

Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Hydroxyimino-Verbindungen und Organischen Nitraten

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität Hamburg
Fachbereich Chemie

vorgelegt von

Isabell Runge

aus Osnabrück

Hamburg 2000

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein

Prof. Dr. D. Geffken

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2000

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 1996 bis November 2000 im Institut für Pharmazie der Universität Hamburg auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein,

dem ich für die Überlassung des Themas, seine zahlreichen Anregungen, stete Diskussionsbereitschaft und engagierte Betreuung herzlich danke.

Herrn Prof. Dr. D. Geffken

möchte ich für die Übernahme des Koreferats und für das freundliche Überlassen der von ihm synthetisierten Substanzen herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Kurz, der durch seine kritische Betrachtung sehr am Gelingen dieser Arbeit beteiligt war. Bei Problemen oder Fragen konnte ich mich immer auf seine Hilfsbereitschaft und sein Engagement verlassen.

Frau C. Bostedt danke ich sehr herzlich für ihre ständige Bereitschaft zur Hilfe bei den Durchführungen der Versuche.

Herrn Dr. U. Riederer danke ich für seine stets spontane Hilfe bei großen und bei kleinen technischen Problemen.

Bei Frau S. Hoffmann möchte ich mich für die Hilfe beim Lesen der Korrekturen bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre ermutigende Unterstützung und die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ferner danke ich Frau Dr. C. Riederer, Frau Dr. M. Köthemann, Frau Dr. C. Fonger und Herrn Dr. T. Kurz, die mir freundlicherweise die von ihnen synthetisierten Substanzen für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben, sowie allen anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung
(d6-DMSO)	deuteriertes Dimethylsulfoxid
Ach	Acetylcholin
aliphat.	aliphatisch
Arg	Arginin
aromat.	aromatisch
Asc	Ascorbinsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ber.	berechnet
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
CDI	1,1' - Carbonyldiimidazol
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cys	Cystein
d	Dublett
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatogramm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ESR	Elektronenspinresonanz
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
Glu	Glutamat
GTN	Glyceroltrinitrat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IOPh	Iodosobenzol
IR	Infrarot
ISDN	Isosorbiddinitrat
J	Kopplungskonstante
m	Multiplett

M	mol / L
MS	Massenspektroskopie
NaBH ₄	Natriumtetrahydroborat
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NANC	non-adrenerg-non-cholinerg
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
nNOS	neuronal NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOHA	N ^ω -Hydroxy-L-arginin
PDE	Phosphodiesterase
ppm	parts per million
q	Quartett
quart.	quartär
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
SD	Standardabweichung
sGC	lösliche (soluble) Guanylat-Cyclase
SOD	Superoxiddismutase
t	Triplett
tert.	Tertiär
TMS	Tetramethylsilan
TPP	Tetraphenylporphyrin
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung -----	11
1.1	Eigenschaften von NO -----	12
1.2	Biosynthese von NO-----	17
1.2.1	NO-Synthase-----	18
1.3	Physiologische Funktionen von NO -----	23
1.3.1	Im Gefäßsystem-----	23
1.3.2	Im zentralen und peripheren Nervensystem -----	23
1.3.3	Im Immunsystem -----	25
1.4	Pathophysiologische Funktionen von NO-----	26
1.4.1	Im Gefäßsystem-----	27
1.4.2	Im zentralen und peripheren Nervensystem -----	28
1.4.3	Im Immunsystem -----	28
1.4.4	DNA-----	29
1.5	NO-Donatoren und NOS-Inhibitoren-----	29
1.6	Aufgabenstellung-----	32
2	Das Modellsystem und die Kofaktoren -----	36
2.1	Das Cytochrom P450-Modellsystem-----	36
2.1.1	Sauerstoffdonatoren-----	39
2.1.1.1	Iodosobenzol-----	39
2.1.1.2	Wasserstoffperoxid-----	40
2.1.2	Reduktionsmittel -----	40
2.1.2.1	Natriumtetrahydroborat -----	40
2.2	Die Kofaktoren -----	41
2.2.1	L-Cystein -----	41
2.2.2	Kupferionen-----	42

2.2.3	Superoxidismutase (SOD)	42
2.2.4	Katalase	43
3	Die NO-Messung	45
3.1	Prinzip der Chemilumineszenz	47
3.2	Der Versuchsaufbau	47
3.3	Bestimmung von NO, Nitrit und Nitrat	49
4	Hydroxyimino-Verbindungen als NO-Donatoren	51
4.1	Literaturübersicht zur oxidativen Bindungs- spaltung der Hydroxyiminogruppe	51
4.1.1	Physiologischer Mechanismus	51
4.1.2	N-Hydroxyguanidine und Amidoxime	53
4.1.3	Harnstoffderivate	62
4.1.4	Thioharnstoffderivate	65
4.1.5	Hydroxamsäuren	67
4.2	Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen	70
4.2.1	N ^ω -Hydroxy-L-arginin	70
4.2.2	Amidoxime	74
4.2.2.1	4-Hydroxyimino-oxazolidin-2-one	74
4.2.3	N-Hydroxyisoharnstoffe	82
4.2.3.1	2-Hydroxyimino-oxazolidin-4-one	82
4.2.4	N-Hydroxyisothioharnstoffe	98
4.2.4.1	2-Hydroxyimino-thiazolidin-4-one	98
4.2.5	Hydroxamsäuren	104
4.2.5.1	α-Hydroxyiminohydroxamsäuren	104
4.3	Diskussion der Ergebnisse	109
4.4	Der Freisetzungsmechanismus	112

4.4.1	Nachweis der Oxoverbindungen -----	115
4.4.1.1	Synthese der Oxoverbindungen -----	115
4.4.1.2	HPLC-Analytik -----	118
4.4.2	Nachweis von Hydroxylamin -----	122
4.4.3	Einfluß von Iodosobenzol -----	125
4.4.4	Einfluß des FeTPPCL / IOPh-Systems -----	126
5	Hydroxylamin -----	128
5.1	Literaturübersicht -----	128
5.2	Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen -----	132
5.3	Diskussion der Ergebnisse -----	135
5.4	Indirekter Nachweis von NO ⁻ -----	137
5.4.1	Kolorimetrischer Nachweis -----	137
5.4.2	Nachweis mit Hilfe von Superoxiddismutase -----	140
6	Organische Nitrate als NO-Donatoren -----	143
6.1	Literaturübersicht -----	143
6.1.1	Organische Nitrate mit Thiolesterpartialstruktur -----	146
6.2	Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen -----	148
6.2.1	Benzylnitratderivate -----	148
6.2.2	N-Acyl-S-(nitrooxyacyl)-L-cystein-Derivate -----	150
6.3	Diskussion der Ergebnisse -----	157
7	Zusammenfassung -----	158
8	Summary -----	162
9	Experimenteller Teil -----	166
9.1	Allgemeine Angaben -----	166

9.2	NO-Messung	170
9.2.1	Messungen aus flüssigen Systemen	171
9.2.1.1	Kalibrierung	171
9.2.1.2	NO-Messung aus den Proben	173
9.2.1.3	Nitrit- und Nitrat-Messung aus den Proben	173
9.2.2	Messungen aus dem Headspace	175
9.2.2.1	Kalibrierung	175
9.2.2.2	NO-Messung aus den Proben	177
9.2.2.3	Nitrit-Messung aus den Proben	178
9.2.3	Meßdaten der Chemilumineszenz-Bestimmung	179
9.3	Synthese der Oxoverbindungen	200
9.4	HPLC-Analytik	203
9.4.1	Proben	204
9.5	Kolorimetrischer Nachweis von Hydroxylamin	204
9.5.1	Kalibrierung	204
9.5.2	Proben	205
9.6	Kolorimetrischer Nachweis von Peroxynitrit	206
9.6.1	Darstellung von Peroxynitrit	206
9.6.2	Durchführung der Versuche	206
9.6.2.1	Kalibrierung	207
9.6.2.2	Proben	208
9.7	Gekaufte Substanzen	209
10	Literaturverzeichnis	210
11	Anhang: Gefahrstoffe	236
12	Lebenslauf	238

1 Einleitung

Die Verleihung des Nobelpreises für Physiologie und Medizin im Jahre 1998 an Ferid Murad, Louis Ignarro und Robert F. Furchgott für die Entdeckung endothelvermittelter vasorelaxierender Eigenschaften von Stickstoffmonoxid war der bisherige Höhepunkt in der großen Karriere des kleinen Moleküls NO.

Stickstoffmonoxid, ein bei Raumtemperatur unter Standardbedingungen farbloses Gas, war lange Zeit nur als atmosphärisches Umweltgift bekannt.

Die ersten Berichte über die Herstellung von NO stammen bereits aus dem Jahre 1620 aus Belgien. Schon 40 Jahre später gelang R. Hooke und R. Boyle unabhängig voneinander die Darstellung von NO durch Erhitzen von Kaliumnitrat mit glühender Holzkohle in Abwesenheit von Luft¹).

1846 erhielt der italienische Chemiker Sobrero aus einem Gemisch von Glycerol und Schwefel- und Salpetersäure zum ersten mal Glyceroltrinitrat²).

17 Jahre später entdeckte Alfred Nobel eine sichere Herstellungsmethode für Dynamit¹ aus Glyceroltrinitrat, das er sich unter dem Namen "Nobels explosives Öl" patentieren ließ. Als er 1896 an Angina pectoris erkrankte, lehnte er jedoch die Einnahme des bereits seit 1879 zur Behandlung dieser myokardialen Ischämie erfolgreich eingesetzten Glyceroltrinitrats³) ab und verstarb noch im selben Jahr⁴).

1980 berichteten Furchgott und Zawadzki erstmalig von einer endogenen Substanz, die den vasodilatorischen Effekt von Acetylcholin intakter Endothelzellen vermittelt und nannten sie EDRF (endothelium-derived relaxing factor)⁵). Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit⁶) dauerte es weitere sieben Jahre, bis die chemische Struktur von EDRF als Stickstoffmonoxid von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander identifiziert wurde^{7, 8, 9, 10}).

¹Dynamit besteht aus einer 75% igen Mischung von Glyceroltrinitrat mit Kieselgur.

Bis zum heutigen Tag flammt die Diskussion, ob nicht auch Nitrosothiole, Dinitrosyleisencystein-Komplexe, Nitroxylanionen, N^ω-Hydroxy-L-arginin-NO-Komplexe und Hydroxylamin als EDRF reagieren können, immer wieder auf, obwohl die Arbeiten von Furchgott und Ignarro weitgehend anerkannt sind.

1.1 Eigenschaften von NO

Stickstoff verfügt über 5 Valenzelektronen, die in einer s^2p^3 Konfiguration angeordnet sind. Er kann daher in Oxidationsstufen von -3 (NH_3) bis $+5$ (NO_3^-) auftreten. NO zeigt mit seinen 15 Elektronen als ein freies Radikal paramagnetische Eigenschaften. Betrachtet man die Verteilung der 11 Valenzelektronen im Orbitalmodell (Abbildung 1-1), so bilden die beiden 2s und die drei 2p Orbitale des Stickstoffes und des Sauerstoffes 8 Molekülorbitale, von denen vier bindend und vier antibindend sind. Im Grundzustand kommt NO also auf acht bindende und drei antibindende Elektronen, was einer formalen Bindungsordnung von 2,5 entspricht.

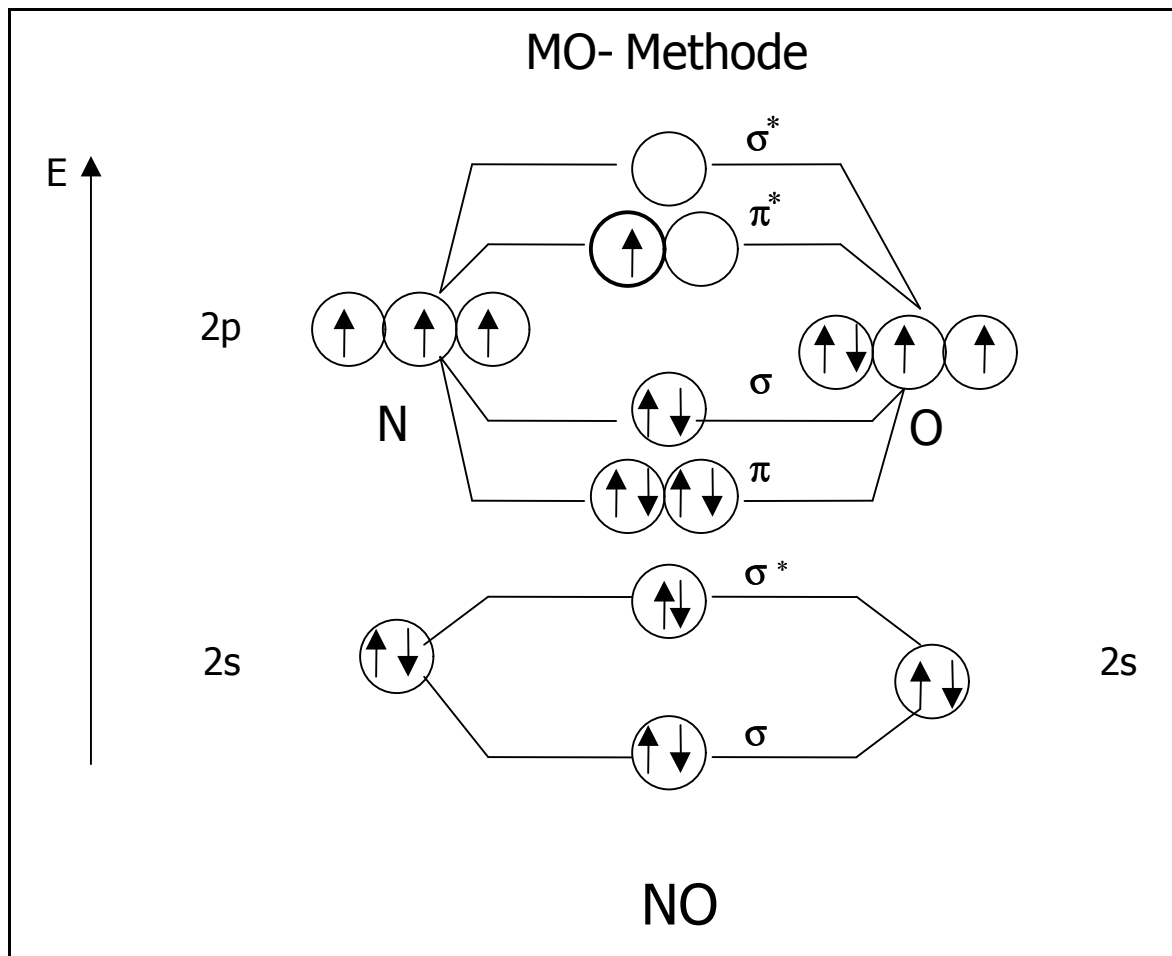
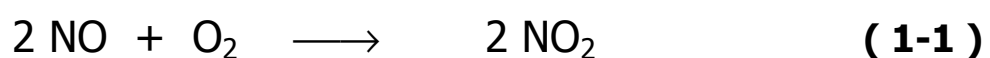


Abbildung 1-1 Vereinfachtes Molekülorbitalmodell von Stickstoffmonoxid im Grundzustand

Sein radikalischer Charakter bedingt die meisten seiner chemischen Reaktionen.

NO hat einen Siedepunkt von $-151,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ sowie einen Schmelzpunkt von $-163,6^{\circ}\text{C}$. Der Stickstoff besitzt die Oxidationsstufe +2 und liegt damit an zweiter Stelle in der Oxidationsreihe der Stickoxide, die von +1 bis +5 reichen.

Die Reaktion mit Sauerstoff erfolgt spontan und ergibt NO_2 , ein braunes Gas¹¹⁾.

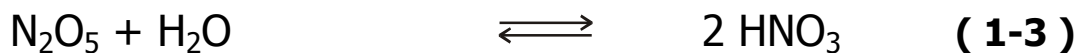
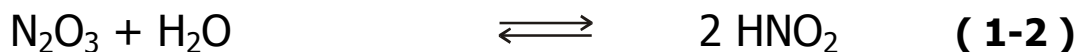


Die Kinetik der Reaktion verläuft 2. Ordnung bezogen auf NO, 1. Ordnung hingegen bezogen auf O₂.

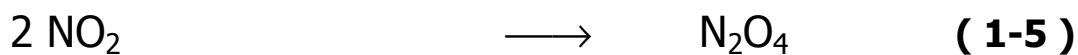
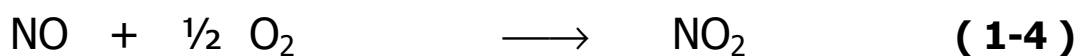
In der Atmosphäre beträgt die NO-Halbwertszeit 24 Sekunden, während bei einer Absenkung der NO-Konzentration um den Faktor 1000 seine Halbwertszeit auf 7 Stunden ansteigt.

Im Gegensatz zum ebenfalls radikalischen NO₂, zeigt NO keine ausgeprägte Dimerisierungstendenz¹²⁾. Wie alle Stickoxide ist NO thermodynamisch instabil, seine Disproportionierung zu N₂O und NO₂ aber kinetisch gebremst, so daß es unter 1 atm Druck und unter Standardbedingungen gelagert werden kann.

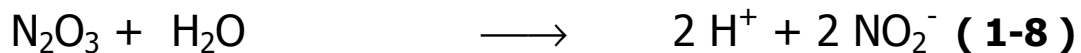
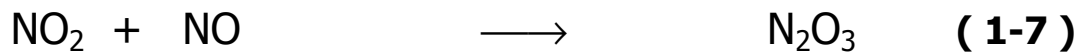
Physiologisch kommt NO überwiegend in Lösung vor. Seine Wasserlöslichkeit ist mit $1,7 \cdot 10^{-3}$ mol/L gering¹³⁾ und unterliegt im Gegensatz zu N₂O₃ und N₂O₅ keiner Hydrationsreaktion.



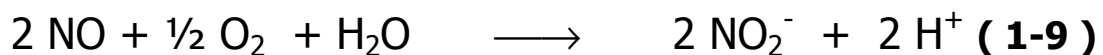
Im wäßrigen Medium sollte aus der Reaktion mit Sauerstoff zu gleichen Teilen Nitrit und Nitrat entstehen:



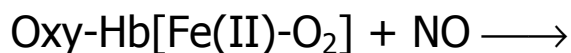
Aufgrund der schnelleren Reaktion von NO₂ mit einem weiteren Molekül NO zu N₂O₃ findet man jedoch fast ausschließlich Nitrit.



Gleichung 1.9 gibt die Gesamtgleichung der Nitritentstehung wieder¹⁴⁾.



NO reagiert bereits bei Raumtemperatur mit Metallionen zu Komplexen, von denen nur die der Übergangsmetalle stabil sind. Dabei besetzen Elektronen des Stickstoffmonoxids freie d-Orbitale des Zentralions¹¹⁾. Physiologisch wird diese Eigenschaft z.B. bei der Reaktion mit dem Eisenzentration des Hämoglobins beobachtet. Im arteriellen Gefäßbett entsteht aus Oxyhämoglobin und NO Methämoglobin und Nitrat¹⁵⁾.



Diese Reaktion zeichnet sich neben der Nitritbildung (**1-9**) hauptverantwortlich für die fehlende systemische Wirkung von NO im Körper. Die Halbwertszeit von NO unter physiologischen Bedingungen wird mit Werten um 5 Sekunden angegeben¹⁶⁾.

Bedenkt man, wie viele Zellen Metalloproteine oder Enzyme Häm als prosthetische Gruppe enthalten, wird schnell klar, daß noch zahlreiche Funktionen des Stickstoffmonoxids zu entdecken sind.

Aufgrund seines hohen Diffusionskoeffizienten (3 bis $4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ in Wasser von 37°C¹⁷⁾), seiner guten Membrangängigkeit und seiner ausgeprägten Lipidlöslichkeit kann NO trotz der geringen

Halbwertszeit in bis zu 160 nm Entfernung von seinem Bildungsort Reaktionen eingehen.

Eine weitere wichtige Reaktion von NO ist die Umsetzung mit Thiolen, die auch physiologisch große Bedeutung besitzt, denn es gilt als gesichert, daß S-Nitrosothiole die Haupttransportform für NO über längere Wegstrecken darstellen. Die SH-Gruppen werden von Cystein, Glutathion sowie Serumalbumin¹ geliefert ¹⁸).

Durch Oxidation von NO bilden sich Nitrosiumionen (NO^+)¹⁹), die sehr reaktiv und höchstens in stark saurer Lösung beständig sind. In wäßriger Lösung reagieren sie sofort weiter zu salpetriger Säure bzw. zu Nitrit.



Physiologische Bedeutung erfährt NO^+ in Transnitrosierungsreaktionen, bei denen Nitrosothiole Nitrosiumionen auf andere Thiole übertragen können²⁰).

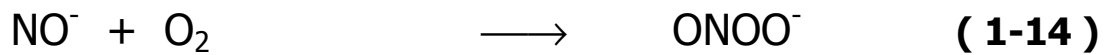


Die Reduktion von NO führt zur Bildung der Nitroxylanionen (NO^-)¹⁹), die bevorzugt im Sauren nach Dimerisierung zu $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$ unter Wasserabspaltung N_2O bilden.

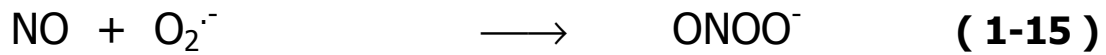


Aus der Reaktion von Sauerstoff mit NO^- kann Peroxynitrit²¹) hervorgehen, eine Substanz mit hohem Oxidationspotential, die vor allem für das toxische Verhalten von NO eine große Rolle spielt.

¹ Die Halbwertszeit von Nitrosoalbumin liegt z. B. bei 40 Minuten.



Die Reaktion von NO und $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikalen liefert ebenfalls Peroxynitrit.



1.2 Biosynthese von NO

Endogen wird NO in zwei Schritten (Abbildung 1-2) aus einem der beiden terminalen Guanidinstickstoffe des L-Arginins²²⁾ in einem von NO-Synthasen katalysierten Prozeß mit Hilfe verschiedener Kofaktoren und Häm als prosthetischer Gruppe durch eine fünf Elektronenoxidation gebildet²³⁾.

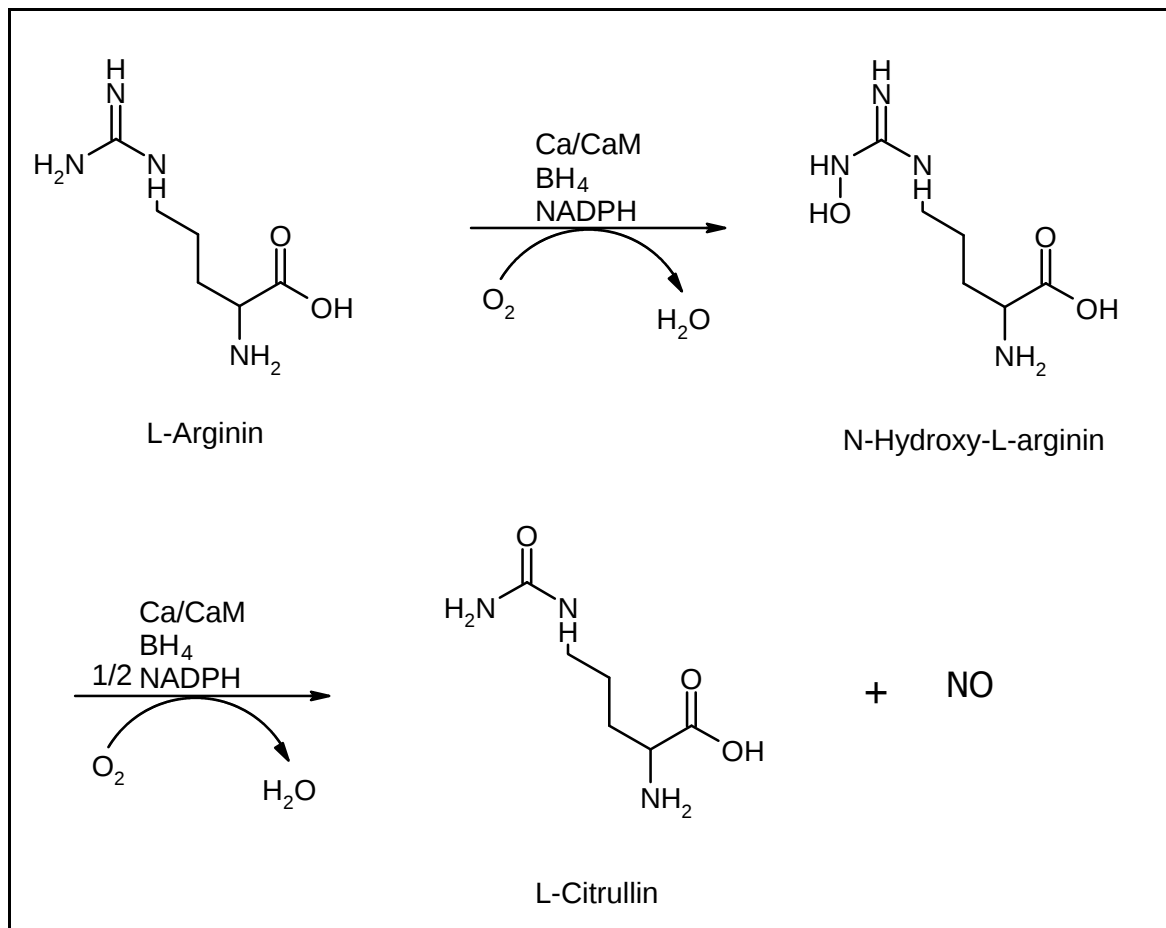


Abbildung 1-2 Biosynthese von NO

Im ersten Reaktionsschritt entsteht unter Verbrauch von einem Mol NADPH und Sauerstoff als Zwischenprodukt N^ω-Hydroxy-L-arginin^{24, 25}). Im zweiten Reaktionsschritt wird unter weiterem Verbrauch von Sauerstoff und einem halben Mol NADPH der hydroxylierte Stickstoff zu NO oxidiert, wobei Citrullin entsteht. ¹⁸O-Markierungsexperimente bewiesen, daß beide dabei eingeführten Sauerstoffatome aus elementarem Sauerstoff und nicht aus Wasser stammen^{26, 27}).

Während der erste Reaktionsschritt für die NO-Synthasen spezifisch ist, kann die Katalyse des zweiten Teils der Reaktion u. a. von Cytochrom P450 übernommen werden^{28, 29, 30}).

1.2.1 NO-Synthase

Bis heute sind drei Isoenzyme der NO-Synthase in ihrer Struktur vollständig aufgeklärt. In der Reihenfolge ihrer Entdeckung wurden

sie zunächst durch den Zusatz I, II und III gekennzeichnet. Heute werden sie in der Regel nach ihrem ersten Fundort unterschieden in:

- Endotheliale NO-Synthase (eNOS, bzw. NOS III)³¹⁾
- Neuronale NO-Synthase (nNOS, bzw. NOS I)³²⁾
- Induzierbare NO-Synthase (iNOS, bzw. NOS II)³³⁾

Eine vierte, mitochondriale NOS wird derzeit diskutiert¹.

Die NO-Synthase liegt als Homodimer vor, wobei jede Untereinheit aus einer C-terminalen Reduktasedomäne ("Schwanz") sowie einer N-terminalen Oxygenase Domäne ("Kopf") besteht. Dabei konnten für die eNOS und die nNOS Kopf-Kopf, Kopf-Schwanz sowie Schwanz-Schwanz Verknüpfungen, für die iNOS lediglich Kopf-Kopf Verknüpfungen gefunden werden³⁴⁾. Abbildung 1-3 zeigt eine schematische Darstellung eines Monomers der NO-Synthase³⁵⁾.

¹ Persönliche Mitteilung, C. Richter, ETH Zürich

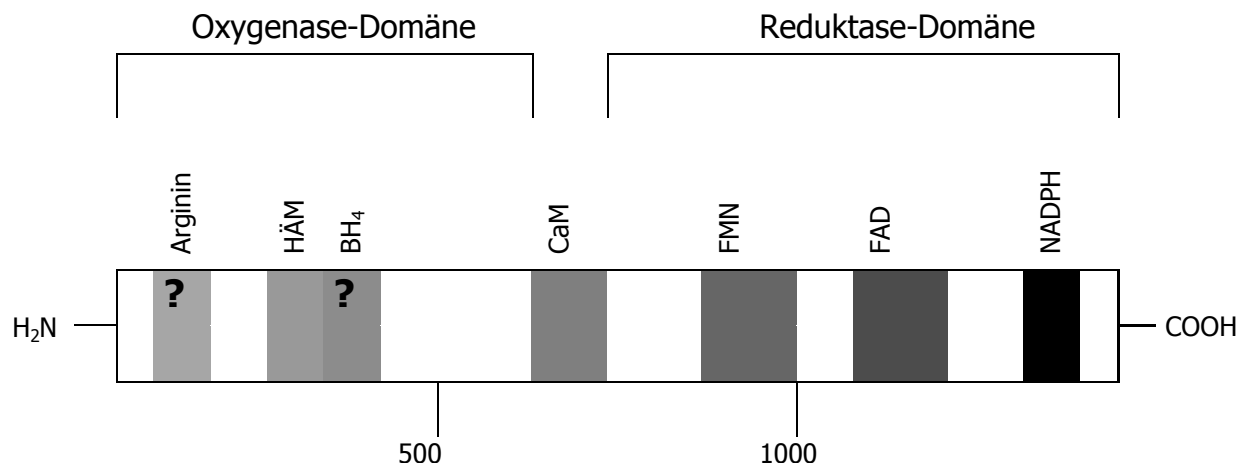


Abbildung 1-3 Schematischer Aufbau eines Monomers der NO-Synthase

Die Bindungsstellen der für die Biosynthese erforderlichen Kofaktoren NADPH, FAD und FMN befinden sich auf dem C-terminalen Ende, das aufgrund seiner großen Ähnlichkeit zur NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase auch als Cytochrom P450-Reduktase-Domäne bezeichnet wird³⁶⁾. NADPH liefert die Elektronen, die über FAD und FMN auf Häm übertragen werden. Da die Flavoproteine im Gegensatz zum NADPH auch einzelne Elektronen abgeben können, ist es aufgrund ihrer Beteiligung möglich, wie schon bei der Cytochrom P450-Reduktase bekannt³⁷⁾, zwischen zwei katalytischen Zyklen einzelne Elektronen zu "parken". Bei flavindefizienten Enzymen bleibt die Oxidation des Arginins auf der Stufe des N^ω-Hydroxy-L-arginins stehen.

Das N-terminale Ende des Enzyms birgt die Bindungsstellen von Häm, Arginin und Tetrahydrobiopterin (BH₄), die allerdings für die beiden letzteren noch nicht exakt lokalisiert werden konnten. Für BH₄ wird vermutet, daß sich die Bindungstasche in unmittelbarer Nähe zum Häm befindet, da Versuche BH₄-freie Enzyme zu präparieren, immer mit dem Verlust von Häm einhergingen.

Häm ist für die Dimerisierung der NO-Synthase von großer Bedeutung. So konnten monomere nNOS-Stränge durch Inkubation mit Häm unter Wiederherstellung voller Enzymaktivität zur Dimerisierung angeregt werden³⁸⁾.

Für Tetrahydrobiopterin wird eine Flavin-ähnliche Funktion als Überträger einzelner Elektronen diskutiert³⁹⁾. Es ist beteiligt an der Hydroxylierungsreaktion von Arginin zu N^ω-Hydroxy-L-arginin⁴⁰⁾ sowie an der weiteren Oxidation zu NO⁴¹⁾. Zusätzlich verstärkt es wie ein allosterischer Kofaktor die Bindung von Arginin am aktiven Zentrum⁴²⁾.

Durch die Anbindung von Calmodulin an einer zwischen Reduktase- und Oxygenase-Domäne befindlichen Bindungsstelle erfährt das Enzym eine Konformationsänderung, wodurch der Elektronenfluß des NADPH auf die Flavine gesteigert und die Übertragung der Elektronen von der Reduktase auf die Oxygenase-Domäne durch die Flavine möglich wird⁴³⁾. Die Bindung von Calmodulin ist nur bei nNOS und eNOS von der Ca²⁺-Konzentration abhängig, wohingegen die iNOS ständig Calmodulin gebunden hat.

Wichtige Eigenschaften und Unterschiede der Isoenzyme sind in Tabelle 1-1 dargestellt.

Tabelle 1-1 *Eigenschaften und Unterschiede der verschiedenen NO-Synthasen*

	nNOS	iNOS	eNOS
Vorkommen	Neuronale Zellen, Skelettmuskel, Niere (Macula densa)	Makrophagen, Hepatocyten, Astrocyten, glatte Muskelzellen, u. v. a.	Endothelzellen, Epithelzellen, Kardio-myocyten, einige Neuronen
Expression	konstitutiv	induziert	konstitutiv
Molare Masse [kDa]	155	125	135
Km [L-Arginin, μ M]	2	2,5	0,9
Calcium-abhängigkeit	ja	nein	ja
Anzahl der Aminosäuren	1433	1153	1203
Membran gebunden	Wenig Anbindung an spezifische Membranproteine ⁴⁴⁾	Löslich?	Ja Anbindung über N-terminale Myristoyl- und Palmitoylgruppen an den Golgi-Apparat sowie an Caveoli

1.3 Physiologische Funktionen von NO

1.3.1 Im Gefäßsystem

Im Endothel des vaskulären Systems gebildetes NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC) der Zielzellen in der glatten Gefäßmuskulatur und den Thrombozyten dadurch, daß es an die Hämgruppe an der N-terminalen Seite der β -Untereinheit des heterodimeren Enzyms bindet⁴⁵). Die auf diese Weise katalysierte Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosin-5-triphosphat (GTP) führt zur Senkung des Calciumspiegels und damit zur Erschlaffung der Gefäßmuskulatur sowie zur Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion⁴⁶). Zusätzlich konnte für NO an den glatten Gefäßmuskelzellen eine antiproliferative Wirkung festgestellt werden, so daß Atherogenese und proliferationshemmende Erscheinungen zu beobachten sind^{47, 48}).

Auch im pulmonalen Gefäßsystem ließen sich NO-Synthasen nachweisen⁴⁹), wobei NO sowohl die Durchblutung als auch den Gasaustausch in den Alveolen verbessert.

1.3.2 Im zentralen und peripheren Nervensystem

Glutamat stimuliert NMDA-Rezeptoren, so daß es zu einem intrazellulären Anstieg an Ca^{2+} -Ionen kommt, wodurch wiederum eine erhöhte NO-Produktion der nNOS hervorgerufen wird (Abbildung 1-4). NO diffundiert zur Zielzelle und löst dort einen Anstieg des cGMP aus^{50, 51}). Darüber hinaus stärkt es bei Diffusion in die Präsynapse die synaptische Verbindung glutaminerger Neuronen. Stickstoffmonoxid wird auf diese Weise eine Beteiligung an der Langzeitpotenzierung von Synapsen zuteil, denen eine wichtige Rolle bei Lernfähigkeit und Gedächtnisprozessen zugeschrieben wird⁵²).

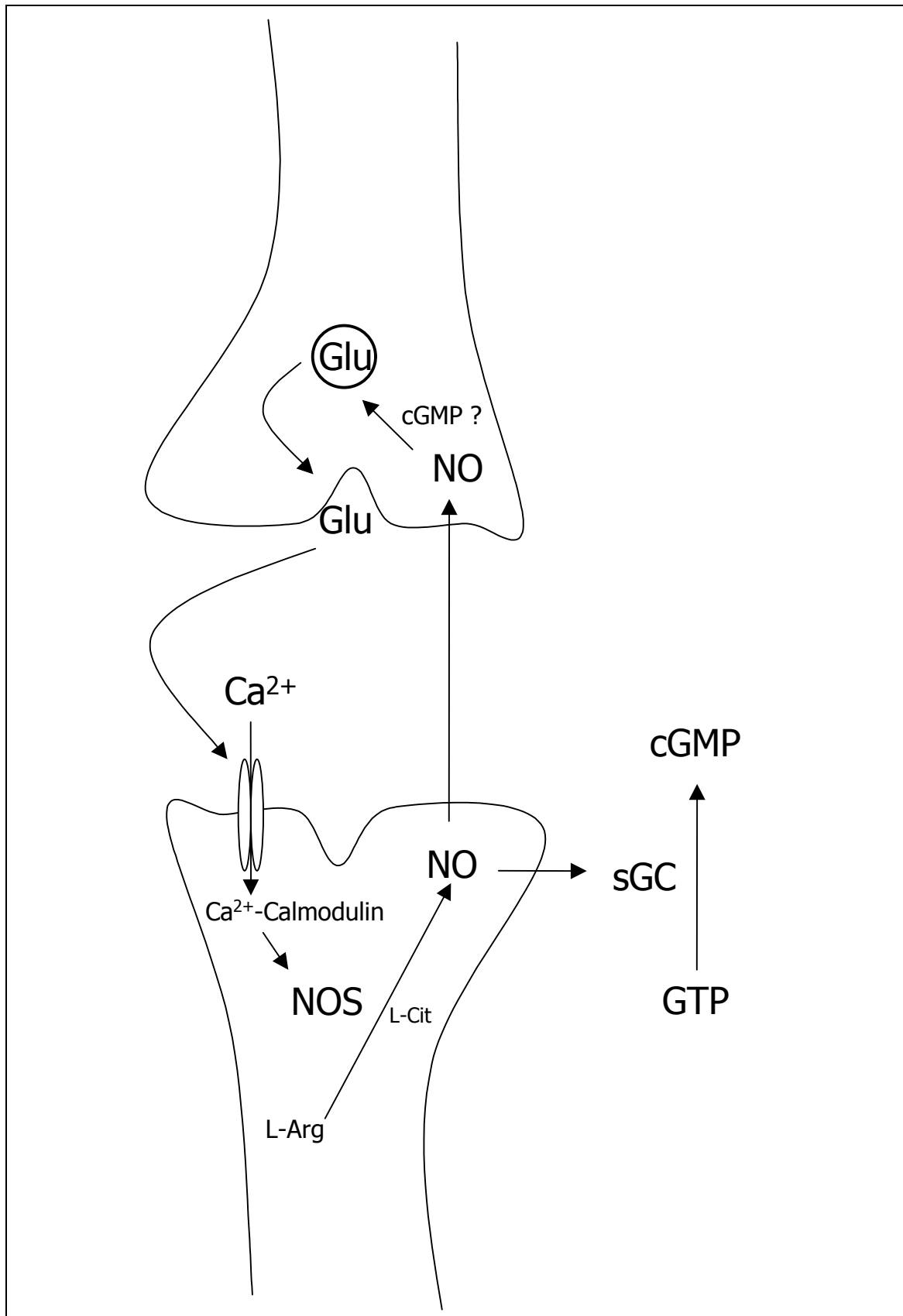


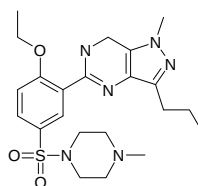
Abbildung 1-4 Funktionen von NO im ZNS

Ebenso verdichten sich Hinweise darauf, daß NO ein wichtiger Neurotransmitter der NANC-Neuronen ist^{53, 54)}, die an der Innervation glatter Muskelgewebe der Luftwege, des Gastrointestinal- sowie des Urogenitaltraktes beteiligt sind. Infolge einer Nervenstimulation wirkt NO auch hier cGMP vermittelt erschlaffend auf die vaskuläre sowie nicht vaskuläre glatte Muskulatur¹.

1.3.3 Im Immunsystem

Zytokine und Lipopolysaccharide stimulieren die iNOS in den Makrophagen^{55, 56)} zur Produktion ca. 400-fach höherer NO-Konzentrationen als bei konstitutiver Ausschüttung (100 nmol), um seine zytotoxische Aktivität für die unspezifische Immunabwehr von Bakterien und Parasiten auszunutzen. Durch die Reaktion von NO mit unterschiedlichen Reaktionspartnern wie verschiedener Sauerstoffspezies, Thiole, Eisenionen, Fe-S-Cluster oder primärer Amine werden Enzyme der Atmungskette und des Citratzyklus` ausgeschaltet⁵⁷⁾.

¹ cGMP wird physiologisch durch die Phosphodiesterase abgebaut, so daß eine Hemmung dieses Enzyms die Wirkung von NO verstärkt. Dieser Zusammenhang war die Grundlage des 1998 zur Therapie der erektilen Dysfunktion eingeführten Phosphodiesterasehemmers Sildenafil (Viagra®), der spezifisch eine Isoform, die PDE 5, hemmt.



Sildenafil

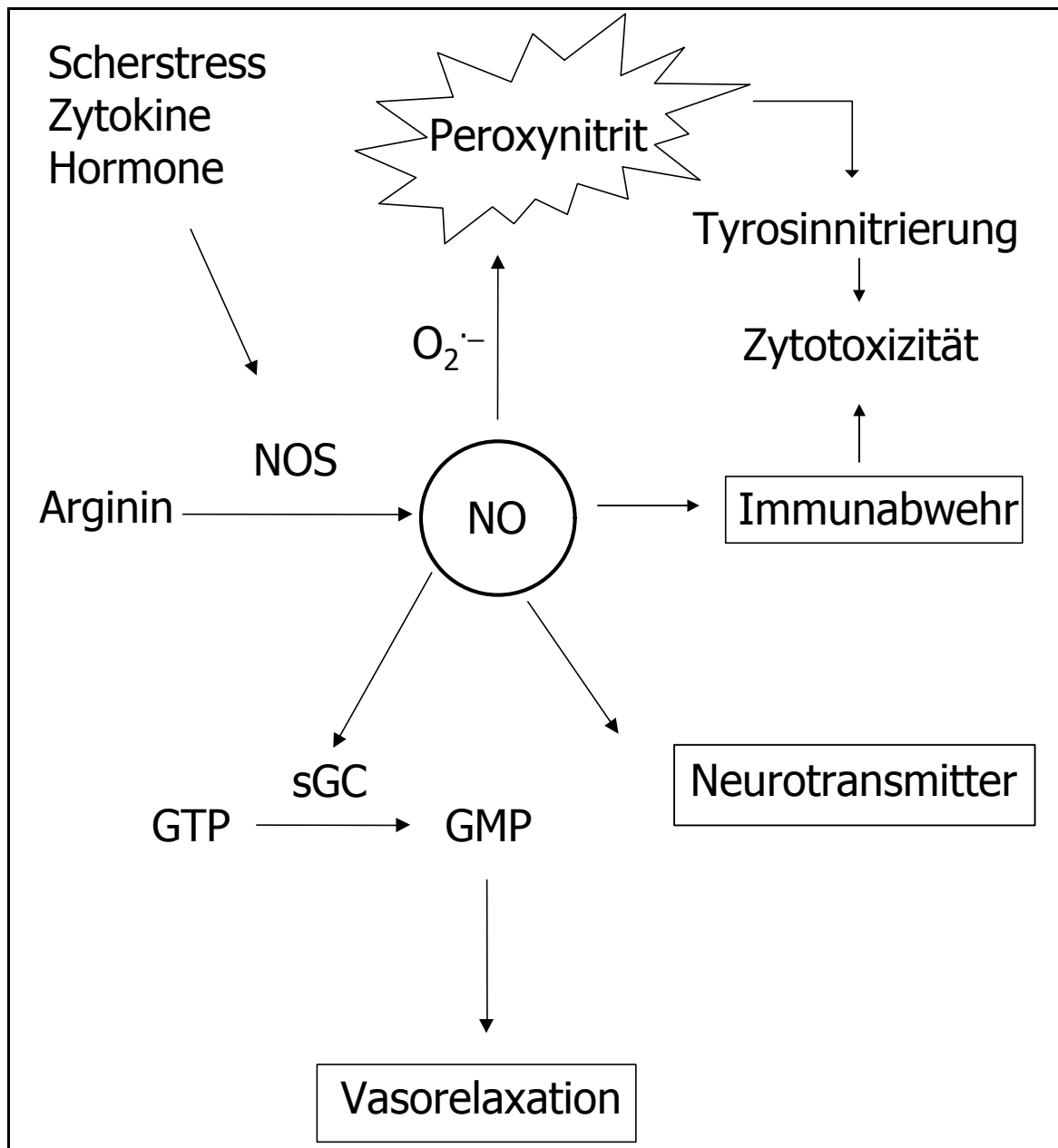


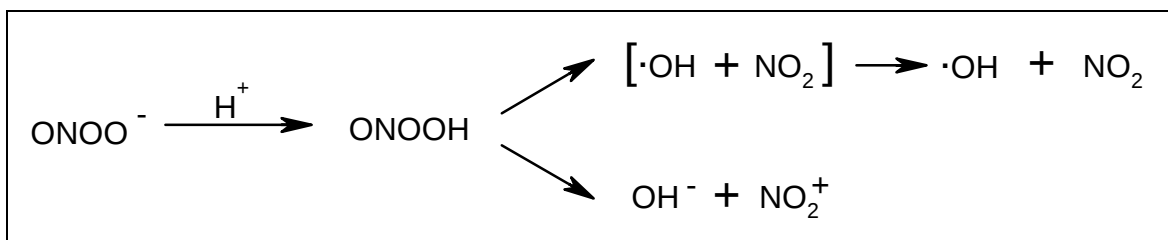
Abbildung 1-5 Zusammenfassung der verschiedenen Wirkungen von NO

1.4 Pathophysiologische Funktionen von NO

Mit NO im Zusammenhang stehende Krankheiten können zum einen durch eine Minder- zum anderen durch eine Überproduktion an NO hervorgerufen werden.

Bei überschießender NO-Produktion ist die Zelle über längere Zeiträume großen Mengen NO ausgesetzt. In der Umgebung werden vor allem durch toxische Folgeprodukte von NO Nitrosierungs- und

Nitrierungsreaktionen ausgelöst. Bei zahlreichen der im folgenden genannten Erkrankungen konnten bei Patienten stark erhöhte Gewebespiegel des 3-Nitrotyrosins nachgewiesen werden, das die Funktion der betroffenen Proteine verändern und eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen kann. Es wird vermutet, daß unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich Peroxynitrit (OONO^-) an der Nitrierung beteiligt ist⁵⁸). Peroxynitrit kann entweder aus der Reaktion von NO mit Superoxidradikalanionen (O_2^-) oder durch Umsetzung von Nitroxylanionen und Sauerstoff entstehen und durch heterolytischen Zerfall der Peroxysalpetrigen Säure Nitronium- und Hydroxidionen bilden⁵⁹) (Schema 1-1). Bei der thermodynamisch weniger wahrscheinlichen homolytischen Spaltung kann ein Radikalkäfig entstehen, aus dem NO_2 und Hydroxylradikale hervorgehen können⁶⁰). Beide Reaktionen werden in der Pathogenese von NO diskutiert.



Schema 1-1 Zerfallsreaktionen von Peroxynitrit über die Peroxysalpetrige Säure

1.4.1 Im Gefäßsystem

Bei einer NO-Überproduktion kommt es durch verstärkte Gefäßrelaxierung zu Hypotonie, möglicherweise zu einem Herz-Kreislauf-Zusammenbruch und im schlimmsten Fall zu Organversagen⁶¹).

Eine endotheliale Dysfunktion, verursacht z. B. durch Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus oder übermäßiges Rauchen, kann eine unzureichende NO-Produktion nach sich ziehen. Gleichermäßen führen unter anderem Störungen im Argininhaushalt, mangelnde NOS-Expression oder NO-scavenger (Hämoglobin, Myoglobin, u. a.)

zu einer Abnahme der physiologischen NO-Konzentration. Atherosklerose, Thrombosen und essentielle Hypertonie wie auch zerebralen Durchblutungsstörungen bis hin zum Schlaganfall können die Folge sein⁶²).

1.4.2 Im zentralen und peripheren Nervensystem

Neurodegenerative Erkrankungen wie z. B. Alzheimer und Parkinson scheinen unter anderem auf den gewebescheidenden Folgen überschießender NO-Produktion zu beruhen. Exzessive NO-Ausschüttung in der Nähe von Oligodendrocyten¹ können z.B. die Myelinbildung hemmen und möglicherweise Multiple Sklerose auslösen.

1.4.3 Im Immunsystem

Ein anhaltender NO-Überschuß infolge inflammatorischer Prozesse kann durch Nitrierung von kardialen Aktin die Kontraktilität des Herzmuskels verändern⁶³).

Durch Interleukin-1 β ausgelöste NO-Produktion kann den Untergang pankreatischer β -Zellen hervorrufen und damit an der Entstehung von insulinabhängigem Diabetes beteiligt sein⁶⁴).

Bei einer bakteriellen Sepsis kommt es durch große Mengen NO aus endothelunabhängiger Produktion infolge der Stimulation der iNOS der glatten Blutgefäßmuskulatur zu einer lebensbedrohlichen maximalen Gefäßerschaffung im gesamten Blutgefäßsystem mit nachfolgendem massivem Blutdruckabfall und Schocksymptomatik⁶⁵).

¹ Fortsätze der Nervenzellen im ZNS

1.4.4 DNA

Aus der Reaktion mit Polynukleotidbausteinen können DNA-Strangbrüche resultieren⁶⁶). Nitrosierungen solcher Nukleotide können möglicherweise an der Tumorentstehung beteiligt sein. Ferner ist eine Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase von NO bekannt⁶⁷).

1.5 NO-Donatoren und NOS-Inhibitoren

Angesichts der vielfältigen Regulationsmechanismen und Funktionen von NO liegt es nahe, Krankheiten als Folge von Störungen im NO-Haushalt, durch die Gabe von NO-Donatoren und NOS-Inhibitoren behandeln zu wollen.

Nitrovasodilatoren, die ihre relaxierende Wirkung über die Freisetzung von NO entfalten, sind in der Regel Prodrugs des aktiven Metaboliten NO. Die bisher in die Therapie eingeführten Substanzen werden hauptsächlich zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Reaktivität, ihres Freisetzungsverhaltens und ihrer Kinetik^{68, 69}). Einige Substanzklassen setzen spontan NO frei (SNAP⁷⁰), FK 409⁷¹), die meisten benötigen enzymatische Aktivierung und wieder andere geben erst nach Interaktion mit Thiolen NO ab (Nitroprussid-Na⁷²). Es gibt sowohl Vertreter, bei denen der Stickstoff zum NO oxidiert (Molsidomin⁷³) als auch solche, bei denen er reduziert (organische Nitrate) werden muß. Ebenso wirken sich pH-Wert, Temperatur sowie die Anwesenheit von Sauerstoff und Licht auf das Freisetzungsverhalten aus.

Auch der Einsatz von NO-Gas¹ in Konzentration von 20 ppm in Stickstoff bei obstruktiven Atemwegserkrankungen wie ARDS², bei pulmonaler Hypertension, bei systemischer Hypertension als Folge

¹ NO-Gas erhielt am 28.12.1999 in den U.S.A seine Zulassung als Arzneimittel.

² Adult respiratory distress syndrome (ARDS)

eines pulmonalen Rechts-links-Shunts¹ und insbesondere als lebensrettende Maßnahme bei Säuglingen mit angeborenem Herzfehler liefert vielversprechende Ergebnisse, so daß eine Zulassung als Arzneimittel auch in Deutschland zu erwarten ist.

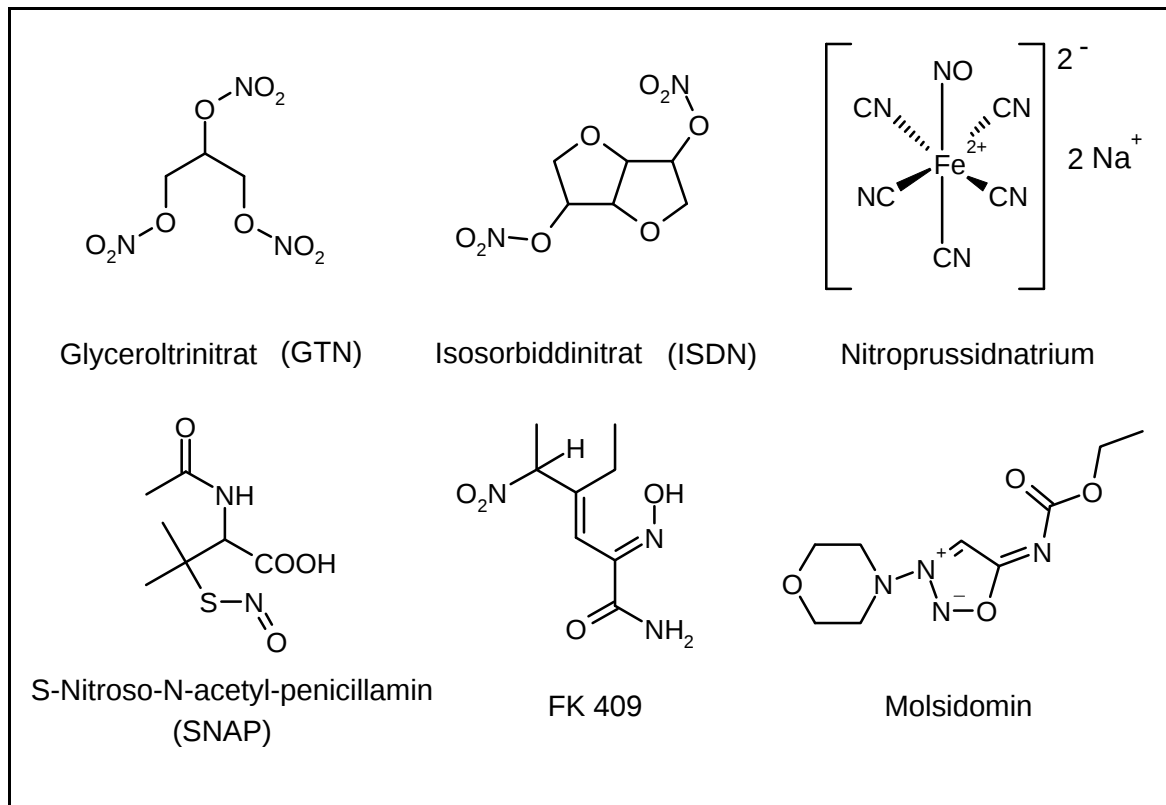


Abbildung 1-6 Auswahl an NO-Donatoren mit unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen

NOS-Inhibitoren zur Therapie von Krankheiten, die auf überschießender NO-Ausschüttung beruhen, konnten noch nicht in ausreichender Isoformselektivität entwickelt werden. Argininanaloge⁷⁴⁾, Thioharnstoffe sowie Isothioharnstoffe (Abbildung 1-7) etc. konkurrieren mit Arginin um die Bindungsstelle an der NOS und hemmen das Enzym kompetitiv¹⁷⁾. Die Anbindung erfolgt über Wasserstoffbrücken, so daß die Basizität der Guanidingruppe nicht von Bedeutung ist.

¹ Kurzschlußverbindung zwischen arteriellen und venösen Blutgefäßen unter Umgehung des Lungenkreislaufes

Ziel ist es, vor allem die iNOS zu hemmen, wobei insbesondere die eNOS keinesfalls betroffen sein darf. Bisher hat kein Arzneistoff die Zulassung als Arzneimittel erlangt.

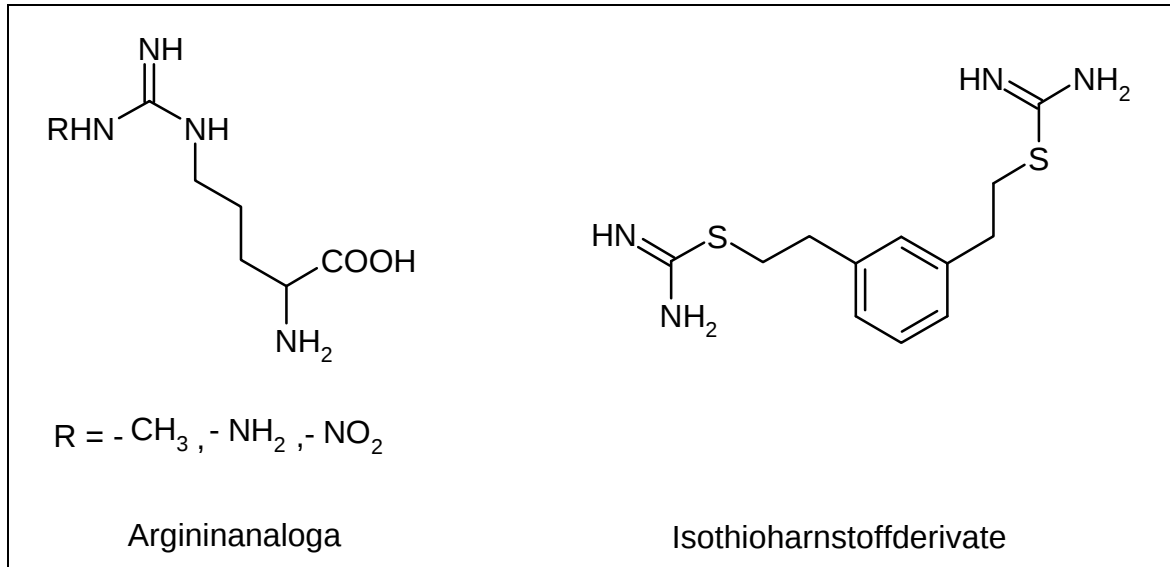


Abbildung 1-7 NO-Synthase-Inhibitoren

1.6 Aufgabenstellung

Unter den zahlreichen Substanzklassen, die in der Lage sind, NO oxidativ freizusetzen, nehmen Verbindungen mit Hydroxylamino- und oder Hydroxyiminopartialstrukturen, aufgrund der strukturellen Vewandtschaft zum physiologischen NO-Donor N^ω-Hydroxy-L-arginin, eine bedeutende Rolle ein. Bisher wurde unter anderem das Freisetzungsverhalten für Aldoxime (**1**), Ketoxime (**2**)⁷⁵, Amidoxime (**3**)⁷⁶, N-Hydroxyharnstoffe (**4**)⁷⁷, N-Hydroxyguanidine⁷⁸ (**5**) und Hydroxamsäuren (**6**)⁷⁹ studiert (Abbildung 1-8).

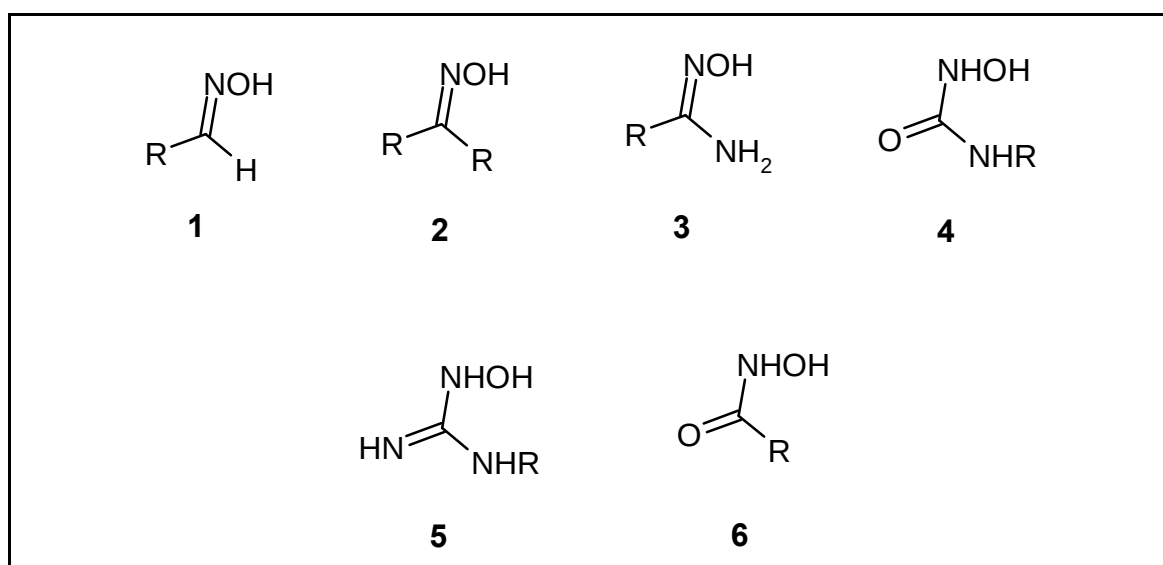


Abbildung 1-8 Funktionelle Gruppen, die NO freisetzen können

In diesem Zusammenhang interessierten wir uns schwerpunktmäßig für die in Abbildung 1-9 dargestellten Verbindungsklassen (**7**, **8**, **9**, **10**), die erstmalig im Arbeitskreis Geffken dargestellt wurden.

