.

Fr. und Hr. Dres. med. Eisenhauer, meinen Eltern, für das Ermöglichen meines Medizinstudiums.

Allen Anderen, die mir kleinere und größere labortechnische Fragen beantworteten, mir bei Problemen weiterhalfen oder sonst irgendwie zur Entstehung dieser Arbeit beitrugen.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Astrid Eisenhauer
Anschrift	Kolosseumstraße 6/IV 80469 München
Telefon	089 / 260 264 12 0172 / 86 25 201
e-mail	astrid.eisenhauer@web.de
Geburtsdatum	01. Oktober 1975
Geburtsort	Pforzheim
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1982 – 1986	Grundschule an der Rothpletzstraße, München
1986 – 1995	Oskar-von-Miller-Gymnasium, München Abschluß: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,9)

Hochschulbildung

WS 1995/96 – SS 1998	Studium der Medizin an der Universität Leipzig
Herbst 1997	Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,66)
Herbst 1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 3,00)
WS 1998/99–WS 2001/02	Studium der Medizin an der Technischen Universität München
Herbst 2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,00)
Frühling 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,00)

Beruflicher Werdegang

Seit Juli 2002	Anstellung als Ärztin im Praktikum im Städtischen Krankenhaus München-Harlaching
----------------	---

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Promotionsarbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe.

München, 21.05.03

Astrid Eisenhauer

Anhang: Kurzzusammenfassung (Vorgabe ~8 Zeilen) für das Jahrbuch der TUM, www.ub.tum.de/jahrbuch/jahr.html, muß vom Doktorvater unterschrieben werden.

Bei Sepsis werden von der induzierbaren Stickstoffmonoxid (NO) -Synthase große Mengen an NO produziert. Wir untersuchten die mögliche Beteiligung des veränderten NO-Stoffwechsels am Zustandekommen der septischen Enzephalopathie im Rahmen einer Sepsis. Es scheint, als führe die NO-Überproduktion durch die (systemische) iNOS während einer Sepsis zu einer feedback-Hemmung der neuronalen (n) NOS-Aktivität und sogar nNOS-Proteinkonzentration im präfrontalen Kortex. Die Folgen könnten eine Verschlechterung des Arbeitsgedächtnisses als (Mit-) Ursache der septischen Enzephalopathie sein.