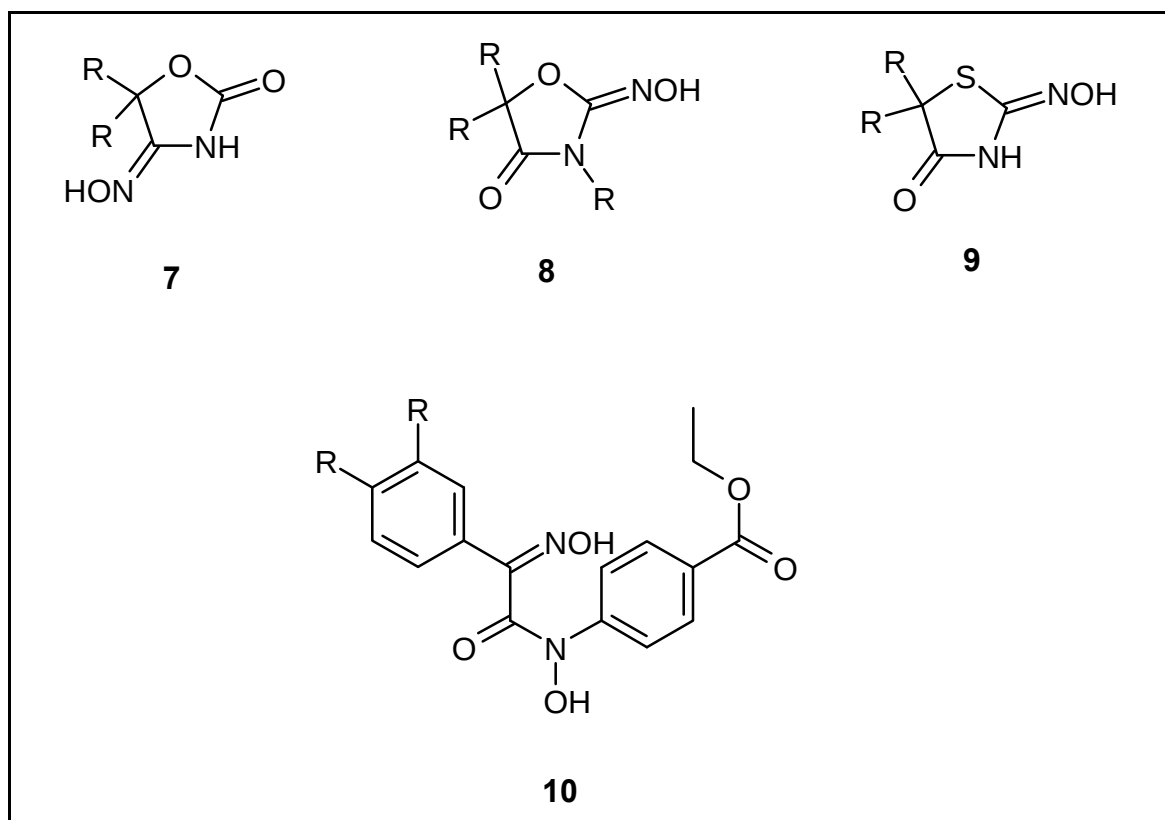


Abbildung 1-9 Bezüglich ihrer oxidativen NO-Freisetzung untersuchte Substanzklassen

Die in Abbildung 1-9 dargestellten fünfgliedrigen heterozyklischen Bindungssysteme sind als semizyklische Amidoxime (**7**), N-Hydroxyisoharnstoffe (**8**) und N-Hydroxyisothioharnstoffe (**9**) aufzufassen. Während N-Hydroxyisoharnstoffe und N-Hydroxyisothioharnstoffe als Kohlensäure- bzw. Thiokohlensäure-Derivate zu verstehen sind, stellen Amidoxime Carbonsäurederivate dar.

Offensichtlich ist die strukturelle Analogie zwischen dem α -Hydroxyiminocarbonsäureamid FK409, einem potenten NO-Donor, und den α -Hydroxyiminohydroxamsäuren des Typs **10** (Abbildung 1-10).

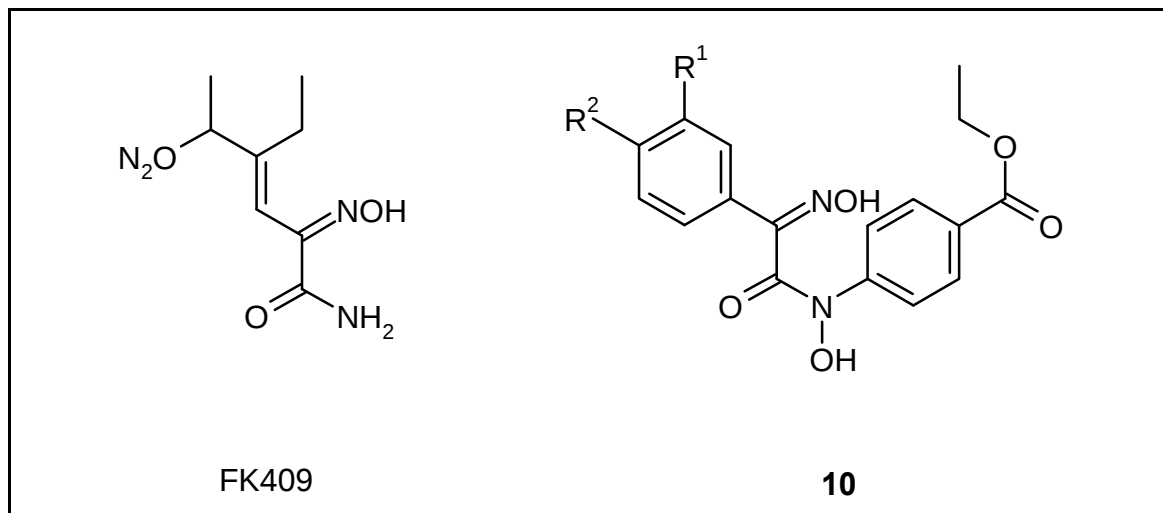


Abbildung 1-10 Strukturelle Ähnlichkeit von FK409 und den α -Hydroxyiminohydroxamsäuren **10**

Die enzymatische NO-Bildung bisher bekannter NO-Donatoren wird physiologisch überwiegend durch Cytochrom P450 katalysiert. Für die Freisetzungsversuche wurde ein im Arbeitskreis Duchstein bereits erprobtes Modellsystem verwendet, das in der Lage ist, Cytochrom P450 vermittelte Reaktionen zu imitieren. In Gegenwart verschiedener Kofaktoren sollte geklärt werden, inwieweit sich die freigesetzten NO-Mengen steigern ließen bzw. unter welchen Voraussetzungen die optimale Freisetzung erfolgte. Die Auswahl der Kofaktoren orientierte sich dabei an physiologischen Gegebenheiten. Die Quantifizierung von NO sollte mit Hilfe der Chemilumineszenzmethode erfolgen. Zum Nachweis der Intermediate und Endprodukte waren ein HPLC-Verfahren zu etablieren und falls erforderlich weitere analytische Verfahren heranzuziehen.

Ein wichtiges Problem in der Therapie mit organischen Nitraten stellt nach wie vor das Phänomen der Nitrattoleranz dar. Ein Hintergrund dafür ist die Reaktion der Nitrate mit körpereigenen Thiolen, wodurch der Thiolpool erschöpft wird. Die Arbeitsgruppe Lehmann entwickelte daraufhin Nitrate, die das Toleranzphänomen nicht mehr

zeigen. Daher sollten diese im Vergleich zu Glyceroltrinitrat weiterentwickelten organischer Nitrates hinsichtlich ihres Freisetzungsverhaltens untersucht werden (Abbildung 1-11). Auch diese Verbindungen, die als Thioester der p-Nitrooxymethylbenzoesäure (**11**) sowie der 3-Nitrooxypivalinsäure (**12**) aufzufassen sind und NO unter reduktiven Bedingungen abgeben, wurden mit Hilfe des Modellsystems und ausgewählter Kofaktoren umgesetzt.

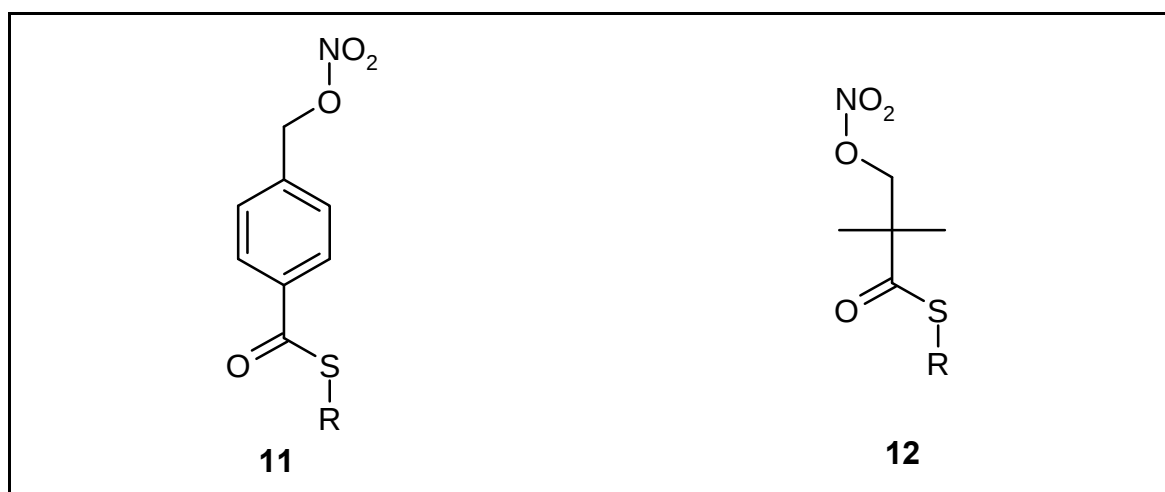


Abbildung 1-11 Organische Nitrates mit Thiolesterpartialstruktur

Frühere Untersuchungen in unserem Arbeitskreis hatten bereits ergeben, daß auch die reduktive Aktivierung von organischen Nitraten zur Freigabe von NO von unserem Cytochrom P450 imitierenden Modell übernommen werden kann⁸⁰).

2 Das Modellsystem und die Kofaktoren

2.1 Das Cytochrom P450-Modellsystem

Wie schon in der Einleitung bemerkt, besteht große Ähnlichkeit zwischen den Reduktasedomänen der NO-Synthasen und Cytochrom P450, das sogar den zweiten Schritt der NO-Biosynthese katalysieren kann. Darüber hinaus verdichten sich Hinweise auf eine Beteiligung von Hämproteinen an der oxidativen und reduktiven Freisetzung von NO aus verschiedenen Substanzklassen^{76, 81}).

Cytochrom P450 ist ein Hämprotein, das der Klasse der Monooxygenasen zuzuordnen ist. Monooxygenasen übertragen einzelne Sauerstoffatome bei den von ihnen katalysierten Reaktionen, wie z.B. aliphatischer und aromatischer Oxidationen, Epoxidierungen sowie N- und O-Desalkylierungen.

Für zahlreiche dieser Reaktionen gelang bereits die Übertragung auf biomimetische Modellsysteme ^{82, 83, 84}), so daß auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Freisetzungsstudien von NO-Donatoren an einem geeigneten Modellsystem durchgeführt wurden^{73, 85, 86}). Gegenüber den Enzymen bieten sie den Vorteil der leichteren Handhabung. Darüber hinaus lassen sich Intermediate und Endprodukte einfacher isolieren¹.

Alle P450 Isoenzyme besitzen als gemeinsames Strukturelement ein Zentraleisenion, das koordinativ in eine Protoporphyrineinheit eingebunden ist und gehören zur großen Gruppe der Häm-Thiolat-Enzyme⁸⁸). Die Bindung zum Enzym erfolgt über den Thiolat-Liganden an das Eisen-Zentrum, das im Ruhezustand als Fe(III)-low-spin-Komplex vorliegt (1).

¹ Der Einsatz solcher Modelle findet häufig in der Aufklärung von Arzneistoffmetabolisierungen Anwendung⁸⁷).

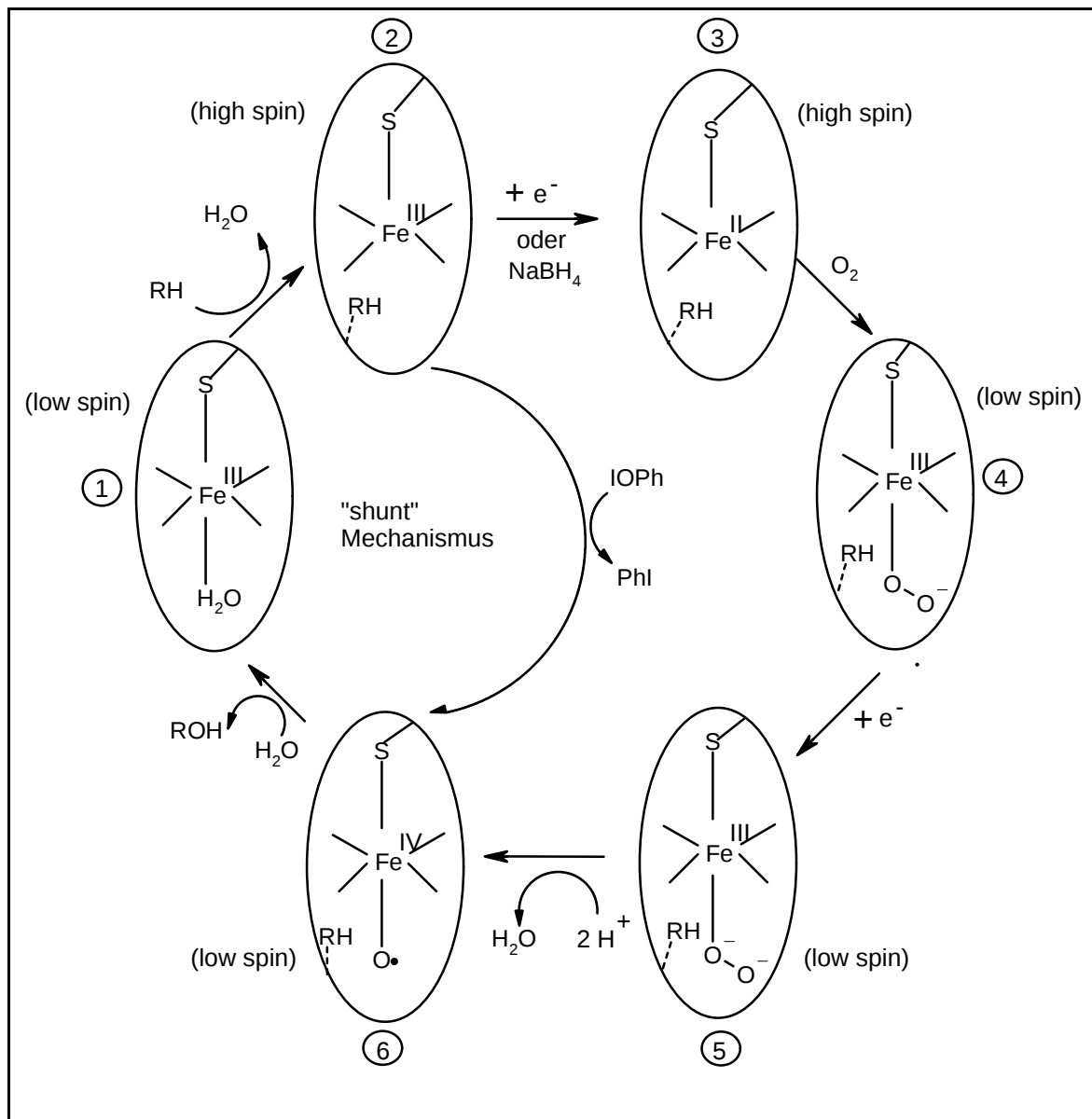


Abbildung 2-1 Katalytischer Zyklus von Cytochrom P450

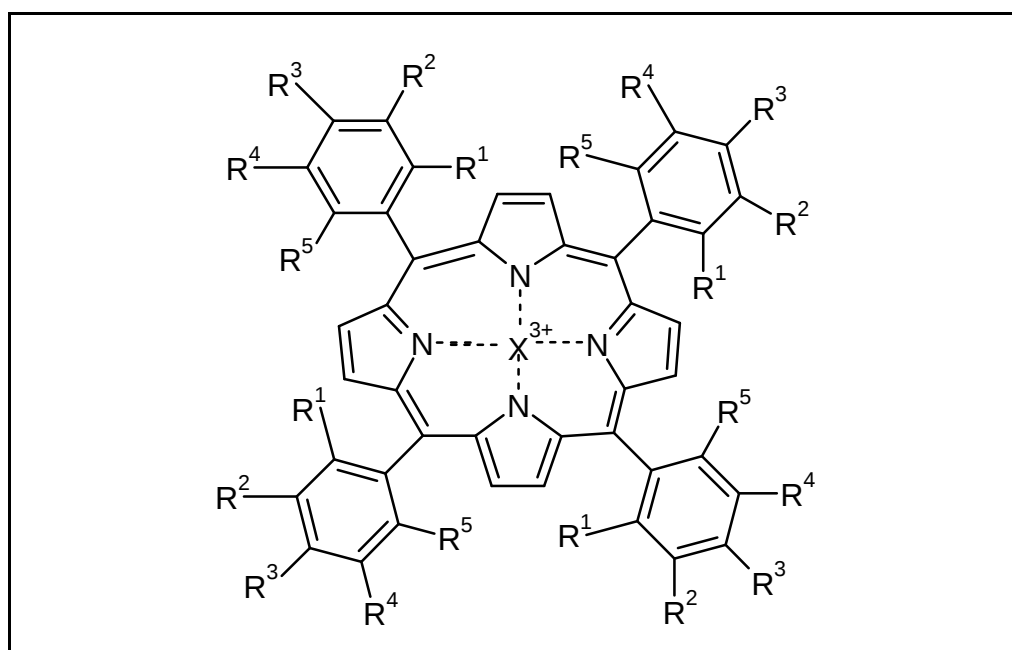
Durch Bindung des Substrats (RH) in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms wird gleichzeitig Wasser als sechster Ligand verdrängt und Fe(III) geht unter Anstieg des Redoxpotentials auf 170 mV in den high-spin Zustand über (2)⁸⁹. NADPH ist nun in der Lage, über die Flavoproteine FAD-FMN den Komplex zum Fe(II)-high-spin zu reduzieren (3). Dieser Komplex ist für die Cytochrom P450 vermittelten Reduktionen verantwortlich.

Mit Sauerstoff reagiert er weiter zu einem Fe(III)-low-spin-Komplex (4). Nach der zweiten Übertragung eines Elektrons auf den gebundenen Sauerstoff, disproportioniert dieser unter Wasserabspaltung

und Ausbildung einer hoch oxidierten Zwischenstufe des Eisens (6). Das Substrat kann jetzt mit dem "aktivierten Sauerstoff" zum hydroxylierten Produkt reagieren (ROH), während das Oxyferrylkation (6) unter Wasseranlagerung in seinen Grundzustand zurückkehrt⁹⁰).

Das chelatisierte Eisen des Enzyms wird im Modell durch einen niedermolekularen Metallkomplex ersetzt. Um den oxidativen Teil nachzuahmen, wird durch die Verwendung synthetischer Sauerstoff-Donatoren wie Iodosobenzol (IOPh) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) der katalytische Zyklus zwischen (2) und (6) bzw. (2) und (5) "kurzgeschlossen" ("shunt-Mechanismus")⁸⁹). Um Reduktionen mit dem Modellsystem zu imitieren, hat sich der Einsatz von Natrium-tetrahydroborat (NaBH_4) bewährt, welches den Fe(III)-Zustand im Porphyrin zum Fe(II) reduziert⁹¹).

In den bei den Messungen verwendeten Modellkomplexen ist das Eisen-Zentrum in ein Tetraphenylporphyringrundgerüst eingebettet. Axiale Liganden erhöhen die Reaktivität der Verbindungen (Formel 2-1).



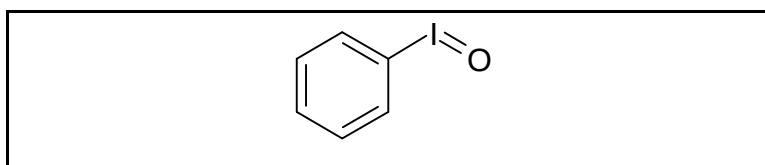
Formel 2-1 Grundstruktur der eingesetzten Modellkomplexe

Tabelle 2-1 *Substituenten der verschiedenen Modellkomplexe*

Zentral-ion (X)	R1	R2	R3	R4	R5	Abkürzung	Name
Fe ³⁺	H	H	H	H	H	FeTPPCI	5,10,15,20-Tetraphenyl 21H,23H porphyrin eisen(III)chlorid
Fe ³⁺	H	H	-O-CH ₃	H	H	FeMeOTPPCI	5,10,15,20-Tetrakis (4-methoxyphenyl) 21H,23H porphyrin eisen(III)chlorid
Fe ³⁺	F	F	F	F	F	FeTPFPPCI	5,10,15,20-Tetrakis(pentafluorophenyl) 21H,23H porphyrin eisen(III)chlorid
Mn ³⁺	H	H	H	H	H	MnTPPCI	5,10,15,20-Tetraphenyl 21H, 23H porphyrin-mangan(III)chlorid

2.1.1 Sauerstoffdonatoren

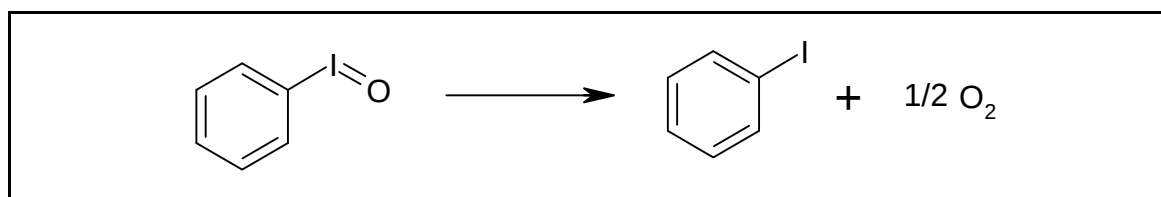
2.1.1.1 Iodosobenzol



Formel 2-2

Iodosobenzol^[92] als Sauerstoffquelle des Cytochrom P450-Modellsystems wurde zuerst von Lichtenberger und Mitarbeitern eingesetzt^[93].

Iodosobenzol gibt sein Sauerstoffatom aufgrund der niedrigen Bindungsenergie der I-O-Bindung von 53 kcal / mol (O₂ 118 kcal / mol) leicht ab und reagiert dabei zu Iodbenzol (Schema 2-1).



Schema 2-1 Sauerstoffabgabe von Iodosobenzol

Der große Vorteil besteht darin, daß weder Iodosobenzol, noch Iodobenzol leicht oxidierbar sind, so daß im katalytischen Zyklus intermediär auftretende Metall-Sauerstoffkomplexe spektroskopisch nachweisbar waren⁹⁰).

2.1.1.2 Wasserstoffperoxid

Auch Wasserstoffperoxid ist ein geeignetes Oxidationsmittel, um im Modell des Cytochrom P450 den katalytischen Zyklus zwischen (2) und (5) kurzzuschließen. Bei "shunt"-Experimenten mit H_2O_2 stellt in der Regel der Eisenkomplex (5) das das Substrat oxidierende Agens dar⁹⁴). Unter Wasserabspaltung kann er in die hochoxidierte Eisenstufe Fe(V)=O , welche eine mesomere Grenzform des $\text{Fe(IV)-O}^{\cdot 95}$) (6) ist, übergehen.

2.1.2 Reduktionsmittel

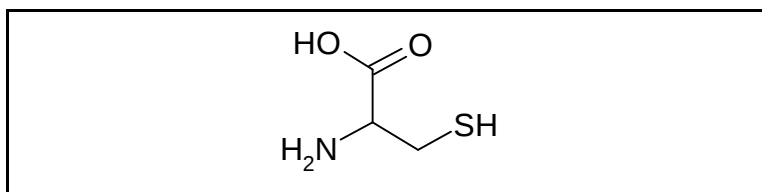
2.1.2.1 Natriumtetrahydroborat

NaBH_4 ist ein salzartiges Hydroborat mit ausgeprägten reduzierenden Eigenschaften. Der Zusatz zum Modellkomplex hat sich als Ersatz für NADPH in der Herstellung des für die reduktive Wirkung verantwortlichen Fe(II) -Komplexes (3) von Cytochrom P450 bewährt.

2.2 Die Kofaktoren

Die Auswahl der in die Freisetzungsuntersuchungen mit einbezogenen Kofaktoren orientierte sich an ihrem physiologischen Vorkommen sowie an ihren Redoxeigenschaften. Die Kofaktoren wurden ausschließlich bei einem pH-Wert von 7.4 eingesetzt.

2.2.1 L-Cystein



Formel 2-3

SH-Gruppen-haltige Verbindungen sind wichtige Liganden des Eisenzentrums im Cytochrom P450⁹⁶⁾. Gleichmaßen wird eine Beteiligung von SH-Gruppen in NO-Synthase-Reaktionen bei der Biosynthese von NO angenommen. Komori und Mitarbeiter zeigten, daß die Syntheserate SH-Gruppen-freier NOS durch Zugabe von Thiolen auf das 4 – 7 -fache gesteigert werden konnte⁹⁷⁾. Darüber hinaus ist die Diskussion über S-Nitrosoverbindungen als EDRF nach wie vor nicht abgeschlossen.

Für organische Nitrate ist die Steigerung der NO-Freisetzung unter Beteiligung von niedermolekularen Thiolen beschrieben worden⁷²⁾. Um die bei längerer Anwendung der Nitrate auftretenden Toleranzerscheinungen zu erklären, wird eine Erschöpfung des physiologischen SH-Pools diskutiert.

Unter den physiologischen niedermolekularen SH-Donatoren liegt Cystein mit 33 µM im Blut in der höchsten Konzentration vor, so daß es für die Freisetzungsversuche ausgewählt wurde.

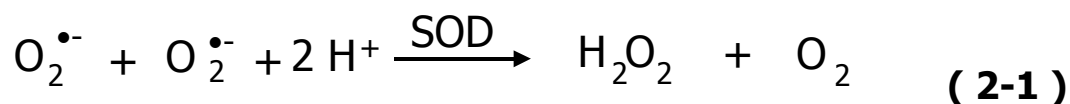
2.2.2 Kupferionen

Die Konzentration von Kupferionen insgesamt (I+II) beträgt 1,4 mM im Serum.

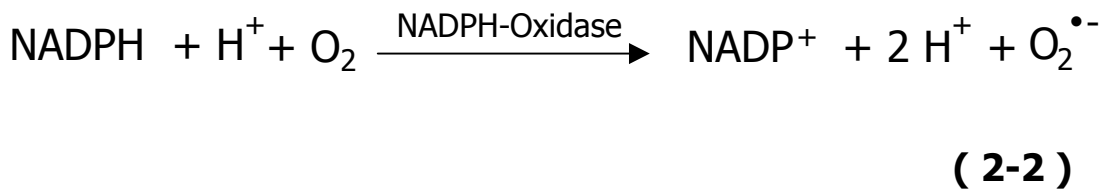
Nitrosothiole zerfallen beschleunigt unter Bildung von NO unter Cu^{2+} - bzw. Cu^+ -Katalyse, die durch Zusatz von EDTA aufgehoben werden kann⁹⁸). Schon Spuren von Cu^+ -Ionen steigern den Zerfall beachtlich^{99, 100}). Fe^{2+} katalysiert den Zerfall bereits bemerkenswert schlechter, wohingegen Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+} inaktiv sind. Cu^{2+} -Ionen spielen darüber hinaus eine Rolle bei der Oxidation von Hydroxylamin zu NO^- . Sie liegen physiologisch von Serumalbumin chelatisiert vor¹⁰¹).

2.2.3 Superoxidismutase (SOD)

SOD katalysiert im Körper die Detoxifizierung von Superoxidradikalanionen zu H_2O_2 , das anschließend von Peroxidasen in Wasser umgewandelt wird.



Die Bildung von Superoxidradikalanionen wurde bei Abwesenheit von Arginin durch Elektronentransfer von NADPH auf Sauerstoff für die nNOS¹⁰²), die iNOS¹⁰³) und die eNOS¹⁰⁴) nachgewiesen. Mayer und Mitarbeiter beschrieben sogar eine nichtenzymatische Produktion von $\text{O}_2^{\bullet -}$ durch Autoxidation von BH_4 der nNOS¹⁰⁵). Ebenso werden Superoxidradikalanionen in hohen Konzentrationen bei entzündlichen Prozessen vor allem durch die NADPH-Oxidase¹⁰⁶) gebildet.



Wird $\text{O}_2^{\bullet -}$ neben NO gebildet, entsteht daraus Peroxynitrit. Der zu Peroxynitrit reagierende Anteil an NO ist dann mit der Chemilumineszenz-Methode nicht mehr zu erfassen.



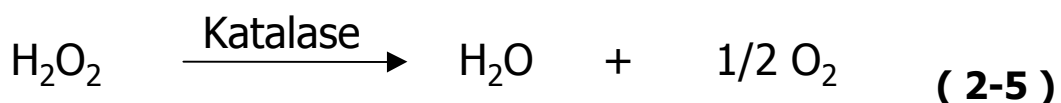
Soll durch Zusatz von SOD zum Reaktionsansatz gebildetes $\text{O}_2^{\bullet -}$ abgefangen werden, so ist zu beachten, daß die Reaktion von NO und $\text{O}_2^{\bullet -}$ ca. dreimal schneller erfolgt als die Detoxifikation. Eine Konzentration von 15 – 100 U/mL SOD verdoppelt bereits die Halbwertszeit von NO.

Murphy berichtete, daß SOD darüber hinaus in der Lage ist, NO^- in NO umzuwandeln¹⁰⁷).



2.2.4 Katalase

Katalase katalysiert physiologisch die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff.



Wird der für die NO-Biosynthese erforderliche Kofaktor Tetrahydrobiopterin inhibiert, so ist die Bildung von H_2O_2 nachweisbar,

während die NO-Syntheserate absinkt¹⁰⁸). Heinzel und Mitarbeiter wiesen bei Argininabwesenheit neben der Bildung von $O_2^{\cdot-}$ zusätzlich die Entstehung von H_2O_2 nach¹⁰⁹).

Bereits 1975 wurde über eine Katalase vermittelte Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch Natriumazid berichtet¹¹⁰). Craven und Mitarbeiter bestätigten vier Jahre später diese Ergebnisse. Sie konnten nachweisen, daß Natriumazid sowie Hydroxylamin erst in Gegenwart intakter Katalase NO freisetzen. Dabei bildet sich ein NO-Katalase-Komplex aus¹¹¹). Sie vermuteten, daß Katalase sowohl für die Umwandlung der Substanzen zu NO, als auch für die Entstehung des spektroskopisch nachgewiesenen NO-Häm-Komplexes und damit für die Aktivierung der sGC verantwortlich ist¹¹²).

3 Die NO-Messung

NO kann direkt oder indirekt quantifiziert werden. Die direkten Nachweismethoden haben in der Regel den Vorteil der höheren Spezifität gegenüber den indirekten. Tabelle 3-1 zeigt verschiedene direkte Detektionsverfahren von NO, während Tabelle 3-2 einige indirekte Nachweisverfahren von NO sowie weiterer aktiver Stickstoffspezies auflistet.

Tabelle 3-1 *Direkte Nachweismethoden von NO*

Methode	Prinzip	Empfindlichkeit
Modifizierte Clark-Elektrode ¹¹³⁾	Elektrochemische Oxidation von NO mit voltametrischer oder amperometrischer Auswertung	1 nM
Elektronen Paramagnetische Resonanzspektroskopie (EPR) ¹¹⁴⁾	Veränderung der kinetischen Energie des Elektronen-Spins von Verbindungen mit ungepaarten Elektronen in Abhängigkeit eines äußeren magnetischen Feldes	1 µM
Chemilumineszenz ¹¹⁵⁾	Auswertung des Lichtsignals aus angeregtem NO ₂ [*] , das aus der Reaktion von NO und Ozon hervorgeht	1 pmol

Tabelle 3-2 Indirekte Nachweismethoden von NO sowie aktiver Stickstoffspezies

Methoden	Prinzip	Empfindlichkeit
Photometrisch ¹¹⁶⁾	Nachweis von Nitrit mit Sulfanilamid und β -Naphthol als Azofarbstoff (Griess-Reaktion)	100 nM
Oxyhämoglobin-Assay ¹¹⁷⁾	Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin unter Bildung von Methämoglobin und Nitrat mit spektralphotometrischer Auswertung der Komplexe	1 nM
sGC-Assay ¹¹⁸⁾	radiochemische Bestimmung der [^{32}P]cGMP-Bildung aus [α - ^{32}P]GTP katalysiert durch sGC, die von NO aktiviert wird	

Da die Quantifizierung von NO in dieser Arbeit auf der Grundlage der Chemilumineszenz erfolgte, wird nachfolgend nur auf dieses Verfahren genauer eingegangen.

3.1 Prinzip der Chemilumineszenz

Die Reaktion von Stickstoffmonoxid und Ozon unter Sauerstoffausschluß führt zur Bildung von NO_2 in einem angeregten Zustand. Die Intensität der bei der Rückkehr in den Grundzustand ausgesandten Lichtquanten ist proportional zur freigesetzten NO-Menge. Das emittierte Licht umfaßt den Wellenlängenbereich von 640 - 3000 nm mit einem Maximum bei 1200 nm.



Ozon entsteht im Ozongenerator des Meßgerätes aus Sauerstoff versetzt mit 5% CO_2 als Trockenmittel.

Um möglichem Quenching der Chemilumineszenz durch Weiterreaktion von angeregtem NO_2 mit anderen Gasmolekülen vorzubeugen, muß der Druck in der Reaktionszelle zwischen 6-10 Torr konstant gehalten werden.

Die hohe Geschwindigkeit der Umsetzung macht es dem Chemilumineszenzassay möglich, schnell auf Änderungen in der NO-Konzentration zu reagieren. Die Reaktion anderer Stickoxide mit Ozon erfolgt langsamer und unterliegt darüber hinaus einer höheren Aktivierungsenergie, so daß diese das NO-Signal nicht beeinflussen.

3.2 Der Versuchsaufbau

Das emittierte Licht wird mit Hilfe eines Photomultipliers vervielfältigt, der für seine einwandfreie Funktionsweise ständig unter 0°C , besser auf -10°C gekühlt werden muß.

Eine Pumpe gewährleistet einen ständigen Unterdruck im System, der zum Sauerstoffausschluß beiträgt und den Einstrom der Probe in die Reaktionszelle erleichtert. Das aus der Probe freigesetzte NO

wird durch Argon als Trägergas aus dem Reaktionsgefäß ("purge and trap reaction vessel") in das Meßgerät überspült. Für die Auswertung der Meßergebnisse ist ein konstanter Gasfluß von 200 mL / Min erforderlich, der durch ein Sieb an der Eintrittsstelle in das Meßgerät erreicht bzw. über ein Flowmeter beobachtet und reguliert wird.

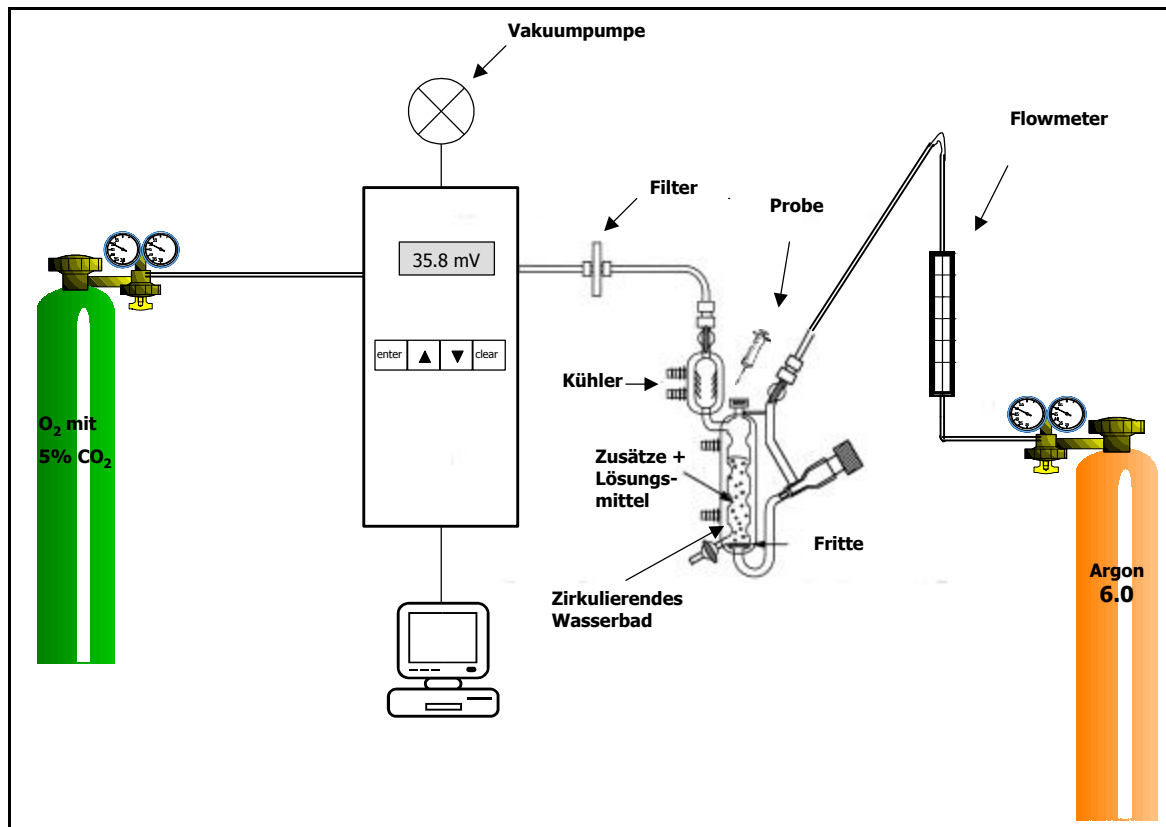
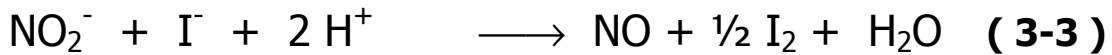


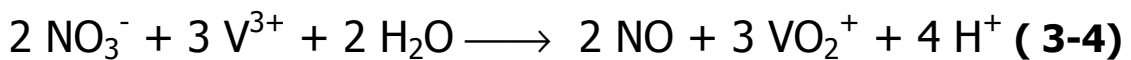
Abbildung 3-1 Versuchsaufbau zur NO-Messung mittels Chemilumineszenz

Für die chemilumineszenztechnische Erfassung der potentiellen Nebenprodukte Nitrit und Nitrat bei der Entstehung von NO in sauerstoffhaltiger wäßriger Lösung müssen entsprechende Reduktionen der NO-Messung vorangehen.

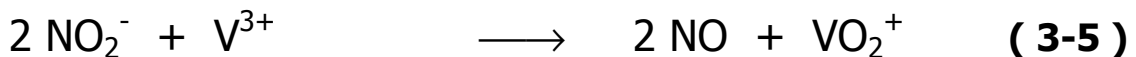
Die quantitative Reaktion von Nitrit zu NO wird durch Umsetzung mit Kaliumiodid in Eisessig erreicht.



Während die Reduktion von Nitrit schon bei Raumtemperatur erfolgt, muß für die quantitative Reduktion von Nitrat zu NO mit VCl_3 in Salzsäure das Reaktionsgemisch auf 95°C erhitzt werden.



Außerdem vorhandenes Nitrit wird dabei ebenso erfaßt.



Mit dieser Methode können noch sehr geringe Mengen an Nitrit und Nitrat gemessen werden¹¹⁹).

Nach einer Arbeit von Marley sind nach chemischer Umwandlung auch Nitrosothiole mit dieser Methode meßbar¹²⁰).

3.3 Bestimmung von NO, Nitrit und Nitrat

Bei allen Versuchsdurchführungen zur Bestimmung von NO oder Nitrit wurde das Reaktionsgefäß des Chemilumineszenzmeßgerätes mit Argon 6.0 anaerobisiert und auf 37°C temperiert. Die Konzentrationsberechnungen erfolgten immer über die Integration der erhaltenen Peakflächen mit Hilfe der entsprechenden Kalibriergeraden.

Aufgrund der quantitativen Umsetzung von Nitrit zu NO mit essigsaurer Kaliumiodidlösung (siehe Gleichung **3-3**), wurde das Gerät sowohl für die NO-Messung als auch für die Nitritmessung mit einer 50 μM KNO_2 -Lösung kalibriert.

Die Reduktion von Nitrat zu NO gelingt mit einer gesättigten VCl_3 -Lösung in 1 N Salzsäure bei 95°C in einem mit Argon zuvor anaerobisierten Reaktionsgefäß (siehe Gleichung **3-4**). Die Kalibrierung erfolgte mit einer 100 μM KNO_3 -Lösung.

Die Quantifizierung von NO, Nitrit und Nitrat wurde im Falle der Hydroxyiminoverbindungen und Hydroxylaminhydrochlorid aus Lösungen unter oxidativen Bedingungen durchgeführt.

Dagegen erfolgte die Messung der reduktiven NO- und Nitrit-Freisetzung aus organischen Nitraten wie bisher in unserem Arbeitskreis aus dem "Headspace". Die NO-Bestimmung aus dem Gasüberstand von Lösungen war aufgrund der niedrigen Löslichkeit von NO in wäßrigen sauerstofffreien Lösungen möglich. Der Verteilungskoeffizient für das System $\text{NO}_{\text{Argon}} / \text{H}_2\text{O}_{37^\circ\text{C}}$ beträgt $40,13 \cdot 10^8$ Pa. Daraus ergibt sich unter unseren Reaktionsbedingungen eine Konzentration von 99,995 % NO im "Headspace" nach Einstellung des Gleichgewichts⁹¹⁾.

Die Versuchsergebnisse wurden als arithmetisches Mittel von 5 Meßwerten in Säulendiagrammen dargestellt. Gezeigt wird die NO-Konzentration in μM einer 1 mM Probe in Abhängigkeit verschiedener Zusätze. Die Fehlerbalken der Säulen symbolisieren dabei die Standardabweichung. Angaben in % bezeichnen die prozentuale NO-Freisetzung bezogen auf die Ausgangskonzentration der Probe.

4 Hydroxyimino-Verbindungen als NO-Donatoren

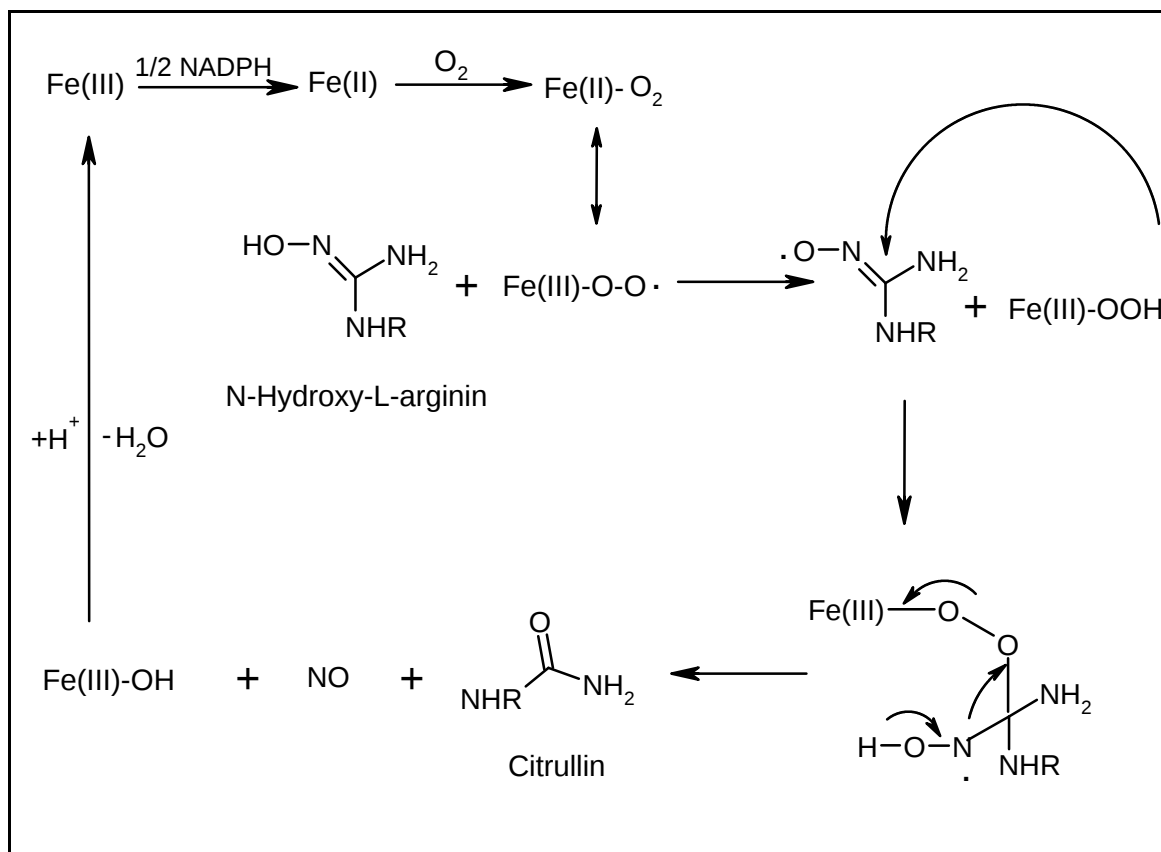
4.1 Literaturübersicht zur oxidativen Bindungsspaltung der Hydroxyiminogruppe

4.1.1 Physiologischer Mechanismus

Betrachtet man die NO-Biosynthese, so bedarf die Freisetzung von NO aus N^ω-Hydroxy-L-arginin einer oxidativen Bindungsspaltung der N-Hydroxyguanidinogruppe. Für N^ω-Hydroxy-L-arginin wurde unter Verbrauch von 1 mol Sauerstoff und ½ mol NADPH ein 3 Elektronen Oxidations-Mechanismus zu NO und L-Citrullin formuliert^{121, 122}). Die ungerade Zahl der ausgetauschten Elektronen bedingt die Übertragung eines einzelnen Elektrons an einem Punkt der Biosynthese. Neben Fe(V)=O als oxidierendem Teilchen der Hämenzyme bewiesen Akhtar und Mitarbeiter am Beispiel der Aromatasen¹²³), daß auch Fe(II)-O₂, das auch als Fe(III)-O₂^{•-} oder als Fe(III)-OO[•] Komplex formuliert werden kann, oxidierend wirken kann. Der Fe(II)-O₂-Komplex entsteht im katalytischen Zyklus durch Anlagerung von O₂ und einer 1 Elektron Reduktion von NADPH (= 0.5 mol) aus Fe(III).

Schema 4-1 beschreibt den thermodynamisch begünstigten Mechanismus der N^ω-Hydroxy-L-arginin-Oxidation¹.

¹ Der zweite, weniger wahrscheinlichere in der Literatur diskutierte Mechanismus beginnt entweder mit einer Elektronenübertragung oder einer Deprotonierung von NOHA, so daß sich NOHA⁺ und Fe(II)-O₂^{•-} bilden mit anschließendem nukleophilen Angriff des Eisenkomplexes am Guanidin-Kohlenstoff.



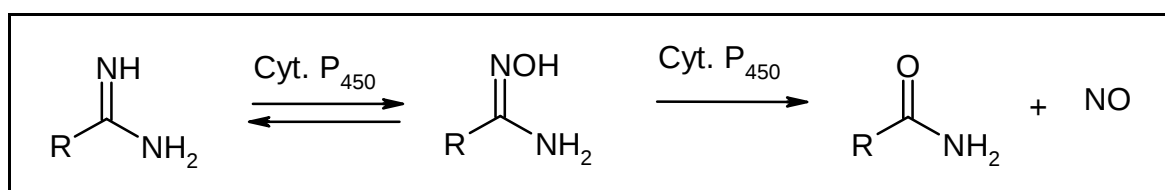
Schema 4-1 *Wahrscheinlicher physiologischer Mechanismus der N^w -Hydroxy-L-arginin-Oxidation*

Er beginnt mit der Abspaltung eines H-Atomes aus N^w -Hydroxy-L-arginin, so daß sich intermediär ein Iminooxylradikal und Fe(III)-OOH bilden. Im nächsten Schritt greift Fe(III)-OOH nucleophil am Guanidin-Kohlenstoffatom an, so daß ein tetraedraler Komplex mit ortho-Kohlensäurepartialstruktur entsteht, der unter Bildung von NO , Citrullin und Fe(III)-OH zerfällt.

Darüber hinaus war es ebenso möglich, nur durch Superoxidanionen N^w -Hydroxy-L-arginin oxidativ zu NO und zyklischen Carbodiimiden zu spalten¹²⁴).

4.1.2 N-Hydroxyguanidine und Amidoxime

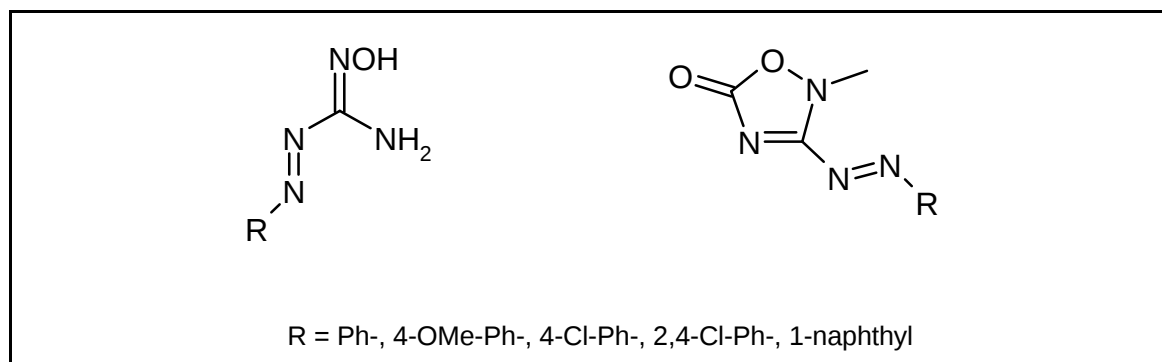
Clement und Mitarbeiter zeigten, daß sich durch Cytochrom P450 katalysierte Hydroxylierungen *in vitro*¹²⁵⁾ und *in vivo*¹²⁶⁾ Amidoxime aus Amidinen erzeugen ließen. Da die in Konkurrenz stehende Rückreaktion ebenfalls durch Cytochrom P450 katalysiert wird¹²⁷⁾, war die Entdeckung der Amidine als neue Klasse der NO-Donatoren nicht zu erwarten (Schema 4-2).



Schema 4-2 Cytochrom P450 vermittelte Oxidation von Amidinen sowie Reduktion und Oxidation von Amidoximen

Potenter dagegen erwiesen sich die Amidoxime. Für sie ist analog der N^ω-Hydroxy-L-arginin-Biotransformation eine Cytochrom P450 vermittelte Umwandlung in NO und das entsprechende Amid beschrieben¹²²⁾.

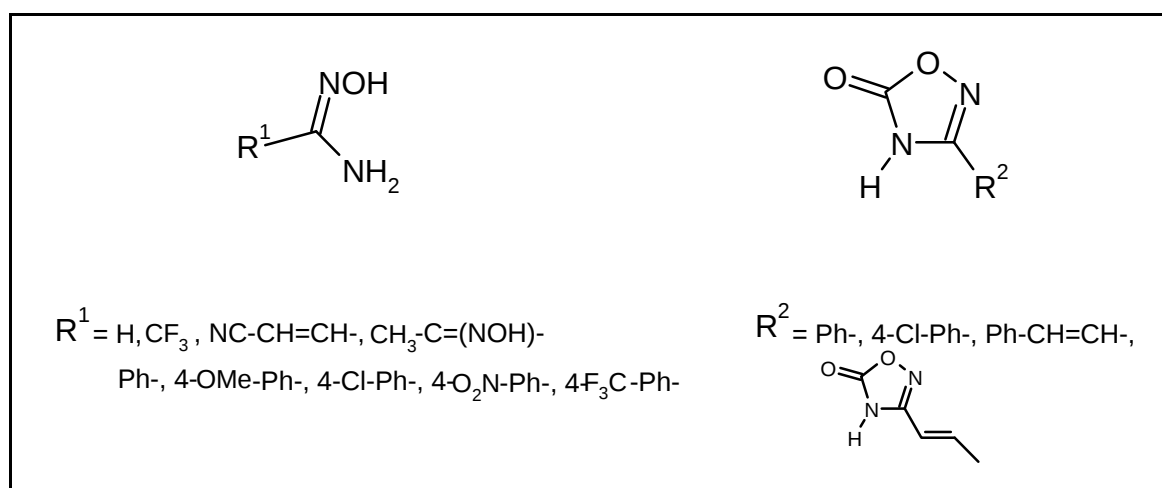
Bade synthetisierte Arylazoamidoxime sowie 3-Arylazo-1,2,4-oxadiazolin-5-one als ihre Prodrugs (Schema 4-3) und konnte ihnen sowohl antithrombotische als auch blutdrucksenkende Eigenschaften nachweisen¹²⁸⁾.



Schema 4-3 Arylazoamidoxime sowie 3-Arylazo-1,2,4-oxadiazolin-5-one als NO-Donatoren

Die elektronenziehenden Eigenschaften der Arylazo-Gruppe wirken sich dabei steigend auf die NO-Freisetzung aus.

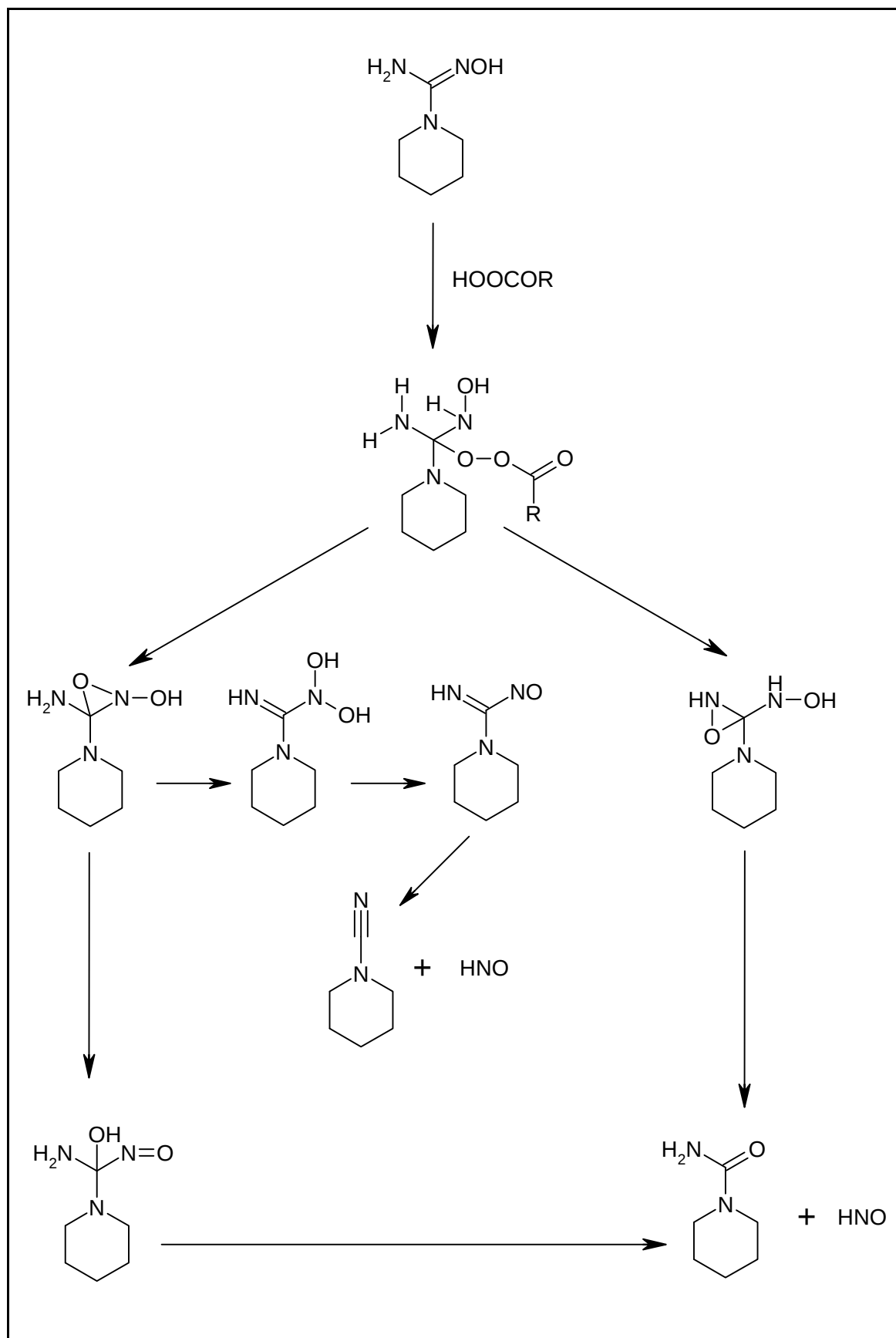
Dieser Befund veranlaßte Brehme, aliphatische und aromatische Amidoxime mit elektronenziehenden Substituenten in geminaler Position sowie deren Prodrugs zu synthetisieren (Schema 4-4). Auch für diese Verbindungen konnte eine vasorelaxierende und aggregationshemmende Wirkung festgestellt werden¹²⁹).



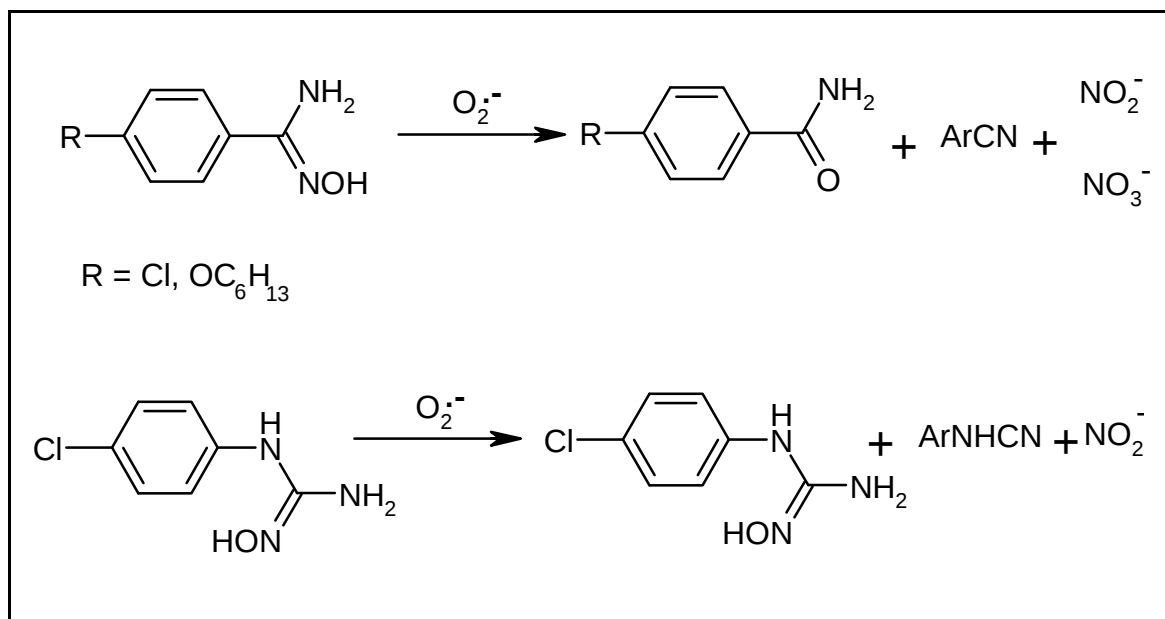
Schema 4-4 Amidoxime sowie 3-substituierte 1,2,4-oxadiazolin-5-one als NO-Donatoren

Fukuto studierte die Oxidation von N-Hydroxyguanidinen durch verschiedene Persäuren und formulierte einen der NO-Biosynthese ähnlichen Mechanismus¹³⁰) (Schema 4-5).

Die Persäuren greifen zunächst den Guanidin-Kohlenstoff nukleophil an. Unter Umlagerung entsteht neben dem korrespondierenden Harnstoff allerdings nur HNO bzw. durch Dimerisierung sein Folgeprodukt N_2O anstelle von NO. Dieser Befund ist nicht sonderlich überraschend, da die verwendeten Oxidationsmittel in der Regel 2e^- Überträger sind und NO dagegen durch eine 3e^- Oxidation aus N^ω -Hydroxy-L-arginin hervorgeht. Auf einem Nebenweg entsteht zusätzlich ein Cyanamid und HNO.

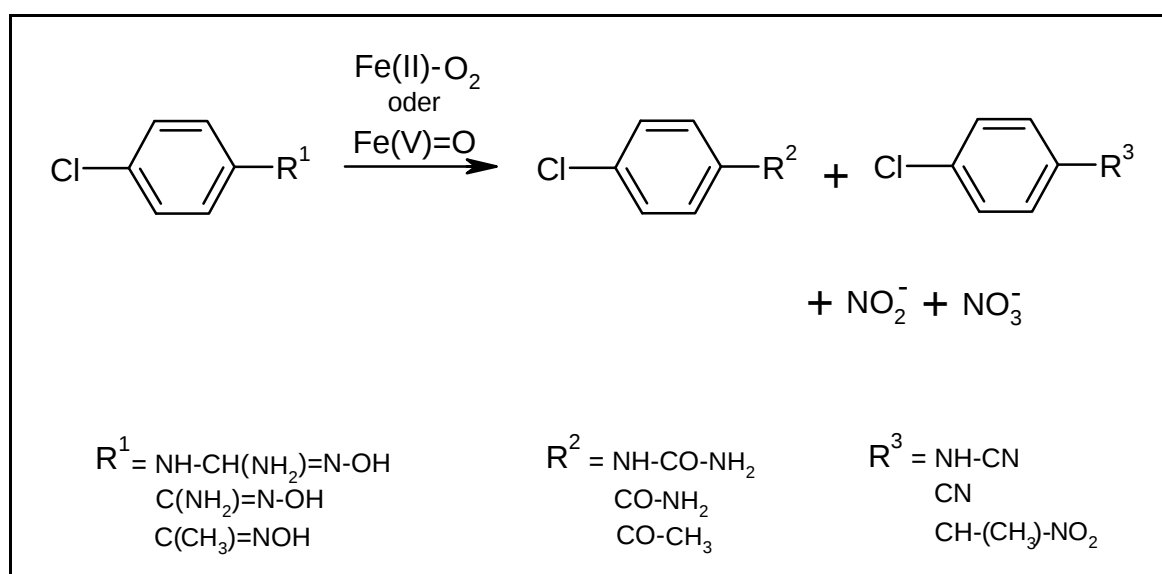
**Schema 4-5** Oxidation von N-Hydroxyguanidinen durch Persäuren¹³⁰⁾

Sennequier und Mitarbeiter¹³¹⁾ untersuchten den Einfluß von Superoxidanionen auf die oxidative Bindungsspaltung von Amidoximen und N-Hydroxyguanidinen, indem sie ausgewählte Vertreter mit KO_2 unter Bildung von Nitrit und Nitrat sowie der entsprechenden Amide und Harnstoffe umsetzten (Schema 4-6). Dabei konnten sie $\text{O}_2^{\cdot-}$ als oxidierendes Agens eindeutig nachweisen, da die Reaktion durch Superoxiddismutase hemmbar war. Die NO-Bildung wurde indirekt über Nitrit und Nitrat, NO-Folgeprodukte in sauerstoffhaltiger wäßriger Lösung, bestimmt. Die Bildung des Cyanamids trat vor allem bei der Umsetzung der Hydroxyguanidine auf. Aus Amidoximen entstehende Nitrile waren nur in geringen Konzentrationen nachweisbar.



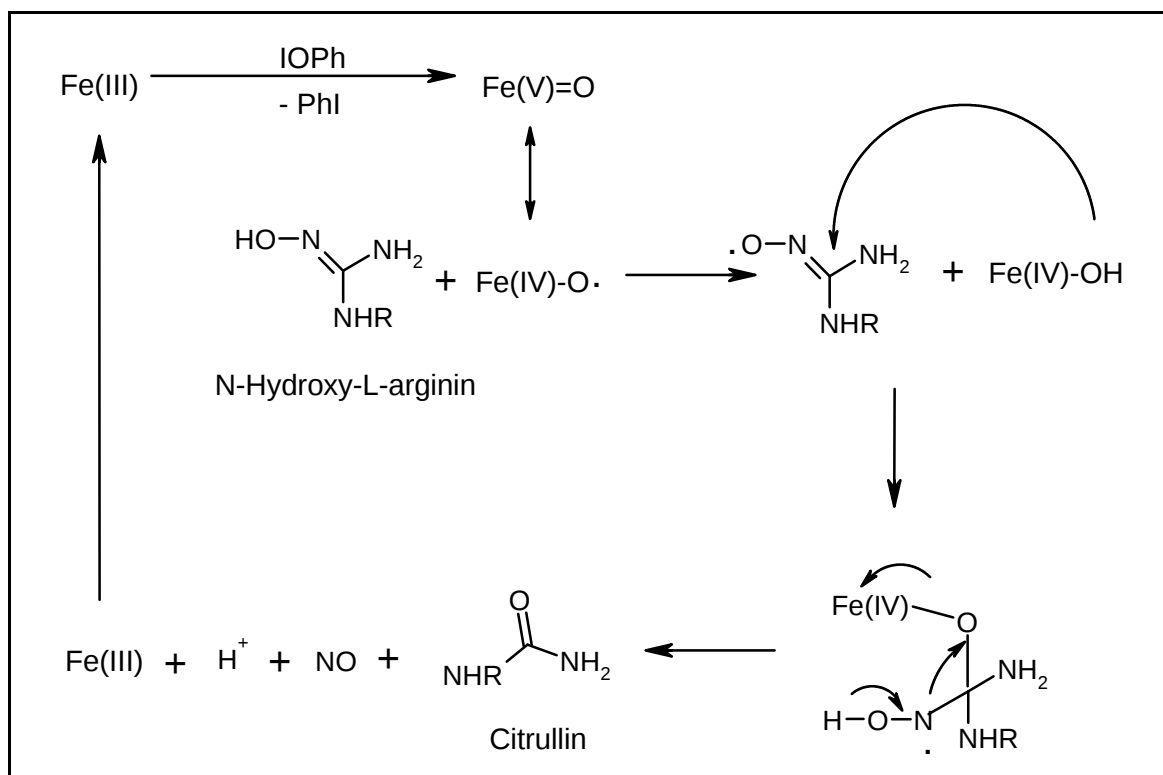
Schema 4-6 Einfluß von Superoxidanionen auf die oxidative Bindungsspaltung von Amidoximen und N-Hydroxyguanidinen

Jousserandot¹³²⁾ berichtete dagegen unter anderem über Amidoxime, N-Hydroxyguanidine und Ketoxime, deren Cytochrom P450 vermittelte Oxidation offensichtlich nicht auf $O_2^{\cdot-}$ zurückzuführen war. Ihre NO-Freisetzung ließ sich nicht einmal in Gegenwart hoher Konzentrationen von SOD hemmen, so daß als oxidierendes Agens $Fe(V)=O$ oder $Fe(II)-O_2$ postuliert wurde (Schema 4-7).



Schema 4-7 $Fe(V)=O$ oder $Fe(II)-O_2$ vermittelte Oxidation verschieden substituierter Amidoxime, N-Hydroxyguanidine und Ketoxime

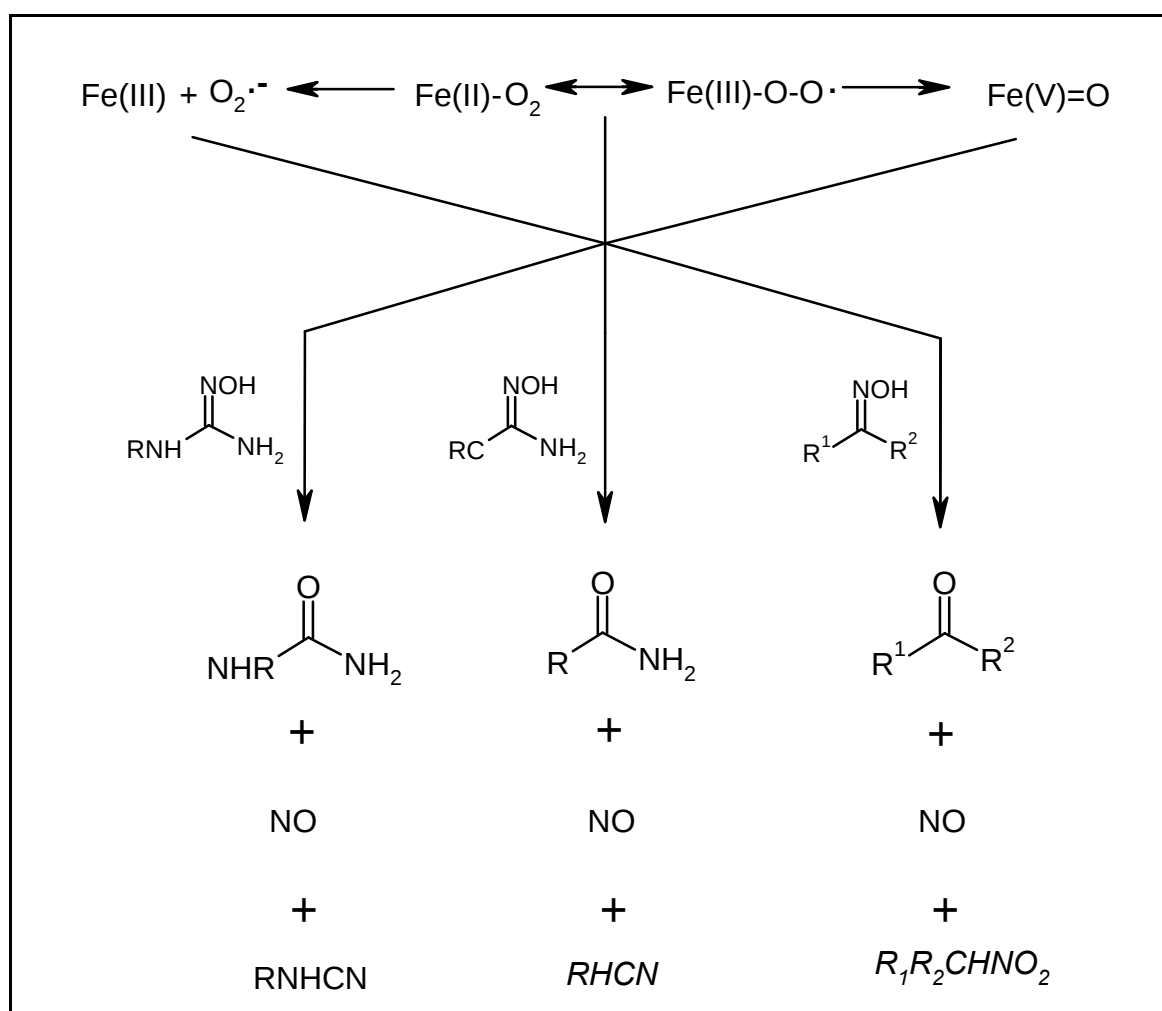
Riederer⁹¹⁾ untersuchte die Freisetzung von NO aus N^w-Hydroxy-L-arginin und N-Hydroxyguanidinen mit Hilfe des FeTPPCL / IOPh-Oxygenierungssystems und bewies die Übertragbarkeit des zweiten Schritts der NO-Biosynthese auf das Modell (Schema 4-8).



Schema 4-8 Postulierter Mechanismus der oxidativen –C=NOH-Bindungsspaltung von N^w-Hydroxy-L-arginin im Modellsystem

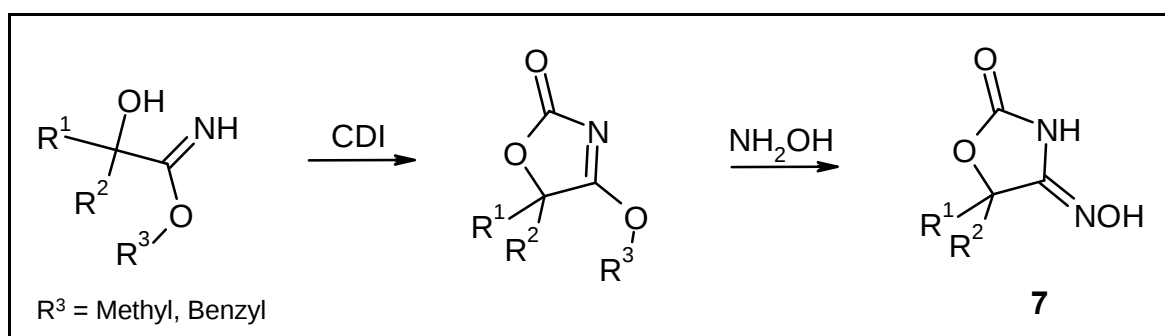
Das entsprechende Cyanamid als mögliches Zwischenprodukt wurde unter diesen Reaktionsbedingungen nicht gefunden.

Schema 4-9 zeigt zusammenfassend die zentrale Rolle von Fe(II)-O_2 . Aus ihm können durch Dissoziation freie $\text{O}_2^{\cdot-}$ - und Fe(III) -Ionen entstehen sowie durch Reaktion und nachfolgende heterolytische Bindungsspaltung von Sauerstoff die hochoxidierte Eisenstufe Fe(V)=O . Fe(II)-O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ und Fe(V)=O oxidieren verschiedene Substrate mit $-\text{C=NOH}$ -Funktion zu NO und den korrespondierenden Oxoverbindungen. Im Falle von Fe(V)=O entstehen als Nebenprodukte Nitrile und Nitroalkane. Cyanamide werden in Gegenwart aller drei oxidierenden Spezies gefunden. Welcher Oxidationsweg bevorzugt ist, hängt sowohl von der Substitution der Verbindungen als auch von den Reaktionsbedingungen ab¹³²⁾.



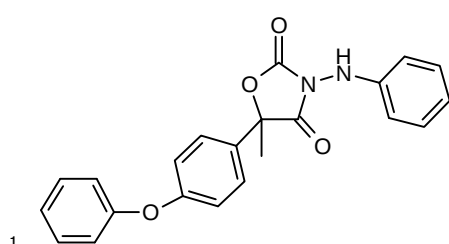
Schema 4-9 Zentrale Rolle von Fe(II)-O_2 bei der oxidativen $-\text{C=NOH}$ -Bindungsspaltung

Für eigene Versuche fiel die Wahl auf 4-Hydroxyimino-oxazolidin-2-one (**7**), die bislang nicht hinsichtlich einer NO-Freisetzung untersucht worden sind. Die als semizyklische Amidoxime aufzufassenden Heterozyklen sind ausgehend von α -Hydroxyimidaten, die mit CDI zu 4-Alkoxy-oxazolin-2-onen ringgeschlossen und anschließend mit Hydroxylamin umgesetzt wurden, erhältlich (Schema 4-10)¹³³).



Schema 4-10 Synthese der 4-Hydroxyimino-oxazolidin-2-one (**7**)

4-Hydroxyimino-oxazolidin-2-one wurden ursprünglich als Analoga des neuen und hochpotenten Breitbandspektrumfungizids Famoxadon¹ aus der Klasse der 3-Amino-oxazolidin-2,4-dione synthetisiert.



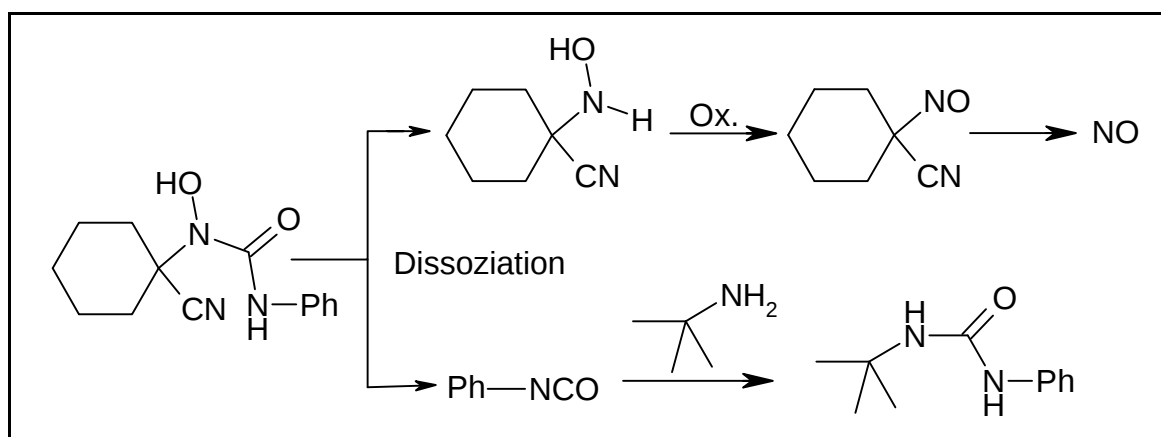
Famoxadon

4.1.3 Harnstoffderivate

N-Hydroxyharnstoffe sind in der Lage unter Komplexbildung mit Hämproteinen, NO sowohl *in vitro*¹³⁴⁾ als auch *in vivo*¹³⁵⁾ freizusetzen.

Darüber hinaus war über N-Hydroxyharnstoffe in der Literatur zu finden, daß sie retrosynthetisch zu Hydroxylamin und den entsprechenden Isocyanaten dissoziieren können¹³⁶⁾.

N-(1-Cyanoalkyl)-N-hydroxyharnstoffe besitzen aufgrund der Fähigkeit, NO oxidativ freizusetzen, antithrombotische Eigenschaften. Nach Dissoziation des N-Hydroxyharnstoffs wird das entstandene Hydroxylaminderivat über die entsprechende Nitrosoverbindung zu NO oxidiert (Schema 4-11)⁷⁷⁾.



Schema 4-11 NO-Freisetzung aus N-(1-Cyanoalkyl)-N-hydroxyharnstoffen

Streptozotocin (Abbildung 4-1) ist das 2-Desoxyglucose-Derivat von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff, dem eine sGC-Aktivierung nachgewiesen werden konnte¹³⁷). In pharmakologischen Tests wird es, vermutlich durch lokale NO-Freisetzung, zum Auslösen von Diabetes verwendet¹³⁸).

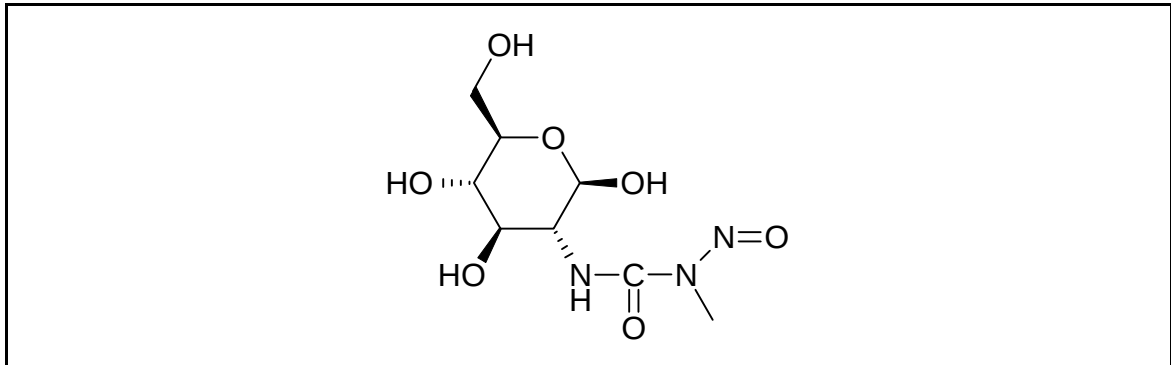
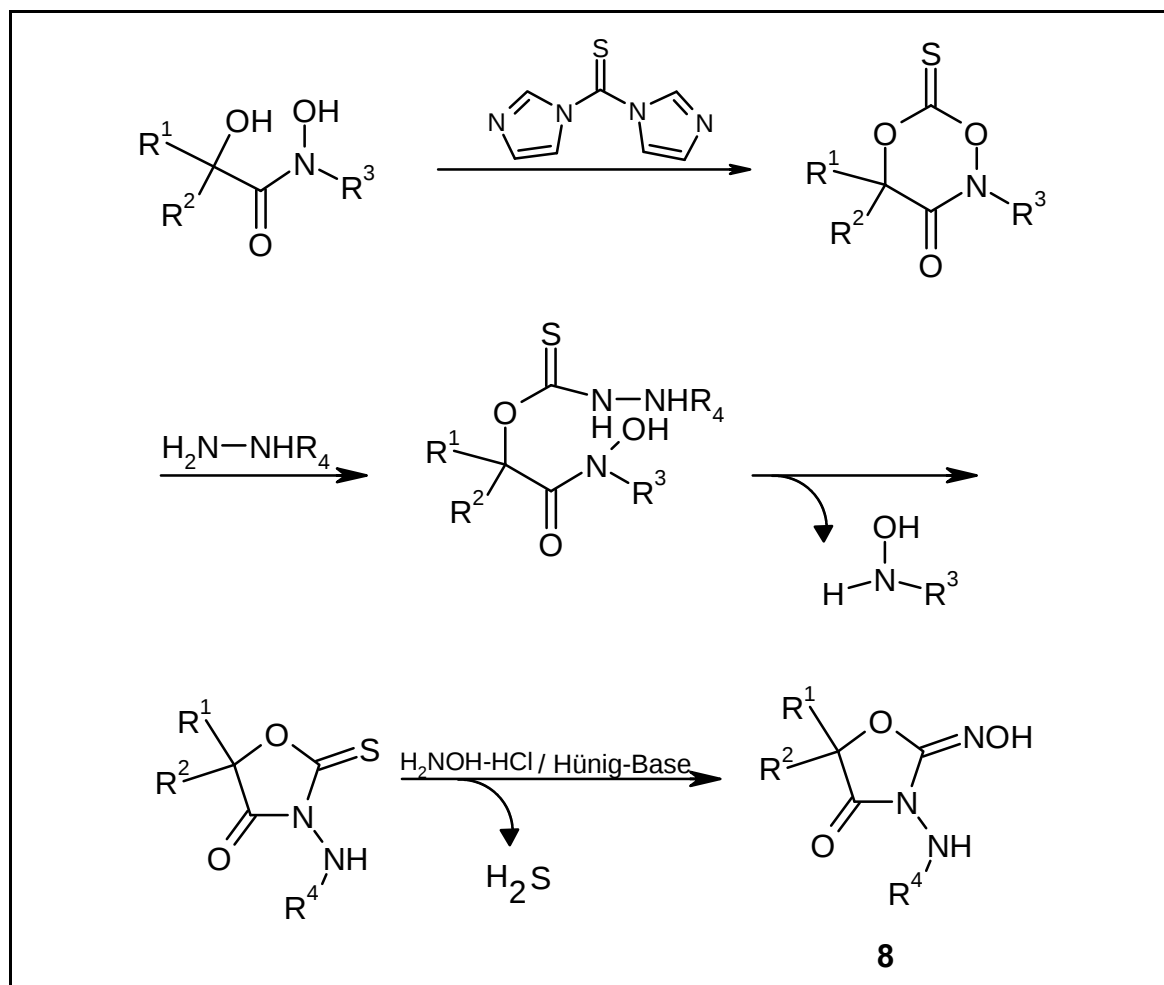


Abbildung 4-1 2-Desoxyglucose-Derivat von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (Streptozotocin)

Da N-Hydroxyisoharnstoffe bisher nicht bezüglich ihrer NO-Freisetzung untersucht worden sind, interessierte uns das NO-Freisetzungspotential von 2-Hydroxyimino-oxazolidin-4-onen.

Ihre Darstellung gelingt durch Umsetzung N-substituierter 2-Hydroxycarbohydroxamsäuren mit 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol zu 1,2,5-Dioxazinanen, die mit Hydrazinen in einer Ringkontraktion zu 2-Thioxo-oxazolidin-4-onen reagieren¹³⁹). Die nachfolgende Behandlung mit Hydroxylamin führt zu 2-Hydroxyimino-oxazolidin-4-onen (**8**)¹⁴⁰) (Schema 4-12).



Schema 4-12 Darstellung von 2-Hydroxyimino-oxazolidin-4-onen (**8**)

¹²2-Hydroxyimino- und 2-Thioxo-oxazolidin-4-one zeichnen sich durch ausgezeichnete fungizide Aktivitäten gegenüber verschiedenen phytopathogenen Pilzen aus.

4.1.4 Thioharnstoffderivate

Isothioharnstoffe sind ebenso wie Thioharnstoffe als NOS-Inhibitoren literaturbekannt (Abbildung 4-2). Sie hemmen die NO-Synthasen kompetitiv ähnlich den L-Argininanaloga durch Bindung an die Guanidinbindungsstelle auf der Substratseite des Enzyms¹. Bisher ist es noch nicht gelungen, NOS-Inhibitoren mit für die therapeutische Nutzung ausreichender Isoformselektivität zu entwickeln.

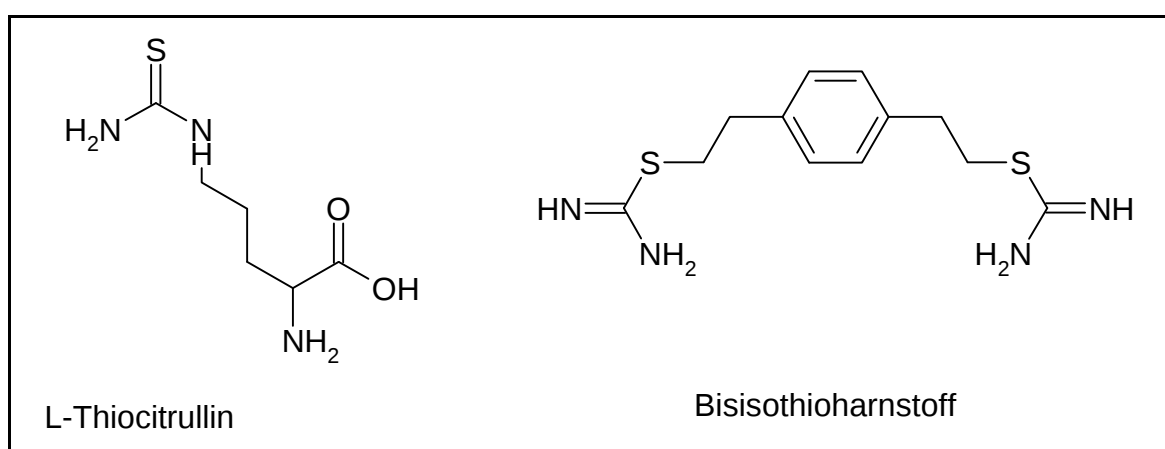
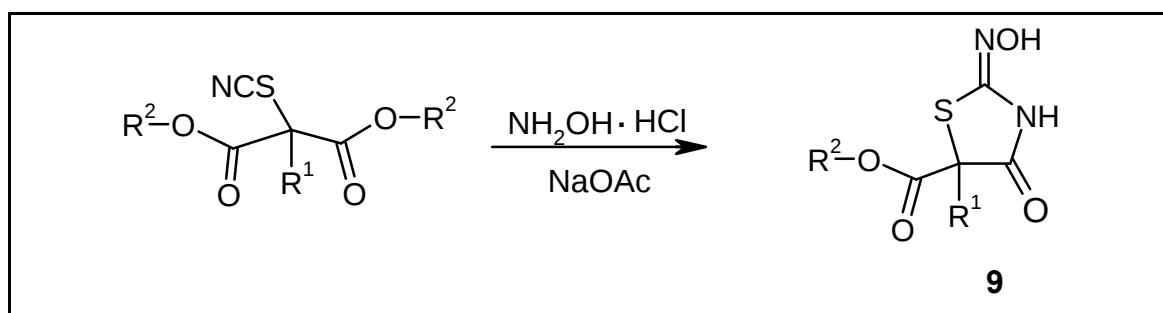


Abbildung 4-2 NO-Synthase-Inhibitoren

¹ Die Bindung an das Enzym erfolgt über Wasserstoffbrücken. Die Basizität der Guanidinogruppe ist nicht von Bedeutung.

Auch als NO-Donatoren spielen Thioharnstoffderivate bisher keine Rolle. Dies veranlaßte uns, das Freisetungsverhalten von 2-Hydroxyimino-thiazolidin-4-onen näher zu beleuchten.

Die als N-Hydroxyisothioharnstoffe aufzufassenden 2-Hydroxyimino-thiazolidin-4-one (**9**)¹ sind durch Zyklisierung von Thiocyanatomalonsäureestern mit Hydroxylaminhydrochlorid in Gegenwart von Natriumacetat erhältlich (Schema 4-13)¹⁴²).

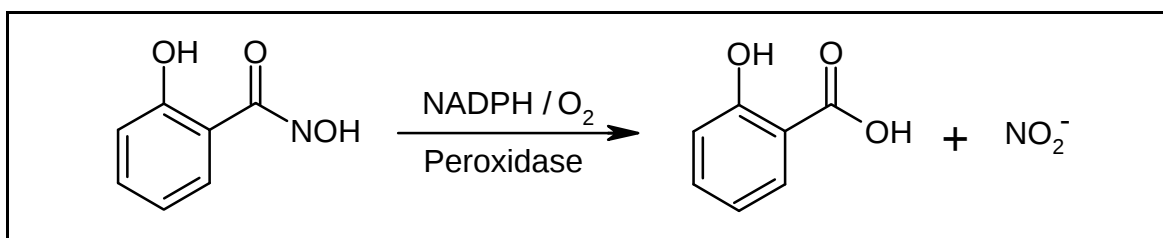


Schema 4-13 Darstellung von 2-Hydroxyimino-thiazolidin-4-onen (**9**)

¹ 2-Hydroxyimino-thiazolidin-4-one zeichnen sich durch eine moderate insektizide und schwache herbizide Wirkung aus¹⁴¹).

4.1.5 Hydroxamsäuren

Salicylohydroxamsäure ließ sich in Gegenwart von Peroxidase und NADPH unter Sauerstoffverbrauch zu Nitrit oxidieren (Schema 4-14). Dabei katalysierte Peroxidase in Anwesenheit von NADPH die Bildung aktiver Sauerstoffspezies aus O_2 , die anschließend in einer nicht-enzymatischen Reaktion die Salicylohydroxamsäure oxidierten. Die Oxidation war sowohl durch SOD als auch durch Katalase hemmbar, ein indirekter Beweis für die Beteiligung aktiver Sauerstoffspezies¹⁴³).

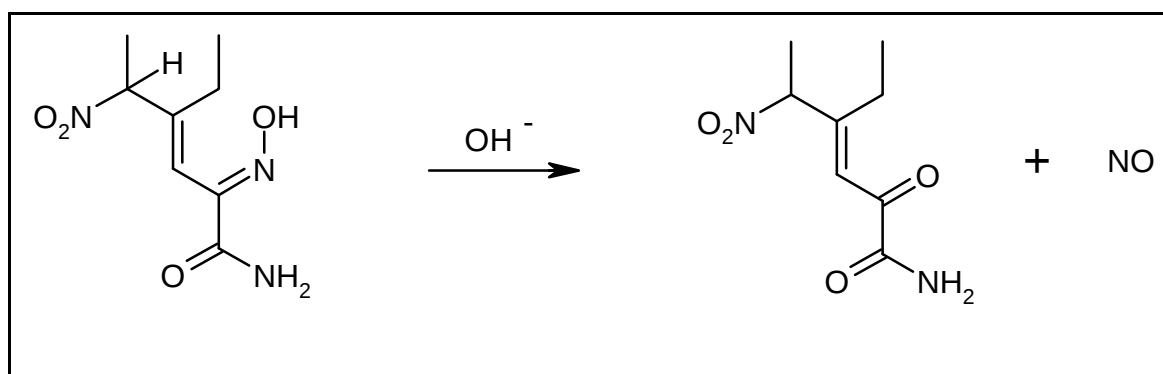


Schema 4-14 Oxidation von Salicylohydroxamsäure

Obwohl keine Angaben über die Entstehung von NO gemacht wurden, scheint es möglich, daß Nitrit das Folgeprodukt von NO in sauerstoffhaltigen, wäßrigen Lösungen darstellt.

Marmion und Mitarbeitern gelang es, eine NO-Donorfunktion von Hydroxamsäuren nachzuweisen, indem sie bewiesen, daß NO sowohl aus Benzo- als auch aus Aceto-, Salicylo- und Anthranilo-hydroxamsäure auf Ruthenium(III)-Verbindungen übertragen wurde, wodurch sich Ruthenium(II)-Nitrosyl-Komplexe ausbildeten, die an Rattenaorten gefäßrelaxierend wirkten⁷⁹). Als Reaktionsprodukte ergaben sich darüber hinaus die jeweils korrespondierenden Carbonsäuren der eingesetzten Hydroxamsäuren.

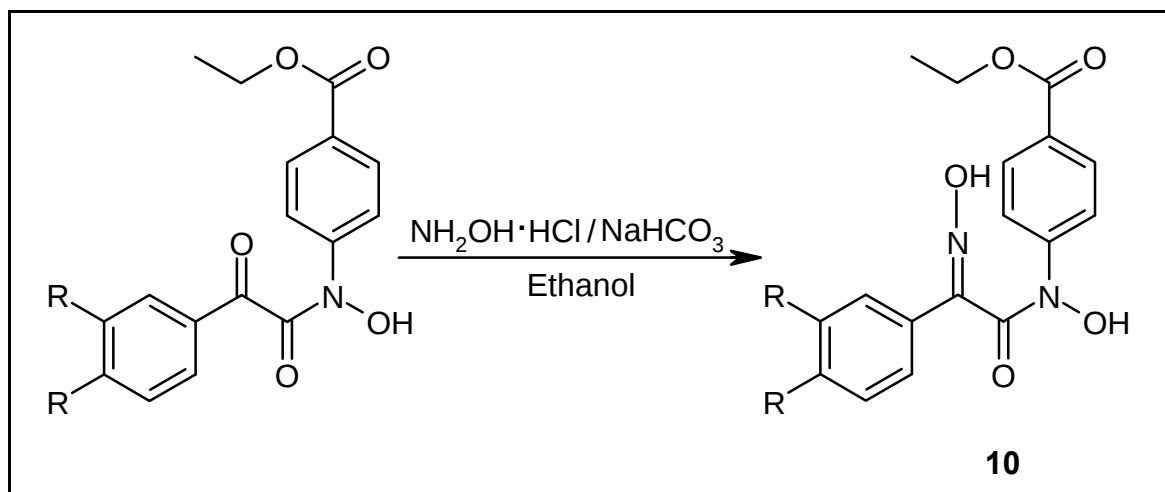
Das erstmalig aus *Streptomyces griseosporeus* isolierte α -Hydroxyiminocarbonsäureamid FK409 (NOR3) besitzt vasodilatorische und antithrombotische Eigenschaften¹⁴⁴). Die Fähigkeit zur NO-Freisetzung zeigt eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit. Während FK409 bei pH-Werten < 3 relativ stabil ist, zerfällt es im Alkalischen fast vollständig spontan zu NO und zum entsprechenden α -Oxocarbonsäureamid (Schema 4-15)^{71, 145}).



Schema 4-15 NO-Freisetzung aus FK409

Als essentielles Strukturelement postulierte Feelisch die elektronenziehende Nitrogruppe, die über eine Vinylgruppe mit der Oximfunktion in Verbindung steht¹).

In diesem Zusammenhang interessierte uns die potentielle NO-Bildung aus den strukturverwandten α -Hydroxyiminohydroxamsäuren (**10**)¹. Diese sind durch Oximierung der korrespondierenden α -Ketohydroxamsäuren zugänglich¹⁴⁶) (Schema 4-16).



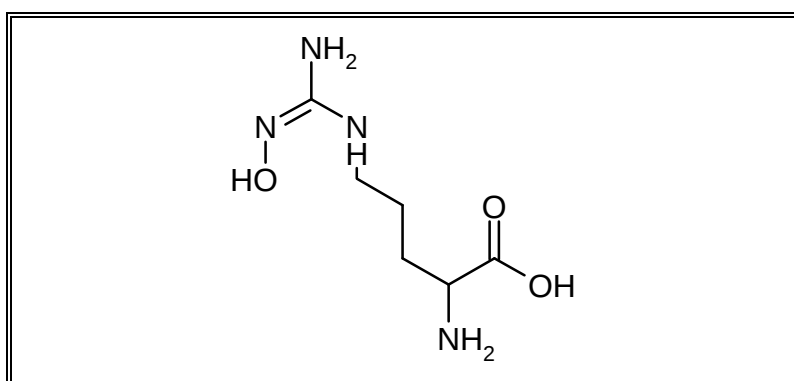
Schema 4-16 Darstellung der α -Hydroxyiminohydroxamsäuren (**10**)

¹ α -Hydroxyiminohydroxamsäuren zeichnen sich durch gute herbizide Aktivität aus.

4.2 Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen

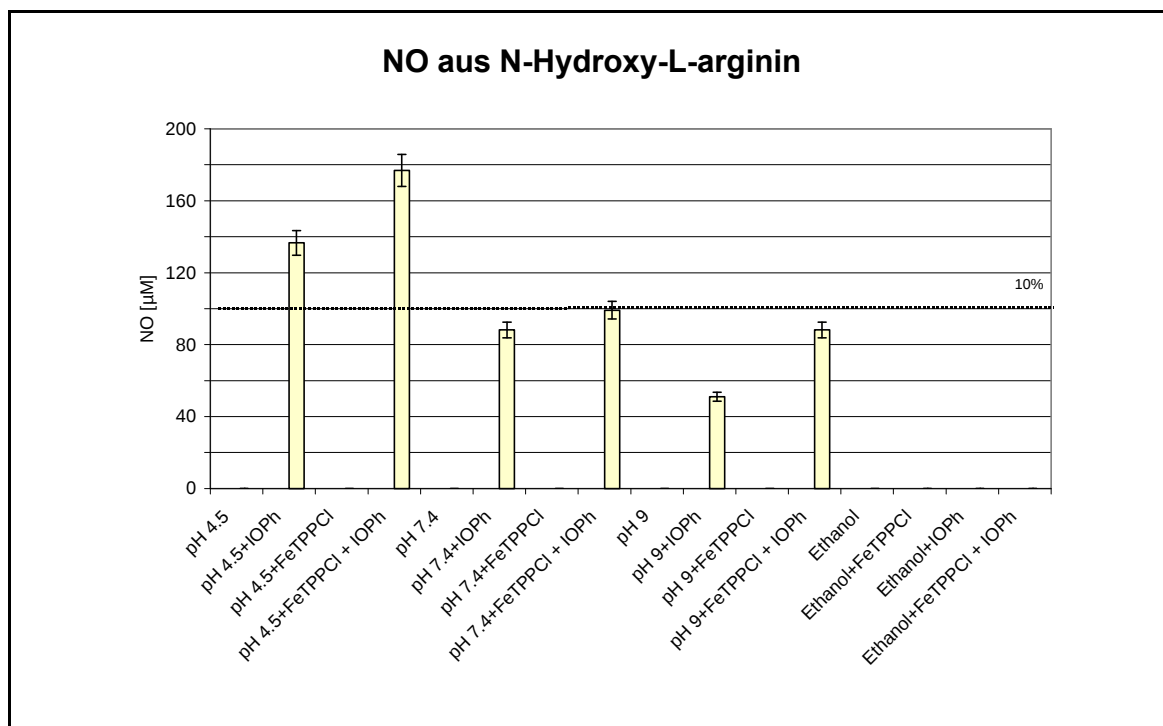
Um die erhaltenen Meßwerte auf einen Standard beziehen zu können, wurde N^ω-Hydroxy-L-arginin (1 mM in DMSO) als Vergleichssubstanz ausgewählt.

4.2.1 N^ω-Hydroxy-L-arginin



Formel 4-1

Eine NO-Freisetzung war nur in oxidativem Milieu zu beobachten (Abbildung 4-3). Der Zusatz des Metallporphyrin-Komplexes (FeTPPCI) führte dabei in Gegenwart von Iodosobenzol zu einer Erhöhung der NO-Konzentration. Die höchsten Werte wurden mit 17,8 % bezogen auf die Ausgangskonzentration für den pH-Wert von 4,5 erreicht. Mit steigendem pH-Wert nahm die NO-Freisetzung auf 8,8 % bei pH 9 ab. Aus ethanolischen Lösungen war überhaupt keine Freisetzung feststellbar.



4 3 Vergleich der NO Freisetzung aus N - - -
 unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, n = 5

Das meiste Nitrit entstand mit 46,4 % bei pH 4.5. Die pH-Abhängigkeit der Nitritbildung zeigte eine der NO-Freisetzung analoge Charakteristik. Dabei wirkte sich der Eisenkomplex in Gegenwart von IOPh steigend auf das Reaktionsergebnis aus. Bei pH 9 waren noch 30 % Nitrit nachweisbar (Abbildung 4-4).

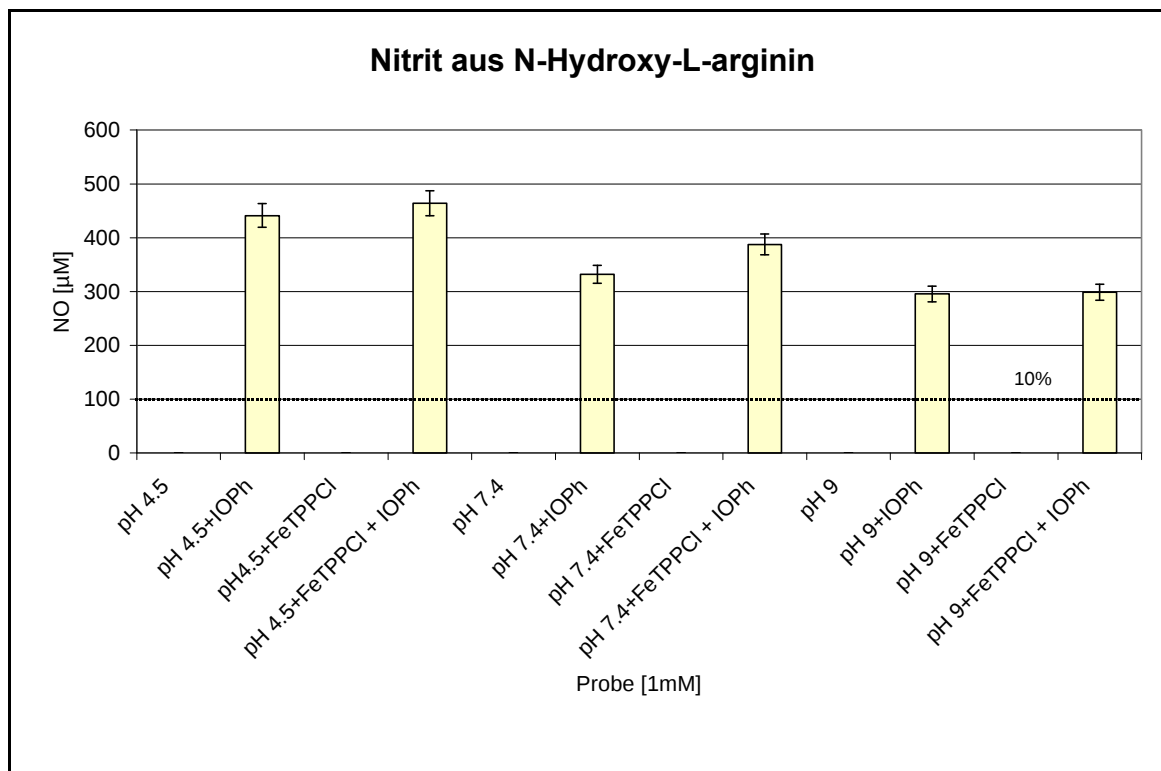


Abbildung 4-4 Vergleich der Nitrit-Freisetzung aus N^w -Hydroxy-L-arginin unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Nitrat bildete sich mit 17,16 % in Gegenwart des FeTPPCI / IOPh Systems ausschließlich im Sauren bei pH 4.5. Nur in Gegenwart von

(Abbildung -5

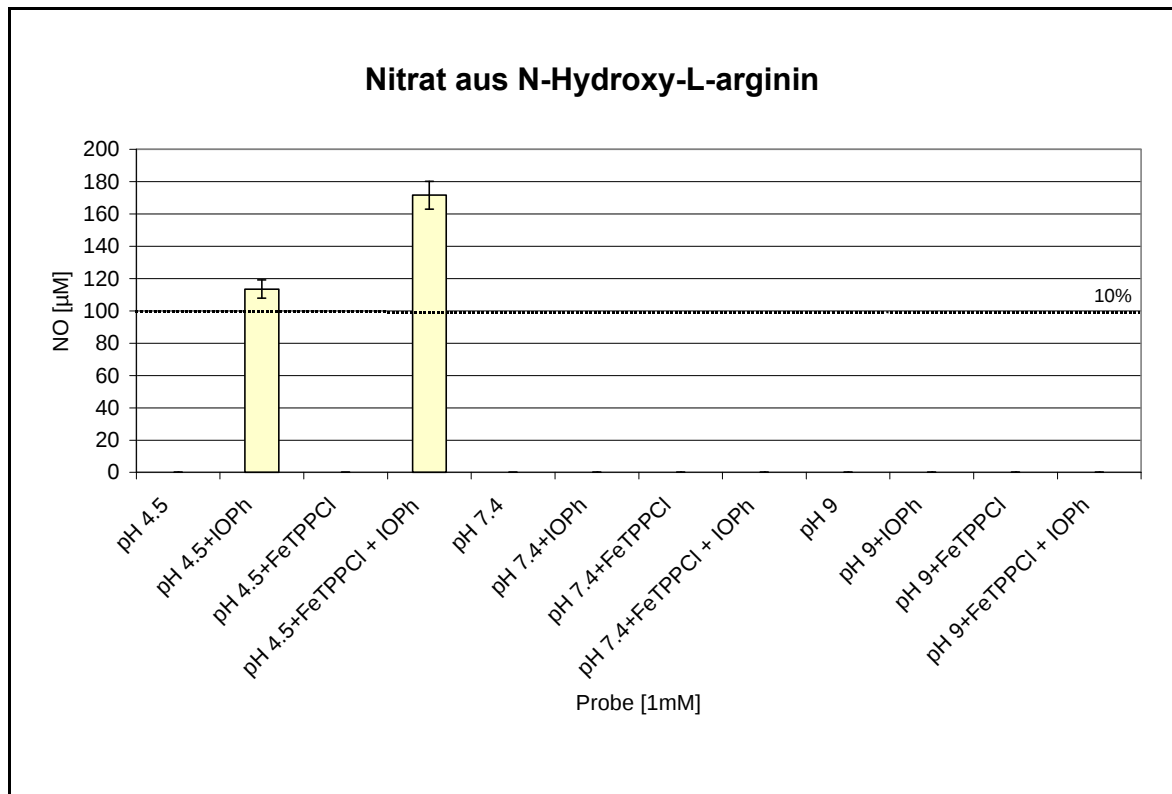
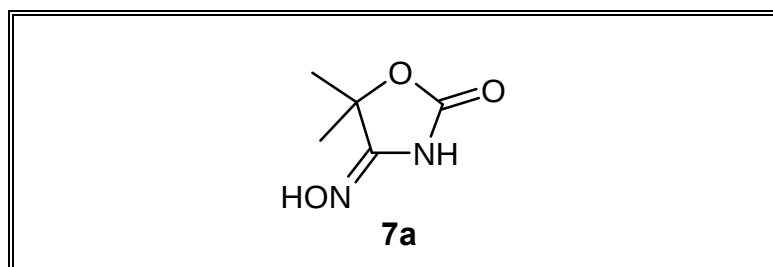


Abbildung 4-5 Vergleich der Nitrat-Freisetzung aus N^w -Hydroxy-L-arginin unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

4.2.2 Amidoxime

4.2.2.1 4-Hydroxyimino-oxazolidin-2-one

5,5-Dimethyl-4-hydroxyimino-oxazolidin-2-on (**7a**)



Formel 4-2

Ohne Zusätze setzte die Substanz unter keinen Bedingungen NO frei. Auch der Zusatz von FeTPPCI-Komplex führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Erst in Anwesenheit von Iodosobenzol war NO detektierbar. Dabei war eine deutliche pH-Abhängigkeit zu beobachten. Mit 25 % NO wurden die besten Werte in saurem pH-Bereich erreicht. Bei pH 5.5 betrug die freigesetzte NO-Menge noch 20 %. Beim physiologischen pH-Wert von 7.4 waren immerhin noch 12,2 % NO detektierbar, während die Ausbeute bei pH 9 auf 4,7 % NO abnahm. Dabei ließ sich die NO-Freisetzung durch die Kombination des FeTPPCI-Komplexes und Iodosobenzol bei pH 5.5 und pH 9 verdoppeln, während sie bei pH 4.5 annähernd gleich blieb. In Ethanol wurde in Gegenwart des Oxygenierungssystems noch eine Konzentration von 6 % NO erreicht.

In Gegenwart von H₂O₂ als Sauerstoffquelle konnte kein NO gemessen werden (Abbildung 4-6).

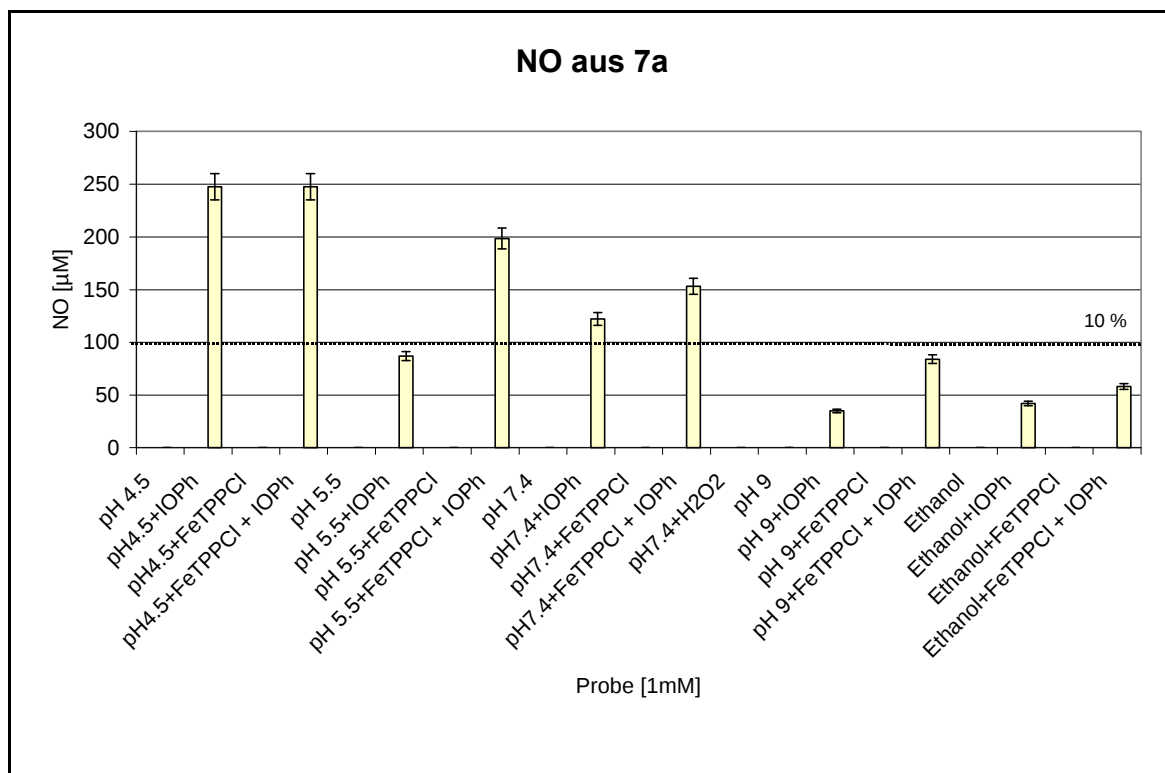
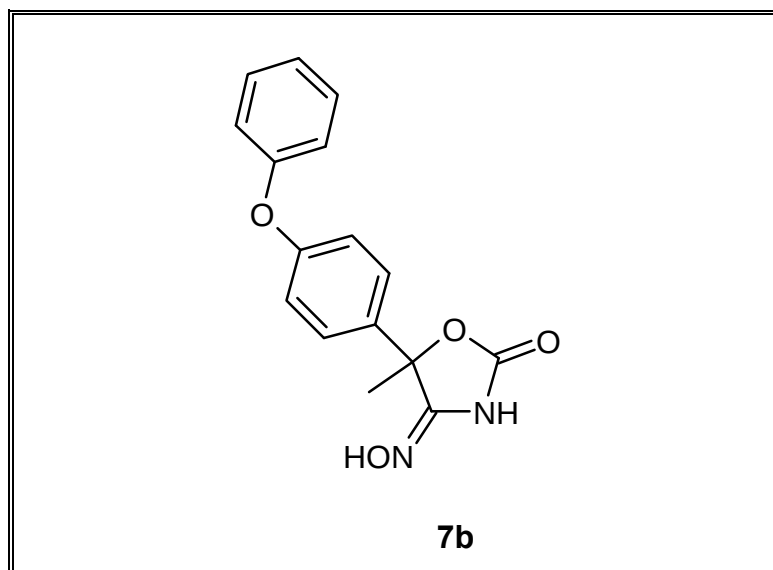


Abbildung 4-6 Vergleich der NO-Freisetzung aus **7a** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

-Hydroxyimino 5- -5 (4- -oxazolidin 2- **7b**)



Formel 4-3

Ohne Zusätze war auch hier unter keinen Bedingungen NO zu messen. Erst in Gegenwart von Sauerstoff wurde NO generiert. Dabei war analog zu **7a** eine pH-abhängige Freisetzungsscharakteristik zu beobachten. Mit 17,2 % war die NO-Ausbeute bei pH 4.5 am höchsten. Bei pH 5.5 betrug sie noch 10,13 %. Bei physiologischem pH-Wert sank sie weiter auf 8,8 %, während im Alkalischen bei pH 9 nur noch 5 % NO zu finden waren. Der FeTPPCL-Komplex-Zusatz erhöhte die NO-Freisetzung gegenüber dem alleinigen Einsatz von Iodosobenzol signifikant. Die Freisetzung in ethanolischer Lösung war mit 0,87 % sehr gering. Der Einsatz von H₂O₂ anstelle von Iodosobenzol führte auch hier nicht zu einer NO-Freisetzung (Abbildung 4-7).

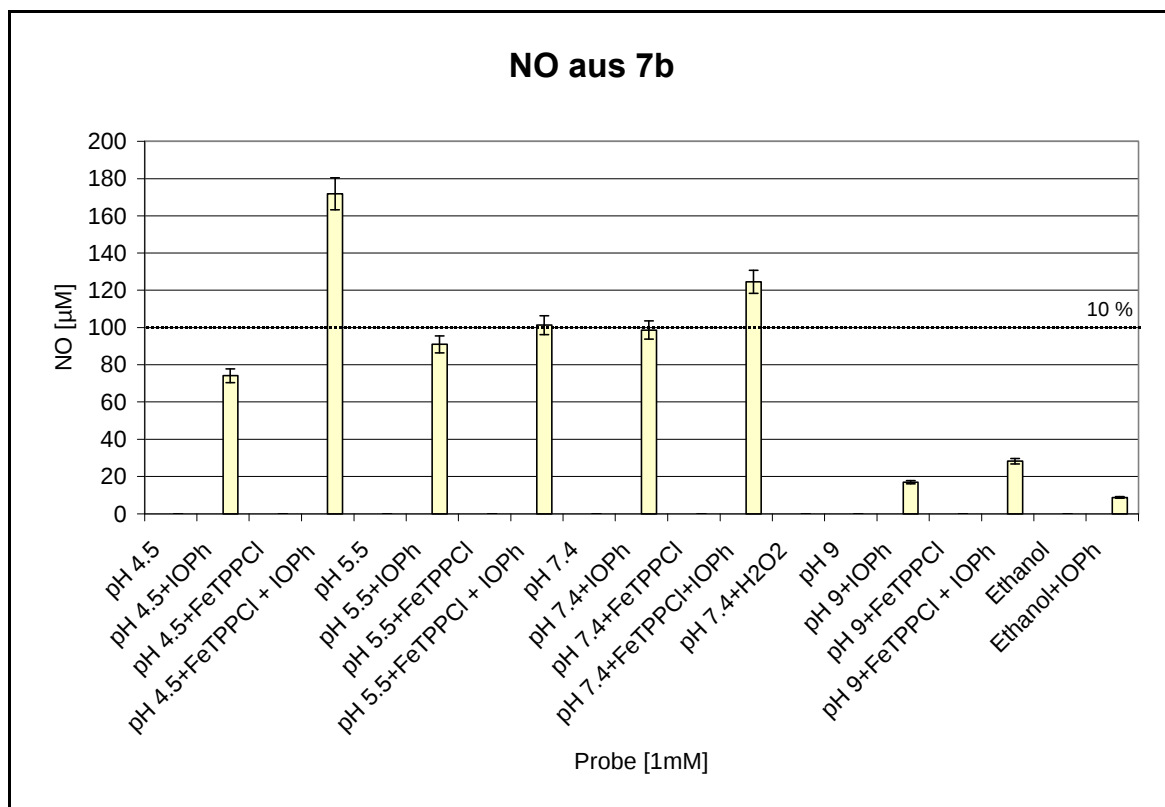


Abbildung 4-7 Vergleich der NO-Freisetzung aus **7b** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Betrachtet man die NO-Messung nach Nitritreduktion (Abbildung 4-8) so war die gleiche Tendenz zu beobachten. Hier wurden mit 117 % Nitrit die höchsten Werte für saure pH-Werte gemessen, während bei pH 9 nur noch 52,34 % zu finden waren. Ferner entstand nach dem Zusatz des Systems FeTPPCI / IOPh mehr Nitrit als durch IOPh allein.

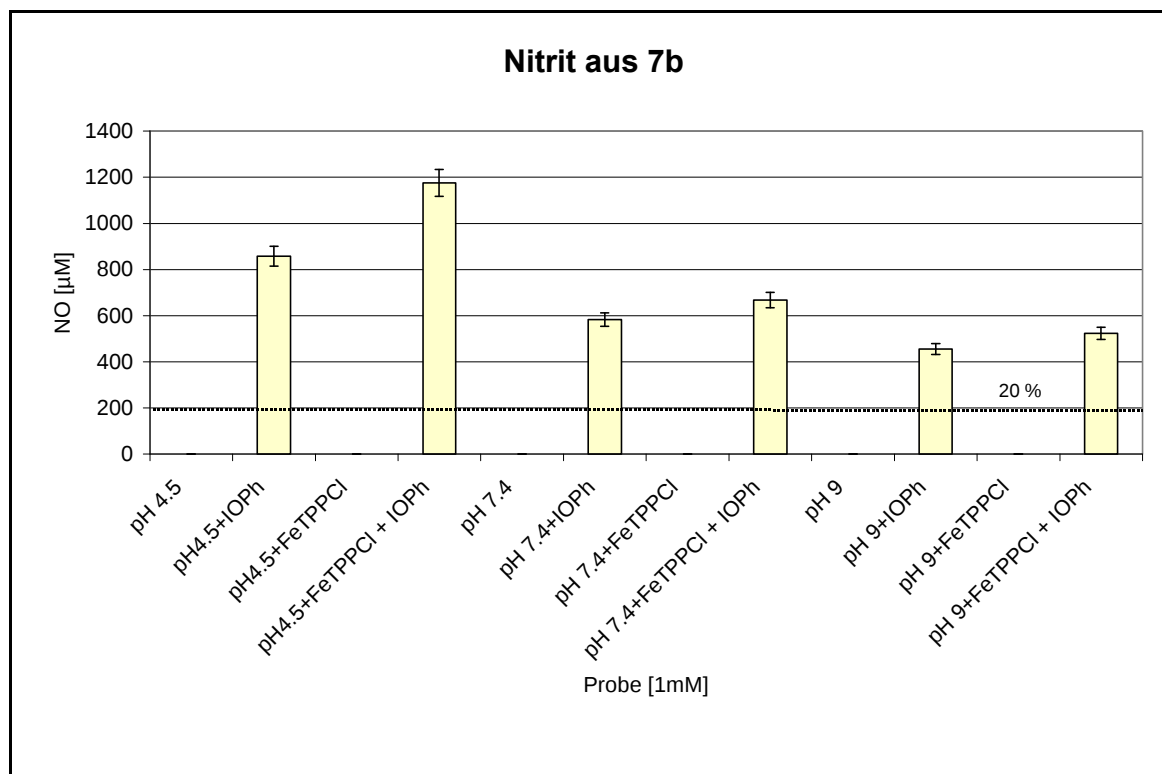


Abbildung 4-8 Vergleich der Nitrit-Freisetzung aus **7b** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Die Messung von NO nach Nitratreduktion (Abbildung 4-9) ergab mit 14 % lediglich Werte für den pH-Wert von 4.5. Unter anderen pH-Bedingungen ließ sich eine Entstehung von Nitrat nicht nachweisen.

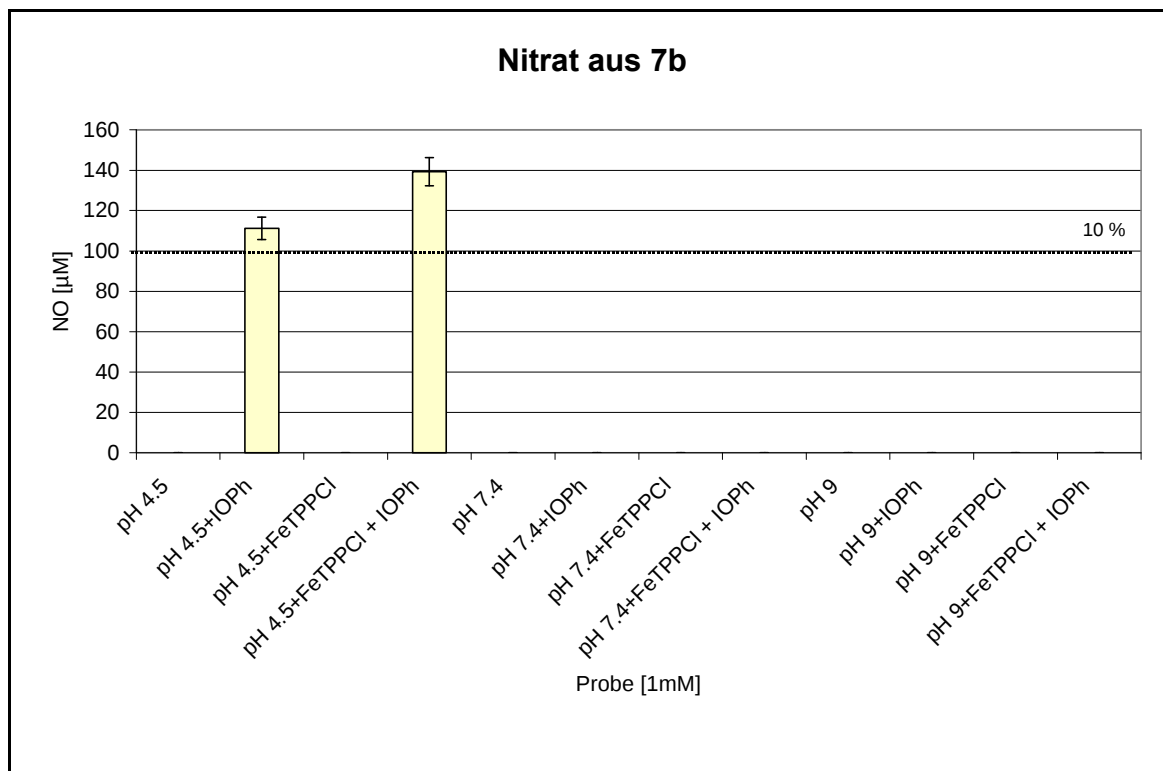
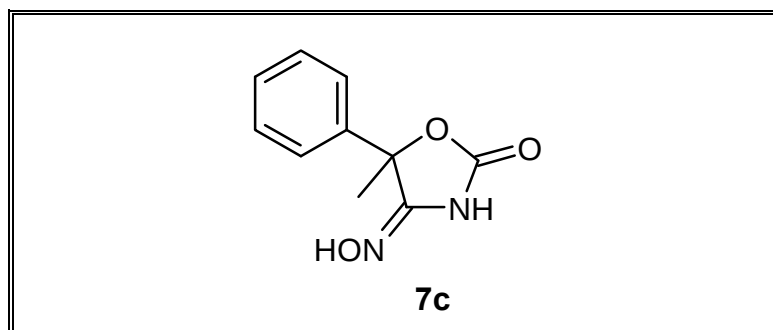


Abbildung 4-9 Vergleich der Nitrat-Freisetzung aus **7b** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

4-Hydroxyimino 5-methyl-5-phenyl-oxazolidin-2-on (**7c**)**Formel 4-4**

Eine NO-Freisetzung erfolgte ausschließlich unter oxidativen Bedingungen. Analog der Messung von **7a** und **7b** war wieder eine pH-Abhängigkeit zu verzeichnen. Die höchsten Werte wurden für NO mit 40,9% im Sauren ermittelt, während die Beträge der NO-Freisetzung im Alkalischen mit 11,4 % am niedrigsten waren. Aus Ethanol wurden immerhin noch 11,7 % NO erreicht (Abbildung 4-10).

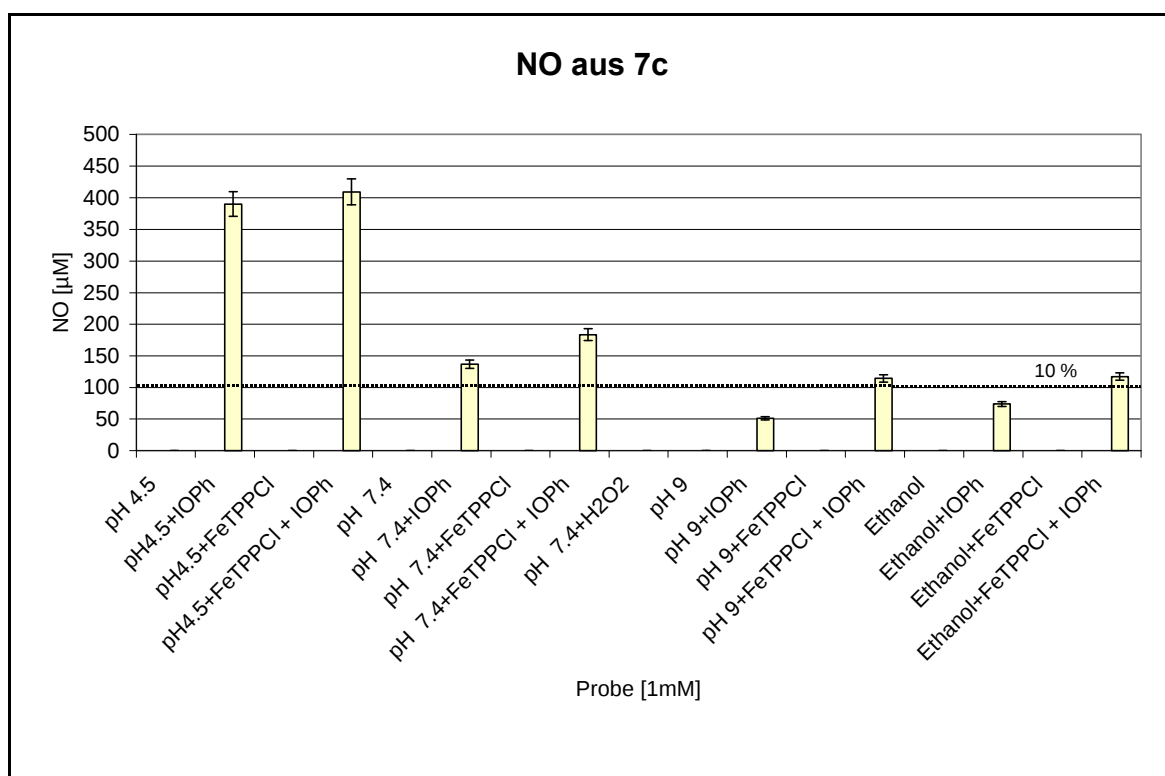
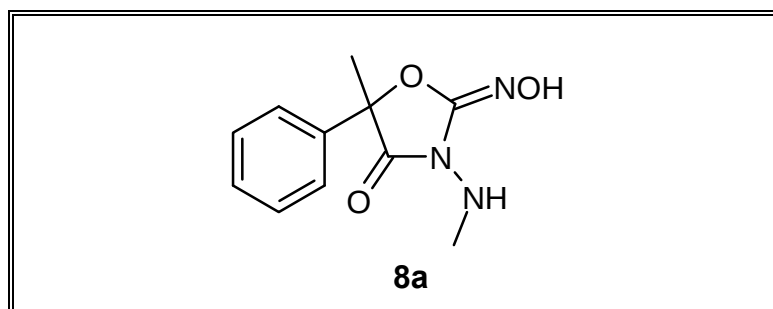


Abbildung 4-10 Vergleich der NO-Freisetzung aus **7c** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

4.2.3 N-Hydroxyisoharnstoffe

4.2.3.1 2-Hydroxyimino-oxazolidin-4-one

2-Hydroxyimino-5-methyl-3-methylamino-5-phenyl-oxazolidin-4-on (8a)



Formel 4-5

Ohne Zusätze ließ sich kein NO messen. Auch die Anwesenheit des Modellkomplexes führte nicht zu einer NO-Freigabe. Erst in Gegenwart des Sauerstoffdonators war NO in einer Konzentration von 23,74 % bei pH 4.5 detektierbar.

Die größten Freisetzungswerte wurden dabei wieder im Sauren erreicht, wohingegen die NO-Konzentrationen im alkalischen Bereich bei pH 9 bis auf 7,14 % abnahmen. Der Zusatz von FeTPPCL / IOPh führte zu einer Verbesserung der Freisetzung. In Ethanol war die Freisetzung in Gegenwart des Oxygenierungssystems mit 1,2 % im Verhältnis gering (Abbildung 4-11).

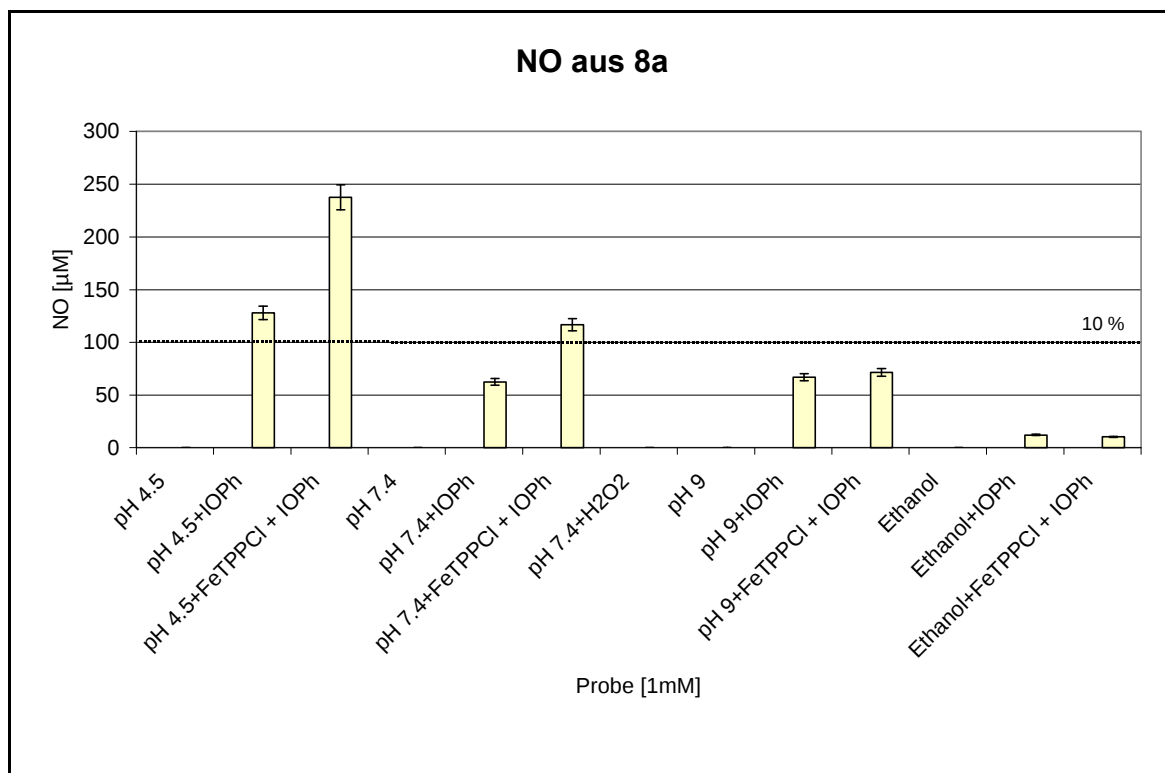
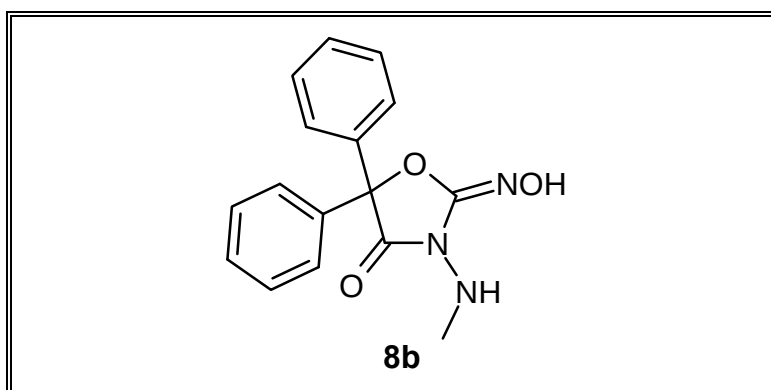


Abbildung 4-11 Vergleich der NO-Freisetzung aus **8a** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

5,5-Diphenyl-2-hydroxyimino-3-methylamino-oxazolidin-4-on (**8b**)



Formel 4-6

Weder eine spontane noch eine Metallkomplex vermittelte NO-Freisetzung waren festzustellen (Abbildung 4-12). Erst die Anwesenheit der Sauerstoffquelle erbrachte die angestrebten Ergebnisse. Die höchste Freisetzung wurde mit 7,4 % NO wieder im

Sauren erzielt. Im Alkalischen sanken die Werte auf 4,4 % NO. Die Unterschiede zwischen den einzelnen pH-Werten waren nicht so deutlich wie in den vorangehenden Freisetzungsversuchen. Der Zusatz des FeTPPCL-Komplexes vermochte in Gegenwart von Iodosobenzol die Freisetzungsrates weiter zu steigern. Die NO-Abgabe in Ethanol war mit 4,0 % im Verhältnis zu der NO-Bildung in Pufferlösungen relativ hoch.

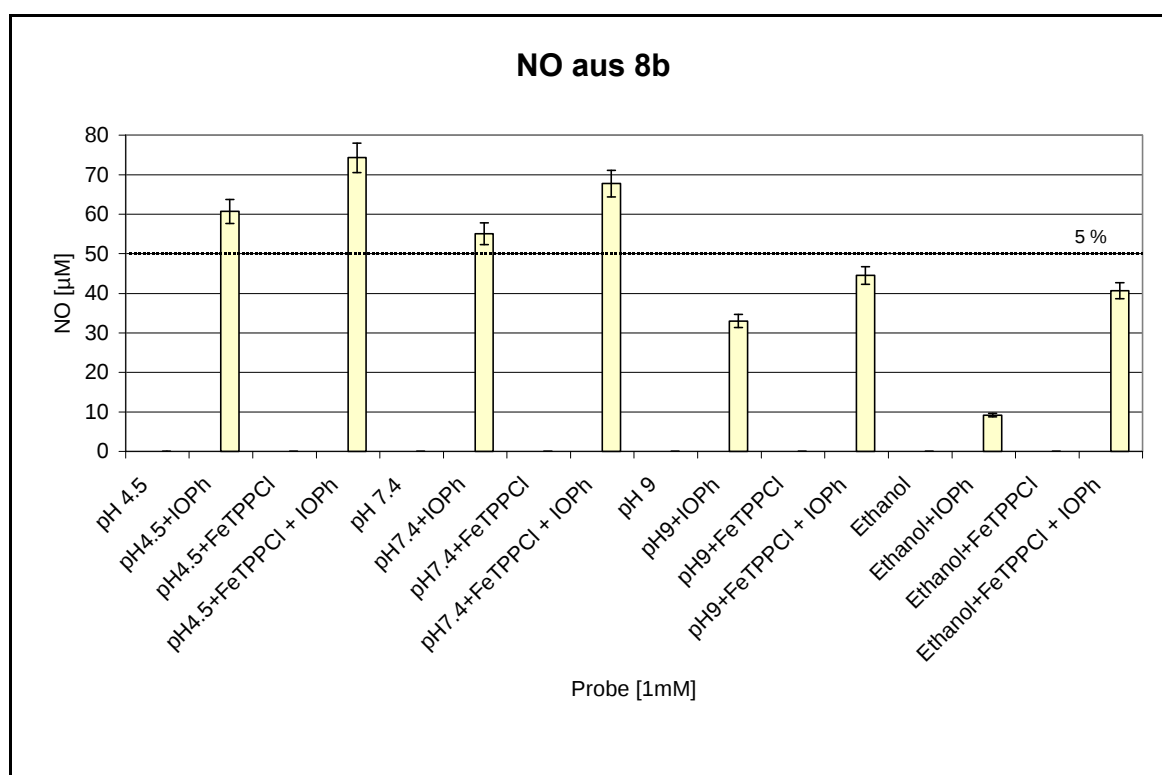
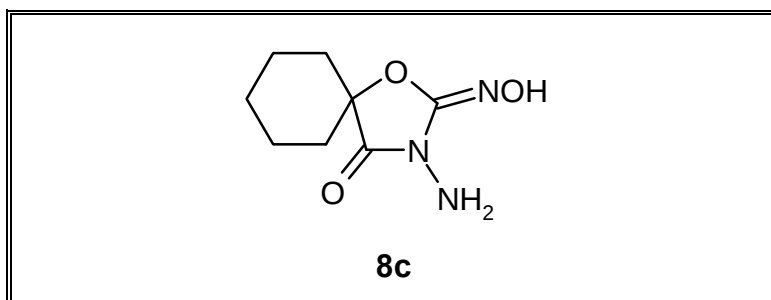


Abbildung 4-12 Vergleich der NO-Freisetzung aus **8b** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

3-Amino-5-cyclohexyl-2-hydroxyimino-oxazolidin-4-on (**8c**)**Formel 4-7**

Die Substanz zeigte eine NO-Freisetzung analog der Messungen von **8a** und **8b** erst unter oxidativen Bedingungen (Abbildung 4-13). Mit 3,92 % wurden die höchsten Werte im sauren, mit 1,83 % die niedrigsten im basischen Milieu gemessen. Durch den Zusatz des FeTPPCI-Komplexes war das Analysenergebnis bei pH 4.5 und 7.4 geringfügig zu steigern. In Ethanol konnte trotz Gegenwart des Oxygenierungssystems keine NO-Bildung detektiert werden.

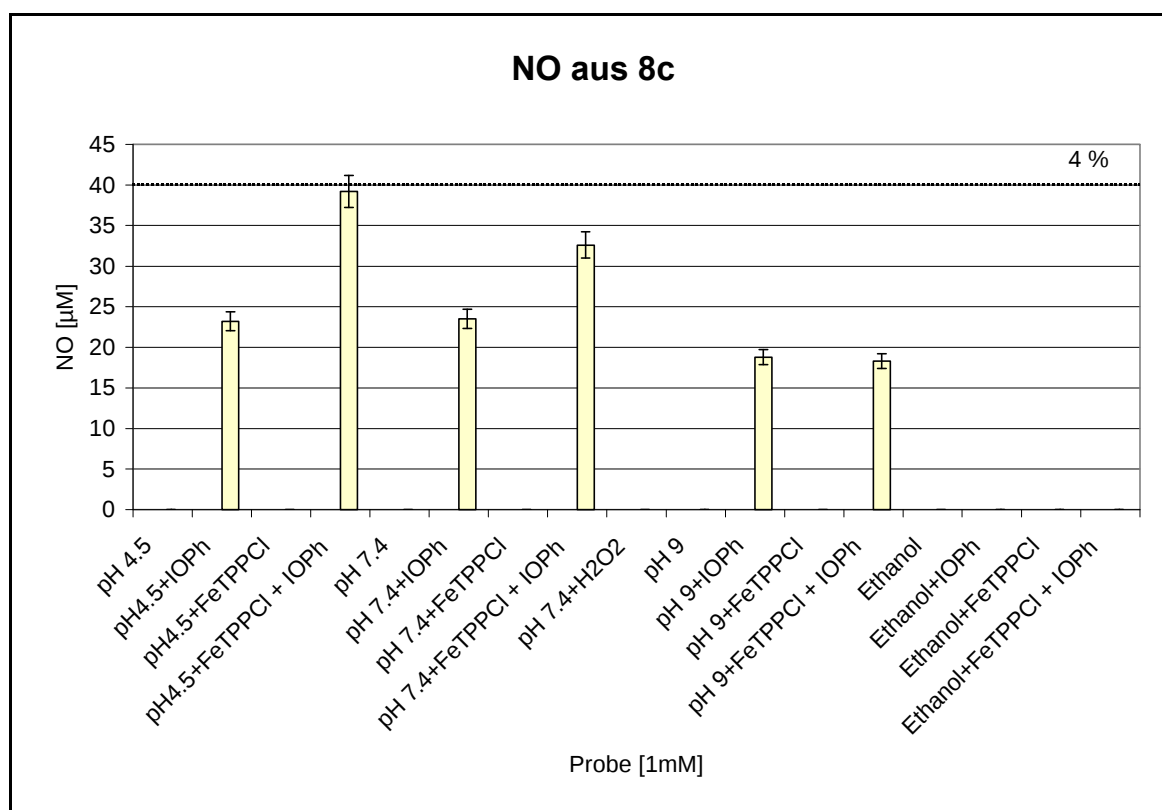


Abbildung 4-13 Vergleich der NO-Freisetzung aus **8c** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Ein Austausch des Komplexsystems erbrachte keine Verbesserung der Untersuchungsergebnisse (Abbildung 4-14). Die besten Werte wurden weiterhin mit dem FeTPPCI / IOPh-System erzielt. Wurde H_2O_2 als Sauerstoffquelle eingesetzt, erfolgte überhaupt keine NO-Bildung.

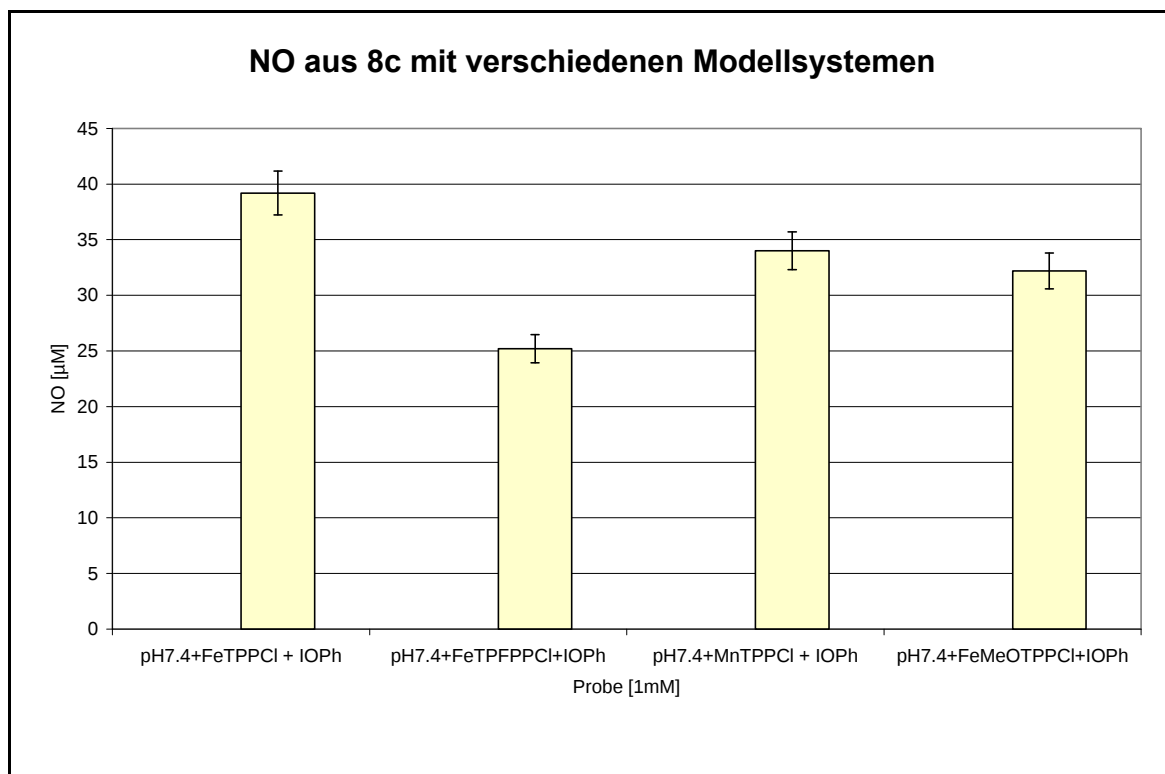
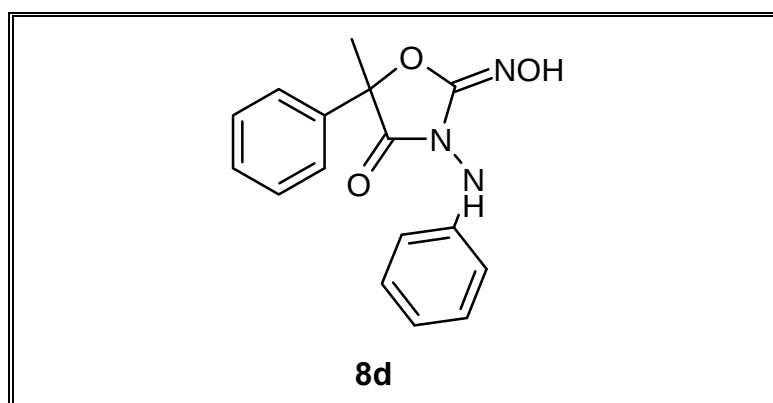


Abbildung 4-14 Vergleich der NO-Freisetzung aus **8c** unter dem Einfluß verschiedener Oxygenierungssysteme bei 37°C, $n = 5$

2-Hydroxyimino-5-methyl-5-phenyl-3-phenylamino-oxazolidin-4-on
(8d)



Formel 4-8

Ohne Zusätze und nur in Gegenwart des FeTPPCI-Komplexes entstand kein NO (Abbildung 4-15). Erst in Anwesenheit von Iodosobenzol war eine NO-Abgabe detektierbar. Die beste Freisetzung erfolgte im Säuren mit Werten von 6,33 %. Durch Verwendung des Systems FeTPPCI / IOPh war die NO-Freisetzung vor allem im alkalischen Milieu deutlich zu steigern. In ethanolischer Lösung wurde unter keinen Bedingungen eine NO-Abgabe gemessen. Der Austausch des Sauerstoffdonators gegen H_2O_2 brachte die NO-Freigabe zum Erliegen.

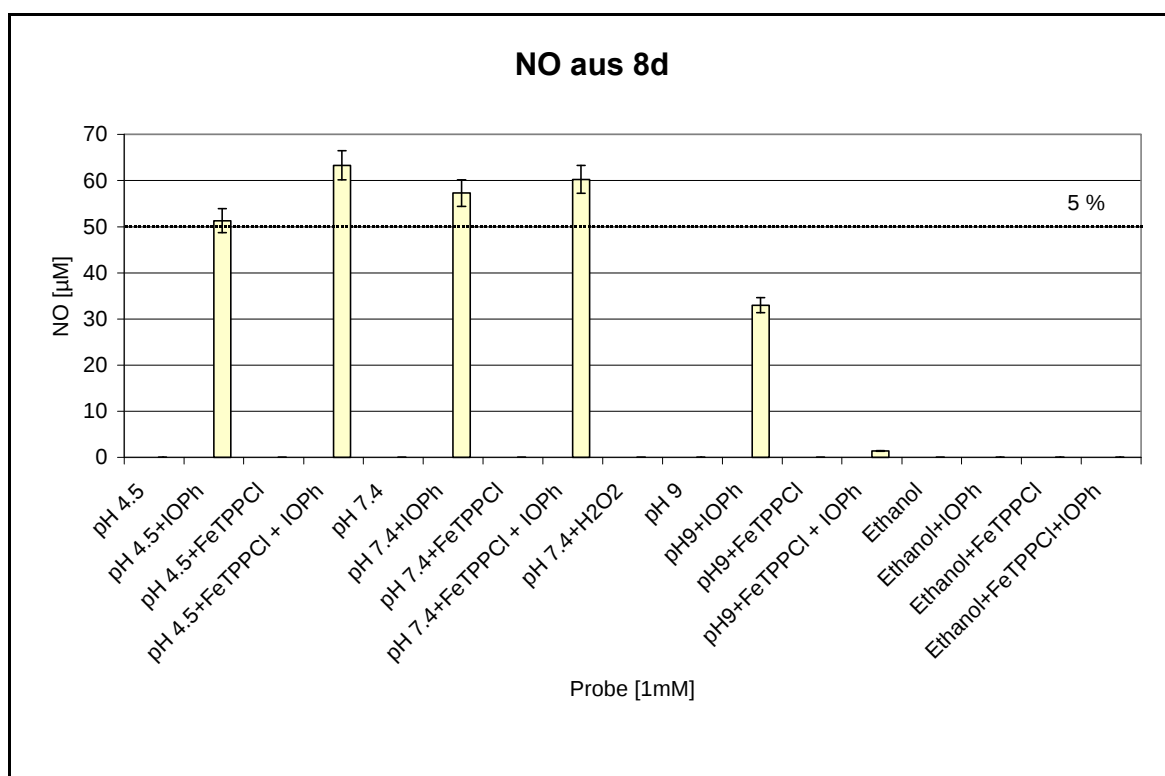


Abbildung 4-15 Vergleich der NO-Freisetzung aus **8d** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Betrachtet man die gemessenen NO-Werte nach Nitritreduktion (Abbildung 4-16), so war bei den pH-Werten das meiste Nitrit entstanden, bei denen auch die NO-Freisetzung am größten war. In Gegenwart von FeTPPCI und IOPh stieg analog der NO-Bildung im Vergleich zu den Werten nur in Anwesenheit des Sauerstoffdonators ebenso der Nitritgehalt.

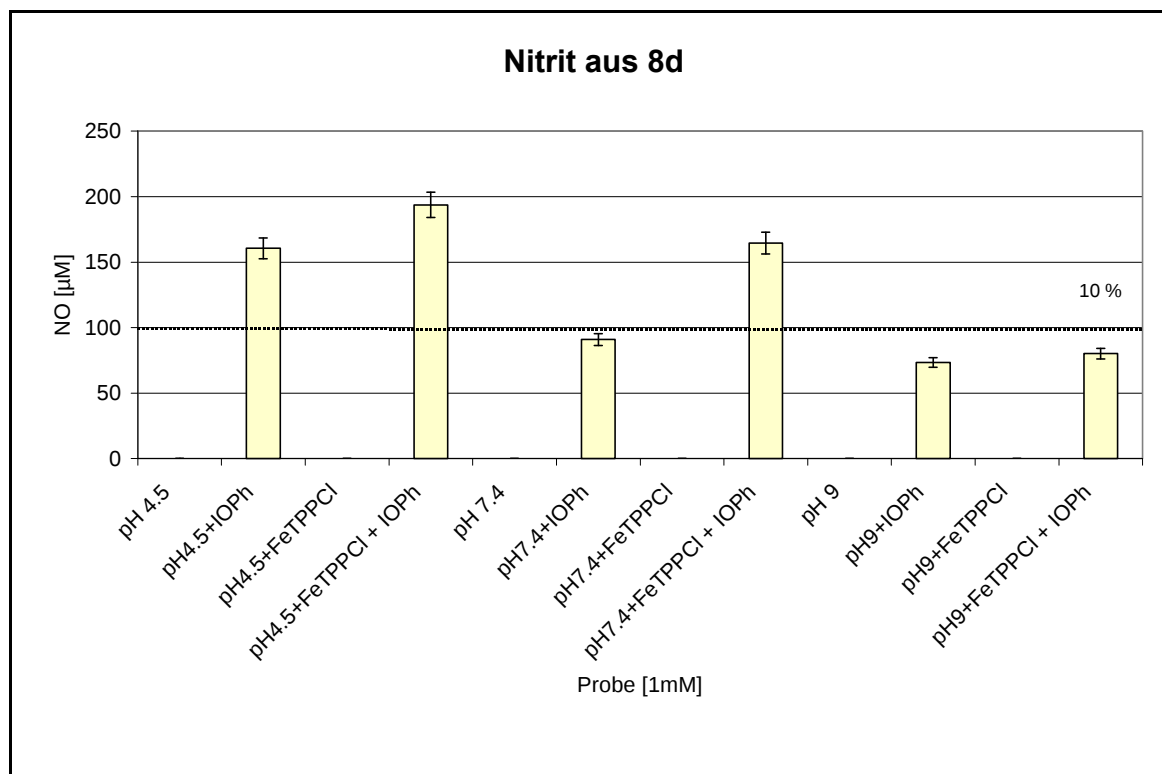


Abbildung 4-16 Vergleich der Nitrit-Freisetzung aus **8d** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Nitrat entstand mit 40 % vor allem im Säuren (Abbildung 4-17). Hier war eine deutliche Abhängigkeit von der Anwesenheit des Metallkomplexes zu erkennen. Die Nitratbildung nur in Gegenwart des Sauerstoffdonators war erheblich niedriger und bei pH 7.4 nur noch in Gegenwart des Eisenkomplexes und Iodosobenzol feststellbar.

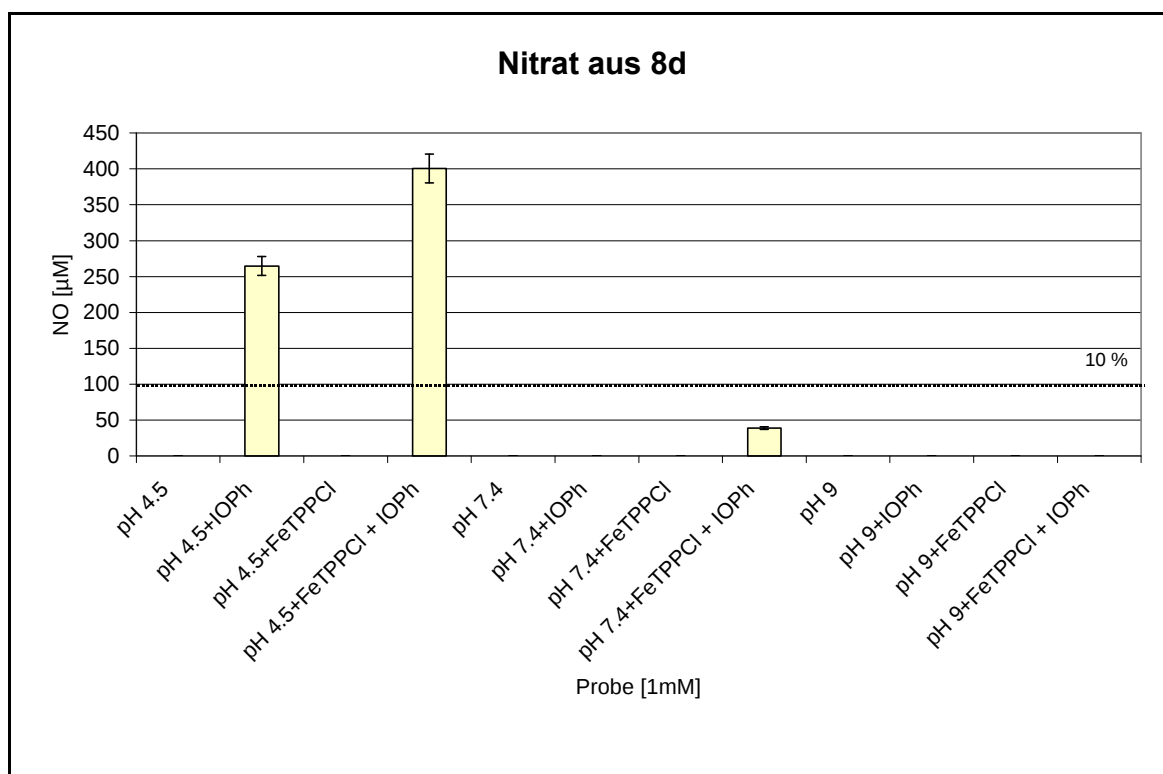
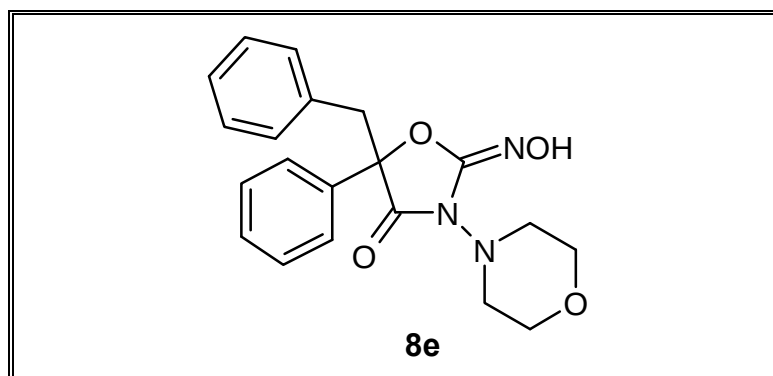


Abbildung 4-17 Vergleich der Nitrat-Freisetzung aus **8d** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

5-Benzyl-2-hydroxyimino-3-morpholino-5-phenyl-oxazolidin-4-on
(8e)



Formel 4-9

Eine NO-Freisetzung ohne Zusätze erfolgte in Analogie zu den anderen Vertretern der N-Hydroxyisoharnstoffe nicht (Abbildung 4-18). Überraschend hohe Werte wurden mit 37 % NO unter oxidativen Bedingungen bei pH 4.5 erhalten. Der Zusatz des Metallkomplexes konnte die NO-Freisetzung in Gegenwart von Iodosobenzol in allen gemessenen pH-Bereichen noch einmal deutlich steigern. NO-Freisetzung aus ethanolischer Lösung war nicht festzustellen.

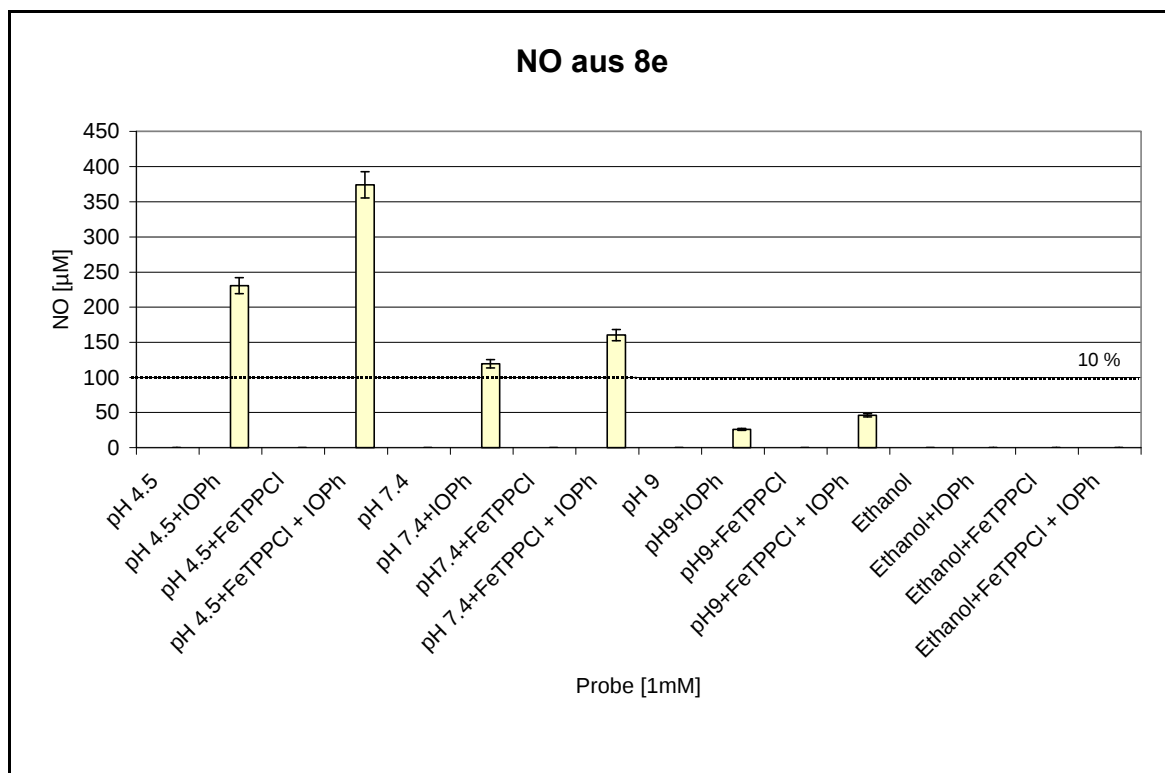
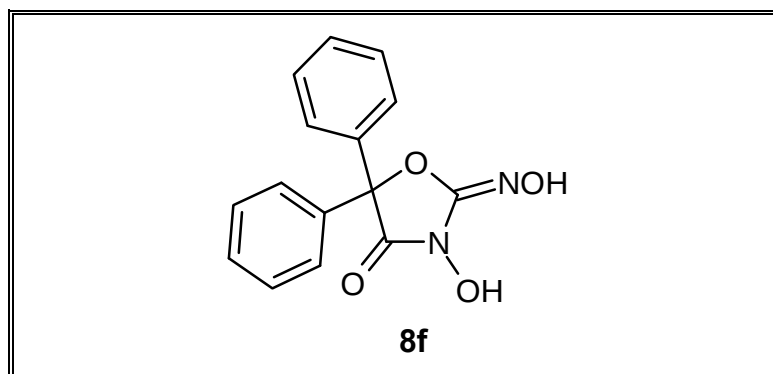


Abbildung 4-18 Vergleich der NO-Freisetzung aus **8e** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

5,5-Diphenyl-3-hydroxy-2-hydroxyimino-oxazolidin-4-on (**8f**)**Formel 4-10**

Nur in Pufferlösung gelöst setzte **8f** kein NO frei und auch der Zusatz von FeTPPCI reichte nicht aus (Abbildung 4-19). Erst in Anwesenheit von Iodosobenzol war NO detektierbar, wobei hohe Werte mit 17, 3% bei pH 4.5 erreicht wurden. Die Verwendung des FeTPPCI / IOPh-Systems konnte die NO-Syntheserate gegenüber Iodosobenzol noch einmal leicht steigern. **8f** erbrachte im Vergleich zu den weiteren pH-Werten sehr hohe NO-Beträge im Säuren. Möglicherweise entstammen sie dem zweiten hydroxylierten Stickstoff des Heterozyklus. In Ethanol war generell keine NO-Freisetzung detektierbar.

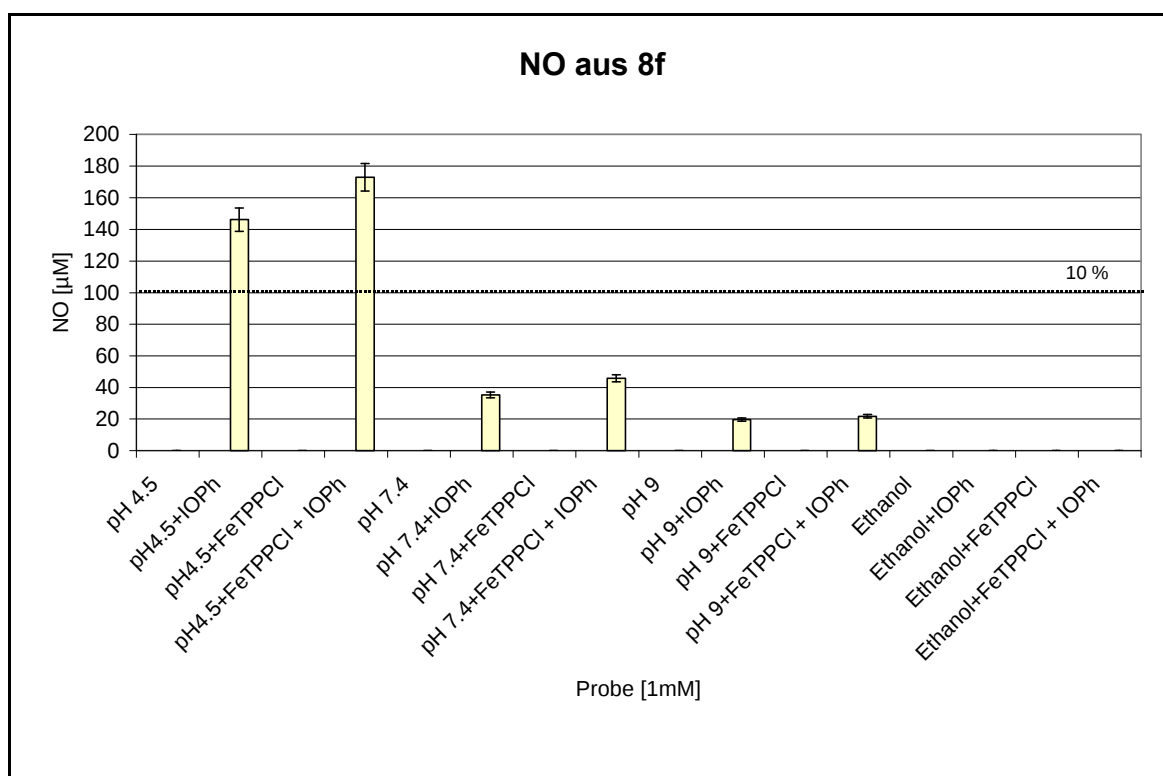


Abbildung 4-19 Vergleich der NO-Freisetzung aus **8f** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Betrachtet man die NO-Konzentration nach Nitritreduktion (Abbildung 4-20), dann fiel auf, daß die höchsten Werte mit 69,8 % NO analog der NO-Freisetzung im Sauren gemessen wurden. Die Ausbeute stieg bei allen drei pH-Werten mit dem Zusatz des Eisenkomplexes zum Iodosobenzol.

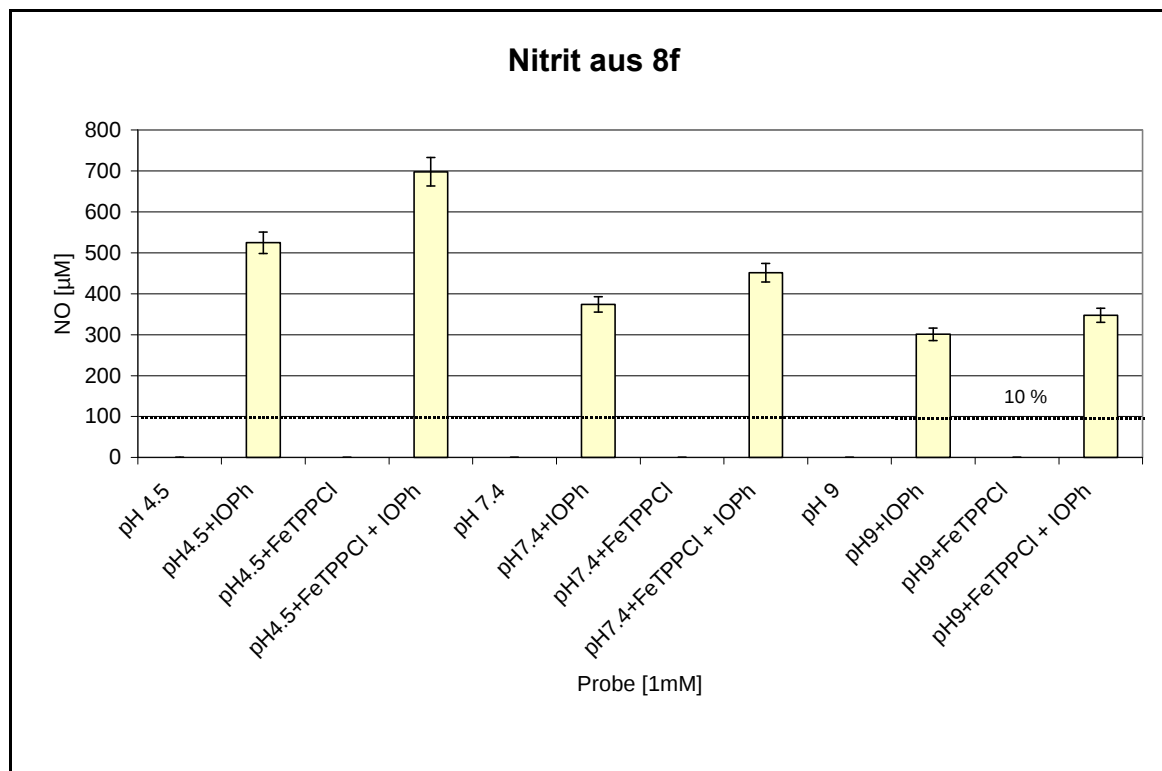


Abbildung 4-20 Vergleich der Nitrit-Freisetzung aus **8f** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Nitrat entstand mit 42 % unter oxidativen Bedingungen nur im Sauren (Abbildung 4-21), wobei die Anwesenheit des Komplexes die Konzentration deutlich erhöhte.

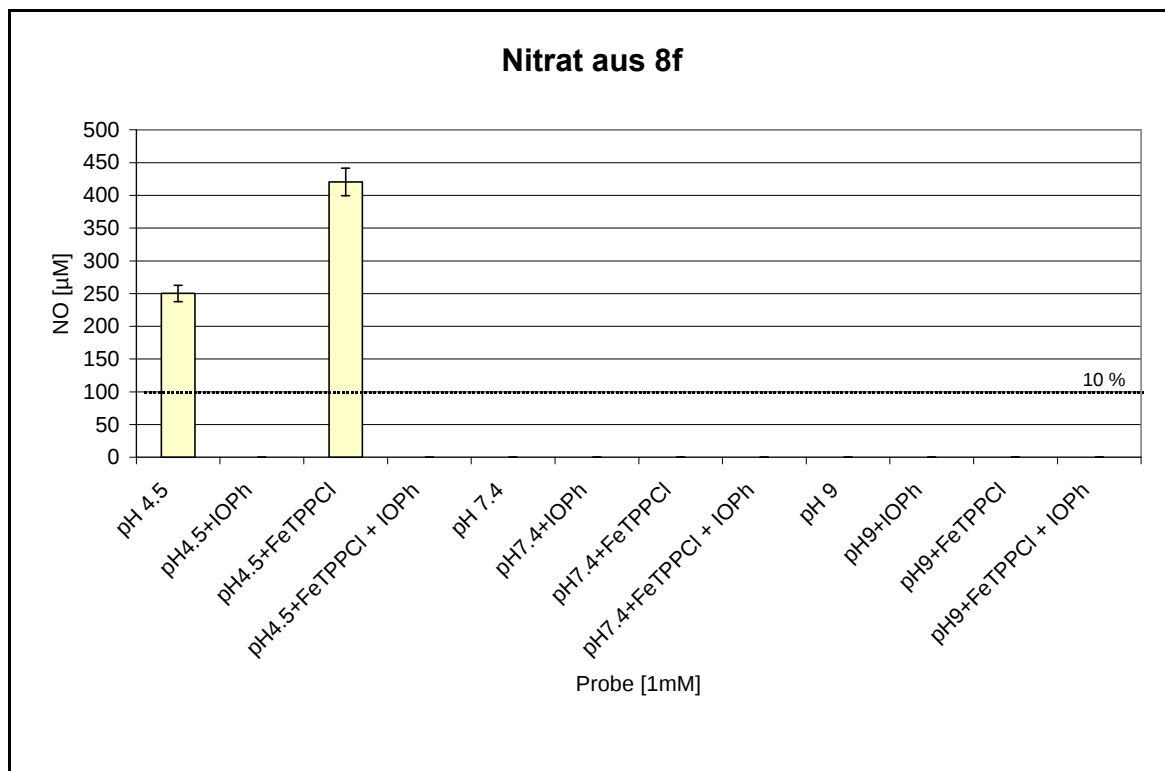
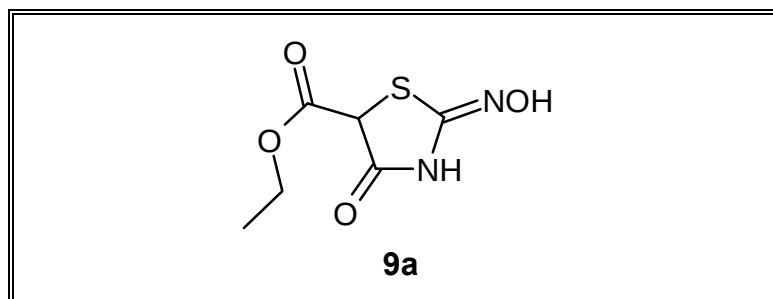


Abbildung 4-21 Vergleich der Nitrat-Freisetzung aus **8f** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

4.2.4 N-Hydroxyisothioharnstoffe

4.2.4.1 2-Hydroxyimino-thiazolidin-4-one

Ethyl 2-hydroxyimino-4-oxo-thiazolidin-5-carboxylat (**9a**)



Formel 4-11

Ohne Zusätze und nur in Gegenwart des Modellkomplexes auftretende NO-Abgabe war nicht nachzuweisen. In Gegenwart von Iodosobenzol / FeTPPCI wurden mit 16,86 % die höchsten NO-Syntheseraten bei einem pH-Wert von 4.5 erzielt. Die Ausbeute im Basischen betrug noch 8,37 % NO. Sogar aus ethanolischer Lösung konnten mit 7,55 % beachtliche Mengen an NO oxidativ freigesetzt werden. Der Zusatz des Eisenkomplexes zum Iodosobenzol führte zu einer weiteren Steigerung der Ergebnisse. Nach Austausch der Sauerstoffquelle konnte kein NO mehr gemessen werden (Abbildung 4-22).

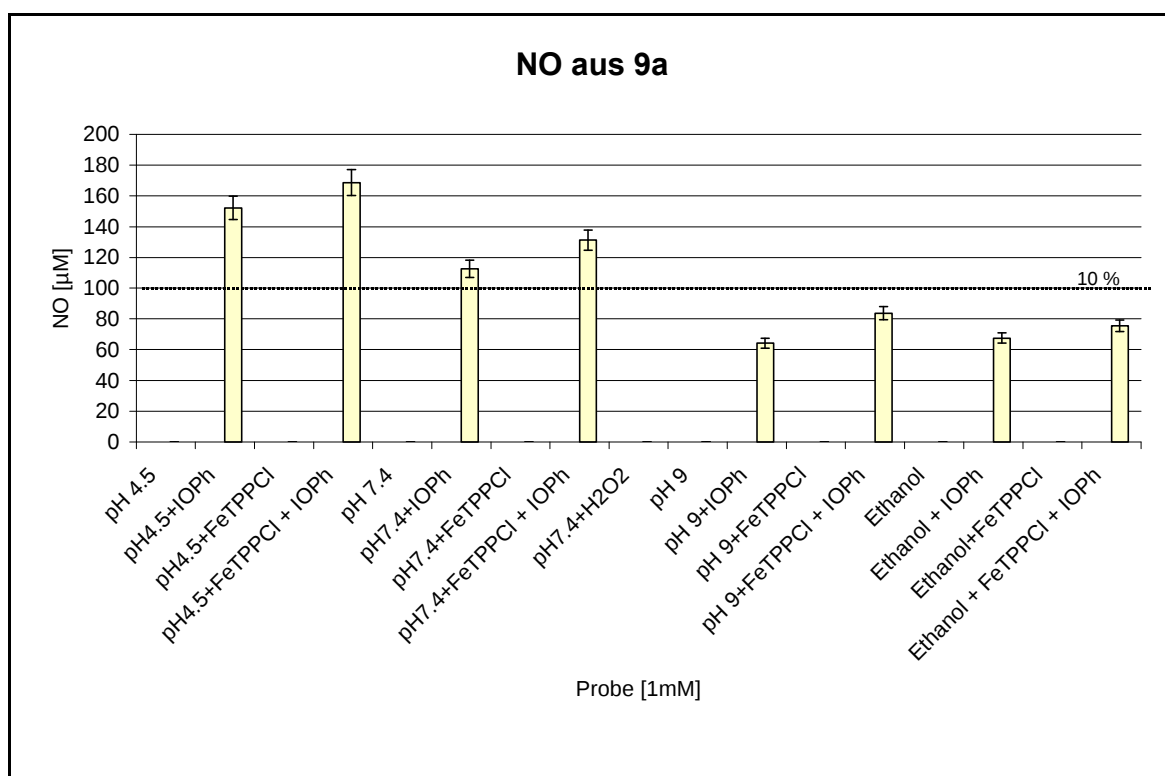


Abbildung 4-22 Vergleich der NO-Freisetzung aus **9a** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Ebenso konnte der Wechsel auf ein anderes Komplexsystem die Werte nicht verbessern (Abbildung 4-23).

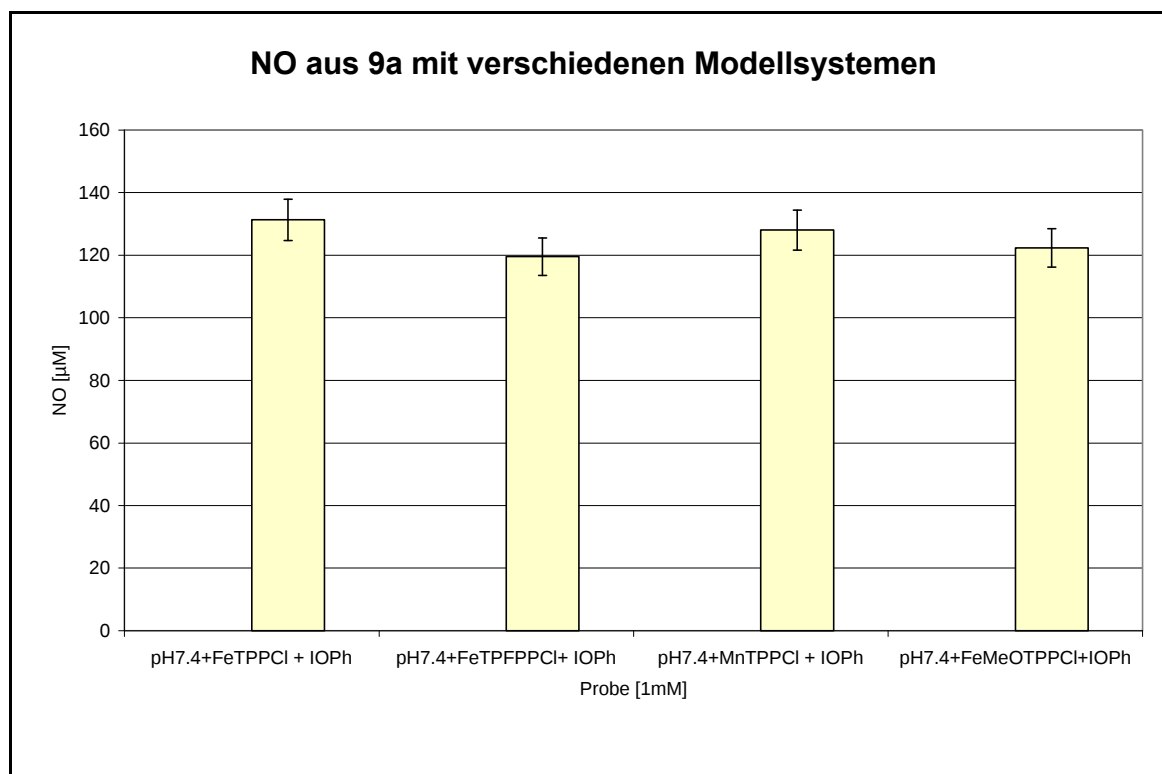


Abbildung 4-23 Vergleich der NO-Freisetzung aus **9a** unter dem Einfluß verschiedener Oxygenierungssysteme bei 37°C, $n = 5$

Die Nitritbildung war analog der NO-Bildung im sauren pH-Bereich am größten (54,2 %). Durch Zugabe des Komplexes konnten in allen verwendeten Lösungsmitteln höhere Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 4-24).

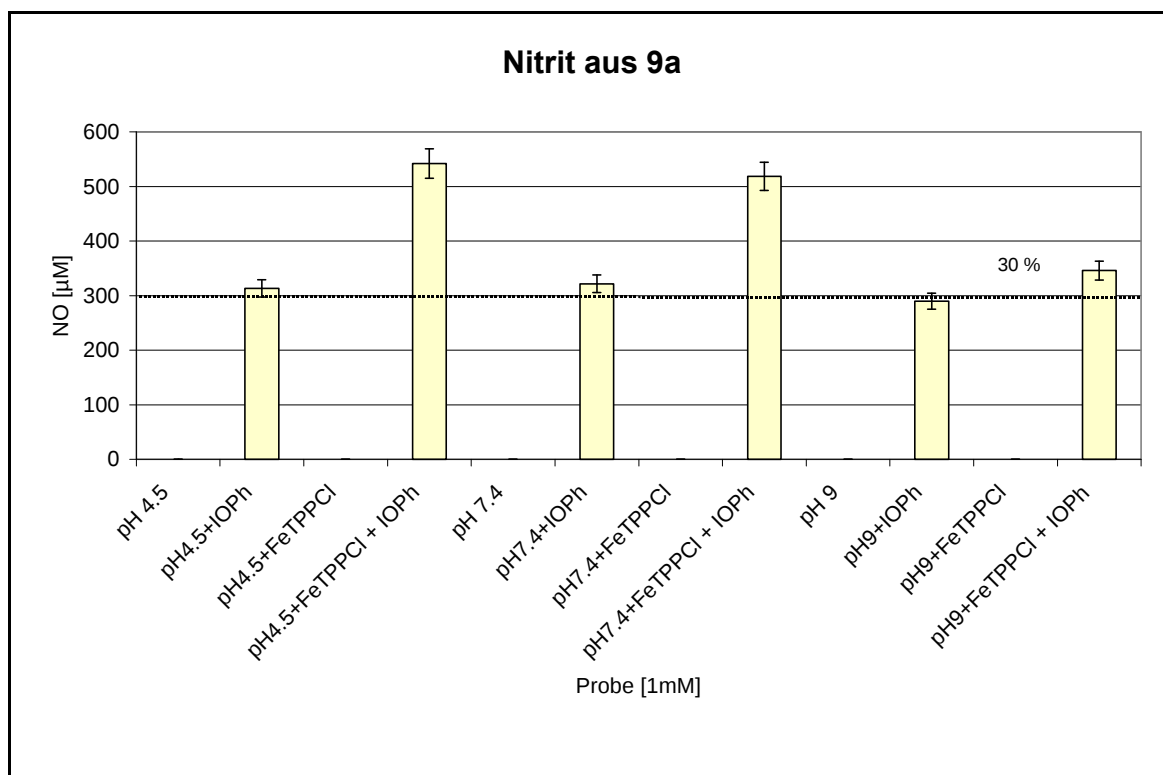


Abbildung 4-24 Vergleich der Nitrit-Freisetzung aus **9a** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Nitrat wurde mit 8,4 % in Gegenwart des Oxygenierungssystems nur für den sauren pH-Wert gefunden (Abbildung 4-25).

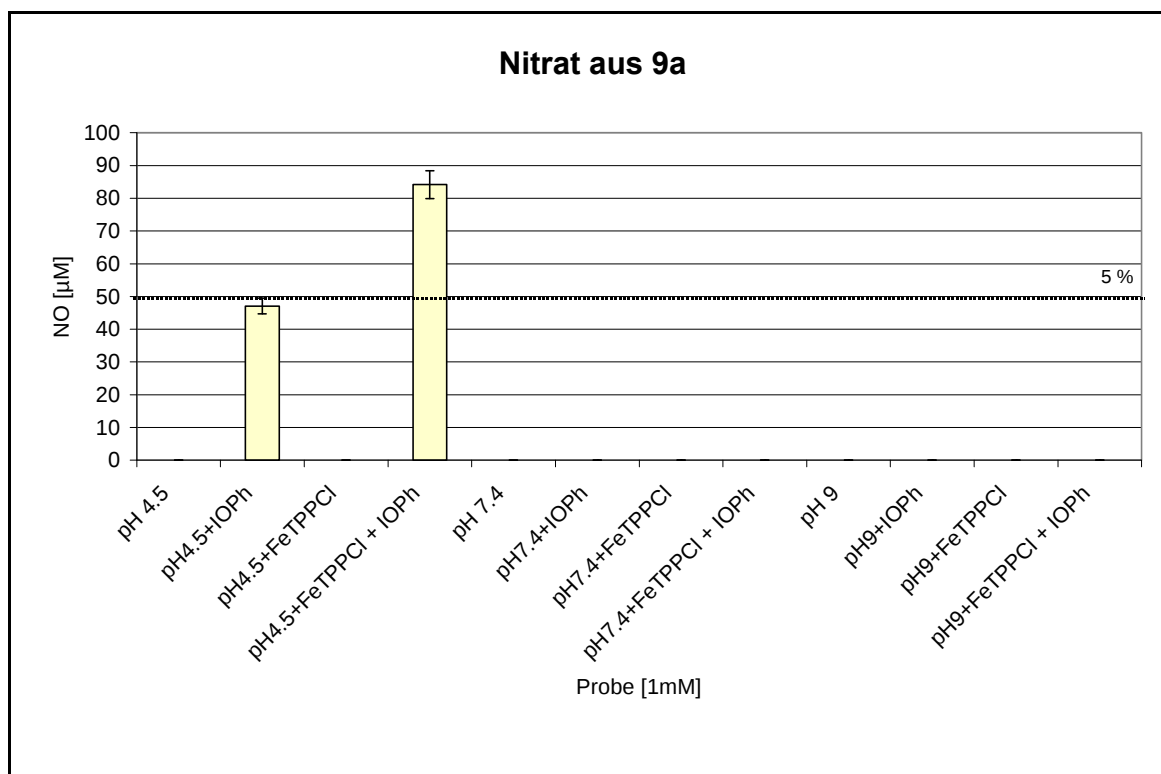
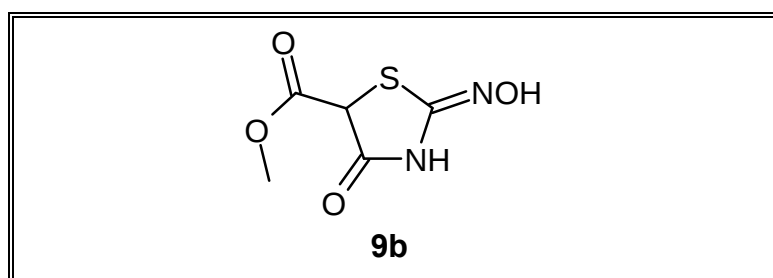


Abbildung 4-25 Vergleich der Nitrat-Freisetzung aus **9a** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Methyl 2-hydroxyimino-4-oxo-thiazolidin-5-carboxylat (**9b**)



Formel 4-12

Dabei konnte NO erst unter oxidativen Bedingungen detektiert werden (Abbildung 4-26). Im Sauren wurden mit 23 % NO die höchsten Werte erzielt und bei pH 9 mit 16,22 % die niedrigsten.

Der Zusatz des Eisenkomplexes zur Sauerstoffquelle verbesserte das Ergebnis. Der Austausch des Sauerstoffdonators blieb auch hier ohne Erfolg. In Ethanol konnte ebenfalls eine oxidative NO-Freisetzung von 6,8 % nachgewiesen werden.

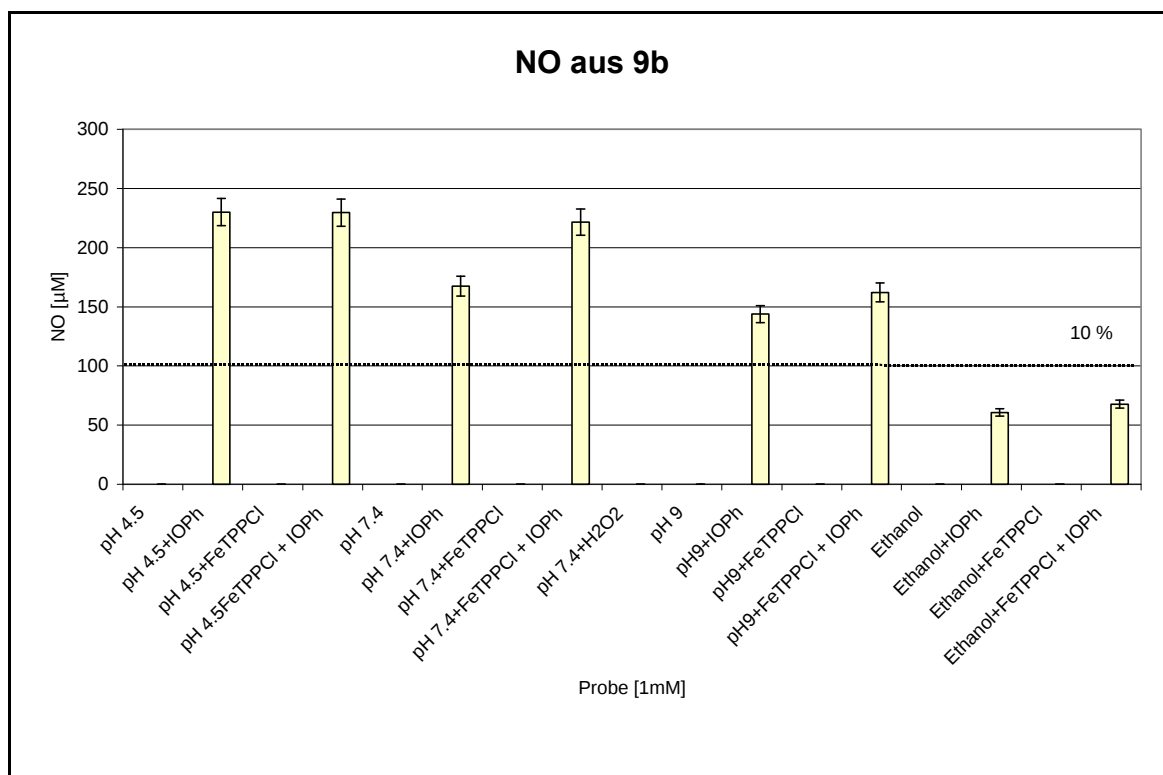
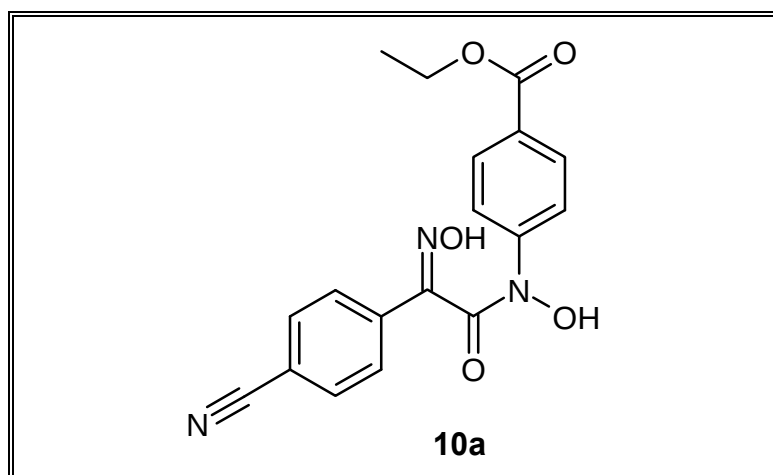


Abbildung 4-26 Vergleich der NO-Freisetzung aus **9b** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

4.2.5 Hydroxamsäuren

4.2.5.1 α -Hydroxyiminohydroxamsäuren

2-(4-Cyanophenyl)-N-(4-ethoxycarbonylphenyl)-2-hydroxyimino-acetohydroxamsäure (**10a**)



Formel 4-13

Eine NO-Freisetzung ohne Kofaktoren erfolgte in keinem der vermessenen Lösungsmittel. Auch der Zusatz des Eisenkomplexes konnte dieses nicht bewirken. Deutlich war zu erkennen, daß mit 4,38 % auch eine oxidative NO-Freisetzung aus ethanolischer Lösung stattfand. Die NO-Bildung war im neutralen Bereich mit 1,8 % sehr niedrig. Bei pH 4.5 wurden mit 10,2 % die höchsten Werte erreicht. Der Zusatz des Metallkomplexes (FeTPPCI) wirkte sich vor allem dort steigernd auf das Reaktionsergebnis aus.

Bei pH 9 sank die NO-Konzentration auf 1 % ab. Ein Austausch der Sauerstoffquelle Iodosobenzol gegen H_2O_2 führte zum Erliegen der NO-Bildung (Abbildung 4-27).

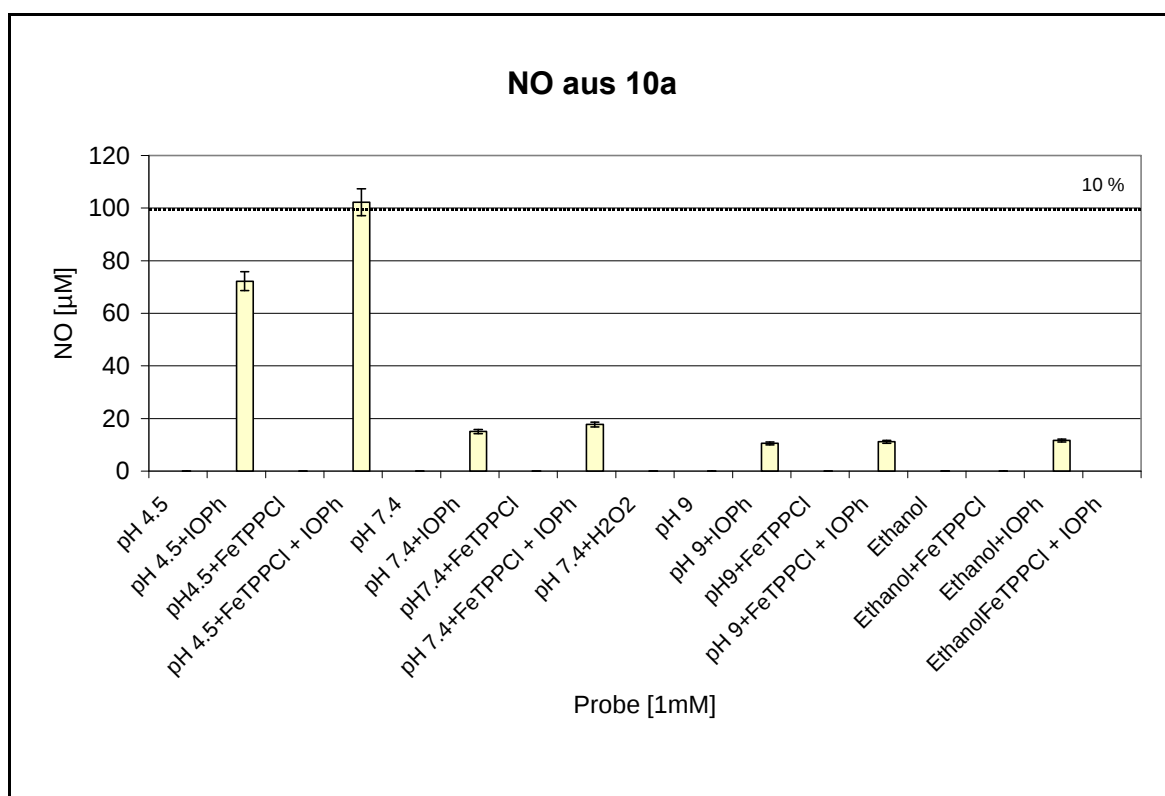
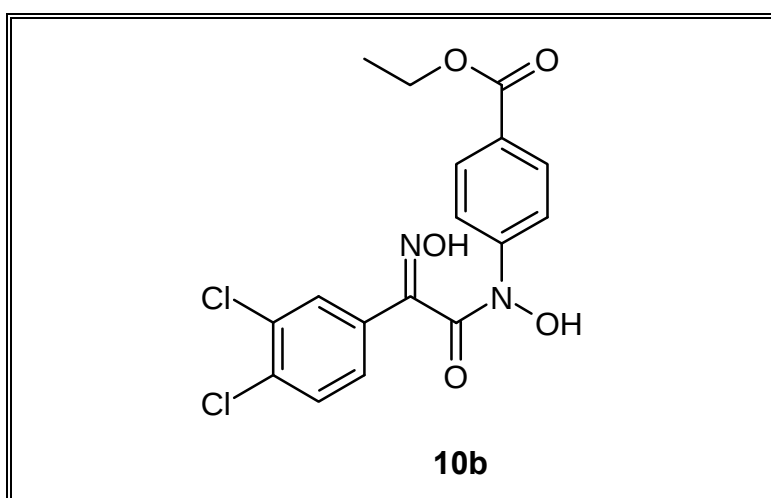


Abbildung 4-27 Vergleich der NO-Freisetzung aus **10a** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

2-(3,4-Dichlorphenyl)-N-(4-ethoxycarbonylphenyl)-2-hydroxyimino-acetohydroxamsäure (**10b**)



Formel 4-14

Spontan war in Übereinstimmung mit **10a** kein NO zu messen. Erst unter oxidativen Bedingungen war eine Abgabe feststellbar, die in saurem Milieu mit 13,2 % zu den höchsten Beträgen führte. Auffällig war auch hier die gute Freisetzung aus ethanolischen Lösungen von 6,2 %. Die Freisetzung aus alkalischer Lösung erbrachte mit 4,2 % die schlechtesten Ergebnisse. Bei einem pH-Wert von 7.4 wurden 10 % NO erreicht. Lediglich bei pH 7.4 vermochte der FeTPPCL-Komplex in Gegenwart von Iodosobenzol, die Ausbeute deutlich zu steigern (Abbildung 4-28).

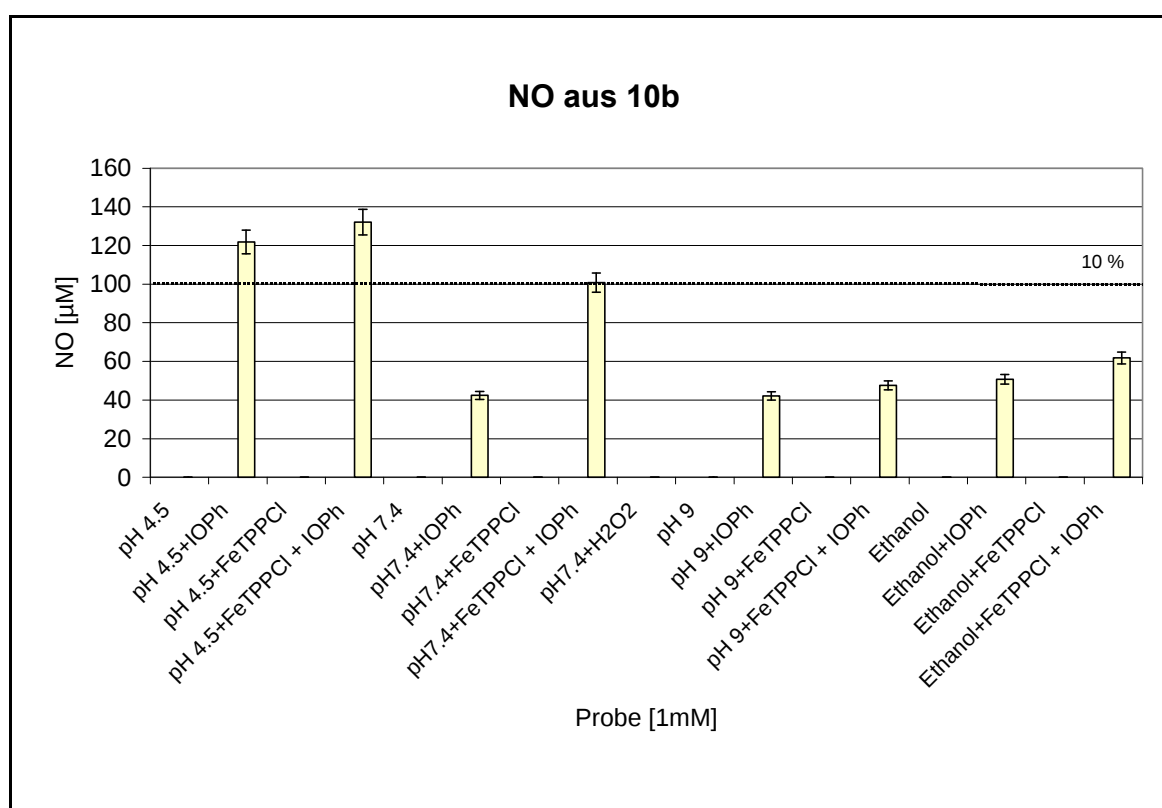


Abbildung 4-28 Vergleich der NO-Freisetzung aus **10b** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Nitrit entstand mit 40 % am meisten dort, wo auch die größte Menge NO entstanden war, im sauren Bereich bei pH 4.5. Im Alkalischen wurden mit 12 % die niedrigsten Werte erhalten. Der Komplex in Gegenwart von Iodosobenzol wirkte sich ebenfalls steigernd auf das Analysenergebnis aus (Abbildung 4-29).

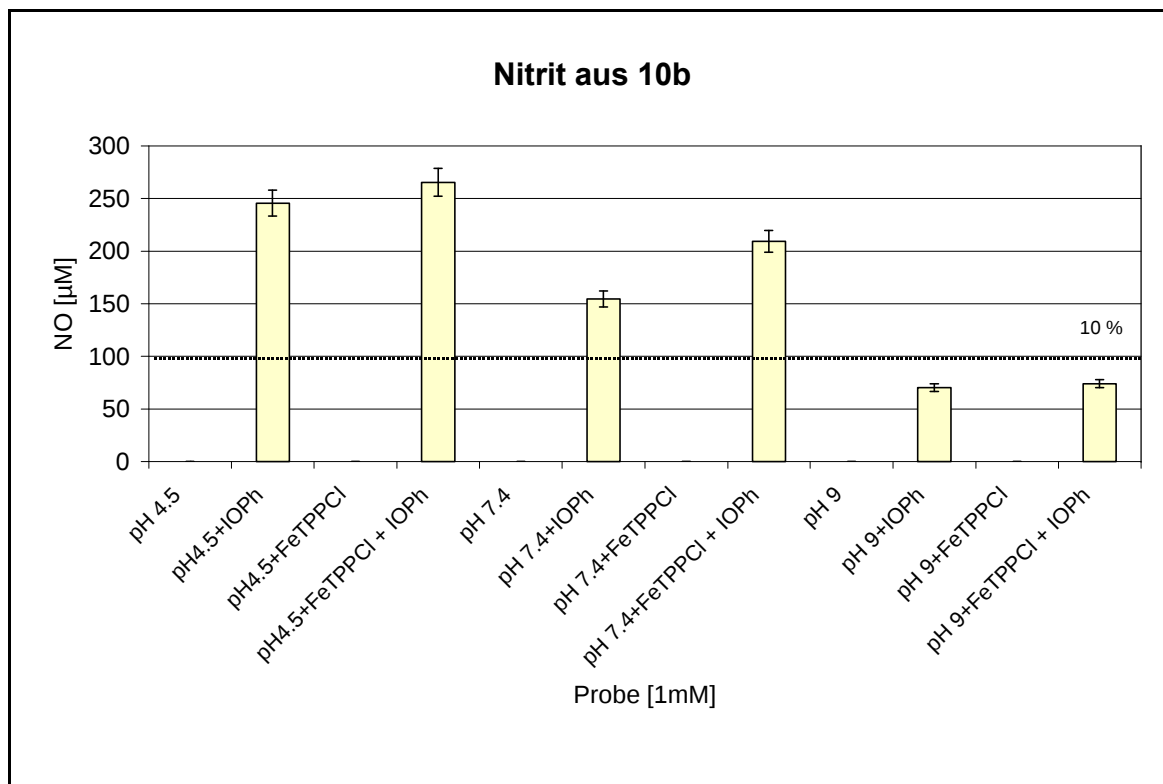


Abbildung 4-29 Vergleich der Nitrit-Freisetzung aus **10b** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Nitrat entstand mit 47 % vor allem im Sauren. Für die beiden anderen pH-Werte war wieder deutlich die Abhängigkeit der Nitrat-entstehung vom Zusatz des Eisenkomplexes zu erkennen (Abbildung 4-30).

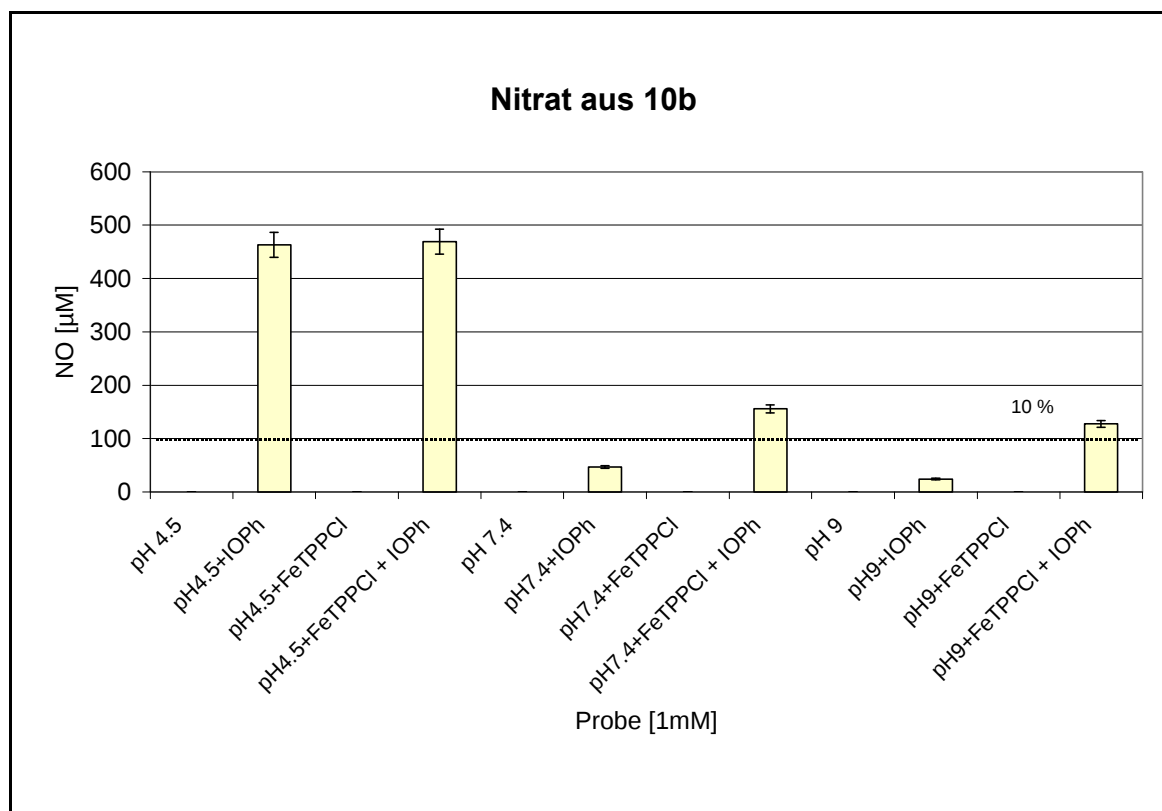


Abbildung 4-30 Vergleich der Nitrat-Freisetzung aus **10b** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Im Gegensatz zu FK 409, das vor allem im Alkalischen spontan NO freisetzt, wurden für die α -Hydroxyiminohydroxamsäuren die höchsten Werte im Sauren erzielt, so daß für sie ein abweichender Freisetzungsmechanismus angenommen werden mußte.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Die höchsten NO-Konzentrationen wurden einheitlich für alle Hydroxyiminoverbindungen unter oxidativen Bedingungen bei pH 4.5 gefunden. Der Zusatz des Eisenkomplexes zum Iodosobenzol wirkte sich generell steigend auf das Reaktionsergebnis aus. Mit einem Wechsel auf ein anderes Komplexsystem konnte keine Verbesserung erzielt werden. Der Austausch von Iodosobenzol gegen H_2O_2 erbrachte für keine der Substanzen ein positives Ergebnis. Offensichtlich ist für die oxidative NO-Freisetzung der aus Eisenkomplex und Iodosobenzol gebildete Fe(V)=O -Komplex verantwortlich und nicht das durch H_2O_2 mit den Modellkomplexen vorwiegend gebildete Fe(II)-O_2 ¹⁴⁷.

Am leistungsfähigsten waren die Amidoxime (**7**), gefolgt von den N-Hydroxyisothioharnstoffen (**9**) und N-Hydroxyisoharnstoffen (**8**). Aus den α -Hydroxyiminohydroxamsäuren (**10**) dagegen konnten nur geringere NO-Mengen freigesetzt werden. Abbildung 4-31 faßt die NO-Freisetzung aus dem jeweiligen besten Vertreter der einzelnen Substanzklassen zusammen.

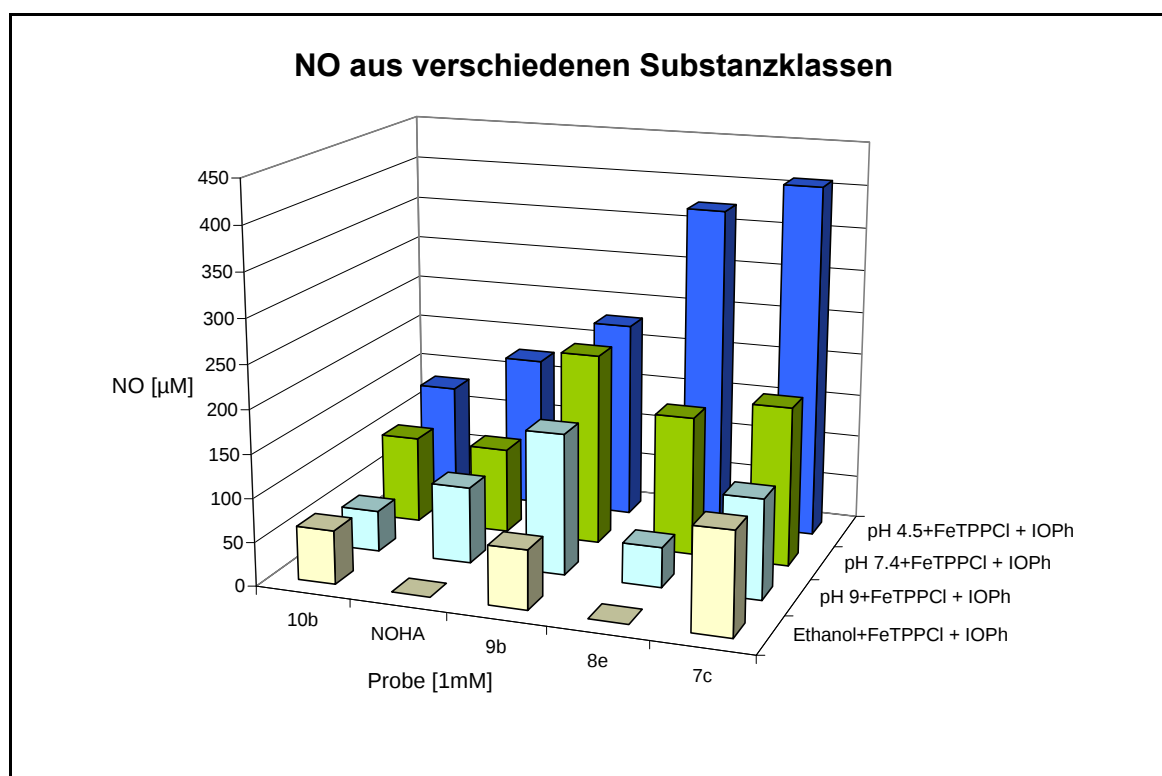
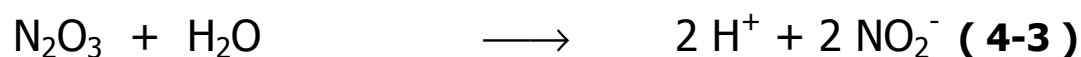
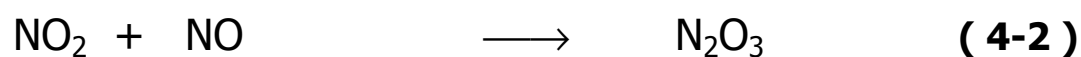
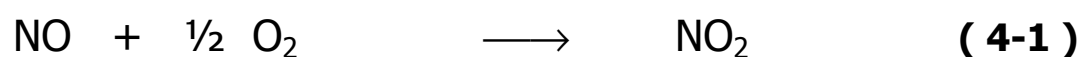


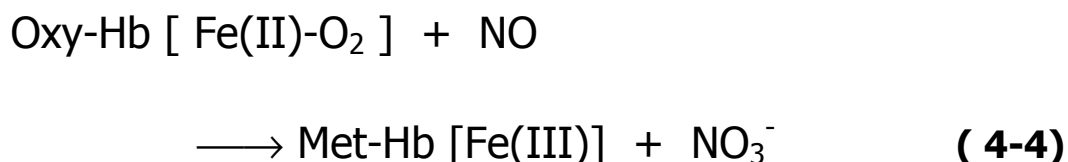
Abbildung 4-31 Vergleich der NO-Freisetzung aus verschiedenen Substanzklassen unter dem Einfluß des Oxygenierungssystems FeTPPCI / IOPh und verschiedener pH-Werte bei 37°C, $n = 5$

In Übereinstimmung mit der NO-Bildung zeigten die für Nitrit durchgeführten Messungen die gleiche pH-abhängige Charakteristik. Nitrit stellt das Folgeprodukt von NO in aeroben wässrigen Lösungen dar.



Daß darüber hinaus Nitrit direkt oxidativ aus den Substanzen freigesetzt wird, kann nicht ausgeschlossen werden.

Die höchsten Resultate für Nitrat wurden wiederum im Säuren und in Anwesenheit des Oxygenierungssystems erzielt. Physiologisch ist die Entstehung von Nitrat aus NO aus der Reaktion mit Oxyhämoglobin bekannt.



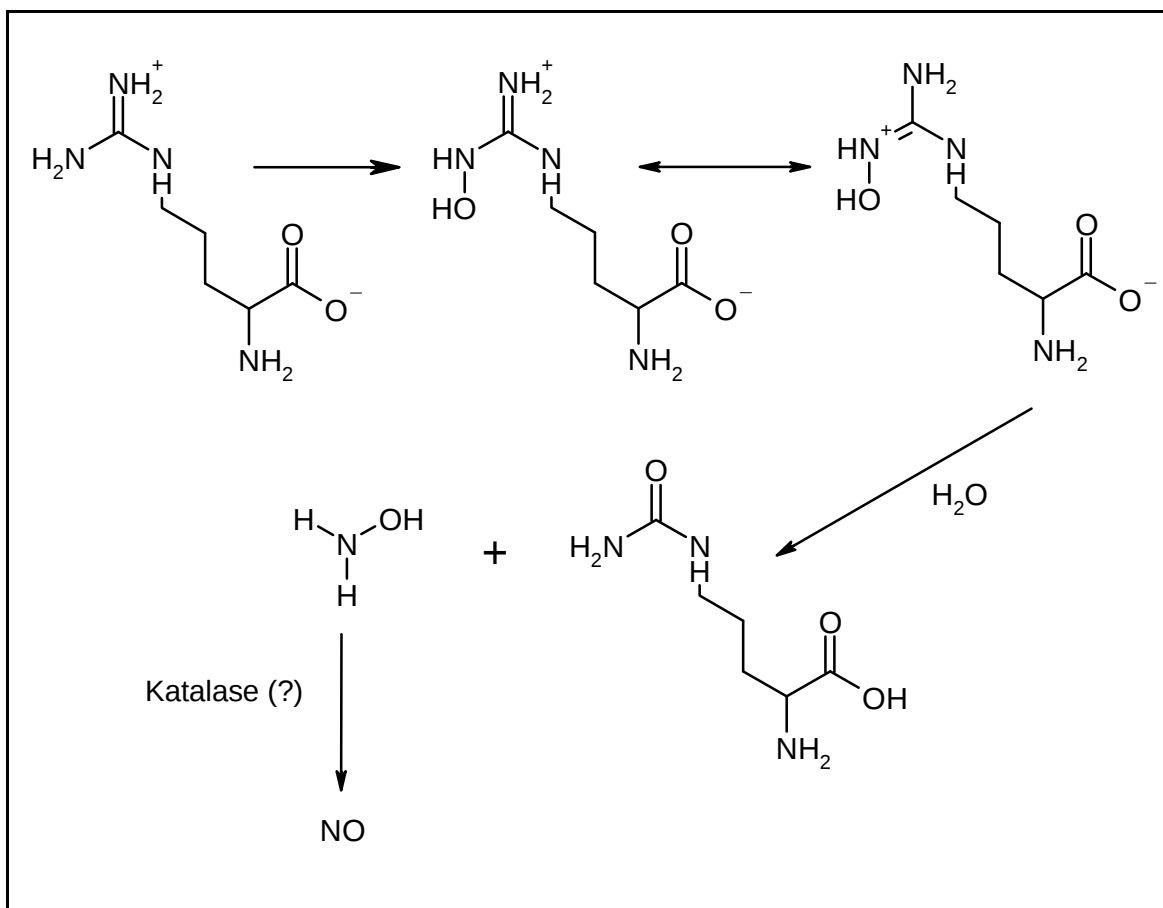
Ob Nitrat zusätzlich aus den Substanzen direkt oxidativ freigesetzt wird oder auch durch Weiteroxidation von Nitrit entsteht, ist nicht zu unterscheiden.

Die im Rahmen der Chemilumineszenzmessungen ermittelten Werte deuten auf einen für alle Substanzklassen gemeinsamen Freisetzungsmechanismus hin.

4.4 Der Freisetzungsmechanismus

Da die im ersten Teil dieser Arbeit untersuchten Verbindungen aus Hydroxylamin und einem Akzeptor aufgebaut sind, sollte zur Aufklärung des Freisetzungsmechanismus` zunächst der Frage nachgegangen werden, ob NO durch Oxidation aus intermediär gebildetem Hydroxylamin entstand.

Unter oxidativen Bedingungen bewiesen verschiedene Arbeitsgruppen die Bildung von NO aus Hydroxylamin^{148, 149, 150}). Der NO-Donor war vor allem in Gegenwart intakter Katalase aktiv¹⁵⁰). Bereits 1979 konnte eine Katalase vermittelte Aktivierung der sGC gezeigt werden. 1989 berichtete DeMaster über eine ebenfalls Katalase vermittelte Aktivierung von NO aus Hydroxylamin. Er hielt es für ein mögliches Intermediat der NO-Biosynthese, das aus der Hydrolyse von N^ω-Hydroxy-L-arginin entsteht und anschließend in einer 3 Elektronen-Oxidation zu NO oxidiert wird (Schema 4-17)¹⁵¹).



Schema 4-17 Hydroxylamin als mögliches Intermediat der NO-Biosynthese¹⁵¹⁾

Pou und Mitarbeiter fanden für N^ω-Hydroxy-L-arginin ein abweichendes Ergebnis, indem sie bewiesen, daß biosynthetisch gebildetes NO auch in Abwesenheit von Katalase in der Lage war, die sGC zu aktivieren¹⁵²⁾. Kwon hatte bereits 1990 gezeigt, daß das O-Atom der Harnstofffunktion des Citrullins dem Sauerstoff und nicht dem Wasser entstammt und damit ebenfalls gegen Hydroxylamin als Zwischenprodukt sprach²⁷⁾.

Eigene Untersuchungen für N^ω-Hydroxy-L-arginin bestätigten seine Katalase-unabhängige NO-Freisetzung. Die NO-Bildung aus den untersuchten Verbindungen dagegen ließ sich in Gegenwart von Katalase und vom Oxygenierungssystem signifikant steigern (Abbildung 4-32). Dieses Ergebnis stellte einen ersten Hinweis auf Hydroxylamin als Intermediat der NO-Freisetzung aus den Hydroxyiminoverbindungen dar.

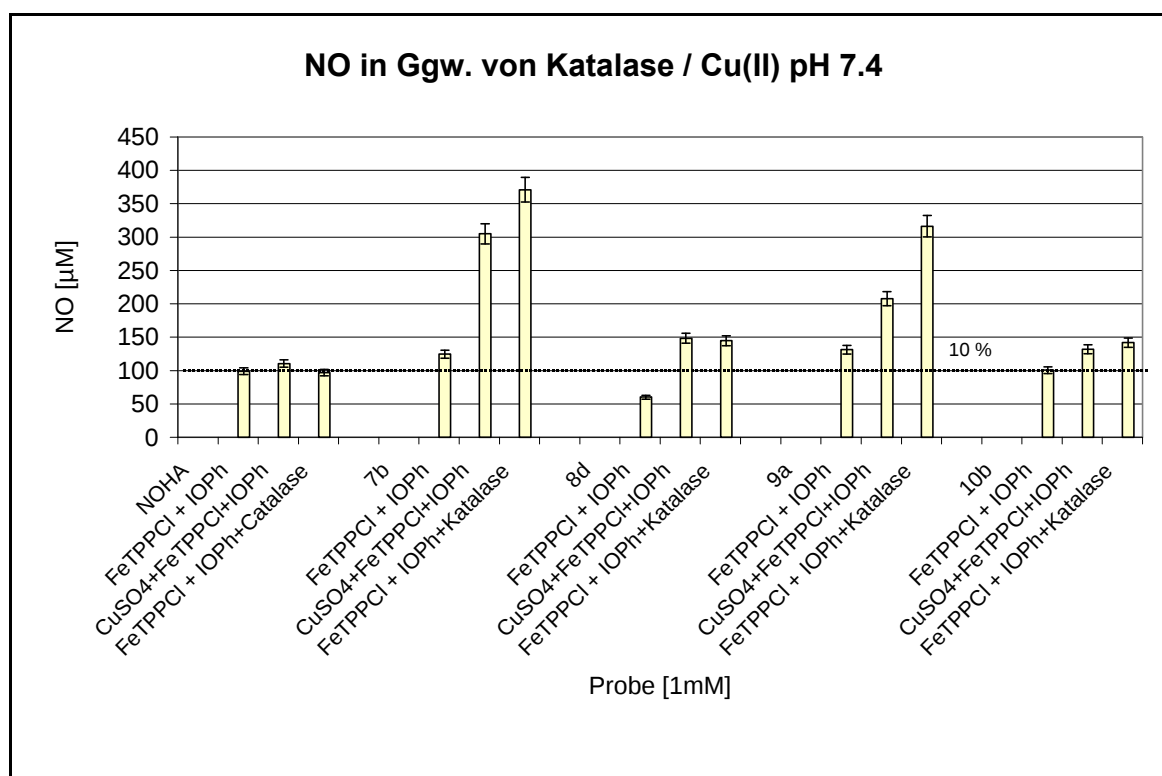
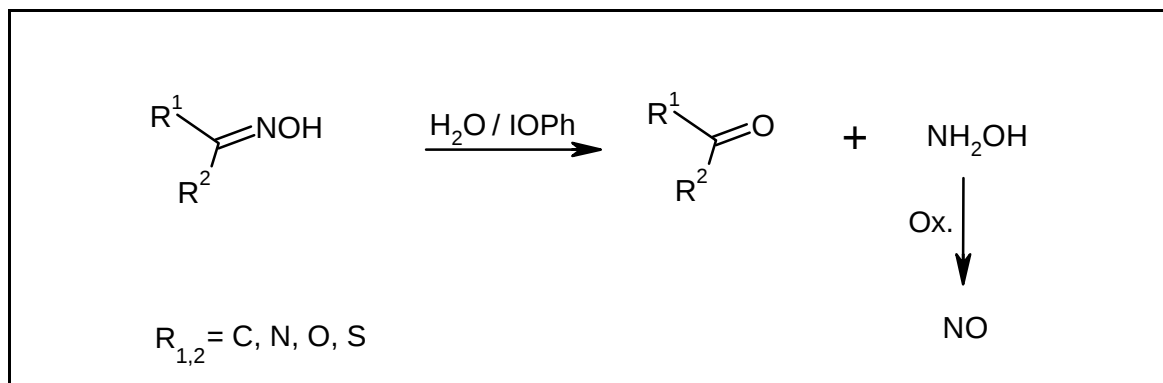


Abbildung 4-32 Vergleich der NO-Freisetzung aus verschiedenen Substanzklassen unter dem Einfluß des Oxygenierungssystems FeTPPCI / IOPh und Katalase bzw. Cu²⁺-Ionen bei 37°C, n = 5

Darüber hinaus stieg die NO-Freisetzung aus den Substanzen in Gegenwart von Cu²⁺-Ionen erheblich an. Cu²⁺-Ionen katalysieren die Oxidation von Hydroxylamin zu NO⁻¹⁵³), das offensichtlich in Gegenwart von Iodosobenzol zu NO oxidiert wird.

Bei einer der NO-Freisetzung vorangehenden Dissoziation müßte also neben Hydroxylamin die korrespondierende Oxoverbindung analytisch nachzuweisen sein (Schema 4-18).

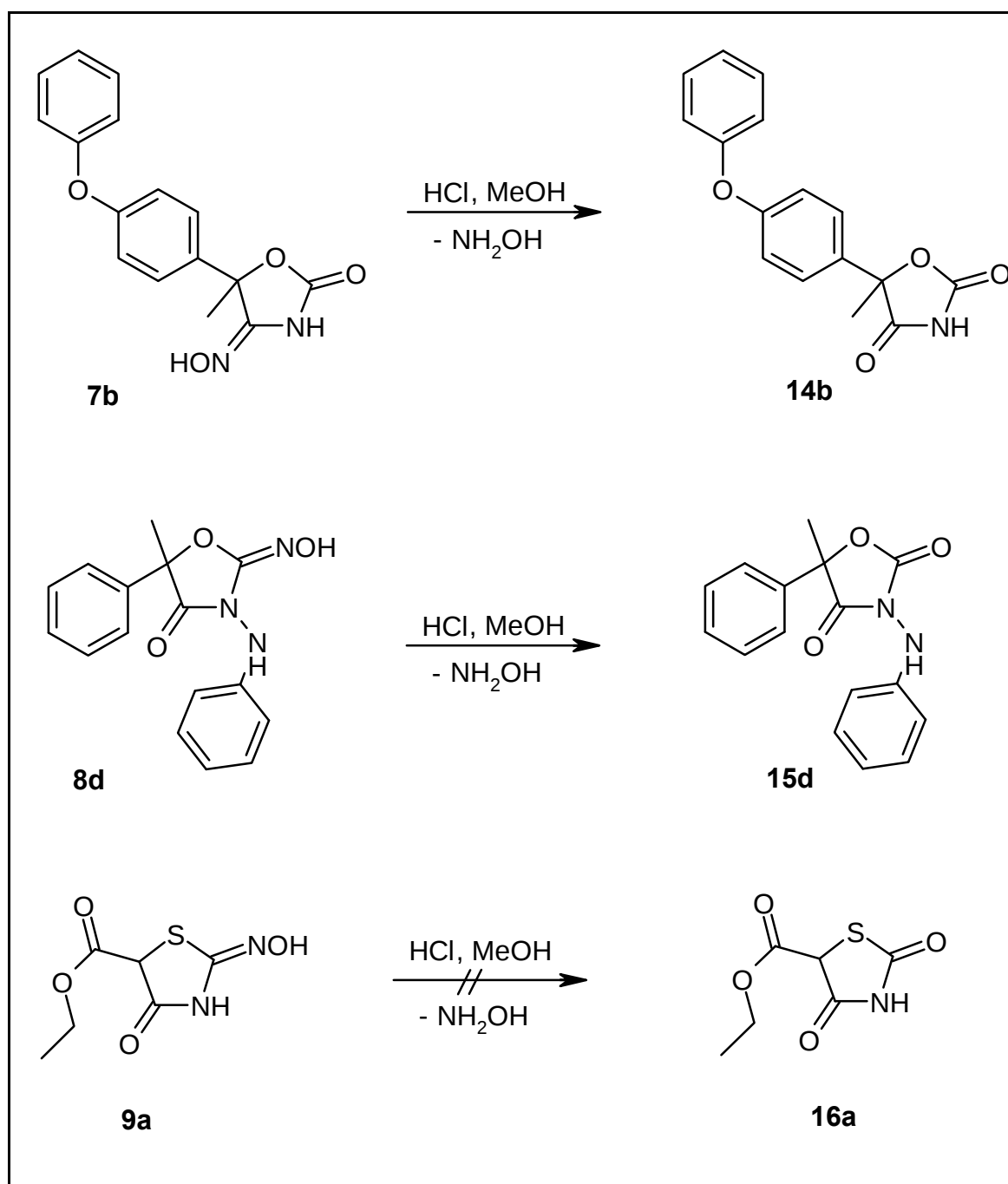


Schema 4-18 Dissoziation der Hydroxyiminoverbindungen in Hydroxylamin und die korrespondierende Oxoverbindung

4.4.1 Nachweis der Oxoverbindungen

4.4.1.1 Synthese der Oxoverbindungen

Um für die HPLC-analytische Erfassung der korrespondierenden Oxoverbindungen auf Vergleichsspektren zurückgreifen zu können, wurden diese als authentische Proben aus ihren Hydroxyiminoanaloga synthetisiert (Schema 4-19).



Schema 4-19 Darstellung der korrespondierenden Oxoverbindung

Im Falle der α -Hydroxyiminohydroxamsäure **10b** konnte auf eine Hydrolyse verzichtet werden, da eine authentische Probe (**17b**) aus der Arbeit von Köthemann zur Verfügung stand¹⁴⁶).

Die exemplarisch ausgewählten Hydroxyiminoverbindungen wurden in Methanol in Gegenwart 12,5 %-iger Salzsäure 10 Stunden rückfließend erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde dabei dünnschichtchromatographisch und IR-spektroskopisch kontrolliert. Nach Aufar-

beutung und säulenchromatographischer Trennung konnten die Oxoverbindungen von **7b** und **8d**, **14b** und **15d**, aus Ether / Petrolether in 70 % bzw. 65 % iger Ausbeute erhalten und zur Kristallisation gebracht werden. Die IR-Spektren von **14b** und **15d** zeigten zwei Carbonylbanden bei $1840 - 1820 \text{ cm}^{-1}$ und $1760 - 1730 \text{ cm}^{-1}$, die ein für Oxazolidin-2,4-dione typisches Intensitätsverhältnis aufweisen¹⁵⁴).

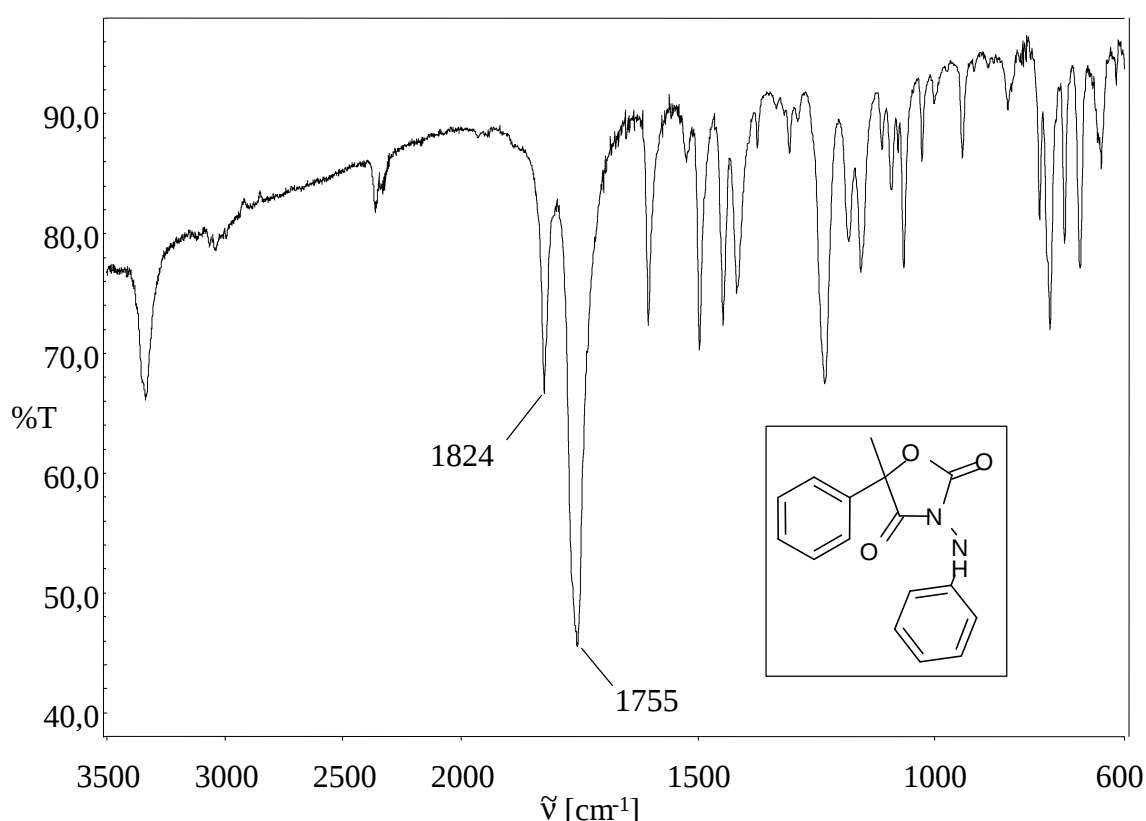


Abbildung 4-33 IR-Spektrum von **15d**

Im ^1H -NMR-Spektrum von **14b** und **15d** waren die Signale der OH-Protonen der Hydroxyiminogruppe verschwunden.

Die Hydrolyse der N-Hydroxyisothioharnstoffe unter analogen Bedingungen führte zu einem komplexen Reaktionsgemisch, das säulenchromatographisch nicht getrennt werden konnte. Auch unter milden Bedingungen konnte die angestrebte Oxoverbindung nicht gewonnen werden. Die Komplexität dieser Reaktion steht vermutlich mit dem Abbau des heterozyklischen Bindungssystems in Verbindung.

4.4.1.2 HPLC-Analytik

Zunächst wurden die Retentionszeiten der Hydroxyiminoverbindungen und ihrer analogen Oxoverbindungen sowie der Zusätze IOPh und FeTPPCI jeweils aus 1mM ethanolischen Lösungen bestimmt. In diesem Zusammenhang wurde das für eine optimale Trennung am besten geeignete Fließmittel ermittelt. Während sich für die Trennung von **7b**, **14b**, **8d** und **15d** das Mischungsverhältnis Methanol 40 % / Wasser 40 % / Acetonitril 20 % (Tabelle 4-1) am besten eignete, mußte für die Hydroxamsäuren (**10b**, **17b**) die Polarität des Fließmittels erniedrigt werden (Tabelle 4-2)

Tabelle 4-1 Retentionszeiten von FeTPPCI, IOPh, **7b**, **14b**, **8d**, **15d**, **9a** und **16a** mit Methanol 40% / Wasser 40% / Acetonitril 20 %

Methanol 40 / Wasser 40 / Acetonitril 20	
Substanz	Retentionszeit [Min]
FeTPPCI	⁻¹
IOPh	18,0 +/- 0,6
7b	6,5 +/- 0,3
14b	16,0 +/- 0,5
8d	5,5 +/- 0,21
15d	9,25 +/- 0,3
9a	3,0 +/- 0,4
16a	⁻²

¹ Konnte mit keinem der getesteten Fließmittelgemischen eluiert werden.

² Eine Oxoverbindung konnte nicht isoliert werden.

Tabelle 4-2 Retentionszeiten von FeTPPCI, IOPh, **10b** und **17b** mit Methanol 40% / Wasser 35% / Acetonitril 25 %

Methanol 40% / Wasser 35% / Acetonitril 25%	
Substanzen	Retentionszeit [Min]
FeTPPCI	-
IOPh	14,0 +/- 0,43
10b	16,22 +/- 0,15
17b	25,0 +/- 0,32

Die Freisetzungsversuche wurden in Pufferlösung pH 7.4, in Gegenwart von Iodosobenzol, von FeTPPCI sowie in Gegenwart der Kombination FeTPPCI / Iodosobenzol in 1,5 mL HPLC-Vials durchgeführt und das Reaktionsgemisch mittels HPLC analysiert. Zur Kontrolle wurde ebenso reiner Puffer pH 7.4 und reiner Ethanol untersucht.

Aufgrund der übereinstimmenden Retentionszeiten bestätigte sich die Hypothese des Freisetzungsmechanismus`. Für die Verbindungen **7b** und **8d** konnten die entsprechenden Oxoverbindungen, **14b** (Abbildung 4-34) und **15d** (Abbildung 4-35), identifiziert werden. Die HPLC-Analytik bestätigte die Ergebnisse der Chemilumineszenzmessung. Eine Freisetzung von NO fand nur in Gegenwart von Iodosobenzol statt. Bei Durchführung der Versuche mit äquimolarer Konzentration an Iodosobenzol waren neben den Oxoverbindungen auch noch die Hydroxyiminoverbindungen im Chromatogramm zu sehen.

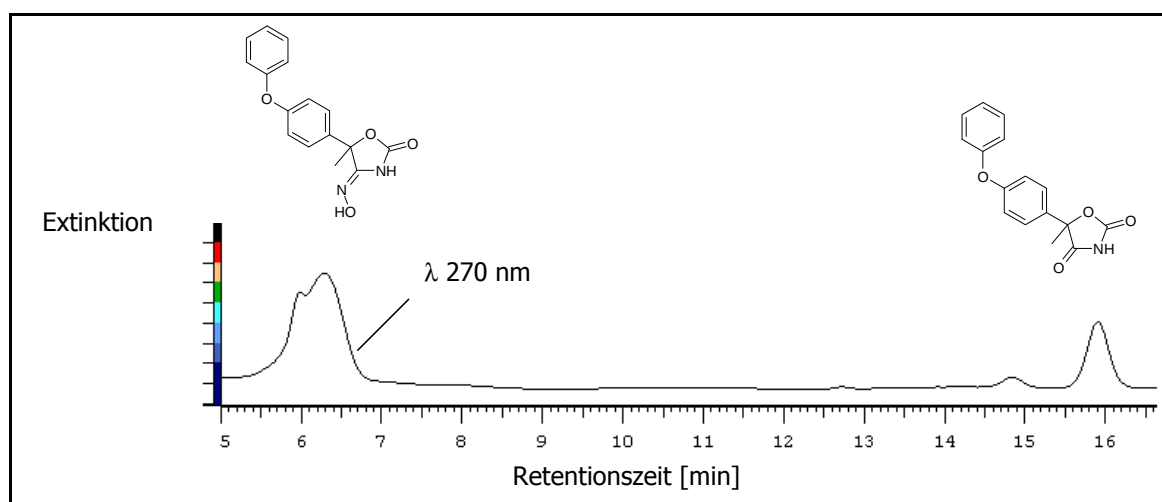


Abbildung 4-34 HPLC-Chromatogramm von **7b** und **14b** nach Reaktion mit Iodosobenzol in äquimolarer Konzentration

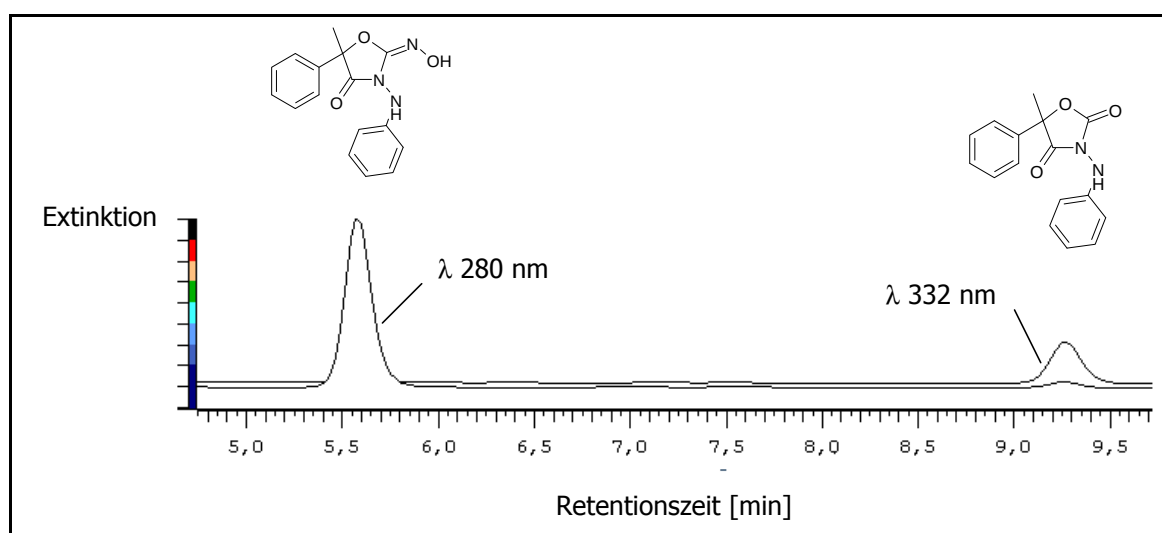
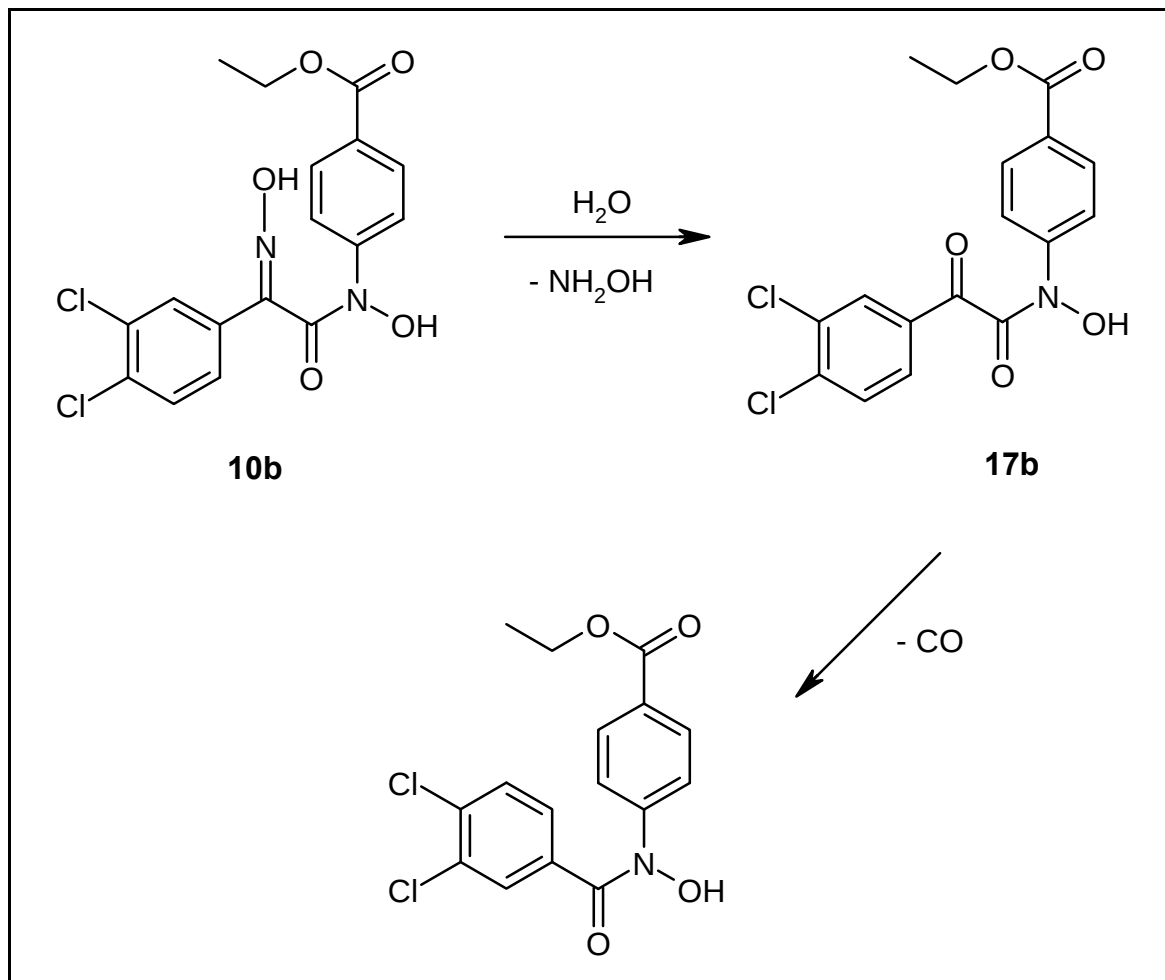


Abbildung 4-35 HPLC-Chromatogramm von **8d** und **15d** nach Reaktion mit Iodosobenzol in äquimolarer Konzentration

Wurden die Versuche mit 10-fachem Überschuß an Iodosobenzol durchgeführt, oxidierte der Sauerstoffdonator die entstandenen Oxoverbindungen **14b** und **15d** weiter zu polareren Derivaten mit niedrigeren Retentionszeiten. Wurde die Iodosobenzolkonzentration gesenkt, wuchs der Peak der Oxoverbindung im Chromatogramm deutlich an und die Peaks mit kleinen Retentionszeiten nahmen ab bzw. verschwanden.

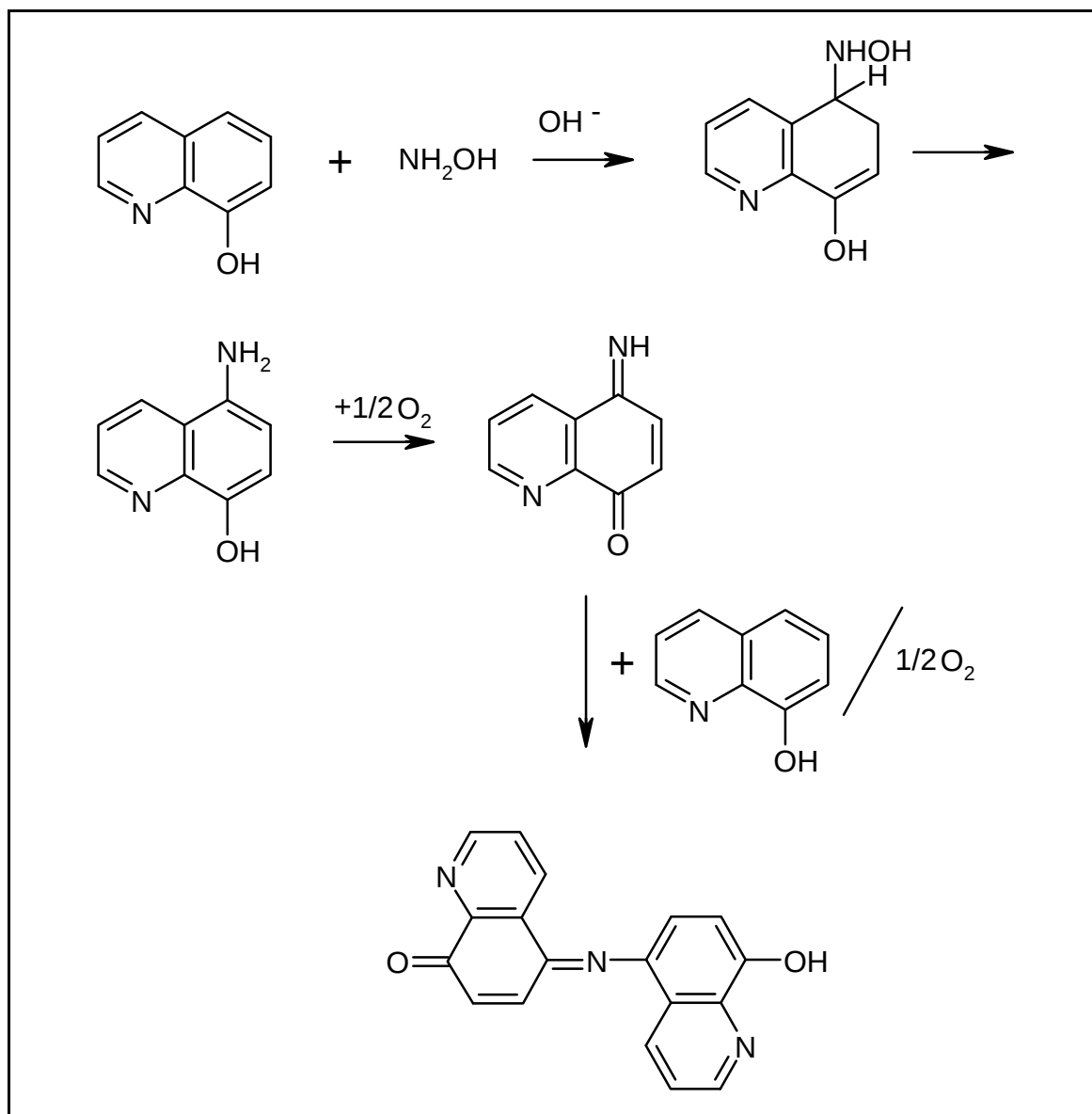
Im Falle der α -Hydroxyiminohydroxamsäure **10a** konnte die korrespondierende Oxoverbindung **17b** nicht identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Decarbonylierung der nach hydrolytischer Hydroxylaminabgabe entstandenen α -Oxohydroxamsäure sein, eine für diese Verbindungsklasse literaturbekannte Reaktion¹⁴⁶⁾ (Schema 4-20).



Schema 4-20 Decarbonylierung der nach hydrolytischer Hydroxylaminabgabe entstandenen α -Oxohydroxamsäure

4.4.2 Nachweis von Hydroxylamin

In alkalischer Lösung bilden Hydroxylamin und 8-Hydroxychinolin ein grünes Chinonimin, das kolorimetrisch bei 700 nm bestimmt werden kann¹⁵⁵). Dabei geht Berg von dem in Schema 4-21 dargestellten Reaktionsmechanismus aus.



Schema 4-21 Kolorimetrischer Nachweis von Hydroxylamin durch Bildung eines grünen Chinonimins mit 8-Hydroxychinolin in alkalischer Lösung

Die Farbreaktion wurde zunächst unter gleichen Reaktionsbedingungen wie die Freisetzungsversuche bei pH 7.4 durchgeführt. Dabei konnte kein Hydroxylamin gefunden werden. Der negative Ausgang der Farbreaktion in Gegenwart von überschüssigem Iodosobenzol war auf die Oxidationsempfindlichkeit von Hydroxylamin, sowie auf die Weiteroxidation des grünen Chinonimins zurückzuführen. In Abwesenheit von Iodosobenzol konnte auch nach 24-stündiger Inkubation kein Hydroxylamin durch die Farbreaktion detektiert werden. Dagegen gelang es in Gegenwart äquimolarer Mengen Iodosobenzol, Hydroxylamin kolorimetrisch zu erfassen. Aufgrund der oben genannten Oxidationsempfindlichkeiten ließen sich nur qualitative Aussagen machen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-36 dargestellt.

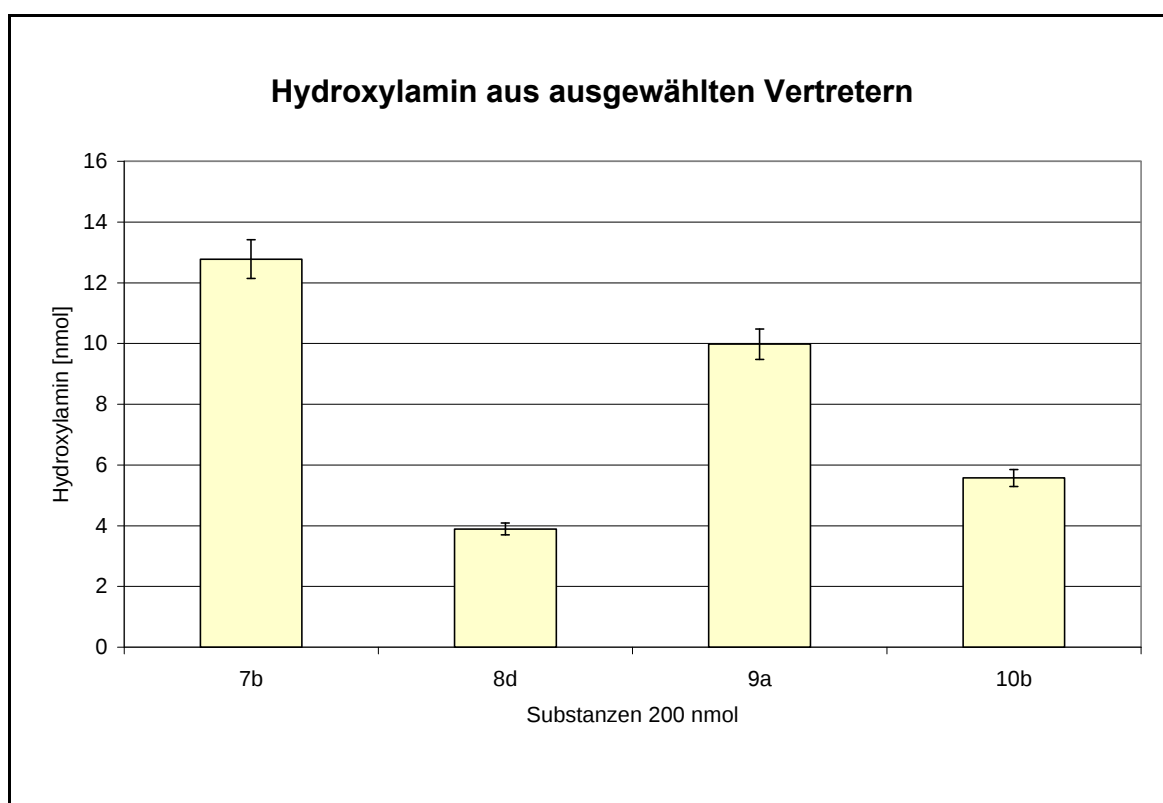
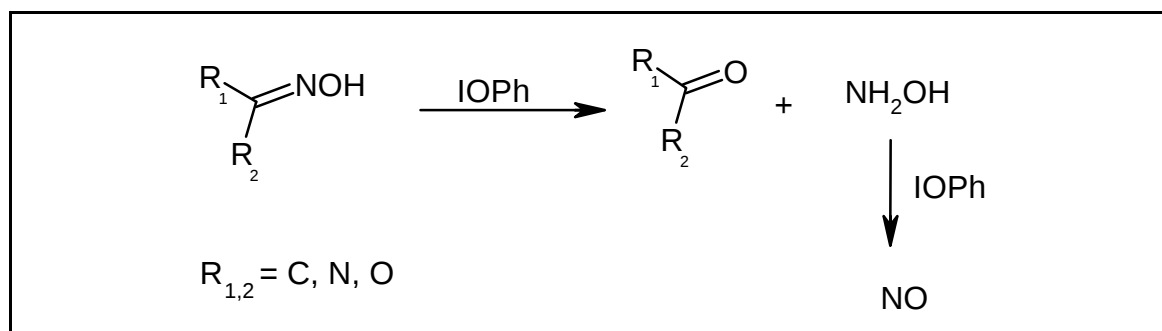


Abbildung 4-36 Kolorimetrischer Nachweis von Hydroxylamin aus verschiedenen Substanzklassen in Gegenwart äquimolarer Mengen IOPh, $n = 5$

Da sowohl die Oxoverbindungen als auch Hydroxylamin analytisch nachweisbar waren, konnte die Hypothese der NO-Bildung via intermediär gebildetem Hydroxylamin zumindest für die Amidoxime (**7**) und N-Hydroxyisoharnstoffe (**8**) bestätigt werden (Schema 4-22).



Schema 4-22 NO-Freisetzung aus den Hydroxyiminoverbindungen über intermediär gebildetes Hydroxylamin

4.4.3 Einfluß von Iodosobenzol

Allgemein erfolgt die Hydrolyse von Hydroxyiminoverbindungen in die korrespondierende Oxoverbindung bevorzugt im Sauren¹⁵⁶). Die Verschiebung des Gleichgewichts auf die Produktseite gelingt u.a. durch Entfernung von Hydroxylamin – hier aufgrund von Oxidation zu NO durch Iodosobenzol¹. Abbildung 4-37 zeigt den Anstieg der NO-Freisetzung mit zunehmender Konzentration an Iodosobenzol.

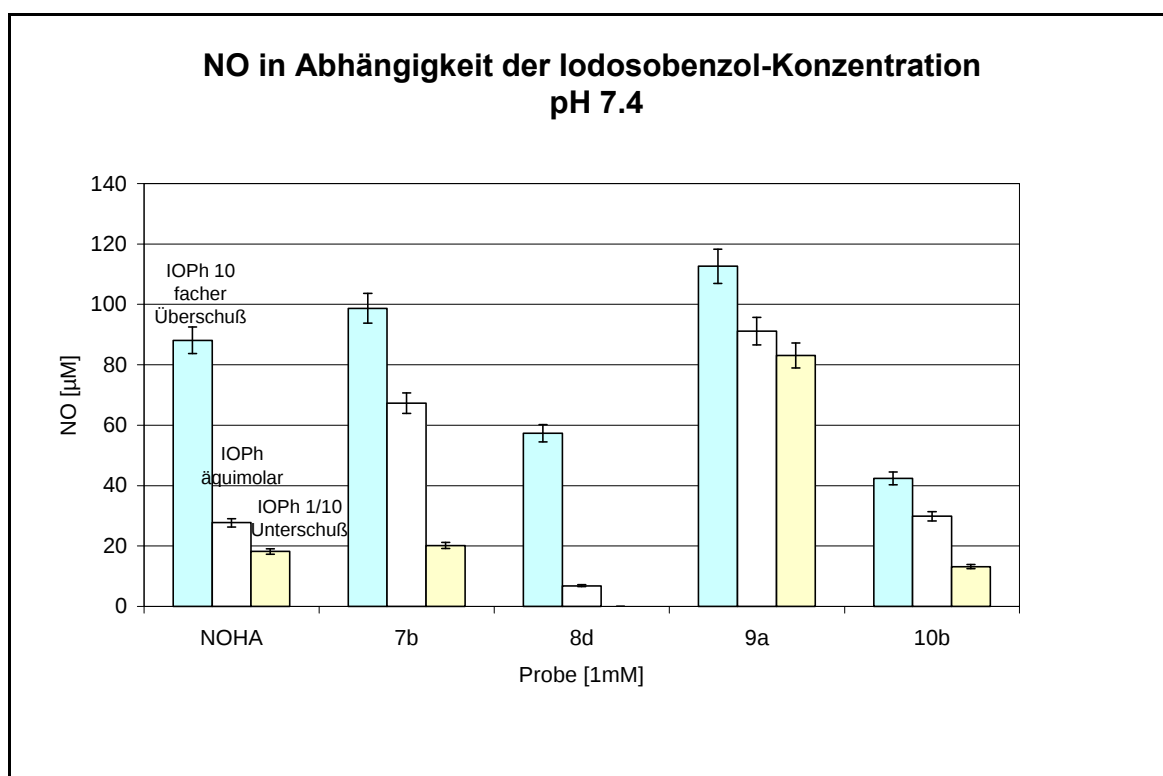
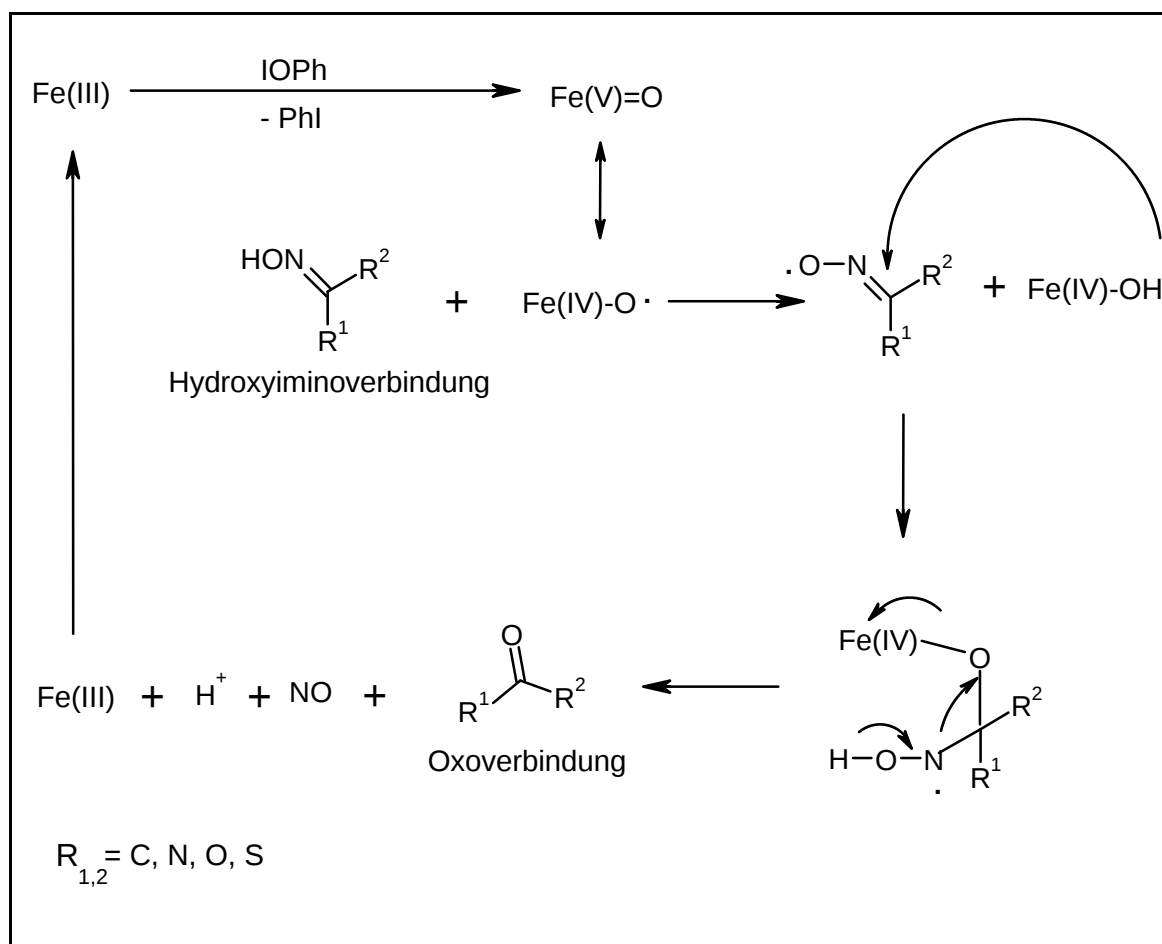


Abbildung 4-37 Anstieg der NO-Freisetzung verschiedener Substanzklassen mit zunehmender Konzentration an Iodosobenzol bei 37°C, $n=5$

¹ Zur Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Produkte eignen sich außerdem die Entfernung der Carbonylverbindung durch Wasserdampfdestillation sowie das Zerstören des Hydroxylamins durch Reduktionsmittel.

4.4.4 Einfluß des FeTPPCI / IOPh-Systems

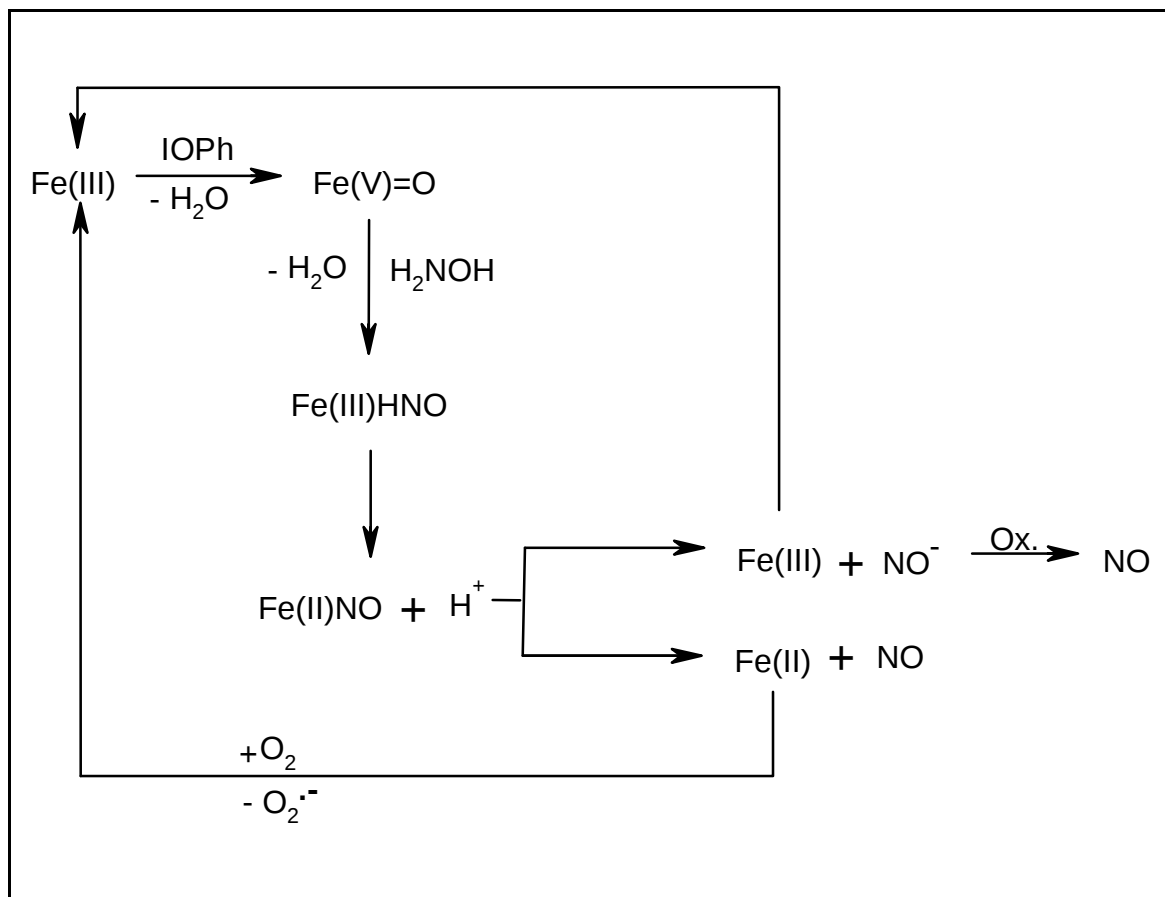
Grundsätzlich führte die Kombination von FeTPPCI und Iodosobenzol zu einer weiteren Erhöhung der NO-Bildung. Der Grund dafür könnte zum einen in der direkten Oxidation der Hydroxyimino-Verbindung durch Fe(V)=O analog des in Schema 4-23 dargestellten Mechanismus` sein.



Schema 4-23 Vorgeschlagener Oxidationsmechanismus der Hydroxyiminoverbindungen durch Fe(V)=O

Durch H-Atom-Abspaltung entstehen intermediär aus der Hydroxyiminoverbindung und Fe(V)=O ein Iminooxylradikal und Fe(IV)-OH. Durch den nukleophilen Angriff des Fe(IV)-OH am Guanidin-Kohlenstoffatom bildet sich ein tetrahedraler Komplex, der unter Regeneration des Eisens in die Oxoverbindung und NO zerfällt.

Ferner ist aber auch die Oxidation von Hydroxylamin durch Fe(V)=O analog dem von DeMaster postulierten ionischen Mechanismus zu NO denkbar (Schema 4-24)¹⁵¹).



Schema 4-24 Oxidation von Hydroxylamin durch Fe(V)=O

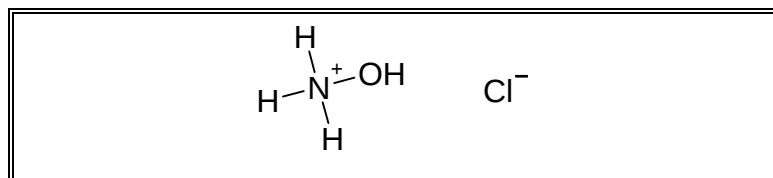
Dabei oxidiert das im katalytischen Zyklus gebildete Fe(V)=O Hydroxylamin über ein Ferrikatalase-NO-Intermediat zu NO. Ferrikatalase (Fe(III)) wird durch Sauerstoffoxidation aus Ferrokatalase (Fe(II)) zurückgewonnen. Den alternativen Weg über die Bildung von NO^- und Ferrikatalase schloß DeMaster allerdings nicht aus.

5 Hydroxylamin

Nachdem es gelungen war, Hydroxylamin als Intermediat der Freisetzung nachzuweisen, war es von Interesse, wie es sich unter gleichen Reaktionsbedingungen der Freisetzungsversuche der Hydroxyiminoverbindungen verhält. Darüber hinaus sollte der weitere Verlauf der Oxidation zu NO näher beleuchtet werden.

5.1 Literaturübersicht

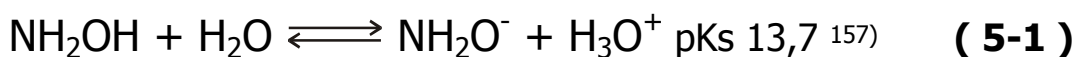
Im Gegensatz zur wenig stabilen und hygroskopischen freien Base ist Hydroxylaminhydrochlorid eine kristalline, gut wasserlösliche und lagerungsstabile Substanz. Die Erhöhung der ionischen Stärke durch Chloridionen aufgrund des in den Versuchen eingesetzten Hydroxylaminhydrochlorid verändert die Kinetik der Reaktionen gegenüber der freien Base nicht bemerkbar¹⁵⁷).



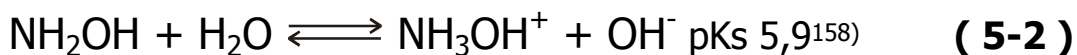
Formel 5-1

Die wohl bekannteste Reaktion des Hydroxylamins ist die Oximbildung mit Aldehyden und Ketonen. Nicht weniger bedeutsam ist die Gewinnung von Hydroxamsäuren aus aktivierten Carbonsäurederivaten und Hydroxylamin.

In stark alkalischer Lösung neigt Hydroxylamin zur Disproportionierung unter Bildung von NH_3 , N_2 sowie N_2O . Im pH-Bereich von 6 - 9 ist Hydroxylamin unter inerten Bedingungen stabil. In wässriger Lösung kann es sowohl als Säure

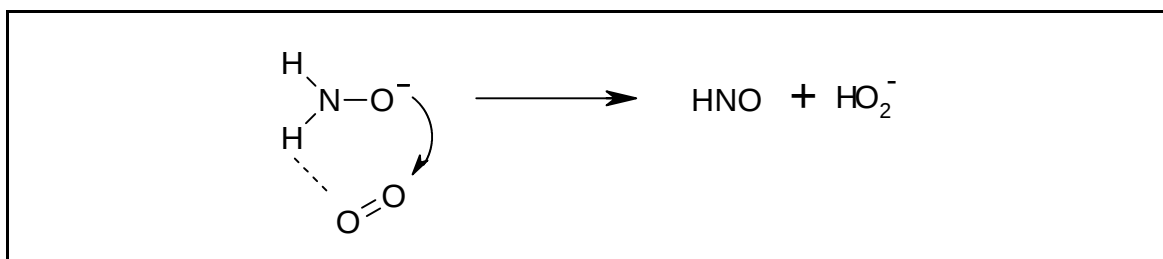


als auch als Base reagieren.



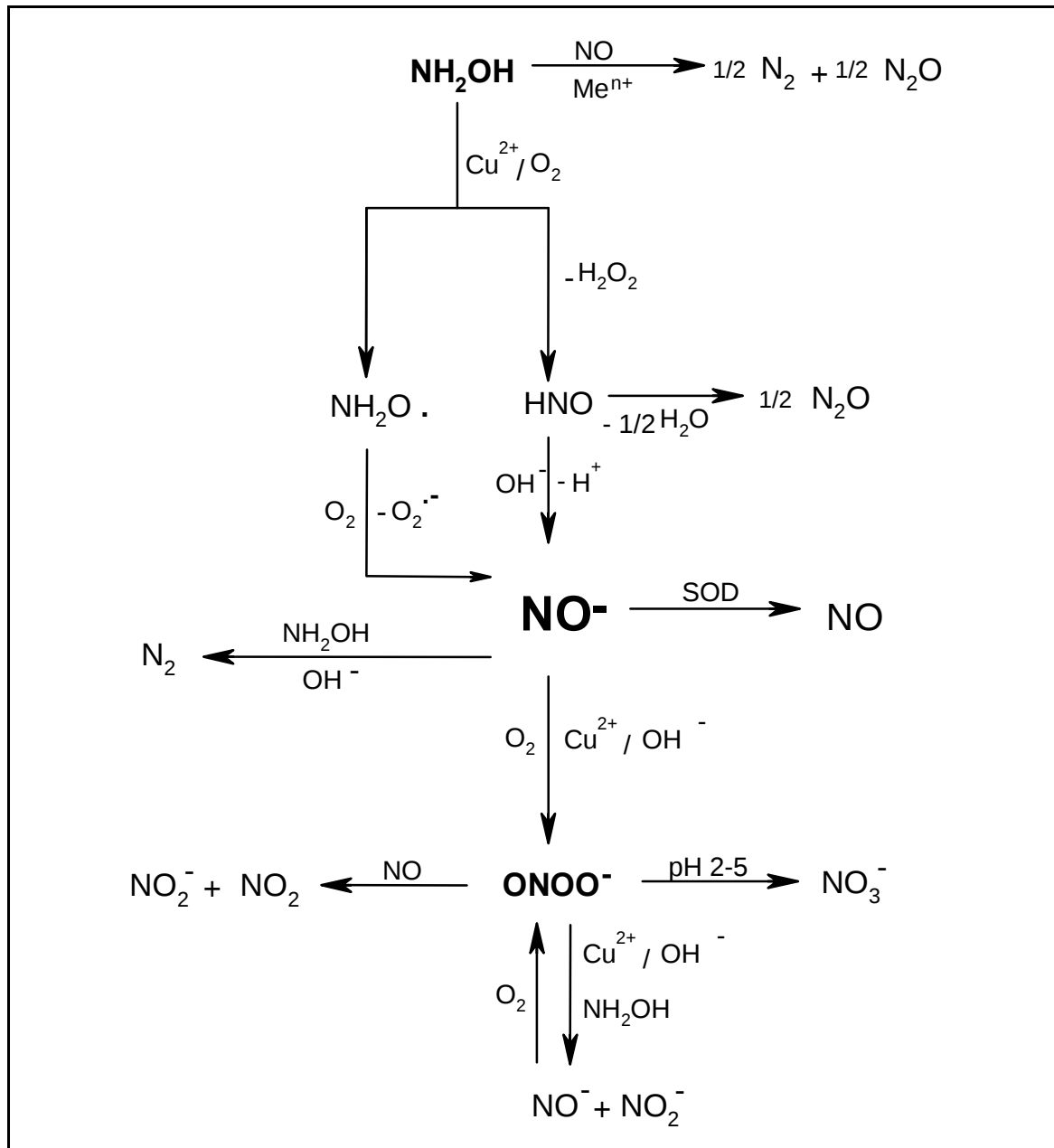
In Gegenwart von Sauerstoff dagegen ist Hydroxylamin oxidationsempfindlich. Die oxidative Bildung von NO aus NH_2OH ist in der Literatur unbestritten. Der Mechanismus ist jedoch in seinen Einzelheiten noch nicht vollständig aufgeklärt.

Während Kono als Intermediat der Oxidation ein $\text{NH}_2\text{O}^\cdot$ -Radikal vorschlägt¹⁵⁹⁾, geht Hughes von einem ionischen Mechanismus zur Bildung von NO^- aus. Der oxidative Angriff erfolgt am Sauerstoffatom des Hydroxylamins, da O-methylierte Hydroxylaminderivate diese Reaktion nicht zeigen¹⁶⁰⁾. Der Sauerstoff wird dabei von Hydroxylaminanionen zu Superoxidradikalanionen reduziert. Durch Abspaltung eines H-Atoms entstehen HNO und Hydroperoxyanionen (Schema 5-1)¹⁶⁰⁾.



Schema 5-1 Ionischer Oxidationsmechanismus von Hydroxylamin

Schema 5-2 faßt das Verhalten von Hydroxylamin unter oxidativen Bedingungen zusammen.



Schema 5-2 Verhalten von Hydroxylamin unter oxidativen Bedingungen

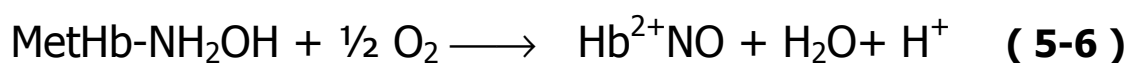
In alkalischer Lösung neigt NH_2OH besonders in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen zu Autoxidationsreaktionen unter Bildung von Peroxynitrit^{153, 161}). Vor allem in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen ist Peroxynitrit nicht stabil, sondern reagiert mit Hydroxylamin zu Nitroxylanionen und Nitrit¹⁶²). Nitroxylanionen können wiederum mit Sauerstoff Peroxynitrit bilden. Peroxynitrit kann zu Nitrat isomerisieren¹⁶⁰). Aus der Reaktion von Peroxynitrit mit NO entstehen NO_2 und Nitrit¹⁶⁰).

Übergangsmetallionen katalysieren die Oxidation von Hydroxylamin zu Stickstoff und N_2O ¹⁵⁷). Stickstoff kann darüber hinaus aus der Synproportionierung von Hydroxylamin und Nitroxylanionen, die bevorzugt im Alkalischen abläuft, entstehen. In Abwesenheit von Sauerstoff befinden sich Reaktionen mit Nitroxylanionen vor allem im Sauren immer in Konkurrenz zur Dimerisierung von HNO zu $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$, die unter Wasserabspaltung zu N_2O reagiert¹⁶³).

Verschiedene Arbeitsgruppen bewiesen eine SOD vermittelte Entstehung von NO aus NO^- ^{107, 164, 165}).

Southern berichtete über die Entstehung von Nitroxyl-Rhenium-Komplexen nach selektiver Oxidation koordinativ gebundenen Hydroxylamins¹⁶⁶).

Mit Oxyhämoglobin bildet Hydroxylamin Komplexe, aus denen Methämoglobin und Hydroxylaminradikale entstehen. Während die Hydroxylaminradikale zu Stickstoff und Wasser zerfallen, reagiert Methämoglobin weiter mit überschüssigem Hydroxylamin zu Methämoglobin-Hydroxylamin-Komplexen, die zu Hämoglobin- NO -Komplexen oxidieren¹⁶⁷).



5.2 Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen

Im Rahmen dieser Versuchsreihen wurde Hydroxylaminhydrochlorid unter gleichen Reaktionsbedingungen wie die Hydroxyiminoverbindungen vermessen (Abbildung 5-1).

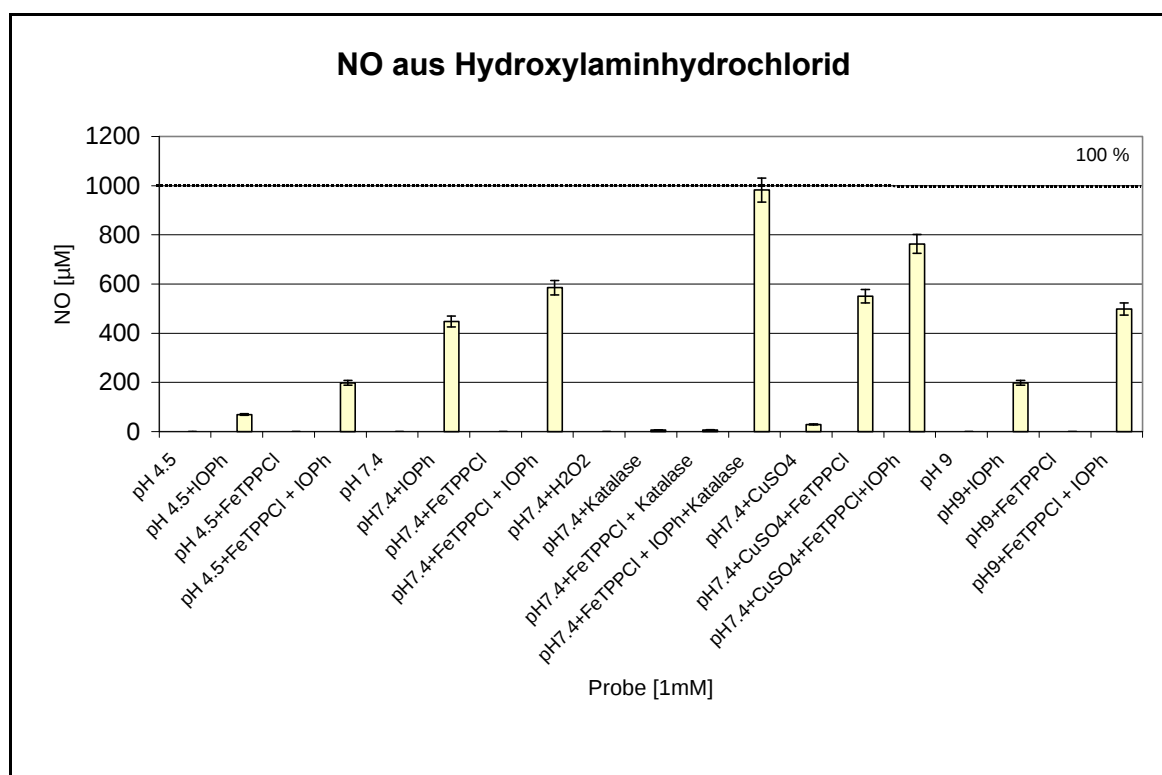


Abbildung 5-1 Vergleich der NO-Freisetzung aus Hydroxylaminhydrochlorid unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, n = 5

Die besten NO-Beträge ohne Kofaktoren wurden mit 58,5 % unter oxidativen Bedingungen im neutralen Bereich erzielt. In Gegenwart von Katalase oder Cu^{2+} -Ionen erreichte die NO-Bildung mit 98 % bzw. 76 % ausgezeichnete Werte. Sogar in Abwesenheit einer Sauerstoffquelle wurden durch Zusatz von Katalase oder Cu^{2+} -Ionen noch kleine Mengen NO gebildet. Im schwach Alkalischen bei pH 9 konnte mehr NO detektiert werden (49,78 %) als im schwach sauren Milieu (19,82 %). In Gegenwart des Oxygenierungssystems wurden bei allen pH-Werten höhere NO-Ausbeuten erzielt als bei alleiniger Anwesenheit von Iodosobenzol.

Nitrit konnte vor allem im neutralen und alkalischen Milieu in Gegenwart von FeTPPCL / IOPh in Konzentrationen von 30 % gefunden werden (Abbildung 5-2). Die NO-Beträge im Sauren waren dagegen gering.

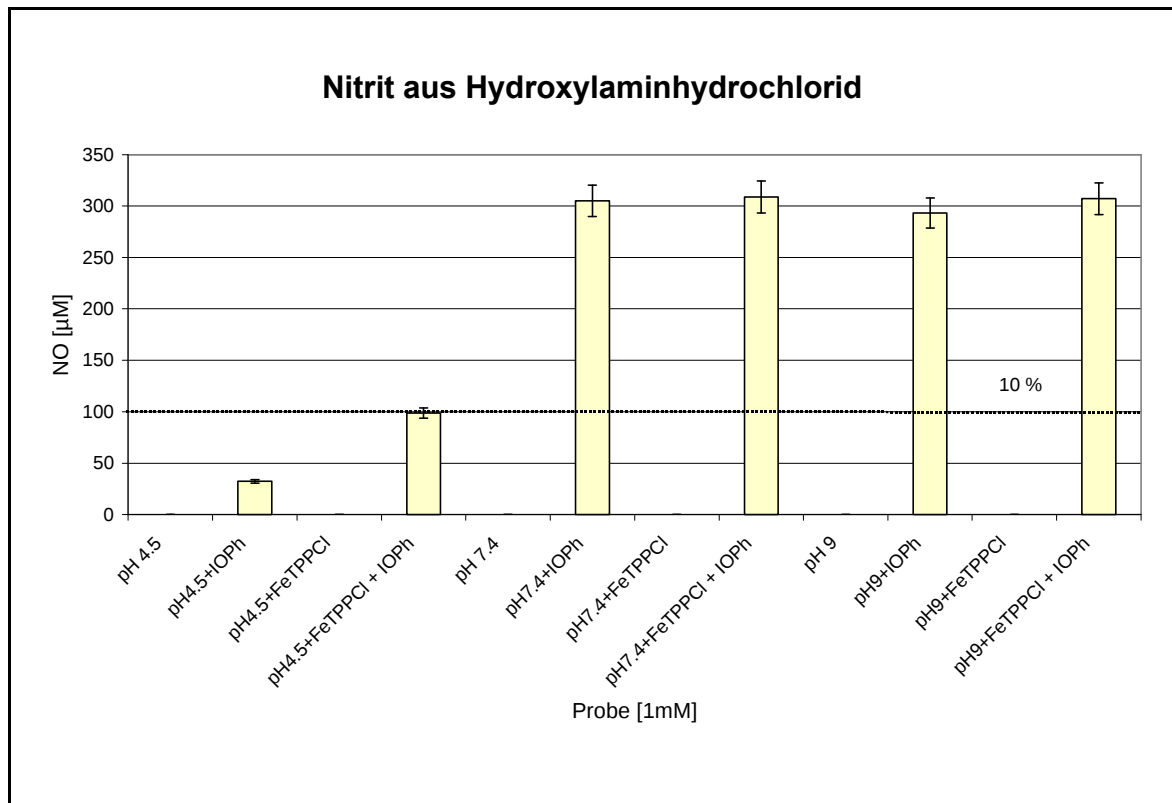


Abbildung 5-2 Vergleich der Nitrit-Freisetzung aus Hydroxylaminhydrochlorid unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

Die Nitratwerte waren im Gegensatz zu den Nitritwerten im Sauren (49 %) am höchsten (Abbildung 5-3). Während im neutralen pH-Bereich kein Nitrat ermittelt werden konnte, waren bei pH 9 wieder 18,7 % zu finden.

In Gegenwart des Oxygenierungssystems stiegen die Werte gegenüber dem alleinigen Zusatz von Iodosobenzol an.

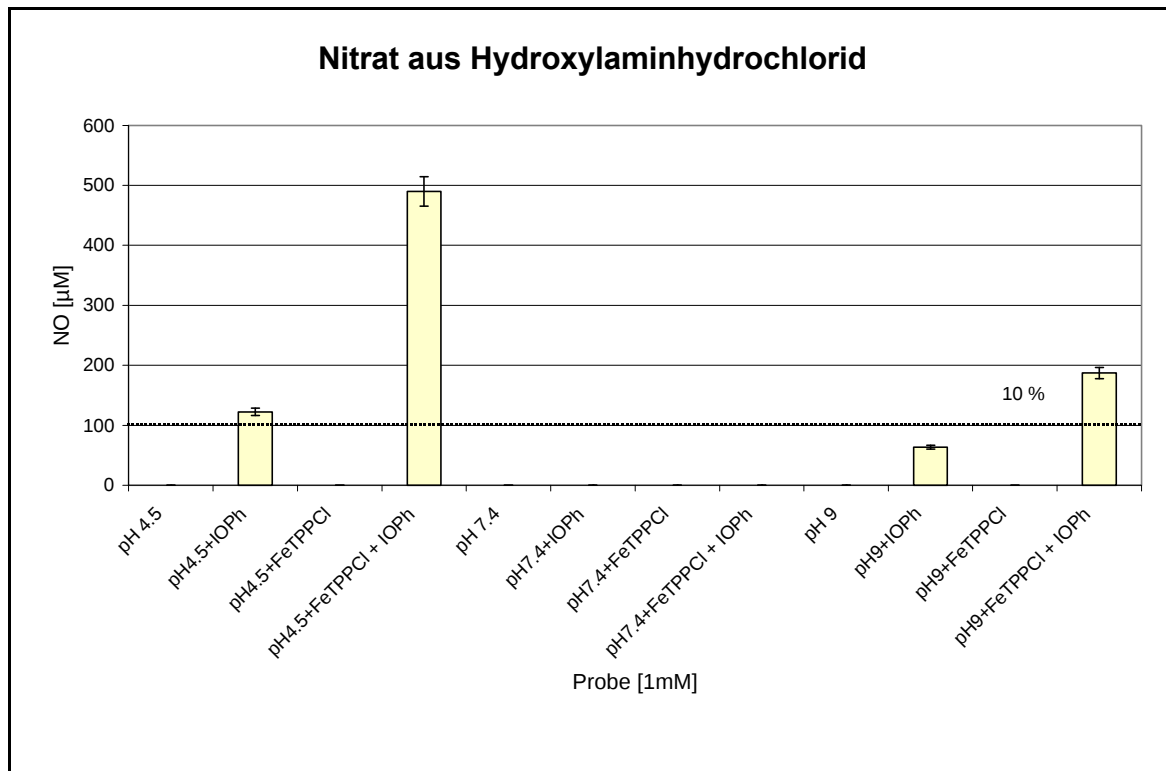


Abbildung 5-3 Vergleich der Nitrit-Freisetzung aus Hydroxylaminhydrochlorid unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

5.3 Diskussion der Ergebnisse

Im Vergleich zu den untersuchten Hydroxyiminoverbindungen zeigte Hydroxylamin eine abweichende pH-abhängige Freisetzungskarakteristik. Die besten NO-Werte wurden bei pH 7.4 erreicht, wobei die NO-Bildung im Säuren mit kleinsten Ausbeuten ablief (Abbildung 5-1).

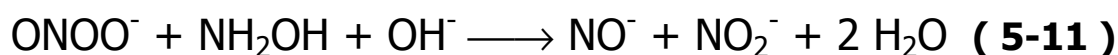
Geht man von NO^- als Zwischenprodukt der Oxidation aus, so würde im Säuren die Dimerisierungstendenz von NO^- über HNO zu $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$, aus dem unter Wasserabspaltung N_2O entsteht, zunehmen, während im Neutralen offensichtlich die Weiterreaktion von NO^- zu NO bevorzugt wäre. Dieser Befund konnte auch durch eine GC-MS-Messung von N_2O gezeigt werden¹⁶⁸).

Die abnehmende NO-Bildung bei pH 9 könnte mit den zahlreichen Konkurrenzreaktionen von NO^- im schwach Alkalischen im Zusammenhang stehen (Schema 5-2).

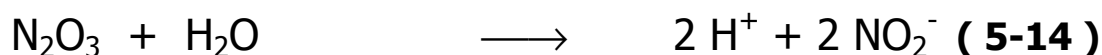
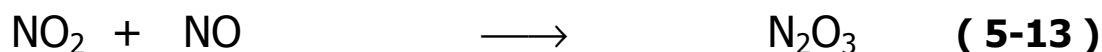
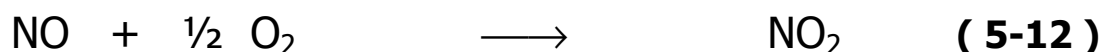
Die Kombination von Katalase oder Cu^{2+} -Ionen mit dem Oxygenierungssystem bei pH 7.4 lieferte eine annähernd quantitative NO-Freisetzung. Während Hydroxylamin vor allem in Gegenwart von Katalase und einer Sauerstoffquelle zu NO reagierte, katalysierten Kupferionen den oxidativen Zerfall von Hydroxylamin zu NO^- , das anschließend zu NO oxidiert wurde. Diese Befunde bestätigten die bereits für die untersuchten Substanzen gefundene NO-Donorfunktion von Hydroxylamin.

Die Bildung von Nitrit war nur im Neutralen und Alkalischen festzustellen (Abbildung 5-2).

In Gegenwart von Sauerstoff entsteht aus Hydroxylamin zunächst Peroxynitrit, das entweder mit NO zu Nitrit und NO_2 , oder mit überschüssigem Hydroxylamin zu Nitroxylanionen und Nitrit weiterreagieren kann.



Darüber hinaus ist Nitrit als Folgeprodukt von NO in aerober wäßriger Lösung bekannt.

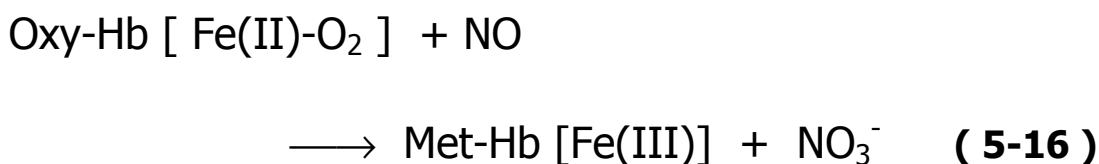


Nitrat kann vor allem im sauren Milieu durch Isomerisierung von Peroxynitrit entstehen¹⁶⁹).



Daß im alkalischen weniger Nitrat als im sauren Medium entstand, könnte dadurch erklärt werden, daß Peroxynitrit unter diesen Bedingungen auch zu intermolekularer Disproportionierung zu NO₂ und O₂ neigt.

Ferner wird in Gegenwart von Eisen-Sauerstoffkomplexen eine Oxidation von NO zu Nitrat beschrieben.



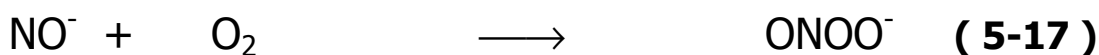
Darüber hinaus ist eine Weiteroxidation von Nitrit zu Nitrat denkbar.

Da Nitroxylanionen von zahlreichen Autoren als das zentrale Zwischenprodukt der Hydroxylaminoxidation angesehen werden, sollte nun versucht werden, NO^- nachzuweisen.

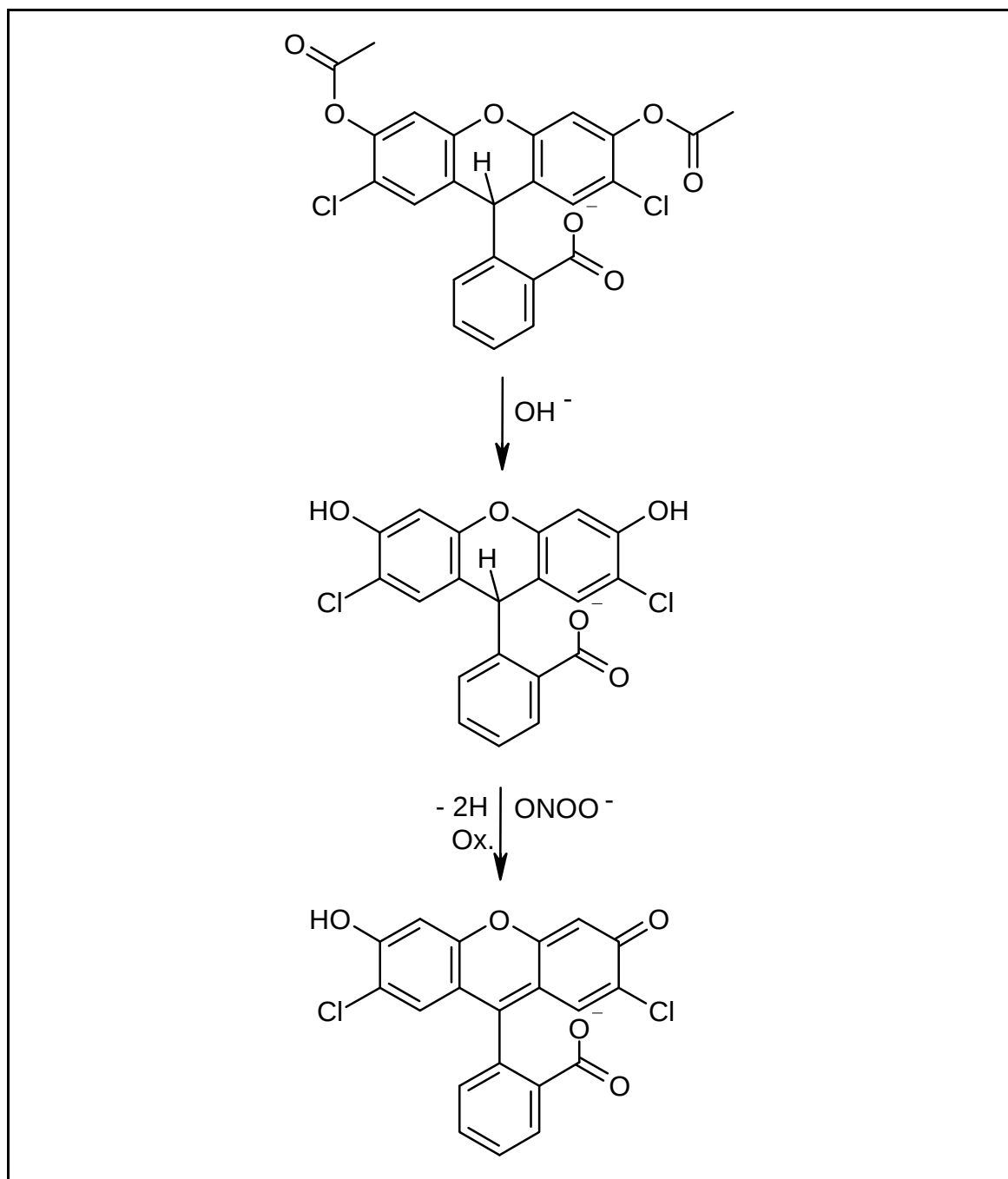
5.4 Indirekter Nachweis von NO^-

5.4.1 Kolorimetrischer Nachweis

Da Peroxynitrit unter aeroben Bedingungen aus Nitroxylanionen entsteht, wurde versucht, zum indirekten Nachweis von NO^- , ONOO^- photometrisch zu bestimmen.



Ein kolorimetrischer Nachweis von Peroxynitrit ist die Oxidation von 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat nach alkalischer Hydrolyse der Esterfunktionen. Es entsteht ein grünes Fluoresceinderivat (Schema 5-3), das bei 504 nm UV / Vis-spektroskopisch vermessen werden kann^{170, 171, 172}). Die Absorptionsmessungen bei 504 nm sind für Peroxynitrit bis in den submikromolaren Bereich sensitiv.



Schema 5-3 Kolorimetrischer Nachweis von Peroxynitrit durch Oxidation von 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat nach alkalischer Hydrolyse der Esterfunktionen

Aufgrund ihrer zu niedrigen Oxidationspotentiale stören NO , H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot -}$ die Oxidationsreaktion nicht.

Zur Aufnahme einer Kalibriergerade wurde aus Natriumnitrit, Wasserstoffperoxid und Natronlauge unter Eiskühlung Peroxynitrit hergestellt¹⁶²⁾. Natriumnitritlösung bildet im Sauren Salpetrige Säure,

einen effektiven Nitrosylkationendonor, der mit acidifizierter Wasserstoffperoxid-Lösung zur Peroxysalpetrigen Säure reagiert.



Da die Peroxysalpetrige Säure äußerst instabil ist, wird durch sofortige Zugabe von Natronlauge ihr Zerfall gestoppt, indem sich Peroxynitrit-Anionen bilden. In alkalischer Lösung ist Peroxynitrit bei -20°C über mehrere Wochen stabil. Vor Beginn jeder Meßreihe wurde die Konzentration der Lösung kolorimetrisch über die spezifische Absorption $\varepsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ¹⁷³⁾ bei 302 nm bestimmt. Mit 0,01 M KOH wurde eine Verdünnungsreihe von Peroxynitrit hergestellt und in Gegenwart von EDTA¹ die Absorptionen des oxidierten 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetats gemessen.

Unter den Reaktionsbedingungen der NO-Freisetzungsversuche sollte versucht werden, NO^- als Intermediat der NO-Bildung aus Hydroxylamin über die Reaktion zu Peroxynitrit nachzuweisen.

Unglücklicherweise stellte sich heraus, daß bereits Iodosobenzol 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat zum grünen Fluoresceinderivat oxidierte und somit, wie von H_2O_2 in Gegenwart von Peroxidasen bereits literaturbekannt war, zu einem falsch positiven Ergebnis führte.

Aus diesem Grund wurde der Peroxynitrit-Nachweis in Abwesenheit des Oxygenierungssystem durchgeführt. Hydroxylaminhydrochlorid wurde dabei in alkalischen Lösungen unterschiedlicher pH-Werte in Gegenwart von EDTA mit 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat umgesetzt.

Dabei konnte über die kolorimetrische Auswertung des grünen Fluoresceinderivats als Produkt der Oxidation die Entstehung von Peroxynitrit aus Hydroxylamin im Alkalischen bestätigt werden.

¹ Metallionen katalysieren den oxidativen Zerfall von Peroxynitrit und müssen aus diesem Grund abgefangen werden.

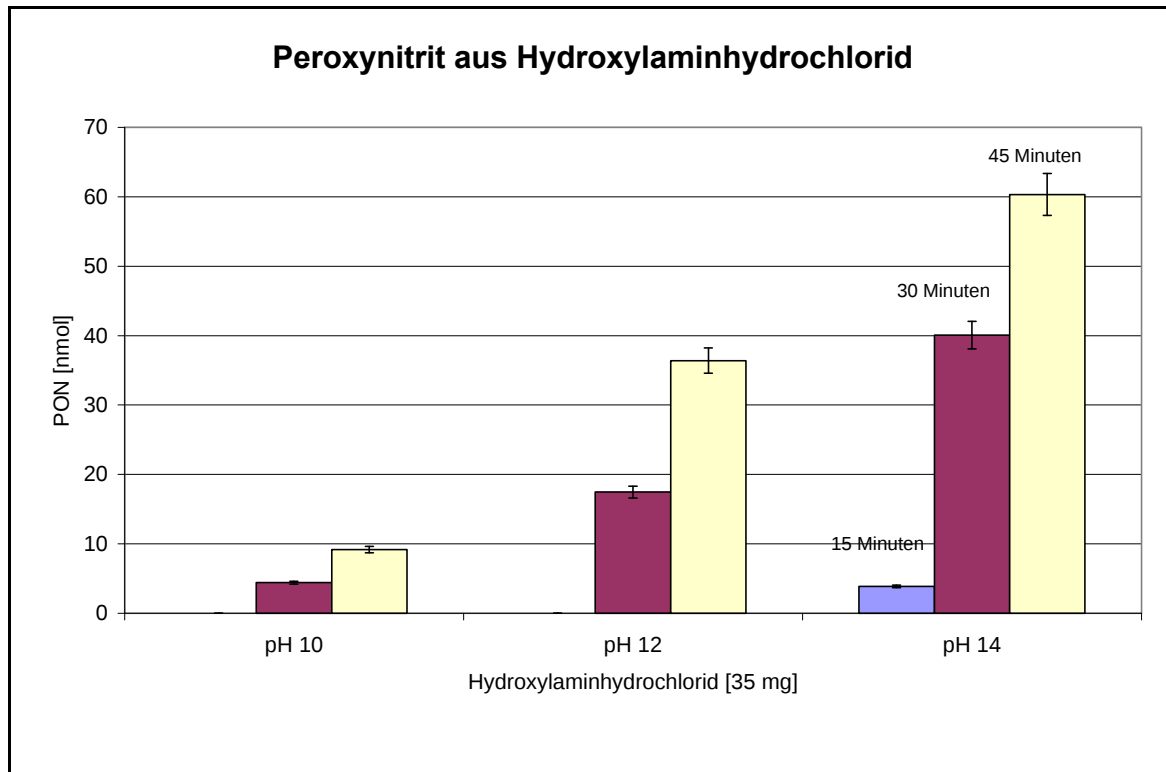


Abbildung 5-4 Entstehung von Peroxynitrit aus Hydroxylamin bei verschiedenen alkalischen pH-Werten

Abbildung 5-4 zeigt die erhaltenen Absorptionen des oxidierten 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat durch Peroxynitrit aus 35,0 mg Hydroxylaminhydrochlorid in Abhängigkeit vom pH-Wert nach verschiedenen Reaktionszeiten.

Mit steigendem pH-Wert und zunehmender Reaktionsdauer nahm die Peroxynitritkonzentration zu. Vor allem stark alkalische Lösungen von pH 14 begünstigten die Entstehung von ONOO^- .

5.4.2 Nachweis mit Hilfe von Superoxiddismutase

Neben der Katalyse des Zerfalls von $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu O_2 und H_2O_2 kann Superoxiddismutase darüber hinaus, wie schon an anderer Stelle bemerkt, die Oxidation von NO^- zu NO hervorrufen^{107, 164, 165}). Aus diesem Grund war es interessant, die NO-Freisetzungsversuche in Gegenwart von SOD durchzuführen. Sollte NO^- ein Intermediat der NO-Freisetzung darstellen, so müßte die NO-Bildung in Anwesenheit

von SOD zu steigern sein. Aufgrund des Stabilitätsoptimums der SOD wurden die Messungen ausschließlich bei pH 7.4 durchgeführt. Abbildung 5-5 zeigt die NO-Freisetzung aus N^ω-Hydroxy-L-arginin, **7b**, **8d**, **9a**, **10b** und Hydroxylaminhydrochlorid in Anwesenheit von SOD. Als Bezugsgröße wurde jeweils der Meßwert bei pH 7.4 in Gegenwart von FeTPPCI / IOPh angegeben, da diese Kombination für die bisher beste NO-Freisetzung bei pH 7.4 ohne Kofaktoren verantwortlich war.

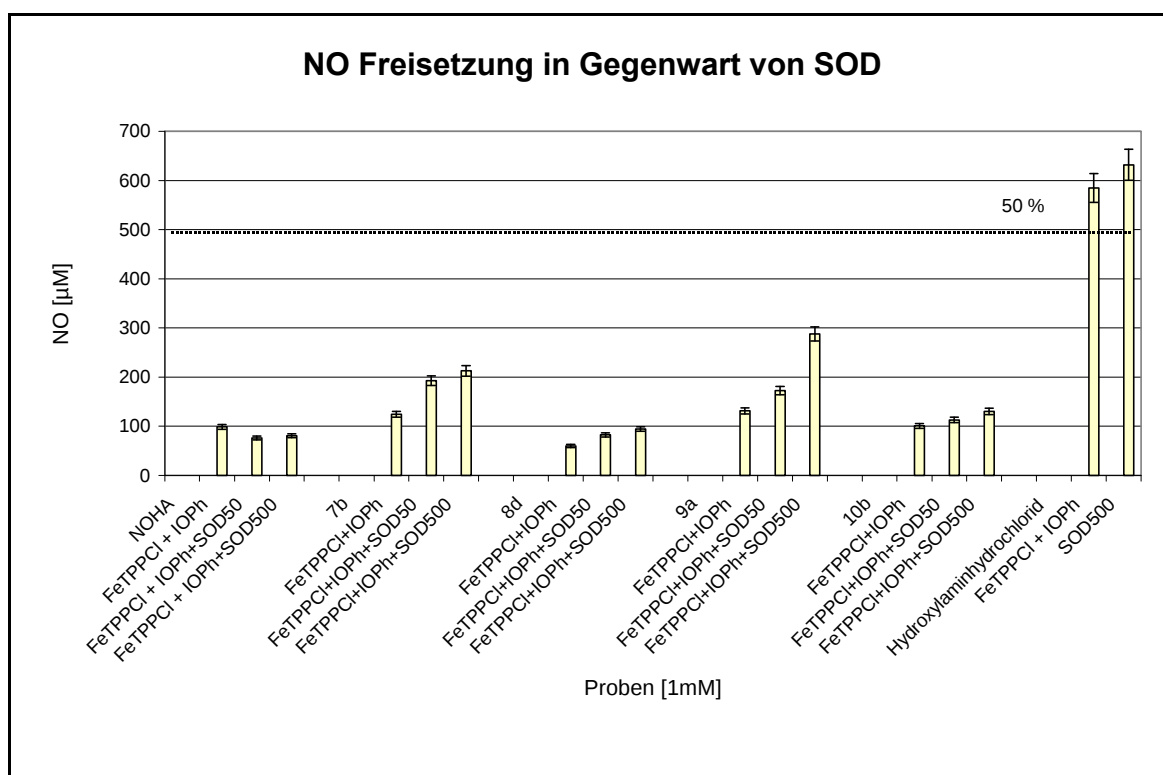


Abbildung 5-5 Vergleich der NO-Freisetzung aus Hydroxylaminhydrochlorid unter dem Einfluß des Oxygenierungssystems und in Gegenwart von SOD bei 37°C, $n = 5$

Während die NO-Bildung aus N^ω-Hydroxy-L-arginin durch SOD-Zusatz nicht zu steigern war, ließ sich die NO-Ausbeute der Hydroxyiminoverbindungen sowie Hydroxylaminhydrochlorid in Gegenwart von SOD deutlich erhöhen. Der Zusatz des FeTPPCI / IOPh-Systems ist bei den Hydroxyiminoverbindungen für die Verschiebung des Hydrolysegleichgewichts auf die Seite von Hydroxylamin und der entsprechenden Oxoverbindungen notwen-

dig. Dagegen erzielte Hydroxylamin bereits ohne Oxygenierungssystem nur in Gegenwart von SOD mit 63,2 % beträchtliche NO-Konzentrationen.

Die hohe NO-Bildung nur in Gegenwart von SOD aus Hydroxylamin, also in Abwesenheit des Oxygenierungssystems oder Iodosobenzols, sowie die deutliche Steigerung der NO-Freisetzung aus den Hydroxyiminoverbindungen nach Zusatz von SOD zum Oxygenierungssystem, ist als indirekter Beweis für die NO-Bildung aus NO⁻ anzusehen.

6 Organische Nitrate als NO-Donatoren

6.1 Literaturübersicht

Zu den wohl bekanntesten Nitrovasodilatoren gehören die organischen Nitrate, Salpetersäureester von ein- oder mehrwertigen aliphatischen oder aromatischen Alkoholen¹⁷⁴). Organische Nitrate dilatieren vorzugsweise das venöse Gefäßbett. Die Vorlast wird gesenkt und das zirkulierende Blutvolumen reduziert, so daß der Sauerstoffbedarf des Herzens abnimmt und die endokardiale Durchblutung verbessert wird¹⁷⁵). Die bislang in die Therapie eingeführten organischen Nitrate (Abbildung 6-1) unterscheiden sich kaum in ihren pharmakodynamischen, sehr dagegen in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften¹⁷⁶).

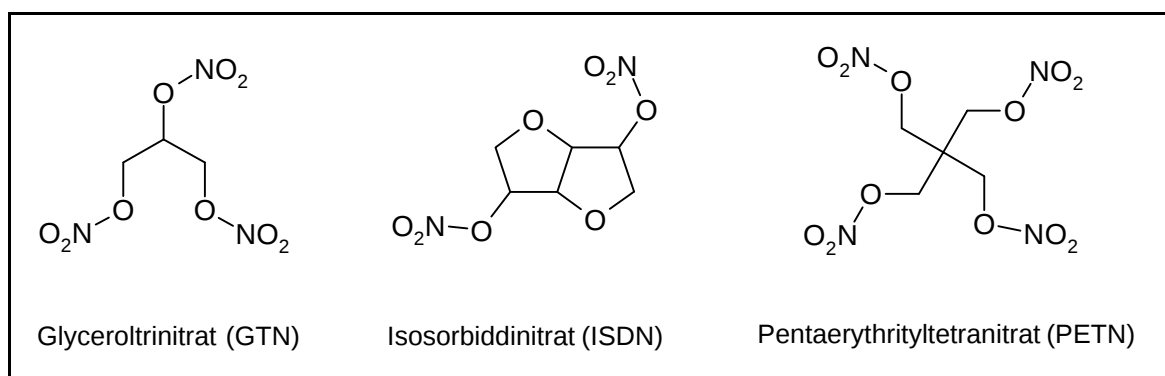


Abbildung 6-1 Auswahl der in der Therapie befindlichen organischen Nitrate

Glyceroltrinitrat wird zur Akuttherapie der Angina pectoris eingesetzt, da bei sublingualer Applikation in Form von Zerbeißkapseln oder Nitrosprays seine Wirkung innerhalb von 2-3 Minuten eintritt. Aufgrund seines hohen First-Pass-Effektes ist eine perorale Anwendung nicht zweckmäßig. Dagegen findet Isosorbiddinitrat nach peroraler Applikation aufgrund seiner verzögerten NO-Freisetzung vorwiegend in der Anfallsprophylaxe Anwendung. Pentaerythrityltetranitrat wird intravenös im akuten Angina pectoris Anfall

eingesetzt. Peroral eingenommen dient es ähnlich dem ISDN der Anfallsprophylaxe.

Der wohl bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Glyceroltrinitrat, das bereits seit mehr als 100 Jahren zur Therapie von Angina pectoris eingesetzt wird. Der Stickstoff liegt mit +5 in seiner höchsten Oxidationsstufe vor und muß für die Bildung des aktiven Metaboliten NO reduziert werden. Für diese Bioaktivierung werden in der Literatur enzymatische sowie nicht-enzymatische Mechanismen diskutiert.

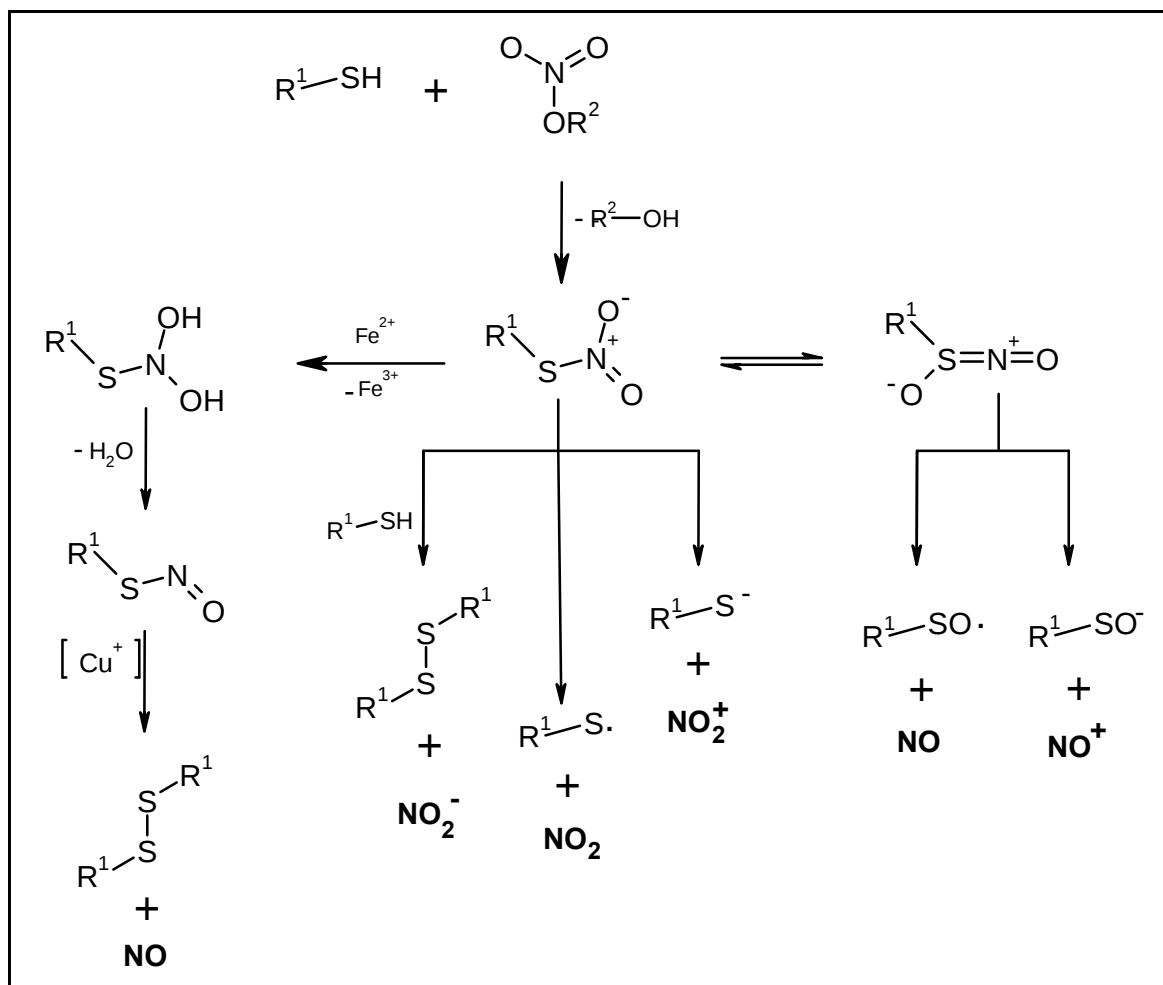
Zu den enzymatischen zählen die Reduktion zum Thionitrit-Ester¹⁷⁷⁾ sowie die Denitrierung durch cytosolische Glutathion-S-transferase¹⁷⁸⁾ oder durch Cytochrom P450 in Gegenwart von NADPH^{81, 179)}.

In Anwesenheit hoher Cysteinkonzentrationen und Bildung von S-Nitrosothiolintermediaten werden auch nicht enzymatische Mechanismen für die NO-Freisetzung verantwortlich gemacht¹⁸⁰⁾.

Unabhängig von dem Weg der NO-Abgabe scheinen Thiole eine essentielle Rolle zu spielen, so daß Rückschlüsse auf eine NO-Freisetzung über intermediär gebildete S-Nitrosothiole gezogen werden können.

Die meisten Thiole führten bei in vitro Versuchen zur NO-Freisetzung aus Glyceroltrinitrat nur zu Nitrit, das für die vasodilatorische Wirksamkeit physiologisch unbedeutend ist. Lediglich Cystein und Thiosalicylsäure sowie deren Derivate bewirkten zusätzlich eine NO-Freisetzung aus GTN¹⁸¹⁾. Ein häufiges Strukturmerkmal dieser Mercaptogruppen findet sich in der koplanaren Anordnung von Thiol- und Carbonylfunktion im Abstand von 2 C-Atomen²⁾.

Für die NO-Freisetzung aus S-Nitrosothiolen werden verschiedene Wege diskutiert^{1, 91, 182)} (Abbildung 6-2).



Schema 6-1 Verschiedene Wege der NO-Freisetzung aus S-Nitrosothiolen

Allen Wegen gemein ist der nukleophile Angriff des Thiols am Nitratester unter Ausbildung eines Thionitrates. Dieses kann mit einem weiteren Thiolmolekül zum Disulfid und Nitrit reagieren oder homolytisch in NO_2^- und Thiyl-Radikale oder heterolytisch in NO_2^+ und R_1S^- zerfallen (mittlerer Ast). Der linke Ast des Schemas beschreibt die reduktive Bildung von Thionitriten nach Wasserabspaltung, die vor allem unter Cu^+ -Katalyse homolytisch zu NO und dem korrespondierenden Disulfid zerfallen. Darüber hinaus kann eine intramolekulare Umlagerung des Thionitrates zum Sulfinylnitrit führen (rechter Ast), das sowohl homolytisch zu NO und $\text{RSO}^\cdot$ -Radikalen als auch heterolytisch zu NO^+ und RSO^- zerfallen kann. Für das nach längerer Einnahme auftretende Phänomen der Nitrattoleranz¹⁸³⁾ wird neben Cytochrom P450-Mangel und Mangel

an verfügbaren Reduktionsäquivalenten¹⁸⁴⁾ vor allem die Verarmung an intrazellulären Thiolen¹⁸⁵⁾ diskutiert.

6.1.1 Organische Nitrate mit Thiolesterpartialstruktur

Aus diesem Grunde wurden organische Nitrate entwickelt, die für ihre reduktive NO-Freisetzung nicht auf körpereigene Ressourcen angewiesen sind. Diese enthalten neben der essentiellen Salpetersäureesterfunktion eine reaktive Thiolesterpartialstruktur (Abbildung 6-2). Mit SPM 5185 war es gelungen, eine S-Acetylalanyl-Verbindung herzustellen, die am Hund nur geringfügig schlechter vasorelaxierend wirkte als GTN und bei einer Dauerinfusion über einen Zeitraum von 5 Tagen keine Nitrattoleranz zeigte²⁾.

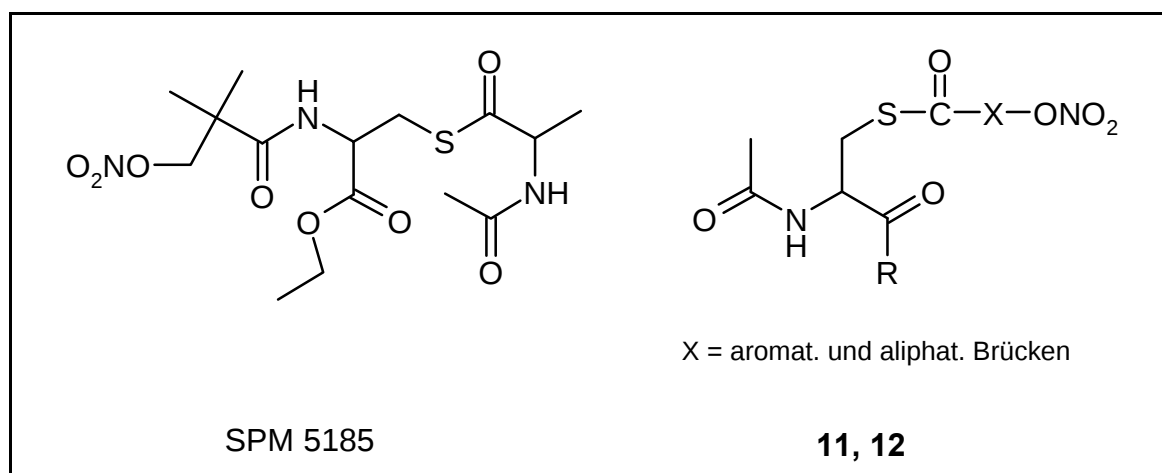


Abbildung 6-2 Organische Nitrate mit Thiolesterpartialstruktur

Im Rahmen von ¹H-NMR-Experimenten wies Fonger¹⁸⁶⁾ für die von ihr synthetisierten S-Nitratoacylierten Cysteinderivate (**11**, **12**) in Gegenwart von N-Acetylcystein das korrespondierende N-Acetylcystein-disulfid nach, das ein charakteristisches Produkt bei der reduktiven Freisetzung von NO aus organischen Nitraten in Gegenwart von Thiolen darstellt. Da die Thiole bei der Reaktion zum Disulfid oxidiert wurden, ging sie von einer Reduktion der Nitrooxygruppe aus.

Versuche an isolierten Rattenaortenringen ergaben eine relaxierende Wirkung für **11a** und **11b**¹⁸⁶). Dabei zeigte sich die Wirksamkeit von organischen Nitraten mit Benzylnitratteilstruktur den aliphatischen Verbindungen überlegen.

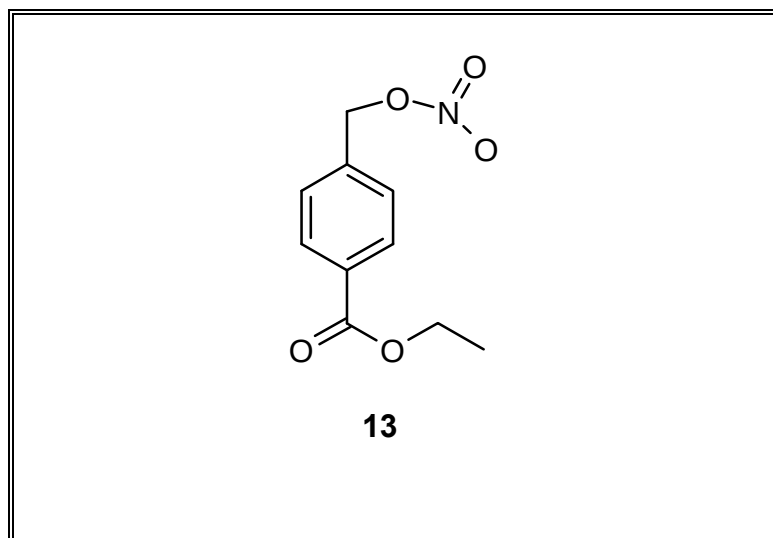
Ausgewählte Vertreter der Hybridmoleküle aus organischen Nitraten und Cysteinderivaten wurden hinsichtlich ihrer NO-Freisetzung in Gegenwart unseres Cytochrom P450-Modellsystems unter verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht. Daß das Modellsystem auch zu Simulationen von Cytochrom P450 vermittelten Reduktionen in der Lage ist, war bereits am Beispiel von Glyceroltrinitrat ausführlich in unserem Arbeitskreis gezeigt worden⁹¹). Dabei wird der reduzierend wirkende Fe(II)-Komplex des katalytischen Zyklus` von Cytochrom P450 aus Fe(III) in Gegenwart von NaBH₄ gebildet.

Die Verbindungen wurden nach der Headspace-Methode vermessen. Zum Vergleich wurde mit einem Benzylnitratderivat (**13**) ein organisches Nitrat herangezogen, daß nicht über eine Thiolstruktur im Molekül verfügt.

6.2 Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen

6.2.1 Benzylnitratderivate

4-Nitrooxymethylbenzoesäureethylester



Formel 6-1

Abbildung 6-3 faßt die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen von **13** zusammen. Bei physiologischem pH-Wert von 7.4 reichte weder ein Reduktionsmittel wie Natriumborhydrid noch der reduktionsaktive Zusatz des Eisenkomplexes aus, um aus Benzylnitrat NO freizusetzen. Erst in Anwesenheit von Cystein war NO detektierbar. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C werden Konzentrationen von 2,67 μM NO in Gegenwart des Modellsystems und Cystein gemessen. Nach 130 minütiger Inkubation war der Wert auf 63,45 μM NO (1,06 %) angestiegen. Nur in Anwesenheit von Cystein war die NO-Ausbeute mit 63,11 μM nahezu identisch. Als Hauptmetabolit entstand jedoch Nitrit in fast 100-fach höherer Konzentration als NO. In Gegenwart von Cystein waren nach 130 Minuten 441,77 μM Nitrit zu verzeichnen, die sich durch zusätzliche Anwesenheit des Modellsystems auf 497,22 μM Nitrit (8,3 %) steigern ließen.

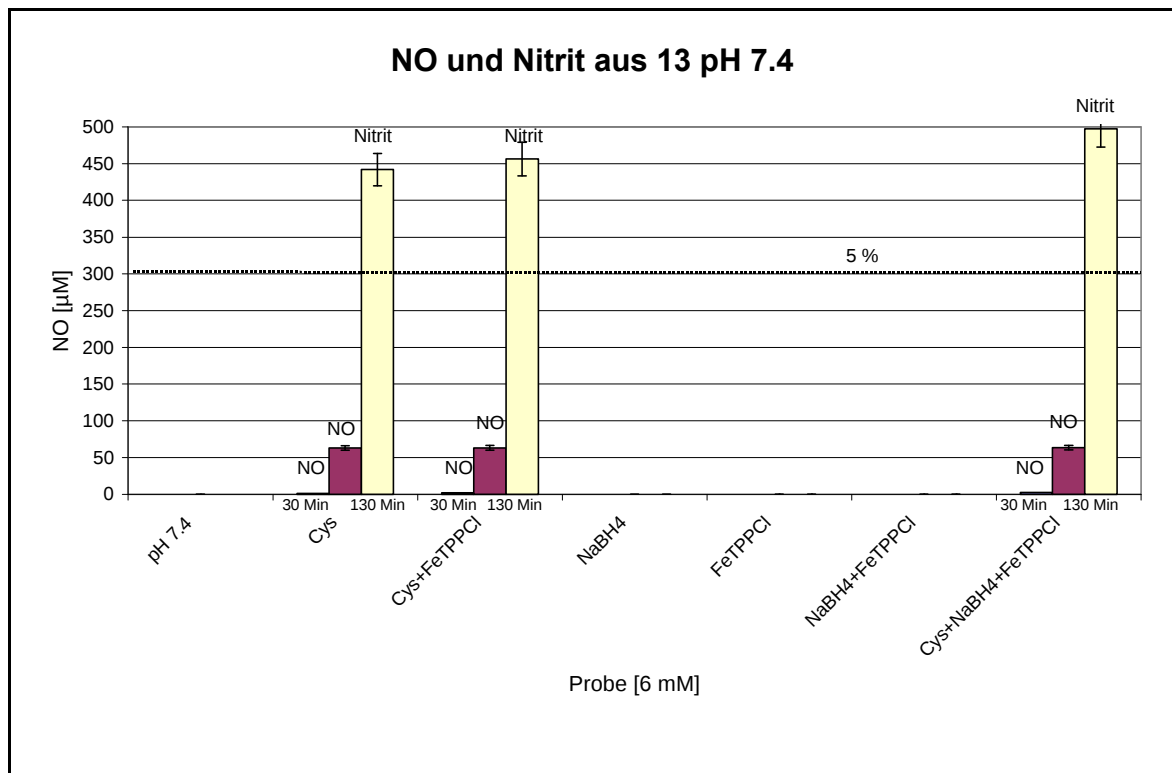
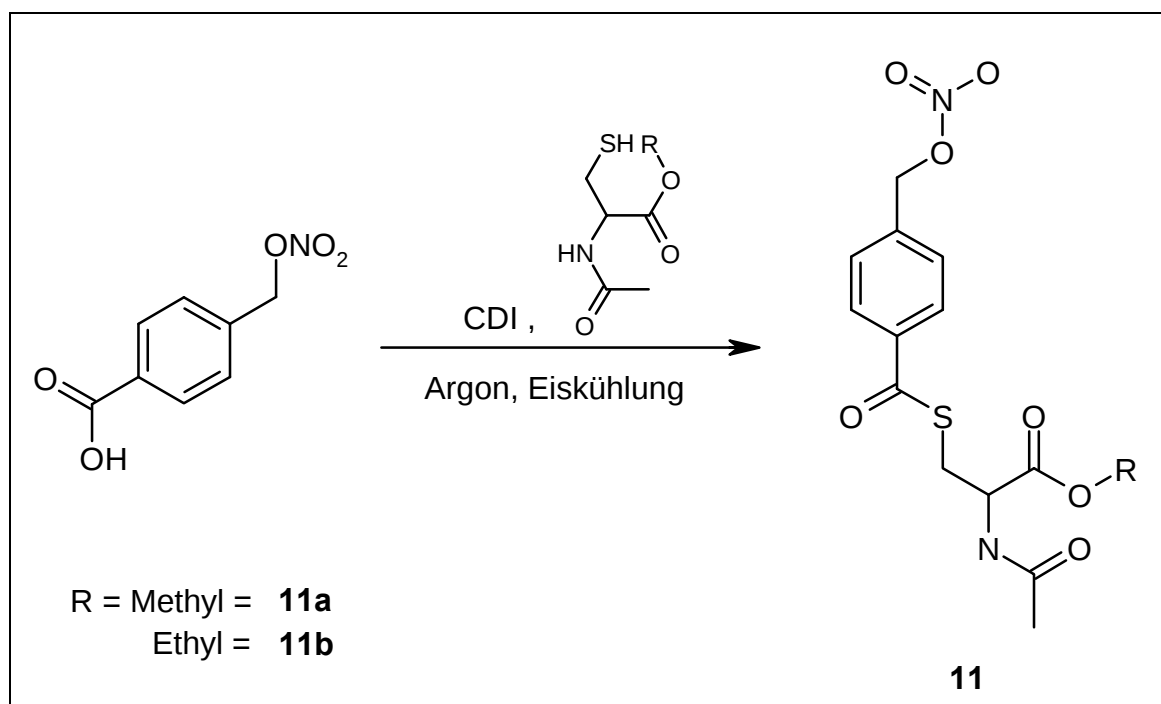


Abbildung 6-3 Vergleich der NO- und Nitrit-Freisetzung aus **13** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

6.2.2 N-Acyl-S-(nitrooxyacyl)-L-cystein-Derivate

Die Darstellung von N-Acyl-S-(nitrooxyacyl)-L-cystein-Derivaten gelingt durch Aktivierung von Nitrooxymethylbenzoesäure mit CDI und anschließender Umsetzung des intermediär gebildeten Azolids mit dem entsprechenden Cystein-Derivat (Schema 6-2)¹⁸⁶.



Schema 6-2 Darstellung von **11a** und **11b**

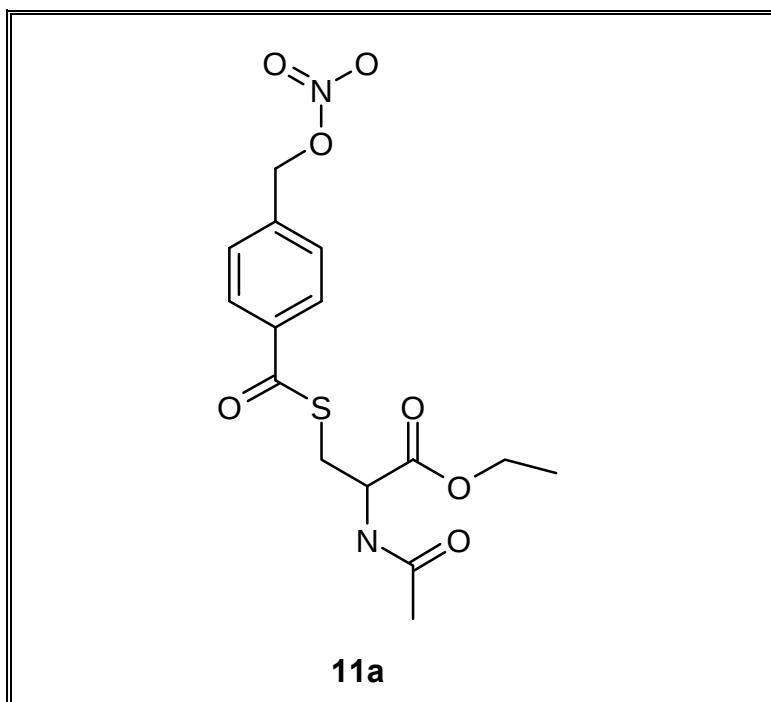
N-Acetyl-S-(4-nitrooxymethylbenzoyl)-L-cysteinethylester (**11a**)**Formel 6-2**

Abbildung 6-4 beschreibt die Ergebnisse der NO-Freisetzung aus **11a**. Nach 30 minütiger Inkubation war unter keinen Bedingungen NO nachzuweisen. Erst nach 130 Minuten konnten geringe Mengen NO detektiert werden. Ohne Anwesenheit von Cystein war keine Freisetzung festzustellen. Die NO-Konzentration ließ sich in Anwesenheit des Modellsystems und Cystein auf 4,8 μM gegenüber Cystein (0,91 μM) steigern. Nitrit war auch hier mit 20-fach höherer Konzentration als NO der Hauptmetabolit. In Gegenwart von Cystein ergab sich eine Konzentration von 73,39 μM Nitrit, die sich bei zusätzlicher Anwesenheit des Modellsystems auf 97,22 μM (1,62 %) erhöhte.

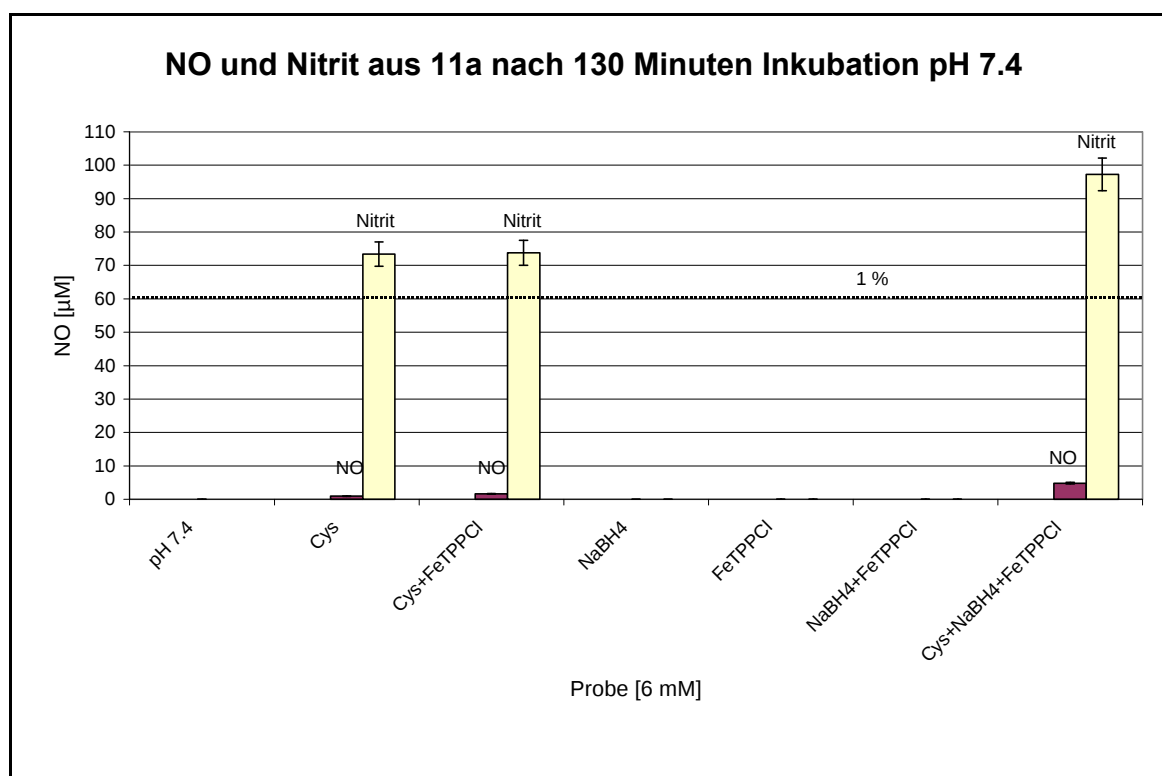
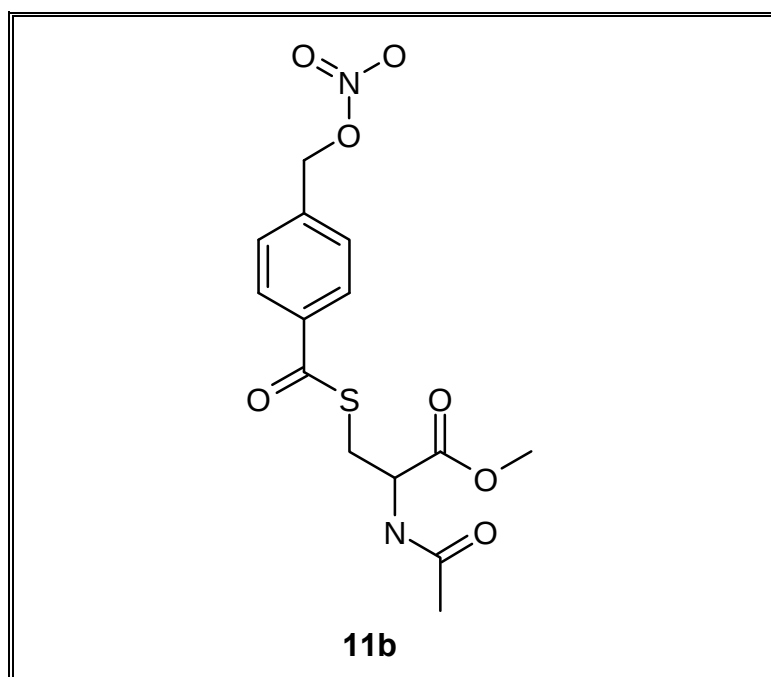


Abbildung 6-4 Vergleich der NO- und Nitrit-Freisetzung aus **11a** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

N-Acetyl-S-(4-nitrooxymethylbenzoyl)-L-cysteinmethylester (**11b**)**Formel 6-3**

Aus Abbildung 6-5 sind die Ergebnisse der NO-Freisetzung aus **11b** zu entnehmen. Die Substanz unterscheidet sich nur geringfügig von **11a**, so daß eine ähnliche Freisetzungsscharakteristik zu erwarten war. Nach 30 Minuten Inkubationszeit war auch hier kein NO zu messen. Erst nach 130 Minuten konnte ausschließlich in Gegenwart von Cystein NO in einer Konzentration von 0,79 μM detektiert werden. In zusätzlicher Anwesenheit des Komplexsystems wurde der Wert noch einmal leicht gesteigert (3,78 μM). Die Nitritbildung war wie in den vorangegangenen Experimenten der NO-Bildung weit überlegen. In Gegenwart von Cystein konnten 65,98 μM Nitrit nachgewiesen werden, während die Gegenwart des Eisenkomplexes die Konzentration noch einmal auf 88,64 μM (1,48 %) erhöhte.

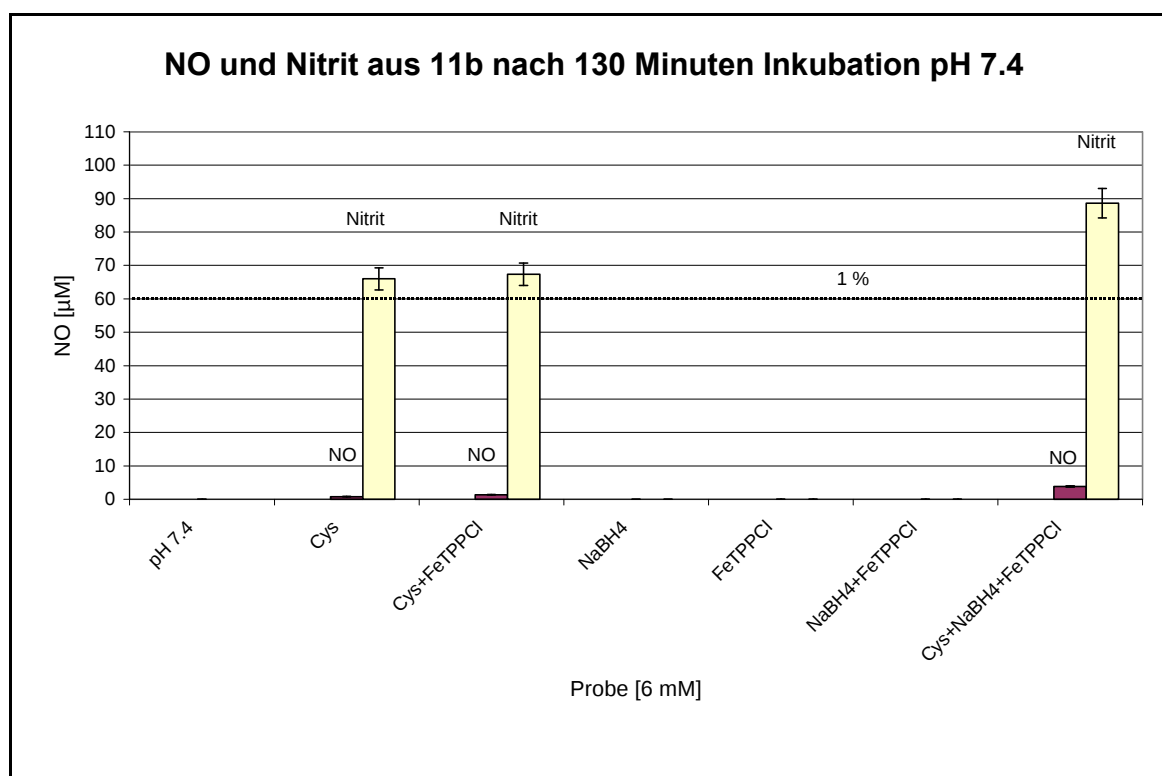
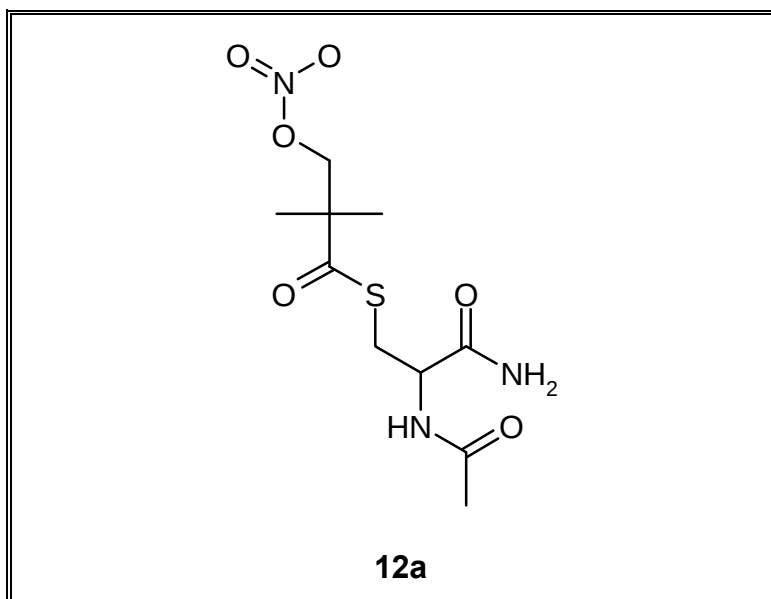


Abbildung 6-5 Vergleich der NO- und Nitrit-Freisetzung aus **11b** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

N-Acetyl-S-(3-nitrooxypivaloyl)-L-cysteinamid (**12a**)**Formel 6-4**

Die Verbindung **12a** kann aus der Umsetzung von N-Acetyl-L-cysteinamid mit 3-Nitrooxypivalinsäure und CDI gewonnen werden¹⁸⁶).

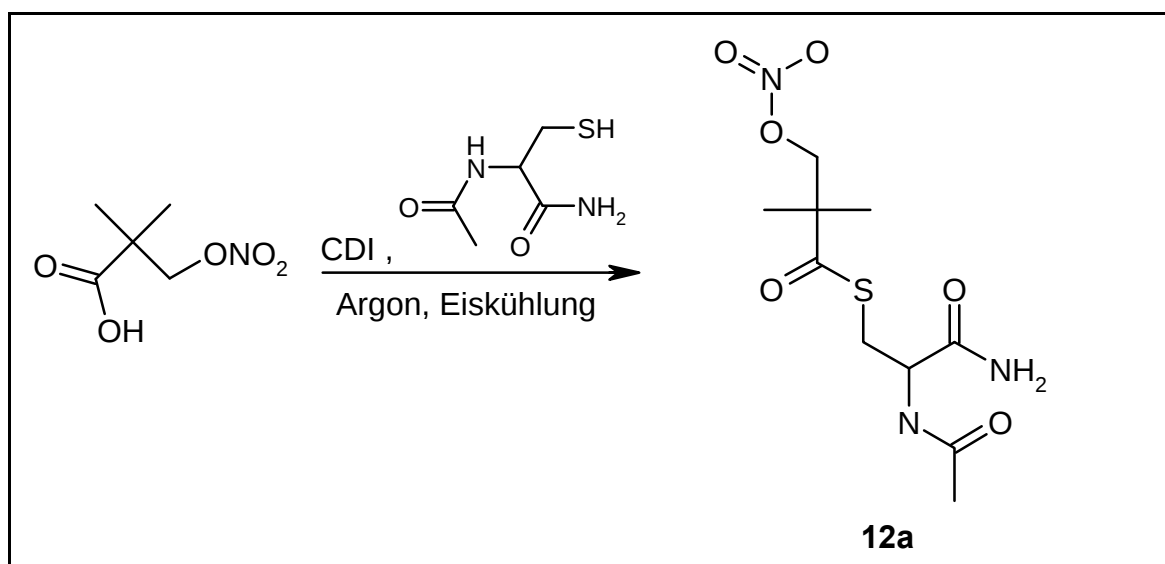
**Schema 6-3** Darstellung von **12a**

Abbildung 6-6 gibt die Ergebnisse der NO-Freisetzung aus **12a** wieder. Analog den aromatischen Vertretern war auch hier eine NO-Bildung an die Anwesenheit von Cystein gebunden und mit 0,66 μM erst nach 130 Minuten Inkubation bei 37°C feststellbar. Der Zusatz des Modellsystems vermochte diesen Wert auf 3,4 μM (0,057 %) zu steigern. Nitrit wurde ebenfalls nur in Gegenwart von Cystein gemessen (66,72 μM). Auch hier wirkte sich der Zusatz des Modellsystems mit 87,98 μM steigernd auf die Nitritbildung aus (1,47 %).

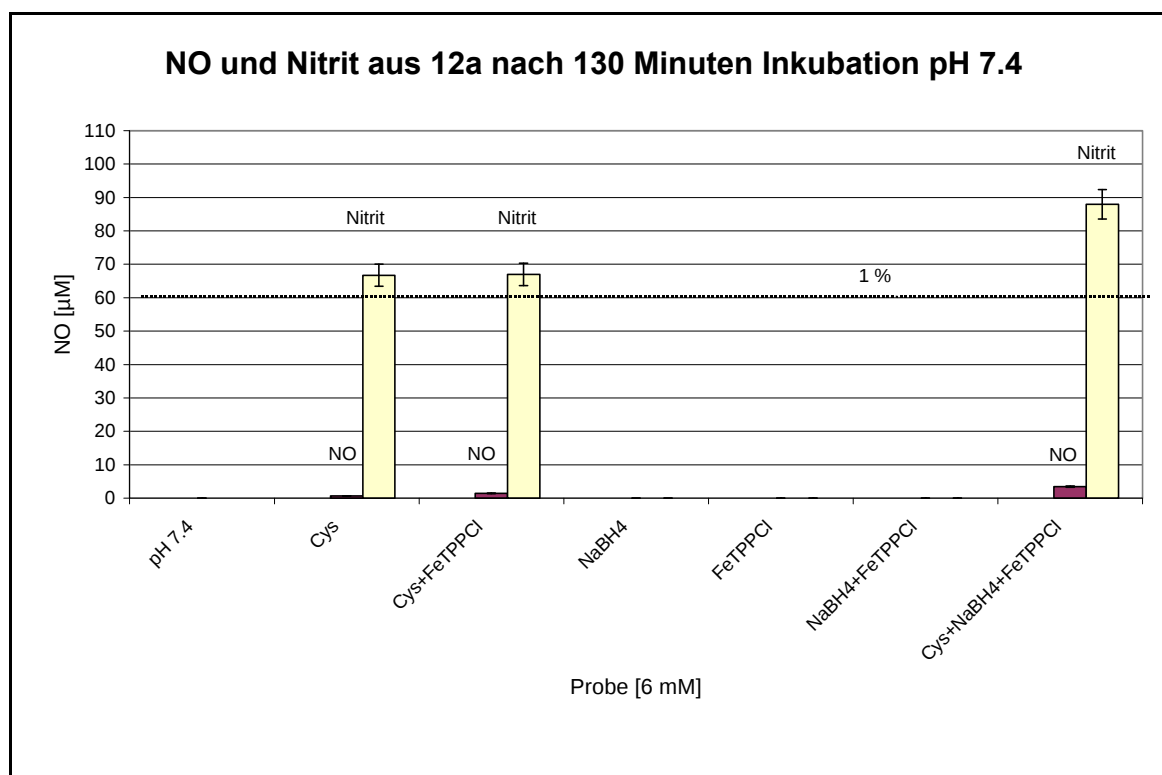


Abbildung 6-6 Vergleich der NO- und Nitrit-Freisetzung aus **12a** unter dem Einfluß verschiedener Aktivierungsbedingungen bei 37°C, $n = 5$

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Wenn auch als Hauptmetabolit bei der reduktiven Freisetzung generell Nitrit entstand, so war NO für alle untersuchten Verbindungen eindeutig nachzuweisen. Dabei war in allen Fällen das Auftreten von NO fest an die Anwesenheit von Cystein gebunden. Ein Einfluß der integrierten Thiolesterpartialstruktur auf die reduktive Freisetzung von NO konnte mit Hilfe des Modellsystems nicht eindeutig bewiesen werden. Zwar stieg die NO-Freisetzung in Gegenwart des Komplexes leicht an, jedoch weist die Vergleichssubstanz ohne Thiolesterpartialstruktur **13** diese Zunahme der NO-Konzentration ebenfalls auf.

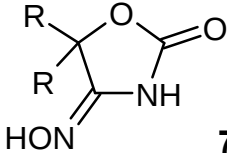
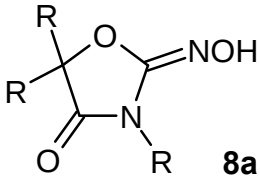
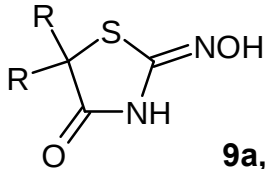
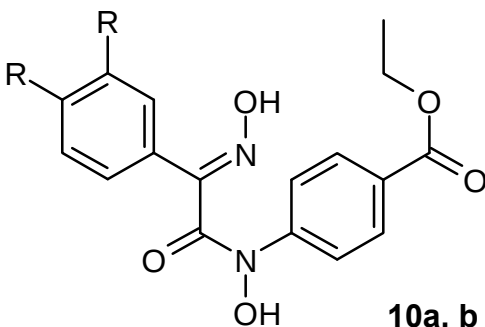
Über die Bildung von Nitrat unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen können keine eindeutigen Aussagen gemacht werden, da Nitrat generell bereits ohne jeglichen Zusatz von Kofaktoren gefunden werden konnte. Dagegen war eine Entstehung von Nitrit ohne Zusatz der Kofaktoren nicht zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). In jedem Fall gelang es, die Funktion dieser organischen Nitrate als NO-Donatoren auch am Modellsystem nachzuvollziehen. Die Reaktion zu Nitrit war dabei generell dominierend.

7 Zusammenfassung

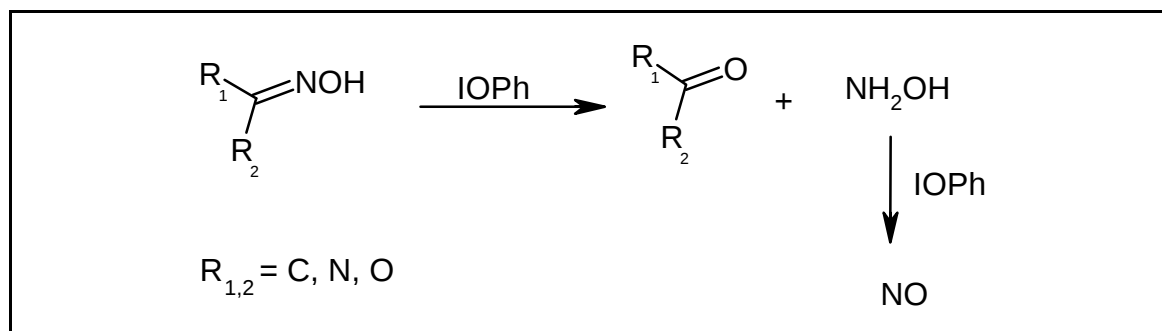
Die vorliegende Arbeit behandelt schwerpunktmäßig die NO-Freisetzung von bisher nicht untersuchten Verbindungsklassen mit Hydroxyimino-Partialstruktur unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Ein möglicher Einfluß von Cytochrom-P450 auf die NO-Freisetzung wurde durch ein erprobtes Modellsystem aus einem niedermolekularen Eisenkomplex und Iodosobenzol als Sauerstoffdonator imitiert. Zur quantitativen Bestimmung des aus den untersuchten Amidoximen (**7**), N-Hydroxyisoharnstoffen (**8**), N-Hydroxyisothioharnstoffen (**9**), α -Hydroxyiminohydroxamsäuren (**10**) und N^ω-Hydroxy-L-arginin freigesetzten Stickstoffmonoxids wurde die bis in den pikomolaren Bereich empfindliche Chemilumineszenzmethode herangezogen. Abweichend von der bisher in unserem Arbeitskreis eingesetzten Headspace-Methode gelang es, ein Verfahren zu etablieren, das erlaubte, in Flüssigkeiten entstandenes NO in situ zu erfassen. Über die NO-Bestimmung hinaus konnten auch Nitrit und Nitrat als Folgeprodukte von NO in aerober Lösung quantitativ bestimmt werden.

Tabelle 7.1 Hinsichtlich ihrer oxidativen NO-Freisetzung untersuchte Verbindungsklassen

Substanzklasse	Strukturformel
Semizyklische Amidoxime	 7a - c
N-Hydroxyisoharnstoffe	 8a - f
N-Hydroxyisothioharnstoffe	 9a, b
α -Hydroxyiminohydroxamsäuren	 10a, b

Die im Rahmen der Chemilumineszenzmessungen ermittelten Werte deuten auf einen für alle Substanzklassen gemeinsamen Freisetzungsmechanismus über Hydroxylamin als intermediär auftretenden NO-Donor hin.



Schema 7-1 NO-Freisetzung aus Hydroxyiminoverbindungen über intermediär gebildetes Hydroxylamin

Bestätigt wurde diese Arbeitshypothese sowohl durch die kolorimetrische Bestimmung von Hydroxylamin in Gegenwart von 8-Hydroxychinolin als auch durch die HPLC-analytische Identifizierung der korrespondierenden Oxoverbindungen durch Vergleich mit eigens hierfür synthetisierten authentischen Proben.

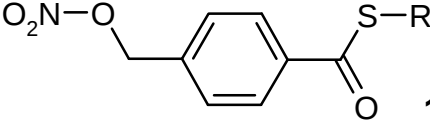
Anschließend wurde der oxidativen Entstehung von NO aus Hydroxylamin nachgegangen. Um aufzuklären, ob NO^- als Intermediat auftritt, wurde zunächst versucht, Peroxynitrit als Reaktionsprodukt von NO^- und O_2 nachzuweisen. Ein kolorimetrischer Nachweis von Peroxynitrit beruht auf der Oxidation von 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat. Obwohl H_2O_2 , NO und O_2^- diese Oxidation nicht stören, führte unser Oxygenierungssystem zu falsch positiven Ergebnissen.

Darüber hinaus wurde die NO-Freisetzung aus Hydroxylamin in Gegenwart von Superoxiddismutase untersucht. Dabei gelang es, die NO-Ausbeute deutlich zu steigern, da SOD die Oxidation von NO^- zu NO katalysiert.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine NO-Bildung aus Hydroxylamin über NO^- hin.

Ferner konnte eine reduktive NO-Freisetzung aus neuentwickelten organischen Nitraten, die neben der essentiellen Salpetersäureesterfunktion eine reaktive Thiolesterpartialstruktur besitzen, nachgewiesen werden (Tabelle 7.2).

Tabelle 7.2 Hinsichtlich ihrer reduktiven NO-Freisetzung untersuchte Verbindungsklasse

Substanzklasse	Strukturformel
Nitrooxymethyl- benzoesäurethioester	 11a, b

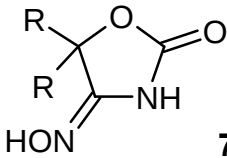
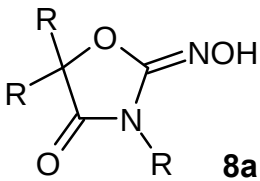
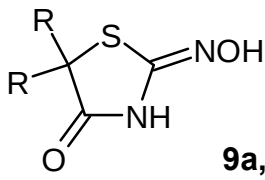
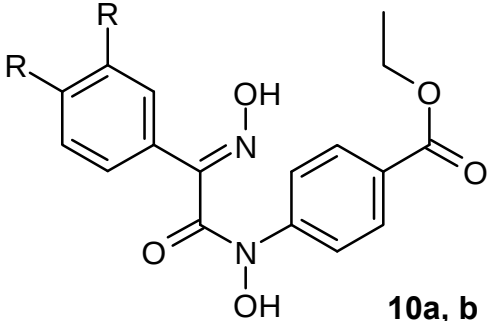
Generell war die Anwesenheit von externen Thiolen für die NO-Bildung unverzichtbar. Ein Einfluß der Thiolesterpartialstruktur auf die NO-Bildung konnte nicht beobachtet werden.

8 Summary

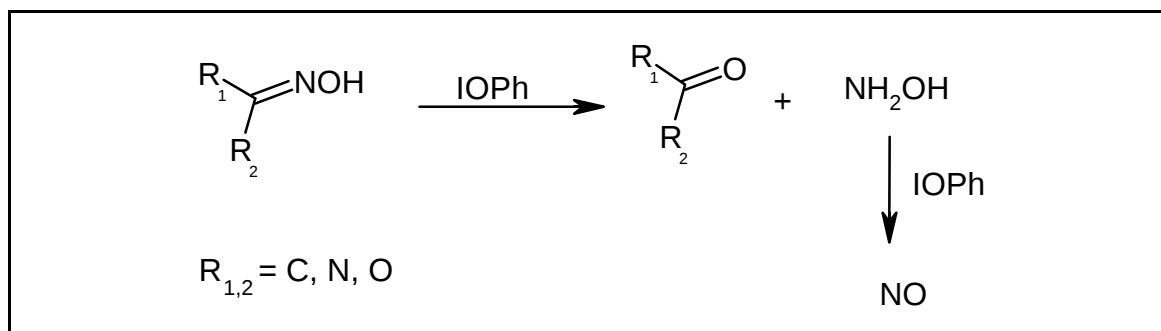
The main objective of this thesis was to investigate NO generation from compounds containing the hydroxyimino structural element under variation of reaction conditions, which, so far, has not been the focus of research.

The possible influence of cytochrom-P450 on such a NO generation was investigated utilizing a proven cytochrom-P450 model system consisting of a low molecular weight iron complex and iodosylbenzene as oxygen source. Nitrogen monoxide from amidoximes (**7**), N-hydroxyisocarbamides (**8**), N-hydroxyisothiocarbamides (**9**), α -hydroxyiminohydroxamic acids (**10**) and N^ω-hydroxy-L-arginine was quantitatively determined by chemiluminescence, which is very sensitive down to the picomolar concentration range. Differing from the usually applied headspace method, a procedure for NO determination in solution was successfully implemented that enabled us to measure its generation in situ. Besides NO, we were also able to determine the products nitrite and nitrate of a NO decay in oxygen containing solutions.

Table 8-1 *Investigated class of compounds with oxidative NO-generation*

Class of Compounds	Structure
Semi-cyclic Amidoximes	 7a - c
N-Hydroxyisocarbamides	 8a - f
N-Hydroxyisothiocarbamides	 9a, b
α -Hydroxyiminohydroxamic acids	 10a, b

Based on the chemiluminescence data a common mechanism for NO generation could be derived for all investigated classes of compounds with the intermediate hydroxylamine as NO donor.



Scheme 8-1 *NO-generation from compounds containing the hydroxyimino structural element via the intermediate hydroxylamine as NO donor*

This hypothetical mechanism was confirmed by colorimetric determination of hydroxylamine in the presence of 8-hydroxy-quinoline as well as by HPLC identification of the corresponding oxo-compounds via comparison with especially synthesized material.

Additionally, the oxidative mechanism for the generation of NO from hydroxylamine was investigated. In order to decide whether NO⁻ plays a role as an intermediate, the NO generation from hydroxylamine was studied in the presence of superoxiddismutase.

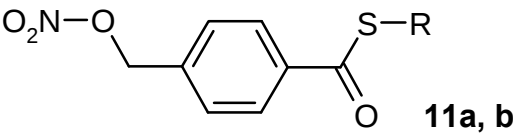
A significant increase in NO yield was observed since SOD catalyzes the oxidation of NO⁻ to NO.

In addition, it was tried to identify peroxynitrite as the reaction product of NO⁻ und O₂. The colorimetric determination of peroxynitrite is based on an oxidation of 2',7'-dichloro-dihydrofluoresceine diacetate. Even though H₂O₂, NO and O₂⁻ do not interfere with such an oxidation, our oxygenation procedures yielded false positive results.

The results, so far, can be interpreted in terms of a NO generation via NO⁻ from hydroxylamine.

Furthermore, a reductive NO generation from newly developed organic nitrates could be confirmed. These nitrates contain a reactive thiolester partial structure besides the nitric acidester function.

Table 8-2 *Investigated class of compounds with reductive NO-generation*

Class of Compound	Structure
Nitro-oxymethylbenzoic acid thioester	 11a, b

In general, the external presence of compounds containing thiol substituents is imperative for the generation of NO. No influence of the thiolester partial structure on the NO generation could be observed.

9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeine Angaben

Elementaranalysen :

C, H, N : Heraeus CHN-O-Rapid, Heraeus (Gießen); Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

Schmelztemperatur :

Schmelzpunktapparatur nach Lindström (unkorrigiert);
Mettler FP 62 (für klarschmelzende Verbindungen mit einem Schmelzpunkt <300 °C).

¹H-NMR Spektren :

Bruker AMX 400 (400 MHz)

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Messungen mit diesem Gerät durchgeführt.

Angabe der chemischen Verschiebung in δ -Werten (ppm), bezogen auf Tetramethylsilan (TMS) als inneren Standard;

Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration;

ein Nachweis der OH-/NH-Protonen erfolgte durch Austausch mit D₂O

Abkürzung der durch Spin-Kopplung auftretenden Signalmultiplizitäten:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett.

¹³C-NMR Spektren :

Bruker AMX 400 (100,62 MHz);

Bruker AMX 250 P (62,90 MHz);

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Messungen mit dem Bruker AMX 400 (100,62 MHz) aufgenommen.

Angabe der chemischen Verschiebung in δ -Werten (ppm), bezogen auf Tetramethylsilan (TMS) als inneren Standard;

die Spektren wurden breitbandentkoppelt und zusätzlich als DEPT-Spektren aufgenommen.

IR-Spektren (KBr) :

Perkin Elmer 1600 FTIR;

Wenn nicht anders vermerkt, wurde für alle IR-Messungen ein KBr Preßling verwendet.

UV-Spektren

Philips PU 8730 UV/Vis-Spektralphotometer (9.6)

Shimadzu UV Visible recording spectrophotometer UV-160 (9.5)

Die Messungen wurden in Quarzküvetten mit einer Dicke von 1 cm vorgenommen. Auf eine Temperierung wurde verzichtet.

Dünnschichtchromatographie (DC) :

DC-Mikrokarten Polygram SIL G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel (Düren),
40 x 80 mm, Schichtdicke 0,25 mm

Alle Untersuchungen wurden über eine Laufstrecke von mindestens
5 cm mit Kammersättigung durchgeführt.

Herstellung der Pufferlösung

Citratpuffer:

pH 4.5 66,4 mL Lösung A + 33,6 mL Lösung B
eingestellt mit 1 M NaOH

Lösung A = 0,1 M Dinatriumcitrat
21,044 g / L Citronensäuremonohydrat in 200 mL 1 M
NaOH lösen
+ Aq. dest. ad 1000 mL

Lösung B = 0,1 M HCl

Phosphatpuffer:

pH 5.5 97,3 mL Lösung A + 2,7 mL Lösung B
eingestellt mit 1 M NaOH

pH 7.4 19,7 mL Lösung A + 80,3 mL Lösung B
eingestellt mit konz. HCl

Lösung A = 1/15 M Kaliumdihydrogenphosphat
9,073 g / L

Lösung B = 1/15 M Dikaliumhydrogenphosphatdihydrat
11,87 g / L

Trockenmittel für organische Phasen:

Wasserfreies Magnesiumsulfat

Gasdichte Spritzen

1,0 mL Hamilton Syringe Model 10015U, Hamilton Company, Reno, U.S.A

100 µL, 50 µL, 25 µL, 10 µL Exmire Microsyringe, ITO Corporation, Fuji, Japan

9.2 NO-Messung

Sievers NOATM280

Sievers Instruments, Boulder, USA

- Empfindlichkeit: < 1 pmol für Flüssigkeiten, < 1 ppb für Gase
- Meßbereich: nM-mM für Flüssigkeiten, < 1-500000 ppb für Gase
- Wiederholbarkeit: ± 5 % für Flüssigkeiten, ± 1 ppb für Gase

Als Inertgas wurde Argon 6.0 der Firma Linde eingesetzt.

Ozon wurde aus Carbogen (95 % O₂ / 5 % CO₂) ebenfalls von der Firma Linde generiert. Der Meßbereich erstreckte sich von 1-400 pmol. Die Peakintegration wurde i.a. bei einem Schwellenwert von 10 und einer Peakbreite von 10 ausgewertet.

9.2.1 Messungen aus flüssigen Systemen

9.2.1.1 Kalibrierung

Für die Messung von NO oder Nitrit:

Aufgrund der quantitativen Umsetzung von Nitrit zu NO mit essigsaurer Kaliumiodidlösung, wurde das Gerät sowohl für die NO-Messung als auch für die Nitritmessung mit einer 50 μM KNO_2 -Lösung kalibriert. Dafür wurden definierte Volumina mittels einer gasdichten Spritze in das Reaktionsgefäß, das 5 mL Kaliumiodidlösung in Eisessig enthielt, injiziert. Aus der Integration der erhaltenen Peakflächen in Abhängigkeit verschiedener Nitritmengen ergab sich folgende Gerade:

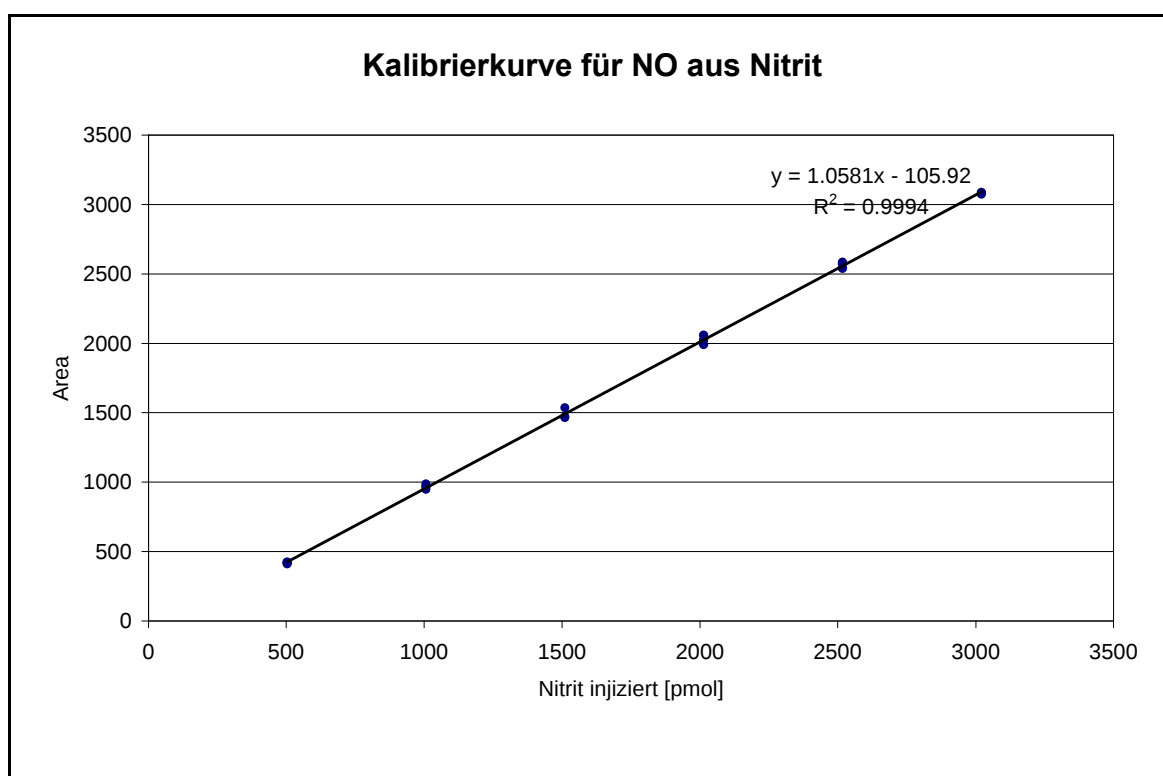


Abbildung 9-1 Kalibriergerade für die Messung von NO und Nitrit aus flüssigen Systemen

Zu Beginn jedes Meßtages wurde mit Hilfe einer frisch verdünnten Kaliumnitritstandardlösung die Genauigkeit der Kalibriergerade überprüft und falls erforderlich, eine neue aufgenommen.

Für die Messung von Nitrat

Die Reduktion von Nitrat zu NO erfolgte mit einer gesättigten VCl_3 -Lösung in 1 N Salzsäure bei 95°C.

Im Reaktionsgefäß wurden 5 mL des Reduktionsmittels vorgelegt, mit Argon anaerobisiert und auf 95°C erhitzt. Mit einer gasdichten Spritze wurden verschiedene Volumina einer 100 μM Kaliumnitratlösung injiziert. Die Erstellung der Kalibriergeraden beruhte auch hier auf der Integration der erhaltenen Peakflächen in Abhängigkeit von der eingesetzten Nitratmenge.

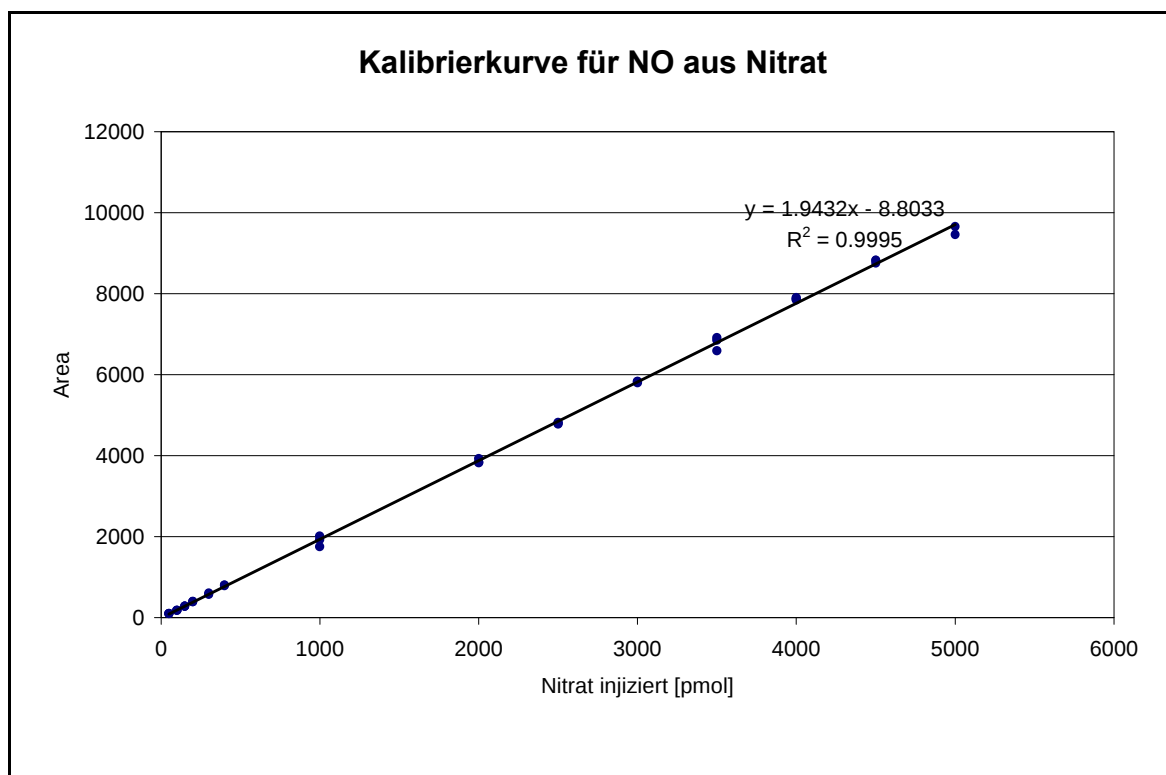


Abbildung 9-2 Kalibriergerade für die Messung von Nitrat aus flüssigen Systemen

Zu Beginn jeder Nitratmessung wurde mit Hilfe einer frisch verdünnten Kaliumnitratstandardlösung die Genauigkeit der

Kalibriergerade überprüft und falls erforderlich, eine neue aufgenommen.

9.2.1.2 *NO-Messung aus den Proben*

In das Reaktionsgefäß (Vessel) wurden das Lösungsmittel sowie die entsprechenden Zusätze in definierten Volumina vorgelegt.

Vesselinhalt:

- je 10 µL Kofaktoren äquimolar zur Probenkonzentration
- 100 U / mL SOD
- 1000 U / mL Katalase
- je 10 µL IOPh oder H_2O_2 in 10-fachem Überschuß zur Probenkonzentration
- je 10 µL FeTPPCI-Komplex äquimolar zur Probenkonzentration
- ad 5,0 mL Lösungsmittel: Ethanol, Citratpuffer pH 4.5, Phosphatpuffer pH 5.5 oder 7.4, Boratpuffer pH 9.0

Probenvolumen:

- 10 µL Probe 1mM ethanolische Lösung

Permanent den Meßaufbau durchströmendes Argon treibt entstandenes NO aus und überführt es in die Meßzelle. Vier Meßwerte pro Sekunde werden aufgezeichnet. Der Abschluß der NO-Freisetzung konnte über den angeschlossenen Monitor verfolgt werden. Mit dieser Methode konnte abweichend von früher in unserem Arbeitskreis durchgeführten Verfahren, in Flüssigkeiten entstandenes NO in situ erfaßt werden.

9.2.1.3 *Nitrit- und Nitrat-Messung aus den Proben*

Um bei der Reaktion in wäßriger Lösung in Gegenwart von Sauerstoff möglicherweise entstandenes Nitrit oder Nitrat zu erfassen, wurde der Versuch analog in einem externen Vial wiederholt.

Nitrit

Vial-Inhalt:

- 50 µL IOPh in 10 fachem Überschuß zur Probenkonzentration
- 50 µL FeTPPCL-Komplex äquimolar zur Probenkonzentration
- 50 µL Probe 10 mM in Ethanol
- ad 2,0 mL Lösungsmittel: Ethanol, Citratpuffer pH 4.5, Phosphatpuffer pH 5.5 und 7.4, Boratpuffer pH 9.0

Probenvolumen, das in das Vessel überführt wird:

- 40 µL Vial-Lösung

Das mit dem gleichen Lösungsmittel gefüllte und einem gasdichten Septum verschlossene Vial wurde mit Argon anaerobisiert und nachfolgend in einem Wasserbad auf 37°C temperiert. Anschließend wurden die Lösungen der Zusätze sowie der Probe mit Hilfe gasdichter Spritzen in das Vial überführt und das Reaktionsgemisch, wenn nicht anders angegeben, über zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgefäß des NOA 280 Analyzer wurde für die Reduktion von Nitrit mit 5 mL Eisessig und Kaliumiodidlösung gefüllt. Nach Abschluß der Inkubation, wurde mit der gasdichten Spritze ein definiertes Volumen des Reaktionsgemisches der Probe in das Reaktionsgefäß des Meßgerätes injiziert und die Daten aufgenommen.

Nitrat

Für die Reduktion von Nitrat wurden 5 mL einer gesättigten Lösung VCl_3 in 1 N Salzsäure in dem Reaktionsgefäß vorgelegt und auf 95°C erhitzt. Um das Gerät vor eintretenden Salzsäuredämpfen zu schützen, wurde ein Gasbubblor, der mit 20 mL 1 N NaOH gefüllt war, zwischengeschaltet. Mit der Probe wurde analog der Nitritbestimmung verfahren. Die bei der Nitratbestimmung ebenfalls miterfaßten Nitritwerte müssen vom Ergebnis abgezogen werden.

9.2.2 Messungen aus dem Headspace

9.2.2.1 Kalibrierung

Für die Messung von NO

Auch für die Headspace-Kalibrierung wurde auf die quantitative Reduktion von Nitrit in Gegenwart von Eisessig und Kaliumiodid zu NO zurückgegriffen. Ein gasdichtes Vial wurde mit 1,5 mL Eisessig und 500 µL Kaliumiodidlösung gefüllt, mit Argon anaerobisiert und auf 37°C temperiert. Zum Start der Reaktion wurden 1.0 mL einer 500 µM Kaliumnitritlösung mit einer gasdichten Spritze über das Septum dem Vial zugeführt. Nach zehn Minuten Inkubationszeit wurden aus dem Gasüberstand der Lösung verschieden definierte Mengen abgenommen und in das ebenfalls anaerobisierte und auf 37°C temperierte Reaktionsgefäß eingebracht. Die Berechnungen der NO-Konzentrationen in Abhängigkeit der injizierten NO-Volumina ergaben folgende Kalibriergerade:

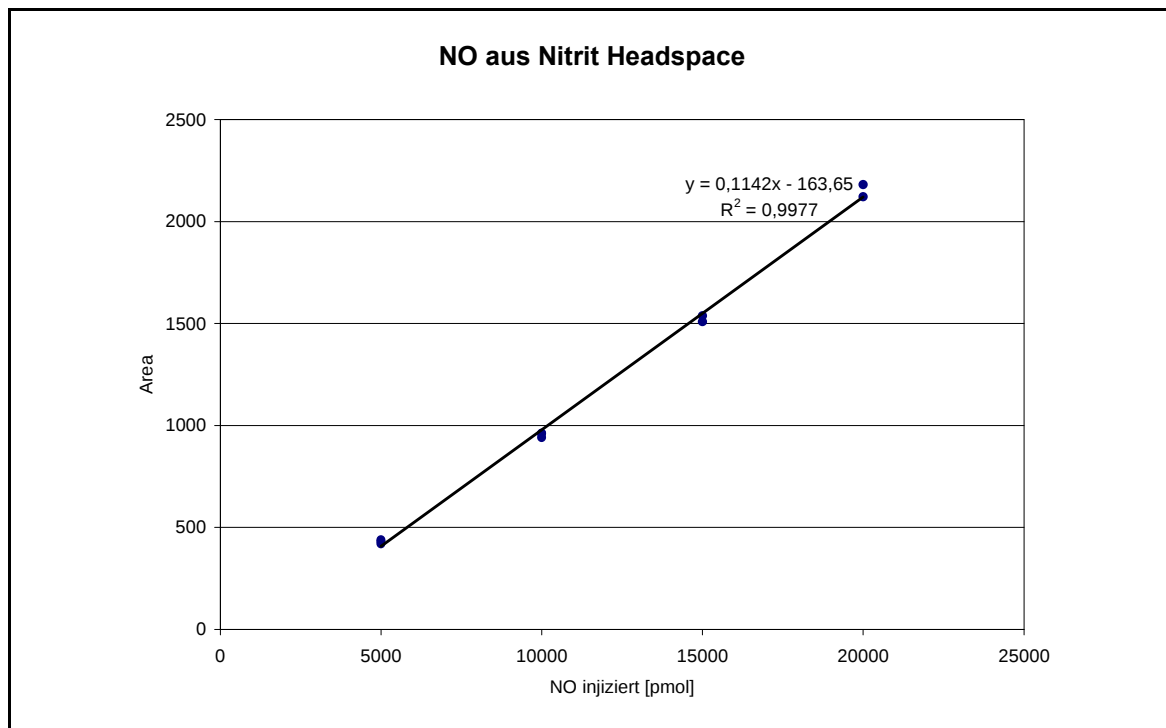


Abbildung 9-3 Kalibriergerade für die Messung von NO aus dem Headspace

Mit Hilfe einer Standardlösung wurde die Genauigkeit der Kalibriergerade zu Beginn jedes Meßtages überprüft.

Für die Messung von Nitrit

Für die Kalibriergerade wurde analog verfahren, mit dem Unterschied, daß 2,0 mL Eisessig eingesetzt wurden, so daß das Gesamtvolumen der Lösung im Vial 3,5 mL betrug.

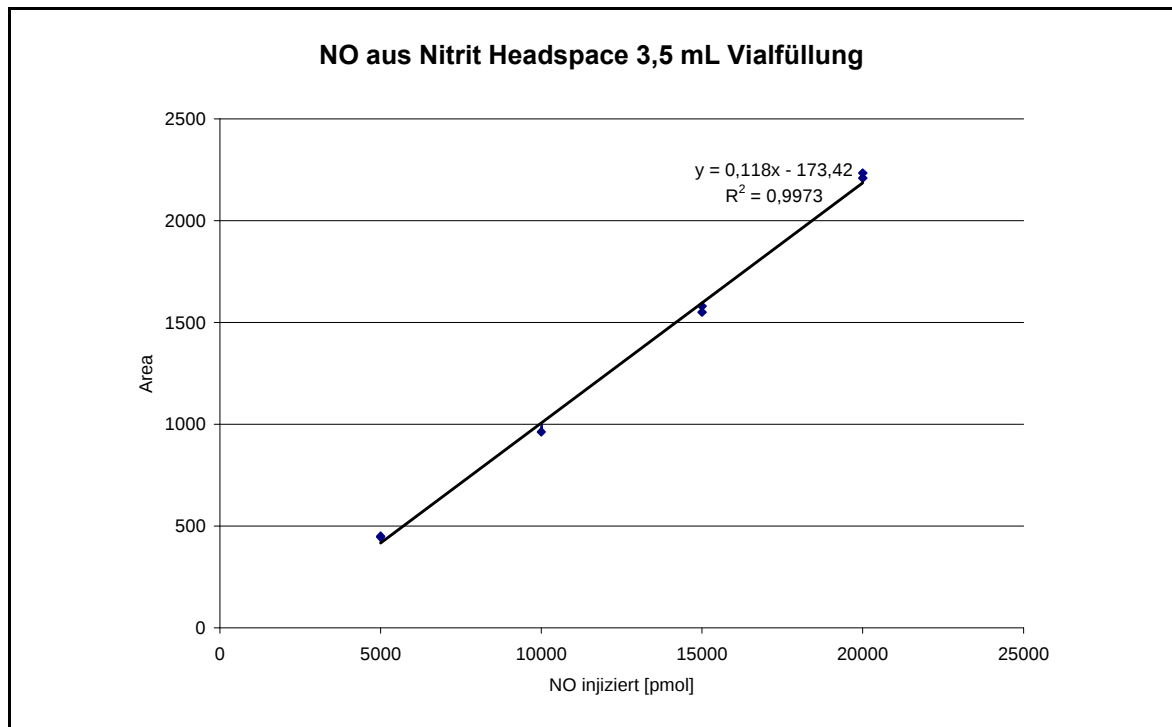


Abbildung 9-4 Kalibriergerade für die Messung von NO aus dem Headspace

9.2.2.2 NO-Messung aus den Proben

Für die NO Messungen aus dem Gasüberstand von Lösungen wurde eine definierte Menge des Lösungsmittels in einem gasdichten Vial anaerobisiert und auf 37°C temperiert. Zum Start der Reaktion wurden sowohl das definierte Volumen der Probenlösung als auch der entsprechenden Zusätze mittels einer gasdichten Spritze in das Vial injiziert und, wenn nichts anderes angegeben ist, über 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

Vial-Inhalt:

- je 500 μL Probe 6 mM ethanolische Lösung
- je 500 μL Kofaktoren äquimolar zur Probenkonzentration
- je 500 μL FeTPPCL-Komplex 100 μM
- ad 3,0 mL Phosphatpuffer pH 7.4

Anschließend wurden 30 μL mit einer gasdichten Spritze aus dem Gasüberstand der Lösungen entnommen und in das Reaktionsgefäß des Chemilumineszenzmeßgerätes eingespritzt. Mit dem Argonstrom wurde das NO in die Meßzelle eingetragen. Die Wasserlöslichkeit von NO von ca. 2 mM wurde durch gleiche Volumina bei der Kalibrierung wie bei der Probenmessung ausgeglichen. Um zu prüfen, wann die NO-Freisetzung abgeschlossen war, wurde in Abständen von 10 – 20 Minuten aus den Probenvials injiziert. Die Meßwerte wurden wie in den vorangegangenen Experimenten alle 25 / 100 Sekunden aufgezeichnet.

9.2.2.3 Nitrit-Messung aus den Proben

Nach Abschluß der NO-Messung wurde den Vials 0,5 mL Kaliumiodid in Eisessig zugesetzt, um aus den organischen Nitraten entstandenes Nitrit zu erfassen. Aus dem Gasüberstand der Vials wurden wiederum 30 μL entnommen, in das Vessel eingespritzt und die Daten aufgezeichnet.

9.2.3 Meßdaten der Chemilumineszenz-Bestimmung

Tabelle 9-1 NO aus **NOHA**, 37°C, n = 5

Bedingungen	NO [μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	136.6	9.22
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	176.77	9.02
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	88.1	14.12
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	99.09	7.20
pH 9	0	
pH 9+IOPh	50.95	7.26
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	88.1	7.45
Ethanol	0	
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+IOPh	0	
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	0	

Tabelle 9-2 Nitrit aus **NOHA**, 37°C, n = 5

Bedingungen	Nitrit [μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	441.2	6.97
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	464	6.39
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	332	8.91
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	387.6	13.21
pH 9	0	
pH 9+IOPh	295.6	9.77
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	298.8	9.56

Tabelle 9-3 Nitrat aus **NOHA**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrat [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	113.48	10.35
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	171.64	6.91
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	0	
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	0	
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	0	

Tabelle 9-4 NO aus **7a**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	247.5	52.48
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	247.56	37.15
pH 5.5	0	
pH 5.5+IOPh	86.93	9.34
pH 5.5+FeTPPCI	0	
pH 5.5+FeTPPCI + IOPh	198.49	9.20
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	122	6.59
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	153.1	25.21
pH7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	34.92	4.49
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	84.07	6.10
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	41.98	3.46
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	58.09	5.24

Tabelle 9-5 NO aus **7b**, 37°C, *n* = 5

Bedingungen	NO [μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	74.1	3.21
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	171.8	3.75
pH 5.5	0	
pH 5.5+IOPh	91	1.07
pH 5.5+FeTPPCI	0	
pH 5.5+FeTPPCI + IOPh	101.3	1.73
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	98.65	1.02
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI+IOPh	124.5	1.29
pH 7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	17	2.43
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	28.3	2.03
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	8.69	1.27
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI+IOPh	10.23	0.60

Tabelle 9-6 Nitrit aus **7b**, 37°C, *n* = 5

Bedingungen	Nitrit [μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	858	23.43
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	1176	60.75
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	582.52	8.30
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	667.64	23.19
pH 9	0	
pH 9+IOPh	455.72	15.20
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	523.48	10.66

Tabelle 9-7 Nitrat aus **7b**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrat [μM]	SD
pH 4.5	0.00	
pH 4.5+IOPh	111.20	5.03
pH 4.5+FeTPPCI	0.00	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	139.20	3.60
pH 7.4	0.00	
pH 7.4+IOPh	0.00	
pH 7.4+FeTPPCI	0.00	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	0.00	
pH 9	0.00	
pH 9+IOPh	0.00	
pH 9+FeTPPCI	0.00	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	0.00	

Tabelle 9-8 NO aus **7c**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	389.98	23.41
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	409.17	11.80
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	136.7	10.18
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	183.6	4.68
pH 7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	51.4	2.83
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	114.4	2.20
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	73.99	3.33
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	117.21	9.51

Tabelle 9-9 NO aus **8a**, 37°C, *n* = 5

Bedingungen	NO[μM]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	127.9	5.26
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	237.4	6.84
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	62.37	3.19
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	116.67	4.15
pH 7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	66.9	3.23
pH 9+FeTPPCI + IOPh	71.4	1.49
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	12.13	2.72
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	10.25	2.07

Tabelle 9-10 NO aus **8b**, 37°C, *n* = 5

Bedingungen	NO[μM]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	60.74	2.66
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	74.3	2.68
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	55.1	2.06
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	67.77	5.82
pH 9	0	
pH9+IOPh	33	3.26
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	44.5	2.44
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	9.2	0.50
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	40.7	0.95

Tabelle 9-11 NO aus **8c**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	23.2	4.69
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	39.2	2.73
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	23.5	1.44
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	32.6	3.35
pH 7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	18.8	4.08
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	18.3	3.91
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	0	
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	0	

Tabelle 9-12 NO aus **8c** verschiedene Komplexe, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μM]	SD
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	39.2	3.35
pH7.4+FeTPFPPCI+IOPh	25.2	1.87
pH7.4+MnTPPCI + IOPh	34	3.10
pH7.4+FeMeOTPPCI+IOPh	32.2	1.31

Tabelle 9-13 NO aus **8d**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	51.31	4.67
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	63.3	5.19
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	57.28	6.33
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	60.25	5.14
pH 7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	33	3.63
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	1.42	0.55
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	0	
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI+IOPh	0	

Tabelle 9-14 Nitrit aus **8d**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrit [μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	160.52	7.84
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	193.72	8.63
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	90.92	7.24
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	164.52	5.83
pH 9	0	
pH9+IOPh	73.32	5.29
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	80.12	8.85

Tabelle 9-15 Nitrat aus **8d**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrat [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	264.68	8.97
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	400.4	10.61
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	0	
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	39.08	8.14
pH 9	0	
pH 9+IOPh	0	
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	0	

Tabelle 9-16 NO aus **8e**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	230.4	7.79
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	374.14	6.81
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	119.6	10.59
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	160.4	7.38
pH 9	0	
pH 9+IOPh	26.085	3.96
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	46.025	4.82
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	0	
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	0	

Tabelle 9-17 NO aus **8f**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	146.1	8.76
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	172.9	3.92
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	35.3	2.60
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	45.84	3.07
pH 9	0	
pH 9+IOPh	19.68	4.58
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	21.82	2.57
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	0	
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	0	

Tabelle 9-18 Nitrit aus **8f**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrit [μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	524.68	4.98
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	698	4.53
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	374.12	4.06
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	451.48	3.15
pH 9	0	
pH9+IOPh	301.12	2.47
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	347.52	4.46

Tabelle 9-19 Nitrat aus **8f**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrat [μM]	SD
pH 4.5	250.2	7.27
pH4.5+IOPh	0	
pH4.5+FeTPPCI	420.48	6.46
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	0	
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	0	
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	0	
pH 9	0	
pH9+IOPh	0	
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	0	

Tabelle 9-20 NO aus **9a**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	152.14	8.18
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	168.65	12.69
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	112.6	14.41
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	131.31	2.79
pH 7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	64.24	6.45
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	83.7	5.87
Ethanol	0	
Ethanol + IOPh	67.51	7.40
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol + FeTPPCI + IOPh	75.52	6.94

Tabelle 9-21 Nitrit aus **9a**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrit [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	313.4	5.30
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	542	2.10
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	321.8	4.29
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	518.4	2.29
pH 9	0	
pH9+IOPh	289.8	11.72
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	346	8.36

Tabelle 9-22 Nitrat aus **9a**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrat [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	47.08	3.64
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	84.16	2.83
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	0	
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	0	
pH 9	0	
pH9+IOPh	0	
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	0	

Tabelle 9-23 NO aus **9b**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO[μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	230.02	10.75
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	229.52	8.87
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	167.6	6.76
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	221.6	6.64
pH 7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH9+IOPh	143.8	6.53
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	162.15	4.13
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	60.8	3.17
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	67.79	7.07

Tabelle 9-24 NO aus **10a**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO[μ M]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	72.2	8.63
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	102.2	11.52
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	15.08	4.28
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	17.75	4.82
pH 7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	10.6	3.53
pH9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	11.19	1.81
Ethanol	0	
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+IOPh	11.64	3.96
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	43.8	6.62

Tabelle 9-25 NO aus **10b**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO[μM]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	121.9	9.22
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	132.1	9.85
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	42.4	8.62
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	100.8	6.60
pH7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 9	0	
pH 9+IOPh	42.1	6.96
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	47.6	6.63
Ethanol	0	
Ethanol+IOPh	50.7	7.94
Ethanol+FeTPPCI	0	
Ethanol+FeTPPCI + IOPh	61.76	8.51

Tabelle 9-26 Nitrit aus **10b**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrit [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	245.62	10.20
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	265.32	10.70
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	154.62	10.70
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	209.32	10.39
pH 9	0	
pH 9+IOPh	70.3	7.27
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	74	8.06

Tabelle 9-27 Nitrat aus **10b**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrat [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	463.2	11.36
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	469.2	13.15
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	46.68	11.31
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	155.88	10.79
pH 9	0	
pH9+IOPh	24.32	7.26
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	127.68	10.08

Tabelle 9-28 NO in Gegenwart von Katalase / Cu(II), pH 7.4, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μM]	SD
NOHA		
FeTPPCI + IOPh	99.09	7.20
CuSO ₄ +FeTPPCI+IOPh	110.63	7.99
FeTPPCI + IOPh+Katalase	96.85	3.74
7b		
FeTPPCI + IOPh	124.5	1.29
CuSO ₄ +FeTPPCI+IOPh	304.82	10.78
FeTPPCI + IOPh+Katalase	370.81	7.87
8d		
FeTPPCI + IOPh	60.25	5.14
CuSO ₄ +FeTPPCI+IOPh	148.5	5.51
FeTPPCI + IOPh+Katalase	144.7	9.01
9a		
FeTPPCI + IOPh	131.31	2.79
CuSO ₄ +FeTPPCI+IOPh	207.74	4.02
FeTPPCI + IOPh+Katalase	316.3	6.67
10b		
FeTPPCI + IOPh	100.8	6.60
CuSO ₄ +FeTPPCI+IOPh	132.04	6.09
FeTPPCI + IOPh+Katalase	141.83	9.32

Tabelle 9-29 *NO aus Hydroxylaminhydrochlorid, 37°C, n = 5*

Bedingungen	NO [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH 4.5+IOPh	68.55	5.15
pH 4.5+FeTPPCI	0	
pH 4.5+FeTPPCI + IOPh	198.23	6.36
pH 7.4	0	
pH 7.4+IOPh	447.53	6.01
pH 7.4+FeTPPCI	0	
pH 7.4+FeTPPCI + IOPh	584.65	5.27
pH 7.4+H ₂ O ₂	0	
pH 7.4+Katalase	6.23	0.88
pH 7.4+FeTPPCI+Katalase	6.9	0.80
pH 7.4+FeTPPCI+IOPh+Katalase	982.13	8.47
pH 7.4+CuSO ₄	28.8	5.11
pH 7.4+CuSO ₄ +FeTPPCI	550.44	6.09
pH 7.4+CuSO ₄ +FeTPPCI+IOPh	763.26	4.80
pH 9	0	
pH 9+IOPh	198.13	9.43
pH 9+FeTPPCI	0	
pH 9+FeTPPCI + IOPh	497.76	5.03

Tabelle 9-30 *Nitrit aus Hydroxylaminhydrochlorid, 37°C, n = 5*

Bedingungen	Nitrit [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	32.2	4.00
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	98.8	1.77
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	305.2	1.30
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	308.8	3.32
pH 9	0	
pH9+IOPh	293.2	5.80
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	307.2	3.39

Tabelle 9-31 Nitrat aus Hydroxylaminhydrochlorid, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	Nitrat [μM]	SD
pH 4.5	0	
pH4.5+IOPh	122.51	5.91
pH4.5+FeTPPCI	0	
pH4.5+FeTPPCI + IOPh	490.01	8.17
pH 7.4	0	
pH7.4+IOPh	0	
pH7.4+FeTPPCI	0	
pH7.4+FeTPPCI + IOPh	0	
pH 9	0	
pH9+IOPh	63.48	2.98
pH9+FeTPPCI	0	
pH9+FeTPPCI + IOPh	187.04	9.76

Tabelle 9-32 NO in Gegenwart von SOD, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO[μ M]	SD
NOHA		
FeTPPCI + IOPh	99.09	7.20
FeTPPCI + IOPh+SOD50	76.2	6.72
FeTPPCI + IOPh+SOD500	80.81	7.15
7b		
FeTPPCI+IOPh	124.5	1.29
FeTPPCI+IOPh+SOD50	192.82	7.42
FeTPPCI+IOPh+SOD500	212.86	6.64
8d		
FeTPPCI+IOPh	60.25	5.14
FeTPPCI+IOPh+SOD50	82.65	10.74
FeTPPCI+IOPh+SOD500	94.72	8.34
9a		
FeTPPCI+IOPh	131.31	2.79
FeTPPCI+IOPh+SOD50	172.74	7.67
FeTPPCI+IOPh+SOD500	287.87	9.42
10b		
FeTPPCI+IOPh	100.8	6.60
FeTPPCI+IOPh+SOD50	113.06	5.85
FeTPPCI+IOPh+SOD500	130.48	6.61
Hydroxylaminhydrochlorid		
FeTPPCI + IOPh	584.65	5.27
SOD500	631.95	13.67

Tabelle 9-33 *NO-Freisetzung in Abhängigkeit der Iodosobenzolkonzentration, 37°C, n=5*

Probe IOPh 10	NO [μ M]	SD
NOHA	88.1	14.12
7b	98.65	1.02
8d	57.28	6.33
9a	112.6	14.41
10b	42.4	8.62
Probe IOPh äquimolar	NO [μ M]	SD
NOHA	27.69	4.14
7b	67.3	3.92
8d	6.85	0.80
9a	91.1	4.58
10b	29.8	6.16
Probe IOPh 1/10	NO [μ M]	SD
NOHA	18.15	3.47
7b	20.18	3.08
8d	0	
9a	83.08	3.99
10b	13.14	2.45

Tabelle 9-34 NO und Nitrit aus **13**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μ M] 30Min	SD
pH 7.4	0	
Cys	1.22	0.53
Cys+FeTPPCI	2.15	0.38
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	2.67	0.11
Bedingungen	NO [μ M] 130Min	SD
pH 7.4	0	
Cys	63.11	5.83
Cys+FeTPPCI	63.27	7.24
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	63.45	10.11
Bedingungen	Nitrit [μ M] 130Min	SD
pH 7.4		
Cys	441.77	11.40
Cys+FeTPPCI	456.31	11.43
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	497.22	7.70

Tabelle 9-35 NO und Nitrit aus **11a**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μ M] 30Min	SD
pH 7.4	0	
Cys	0	
Cys+FeTPPCI	0	
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Bedingungen	NO [μ M] 130Min	SD
pH 7.4	0	
Cys	0.905	0.16
Cys+FeTPPCI	1.62	0.42
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	4.804	0.69
Bedingungen	Nitrit [μ M] 130Min	SD
pH 7.4		
Cys	73.39	6.74
Cys+FeTPPCI	73.79	5.64
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	97.22	8.08

Tabelle 9-36 NO und Nitrit aus **11b**, 37°C, $n = 5$

Bedingungen	NO [μ M] 30Min	SD
pH 7.4	0	
Cys	0	
Cys+FeTPPCI	0	
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Bedingungen	NO [μ M] 130Min	SD
pH 7.4	0	
Cys	0.7865	0.15
Cys+FeTPPCI	1.34	0.23
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	3.799	0.24
Bedingungen	Nitrit [μ M] 130Min	SD
pH 7.4		
Cys	65.98	10.42
Cys+FeTPPCI	67.32	7.95
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	88.64	11.14

Tabelle 9-37 NO und Nitrit aus **12a**, 37°C, n = 5

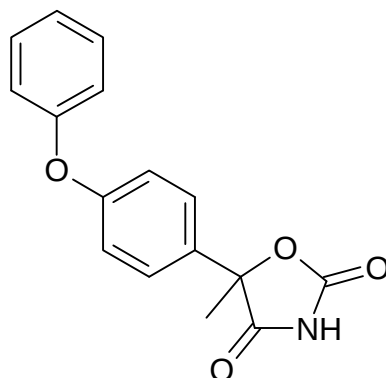
Bedingungen	NO [μ M] 30Min	SD
pH 7.4	0	
Cys	0	
Cys+FeTPPCI	0	
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Bedingungen	NO [μ M] 130Min	SD
pH 7.4	0	
Cys	0.6578	0.13
Cys+FeTPPCI	1.43	0.11
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	3.421	0.09
Bedingungen	Nitrit [μ M] 130Min	SD
pH 7.4		
Cys	66.72	7.98
Cys+FeTPPCI	66.98	4.82
NaBH ₄	0	
FeTPPCI	0	
NaBH ₄ +FeTPPCI	0	
Cys+NaBH ₄ +FeTPPCI	87.98	6.51

9.3 Synthese der Oxoverbindungen

1 mmol der betreffenden Hydroxyiminoverbindung wurde in 20 mL Methanol gelöst und bei Umgebungstemperatur tropfenweise mit 3 mL 12,5 % iger HCl versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 10 Stunden rückfließend erhitzt. Nach Abschluß der Hydrolyse wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der verbleibende Rückstand mit Na₂CO₃-haltigem Wasser neutralisiert und mit Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethan-Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. Der erhaltene

Rückstand wurde in 2-3 mL Dichlormethan aufgenommen und mit Ethylacetat / n-Hexan (1 / 3) säulenchromatographisch getrennt. Nach Abrotieren des Elutionsmittels wurde das gewonnene Rohöl aus Ether / Petrolether zur Kristallisation gebracht.

5-Methyl-5-(4-phenoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (**14b**)



Ausbeute: 65 %

Schmp : 116°C

IR (KBr): (C=O) 1825 cm⁻¹, 1731 cm⁻¹

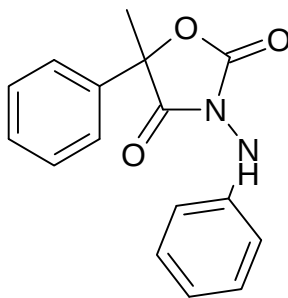
¹H-NMR: (DMSO-d₆), δ (ppm) = 1.82 (s, 3H, CH₃), 6.91-7.53 (m, 10H, arom.H), 11.36 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR: (DMSO-d₆), δ (ppm) = 23.3 (CH₃), 85.2 (C quart.), 118.3, 119.0, 123.9, 126.5, 130.1 (C. tert., arom.), 134.1, 154.2, 155.7, 155.9 (C. quart., arom.), 157.2 (C=O), 174.8 (C=O)

C₁₆H₁₃NO₄ [283.29]

Ber. [%]	C 67.84	H 4.63	N 4.94
----------	---------	--------	--------

Gef. [%]	C 67.59	H 4.60	N 5.01
----------	---------	--------	--------

5-Methyl-5-phenyl-3-phenylamino-oxazolidin-2,4-dion (**15d**)

Ausbeute:	70 %		
Schmp :	166 °C		
IR (KBr):	(C=O) 1824 cm ⁻¹ , 1755 cm ⁻¹		
¹ H-NMR:	(DMSO-d ₆), δ (ppm) = 2.02 (s, 3H, CH ₃), 6.81-7.63 (m, 10H, aromat.H), 8,6 (s, 1H, NH)		
¹³ C-NMR:	(DMSO-d ₆), δ (ppm) = 23.5 (CH ₃), 84.6 (C quart.), 112.2, 120.5, 124.6, 129.0, 129.1, 129.3 (C tert., aromat.) 136.1, 145.3 (C quart., aromat.), 152.8 (C=O), 172.1 (C=O)		
C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	[282.30]		
Ber. [%]	C 68.08	H 5.00	N 9.92
Gef. [%]	C 68.13	H 5.11	N 9.77

9.4 HPLC-Analytik

System: Niederdruckgradientensystem
Merck Hitachi La Chrom, Darmstadt
DAD-Detektor L-7455
Autosampler L-7200
Pumpe L-7100
Solvent Degasser L-7612
Column Oven L-7350
Peltier Cooling Module for L-7350/7351

Software: Merck D-7000 HPLC System Manager Windows NT 4.0

Stationäre Phase: Nucleogel 250-5 RP18
Licrospher 100 RP18 5 µm 125-4

Mobile Phase: Methanol 40 % Wasser 40 % Acetonitril 20 %
Methanol 40 % Wasser 35 % Acetonitril 25 %

Flußrate: 0,8 mL / Min

Nachsäulenreagenz: Methanol 100%

Injektionsvolumen: 20 µL, 30 µL

9.4.1 Proben

Die Freisetzungsversuche wurden in 1,5 mL HPLC-Vials durchgeführt.

Vial-Inhalt:

- je 25 μ L FeTPPCL 10 mM in Ethanol
- je 25 μ L IOPh 1 mM, 10 mM, 100 mM in Ethanol
- je 25 μ L Probe 10 mM in Ethanol
- ad 1,0 mL Phosphatpuffer pH 7.4

Die Zusätze und das Lösungsmittel wurden in die HPLC-Vials eingefüllt und die Reaktion durch Zugabe der Probe gestartet. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C wurden sie der HPLC-Analytik zugeführt. Untersucht wurde die Entstehung der korrespondierenden Oxoverbindung in Gegenwart von FeTPPCL, in Gegenwart von IOPh, in Gegenwart von FeTPPCL / IOPh sowie nur in Pufferlösung.

9.5 Kolorimetrischer Nachweis von Hydroxylamin

9.5.1 Kalibrierung

Die Vials wurden mit je 1,0 mL 1%-iger ethanolischer 8-Hydroxychinolin-Lösung und 1,0 mL 1 M Na_2CO_3 -Lösung gefüllt, verschlossen und mit Stickstoff entgast. Zur Aufnahme einer Kalibriergerade wurde eine Verdünnungsreihe von Hydroxylaminhydrochlorid in Konzentrationen von 10 – 200 μ M angefertigt. Nach Zusatz von 1,0 mL Probenlösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 700 nm gemessen. Dabei ergab sich die in Abbildung 9-5 dargestellte Gerade.

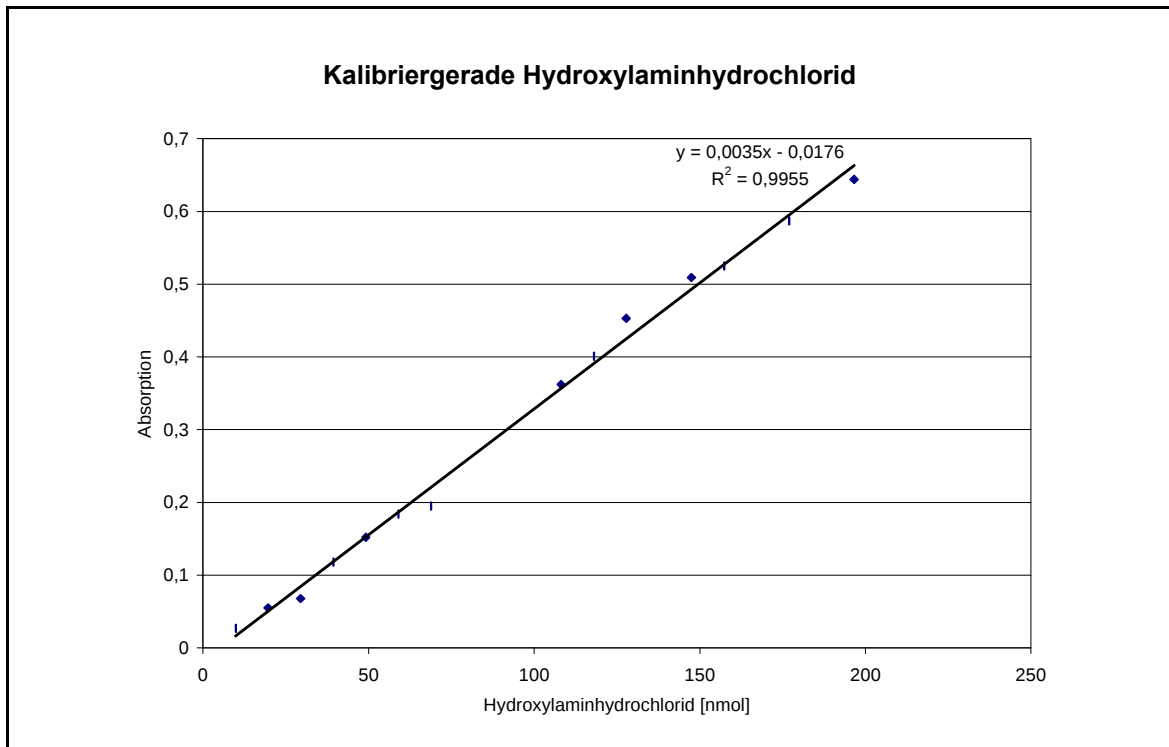


Abbildung 9-5 Kalibriergerade zum kolorimetrischen Nachweis von Hydroxylamin

9.5.2 Proben

Vialinhalt:

- 0,5 mL Probe 10 mM in Ethanol
- 0,01 mL FeTPPCI 1 mM in Ethanol
- 0,01 mL IOPh 1 mM, 10 mM, 100 mM in Ethanol
- 1,0 mL 8-Hydroxychinolin-Lösung 1 % in Ethanol
- 1,0 mL Na₂CO₃-Lösung 1 M
- ad 3,0 mL Phosphatpuffer pH 7.4

Die Vials wurden mit Phosphatpuffer pH 7.4, 10 µL FeTPPCI-Lösung 1 mM und 1,0 mL 1%-iger ethanolischer 8-Hydroxychinolin-Lösung gefüllt, verschlossen und mit Stickstoff entgast. Nach Zusatz von 500 µL 1 mM Probenlösung und 1,0 mL 1 M Na₂CO₃-Lösung wurden sie 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C unter Rühren inkubiert. Anschließend wird 10 µL Iodosobenzol dazugegeben und die Extinktion sofort bei 700 nm gegen einen Blindwert gemessen.

Tabelle 9-38 Hydroxylamin aus **7b**, **8d**, **9a**, **10b**, $n = 5$

Probe	Hydroxylamin [nmol]	SD
7b	12.78	5.12
8d	3.89	2.04
9a	9.98	3.93
10b	5.57	2.05

9.6 Kolorimetrischer Nachweis von Peroxynitrit

9.6.1 Darstellung von Peroxynitrit

100 mL 0,6 M Natriumnitrit-Lösung, 100 mL 0,6 M Wasserstoffperoxidlösung in 0,8 M Chlorwasserstoffsäure (HCl) und 200 mL 1,2 M Natriumhydroxidlösung wurden hergestellt und auf ca. 2°C gekühlt. Die Nitritlösung wurde in einem großen Weithalsbecherglas, das in einem Eisbad steht, vorgelegt. Anschließend wurden kurz hintereinander unter ständigem Rühren die Wasserstoffperoxidlösung und die Natronlauge dazu gegossen. Es entstand eine gelbe Lösung¹⁷³).

In alkalischer Lösung ist Peroxynitrit bei – 20°C über mehrere Wochen stabil. Vor Beginn jeder Meßreihe wurde die Konzentration der Lösung kolorimetrisch über die spezifische Absorption $\varepsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 302 nm bestimmt¹⁷³) (60,66 mMol / L).

9.6.2 Durchführung der Versuche

Aus 2`7`-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat wurde eine 7 mM ethanolische Stammlösung hergestellt, die bei –20°C und unter Lichtschutz in einem mit N₂ ausgespülten Gefäß einige Zeit gelagert werden kann. Aus der Stammlösung wurde 2`7`-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat vor dem Gebrauch frisch mit 20 mM NaOH verdünnt. Nach abgeschlossener Esterhydrolyse erhielt man eine

klare Lösung, die unter Lichtschutz und in einem mit Argon anaerobisierten Gefäß im Eiswasser einige Stunden haltbar war. In ein Vial wurden die EDTA-Lösung, die 2`7`-Dichlorodihydrofluorescein-Lösung und der entsprechende Puffer eingefüllt und die Reaktion durch Zugabe der Probe gestartet.

Vialinhalt:

- 0,15 mL EDTA 100 μ M
- 0,15 mL Indikator 100 μ M
- ad 2,1 mL NaOH 100 μ M, 20 mM, 1 M

Probe:

10-100 μ L Peroxynitrit 1,65 mM bzw.
35,0 mg Hydroxylaminhydrochlorid

Nach Zusatz der Probe wird die Absorption nach 10 Minuten bei Raumtemperatur bei 504 nm gegen einen Blindwert gemessen.

9.6.2.1 Kalibrierung

Mit 0,01 M KOH wurde eine Verdünnungsreihe von Peroxynitrit hergestellt. In Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen Peroxynitrits ergab sich folgende Kalibriergerade:

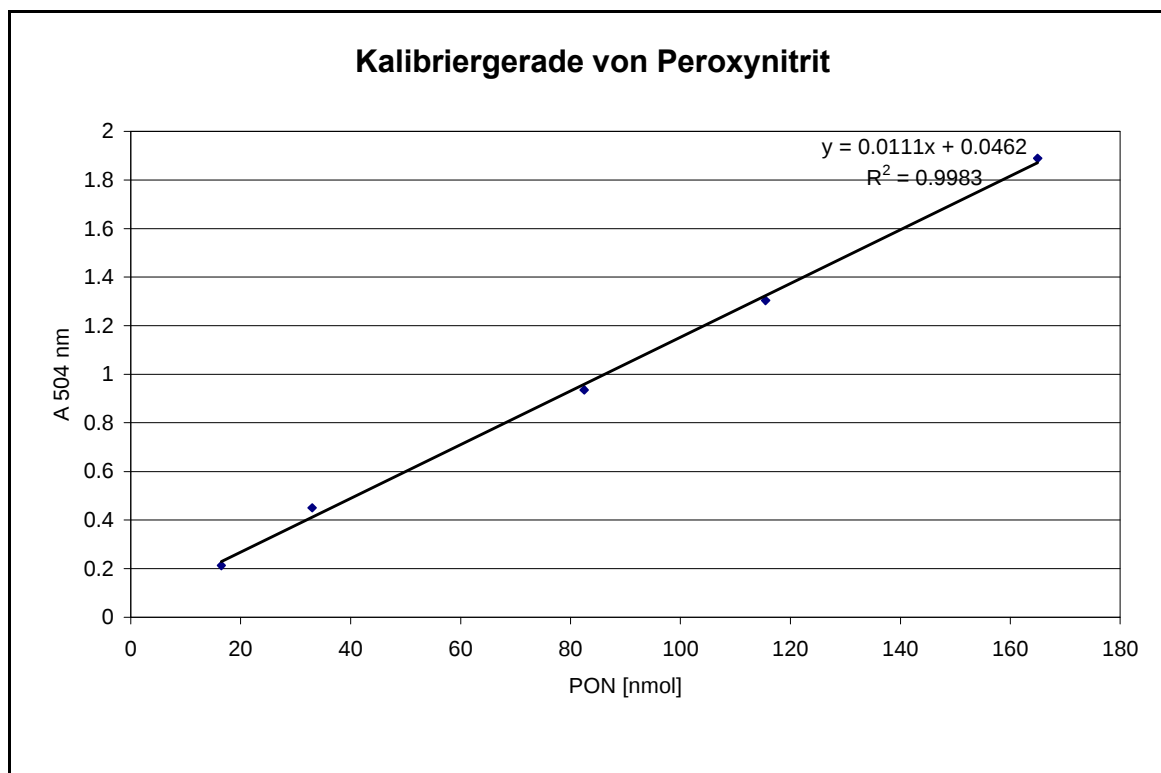


Abbildung 9-6 Kalibriergerade zur kolorimetrischen Bestimmung von Peroxynitrit

9.6.2.2 Proben

Tabelle 9-39 Peroxynitritbildung aus Hydroxylamin bei verschiedenen pH-Werten, $n = 5$

pH	PON[nmol] nach 15 Min	SD
pH 10	0	
pH 12	0	
pH 14	3.86	2.31
pH	PON[nmol] nach 30 Min	SD
pH 10	4.4	2.51
pH 12	17.46	8.87
pH 14	40.07	16.83
pH	PON[nmol] nach 45 Min	SD
pH 10	9.17	1.90
pH 12	36.38	5.46
pH 14	60.34	8.74

9.7 Gekaufte Substanzen

2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat *Alexis* 610-022

Catalase *Callbiochem* 219001

L-Cystein *Merck* 1.02838

FeMeOTPPCI *Aldrich* 30,303-8

FeTPFPPI *Aldrich* 25,291-3

FeTPPCI *Aldrich* 25,907-1

Hydroxylaminhydrochlorid *Fluka* 55460

Kaliumnitrat *Fluka* 60419

Kaliumnitrit *Fluka* 60417

MnTPPCI *Aldrich* 25,475-4

NaBH₄ *Lancaster* 5859

N^G-Hydroxy-L-argininmonoacetat *Alexis* 106-004

Superoxiddismutase *Alexis* 202-022

10 Literaturverzeichnis

- 1) **M. Feelisch und J. S. Stamler**, *Methods in Nitric Oxide Research*, Wiley, New York 1996.
- 2) **J. Lehmann**, *Organische Nitrate - Neue Perspektiven für eine alte Arzneistoffgruppe*, Pharm. Unserer Zeit **2**, 52-57 (1998).
- 3) **W. Murrell**, *Nitroglycerine as a Remedy for Angina Pectoris*, Lancet **1**, 80-81, 113-115, 225-227 (1879).
- 4) **K. Lindqvist**, *The 1998 nobel prize in physiology or medicine*, Stockholm, Nobel-Komitee, Karolinska-Institut (1998).
- 5) **R. F. Furchgott und J. V. Zawadzki**, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin*, Nature (London) **288**, 373-376 (1980).
- 6) **R. J. Gryglewski, S. Moncada und R. M. J. Palmer**, *Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells*, Br. J. Pharmacol. **87**, 685-694 (1986).
- 7) **L. J. Ignarro, R. E. Byrns, G. M. Buga und K. S. Wood**, *Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical*, Circ. Res. **61**, 866-879 (1987).
- 8) **M. Kelm, M. Feelisch, R. Spahr, H. M. Piper, E. Noack und J. Schrader**, *Quantitative and Kinetic Characterization of Nitric Oxide and EDRF Released from Cultured Endothelial Cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **154**, 236-244 (1988).

- 9) **M. T. Khan und R. F. Furchgott**, *Additional Evidence that Endothelium Derived Relaxing Factor is Nitric Oxide*, Elsevier, Amsterdam 1987.
- 10) **R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige und S. Moncada**, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*, *Nature (London)* **327**, 524-526 (1987).
- 11) **A. F. Hollemann und E. Wiberg**, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1985.
- 12) **C. E. Dinerman und G. E. Ewing**, *Infrared Spectrum, Structure, and Heat of Formation of Gaseous (NO)₂**, *J. Chem. Phys.* **53**, 626-631 (1970).
- 13) **E. Wilhelm, R. Battino und R. J. Wilcox**, *Low-Pressure Solubility of Gases in Liquid Water*, *Chem. Rev.* **77**, 219-262 (1977).
- 14) **S. Goldstein und G. Czapski**, *Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution in the absence and presence of various reductants. The nature of the oxidizing intermediates*, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12078-12084 (1995).
- 15) **L. J. Ignarro, J. M. Fukuto, J. M. Griscavage, N. E. Rigors und R. E. Byrns**, *Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not to nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8103-8107 (1993).
- 16) **C. J. Lowenstein und S. H. Snyder**, *Nitric Oxide, a Novel Biologic Messenger*, *Cell* **70**, 705-707 (1992).

- 17) **J. F. Kerwin, J. R. Lancaster und P. L. Feldman**, *Nitric oxide: A new paradigm for second messengers*, J. Med. Chem. **38**, 4343-4362 (1995).
- 18) **J. S. Stamler, D. I. Simon, J. A. Osborne, M. E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D. J. Singel und J. Loscalzo**, *S-Nitrosylation of Proteins with Nitric Oxide: Synthesis and Characterization of Biologically Active compounds*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 444-448 (1992).
- 19) **J. S. Stamler, D. J. Singel und J. Loscalzo**, *Biochemistry of nitric oxide and its redox-active forms*, Science **258**, 1898-1902 (1992).
- 20) **A. R. Butler, F. W. Flitney und D. L. H. Williams**, *NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective*, Trends Pharmacol. Sci. **16**, 18-22 (1995).
- 21) **J. S. Beckman, J. Chen, H. Ischiropoulos und J. P. Crow**, *Oxidative chemistry of peroxynitrite*. In: Oxygen radicals in biological systems. Part C (L. Packer, Hrsg.), S. 229-240, Academic Press, New York 1994.
- 22) **M. W. Radomski, R. Palmer, M., J., und S. Moncada**, *Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets*, Br. J. Pharmacol. **101**, 325-328 (1990).
- 23) **R. M. J. Palmer, D. S. Ashton und S. Moncada**, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*, Nature (London) **333**, 664-666 (1988).
- 24) **D. J. Stuehr, N. S. Kwon, C. F. Nathan, O. W. Griffith, P. L. Feldman und J. Wiseman**, *N-hydroxy-L-arginine is an*

intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine, J. Biol. Chem. **266**, 6259-6263 (1991).

- 25) **B. Clement, E. Schnörwangen, T. Kämpchen, P. Mordvintcev und A. Mülsch**, *Synthesis of $^{15}\text{N}^{\text{W}}$ -hydroxy-L-arginine and ESR and ^{15}N NMR studies for the elucidation of the molecular mechanism of enzymic nitric oxide formation from L-arginine*, Arch. Pharm. (Weinheim) **327**, 793-798 (1994).
- 26) **A. M. Leone, R. M. J. Palmer, R. G. Knowles, P. L. Francis, D. S. Ashton und S. Moncada**, *Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthase Incorporate Molecular Oxygen into Both Nitric Oxide and Citrulline*, J. Biol. Chem. **266**, 23790-23795 (1991).
- 27) **N. S. Kwon, C. F. Nathan, C. Gilker, O. W. Griffith, D. E. Matthews und D. J. Stuehr**, *L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase*, J. Biol. Chem. **265**, (1990).
- 28) **J. L. Boucher, A. Genet, S. Vadon, M. Delaforge, Y. Henry und D. Mansuy**, *Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N^{W} -hydroxy-L-arginine by NADPH and O_2 to nitric oxide and citrulline*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **187**, 880-886 (1992).
- 29) **C. A. Schott, C. M. Bogen, P. Vetrovsky, C. C. Berton und J. C. Stoclet**, *Exogenous N^{G} -hydroxy-L-arginine causes nitrite production in vascular smooth muscle cells in the absence of nitric oxide activity*, FEBS Lett. **341**, 203-207 (1994).

- 30) **J.-P. Renaud, J.-L. Boucher, S. Vadon, M. Delaforge und D. Mansuy**, *Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N^W -hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in NO synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **192**, 53-60 (1993).
- 31) **H. H. H. W. Schmidt, J. S. Pollock, M. Nakane, L. D. Gorsky, U. Förstermann und F. Murad**, *Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating factor synthase*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 365-369 (1991).
- 32) **D. Bredt und S. Snyder**, *Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, (1990).
- 33) **D. Stuehr, H. Cho, M. Kwon, C. Weise und C. Nathans**, *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7773-7777 (1991).
- 34) **R. C. Venema, H. Ju, R. Zou, J. W. Ryan und V. J. Venema**, *Subunit Interactions of Endothelial Nitric-oxide Synthase*, *J. Biol. Chem.* **272**, 1276-1282 (1997).
- 35) **H. H. H. W. Schmidt**, *NO, ein endogener Botenstoff und Zellgift*, *Med. Monatsschr. Pharm.* **17**, 168-185 (1994).
- 36) **D. S. Bredt, P. M. Hwang, C. E. Glatt, C. Lowenstein, R. R. Reed und S. H. Synder**, *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P450 reductase*, *Nature (London)* **351**, 714-718 (1991).
- 37) **J. L. Vermilion und M. J. Coon**, *Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH*

- cytochrome P-450 reductase*, J. Biol. Chem. **253**, 8812-8819 (1978).
- 38) **P. Klatt, S. Pfeiffer, B. M. List, D. Lehner, O. Glatter, H. P. Bachinger, E. R. Werner, K. Schmidt und B. Mayer**, *Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin*, J. Biol. Chem. **271**, 7336-7342 (1996).
- 39) **M. A. Marletta, A. R. Hurshman und K. M. Rusche**, *Catalysis by nitric oxide synthase*, Curr. Opin. Chem. Biol. **2**, 656-663 (1998).
- 40) **K. L. Campos, J. Giovanelli und S. Kaufman**, *Characteristics of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of arginine to N-hydroxyarginine, the first oxygenation step in the enzymic synthesis of nitric oxide*, J. Biol. Chem. **270**, 1721-1728 (1995).
- 41) **P. Klatt, K. Schmidt, G. Uray und B. Mayer**, *Multiple catalytic function of brain nitric oxide synthase*, J. Biol. Chem. **268**, (1993).
- 42) **P. Klatt, M. Schmid, E. Leopold, K. Schmidt, E. R. Werner und B. Mayer**, *The Pteridine Binding Site of Brain Nitric Oxide Synthase*, J. Biol. Chem. **269**, 13861-13866 (1994).
- 43) **H. M. Abusoud, L. L. Yoho und D. J. Stuehr**, *Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism - Activation of intra- and interdomain electron transfer*, J. Biol. Chem. **269**, 32047-32050 (1994).

- 44) **J. Saras und C. H. Heldin**, *PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins*, Trends Biochem. Sci. **21**, 455-458 (1996).
- 45) **J. R. Stone und M. A. Marletta**, *Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide*, Biochemistry **35**, 1093-1099 (1996).
- 46) **M. W. Radomski, R. M. J. Palmer und S. Moncada**, *Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets*, Br. J. Pharmacol. **92**, 181-187 (1987).
- 47) **J. Loscalzo**, *Nitric oxide and vascular disease*, N. Engl. J. Med. **333**, 251-253 (1995).
- 48) **I. Tikkanen und F. Fyhrquist**, *Nitric oxide in hypertension and renal diseases*, Ann. Med. **27**, 353-357 (1995).
- 49) **P. A. Lonnqvist, B. Jonsson, P. Winberg und C. G. Frostell**, *Inhaled nitric oxide in infants with developing or established chronic lung disease*, Acta Paediat. **84**, 1188-1192 (1995).
- 50) **J. Garthwaite**, *Glutamate, Nitric Oxide and Cell-cell Signalling in the Nervous System*, Trends Neurosci. **14**, 60-67 (1991).
- 51) **I. Paakkari und P. Lindsberg**, *Nitric oxide in the central nervous system*, Ann. Med. **27**, 369-377 (1995).
- 52) **G. A. Böhme, C. Bon, J.-M. Stutzmann, A. Doble und J.-C. Blanchard**, *Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation*, Eur. J. Pharmacol. **199**, 379-381 (1991).

- 53) **J. Rajfer, W. J. Aronson, P. A. Bush, F. J. Dorey und L. J. Ignarro**, *Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission*, N. Engl. J. Med. **326**, 90-94 (1992).
- 54) **R. A. Lefebvre**, *Nitric oxide in the peripheral nervous system*, Ann. Med. **27**, 379-388 (1995).
- 55) **P. C. Kuo und K. Y. Abe**, *Nitric oxide-associated regulation of hepatocyte glutathione synthesis is a guanylyl cyclase-independent event*, Surgery **120**, 309-314 (1996).
- 56) **A. K. Nüssler, T. R. Billiar und R. L. Simmons**, *Inducible nitric oxide synthase: Its role in inflammation, sepsis, and shock*. In: *Modulation of the Inflammatory Response in Severe Sepsis* (J. M. Tellado, R. A. Forse und J. S. Solomkin, Hrsg.), S. 33-50, Karger, Basel, Switzerland 1995.
- 57) **H. J. Galla**, *Stickstoffmonoxid, NO, ein interzellulärer Botenstoff*, Angew. Chem. **105**, 399-402 (1993).
- 58) **J. S. Beckman und W. H. Koppenol**, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly*, Am. J. Physiol.-Cell Physiol. **40**, C1424-C1437 (1996).
- 59) **W. H. Koppenol**, *The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite*, Free Radical Biol. Med. **25**, 385-391 (1998).
- 60) **W. H. Koppenol und R. Kissner**, *Can O=NOOH undergo homolysis?*, Chem. Res. Toxicol. **11**, 87-90 (1998).
- 61) **J. L. Mehta**, *Endothelium, coronary vasodilation, and organic nitrates*, Am. Heart J. **129**, 382-391 (1995).

- 62) **S. H. Snyder und D. S. Bredt**, *Stickstoffmonoxid-Regulator biologischer Signale*, Spektr. Wissenschaften 72-80 (1992).
- 63) **D. Ungureano-Longrois, J.-L. Balligand, R. A. Kelly und T. W. Smith**, *Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes*, Mol. Cell. Cardiol. **27**, 155-167 (1995).
- 64) **K.-D. Kröncke, V. Kolb-Bachofen, B. Berschick, V. Burkart und H. Kolb**, *Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation*, Biochem. Biophys. Res. Comm. **175**, 752-758 (1991).
- 65) **E. Moilanen und H. Vapaatalo**, *Nitric oxide in inflammation and immune response*, Ann. Med. **27**, 359-367 (1995).
- 66) **K. D. Kröncke, K. Fehsel, A. Sommer, M. L. Rodriguez und V. Kolb-Bachofen**, *Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage*, Biol. Chem. Hoppe-Seyler **376**, 179-185 (1995).
- 67) **D. A. Wink, K. S. Kasprzak, C. M. Maragos, R. K. Elespuru, M. Misra, T. M. Dunams, T. A. Cebula, W. H. Koch, A. W. Andrews, J. S. Allen und L. K. Keefer**, *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors*, Science **25**, 1001-1003 (1991).
- 68) **M. Feelisch**, *The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: Appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions*, J. Cardiovasc. Pharmacol. **17 (Suppl 3)**, S 25-S 33 (1991).

- 69) **A. M. Gasco, R. Fruttero und G. Sorba**, *NO-Donors: an emerging class of compounds in medicinal chemistry*, *Il Farmaco* **51**, 617-635 (1996).
- 70) **D. Morley, C. M. Maragos, X. Y. Zhang, M. Boignon, D. A. Wink und L. K. Keefer**, *Mechanism of vascular relaxation induced by the nitric oxide(NO)/nucleophile complexes, a new class of NO-based vasodilators*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **21**, 670-676 (1993).
- 71) **S. Fukuyama, Y. Kita, Y. Hirasawa, A. Sato, N. Morokoshi, S. Koda, T. Yasuda, S. Oka und H. Sakurai**, *A new nitric oxide (NO) releaser: Spontaneous NO release from FK409*, *Free Radical Res.* **23**, 443-452 (1995).
- 72) **D. G. Harrison und J. N. Bates**, *The nitrovasodilators - New ideas about old drugs*, *Circulation* **87**, 1461-1467 (1993).
- 73) **H.-J. Duchstein und S. Riederer**, *Vorstellungen zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus NO-Pharmaka. Modellreaktionen in Gegenwart von Licht und Übergangsmetallkomplexen, 1. Mitt.*, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **328**, 317-324 (1995).
- 74) **C. Moali, J. L. Boucher, M. A. Sari, D. J. Stuehr und D. Mansuy**, *Substrate Specificity of NO Synthases: Detailed Comparison of L-Arginine, Homo-L-arginine, their N^W -Hydroxy Derivatives, and N^W -Hydroxynor-L-arginine*, *Biochemistry* **37**, 10453-10460 (1998).
- 75) **G. Thomas und P. W. Ramwell**, *Vascular relaxation mediated by hydroxylamines and oximes: their conversion to nitrites and mechanism of endothelium dependent vascular*

- relaxation*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **164**, 889-893 (1989).
- 76) **V. Andronik-Lion, J. L. Boucher, M. Delaforge, Y. Henry und D. Mansuy**, *Formation of nitric oxide by cytochrome P450-catalyzed oxidation of aromatic amidoximes*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **185**, 452-458 (1992).
- 77) **R. Camehn und K. Rehse**, *New NO donors with antithrombotic and vasodilating activities, Part 28 - N-(1-cyanoalkyl)-N-hydroxyureas*, Arch. Pharm. (Weinheim) **333**, 27-31 (2000).
- 78) **B. Clement, J. L. Boucher, D. Mansuy und A. Harsdorf**, *Microsomal formation of nitric oxide and cyanamides from non-physiological N-hydroxyguanidines: N-hydroxydebrisoquine as a model substrate*, Biochem. Pharmacol. **58**, 439-445 (1999).
- 79) **C. J. Marmion, T. Murphy, J. R. Docherty und K. B. Nolan**, *Hydroxamic acids are nitric oxide donors. Facile formation of ruthenium(II)-nitrosyls and NO-mediated activation of guanylate cyclase by hydroxamic acids*, Chem. Commun. 1153-1154 (2000).
- 80) **H.-J. Duchstein und S. Riederer**, *Cytochrom P450: Enzymsystem zur NO-Freisetzung*, Pharm. Ztg. **140**, 2761-2765 (1995).
- 81) **H. Schröder**, *Cytochrome P-450 mediates bioactivation of organic nitrates*, J. Pharmacol. Exp. Ther. **262**, 298-302 (1992).
- 82) **M.-N. Carrier, C. Scheer, P. Gouvine, J.-F. Bartoli, P. Battioni und D. Mansuy**, *Biomimetic Hydroxylation of*

- Aromatic Compounds: Hydrogen Peroxide and Manganese-Polyhalogenated Porphyrins as a Particularly Good System*, Tetrahedron Lett. **31**, 6645-6648 (1990).
- 83) **A. J. Appelton, S. Evans und J. R. Lindsay Smith**, *Allylic oxidation and epoxidation of cycloalkenes by iodosobenzene catalysed by iron(III) and manganese(III) tetra(dichlorophenyl)-porphyrin: The marked influence of the ring size on the rate of allylic oxidation*, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 **1996**, 281-285 (1996).
- 84) **M. Komuro, Y. Nagatsu, T. Higuchi und M. Hirobe**, *Oxidative decarboxylation of carboxylic acids by iron porphyrin-iodosobenzene system*, Tetrahedron Lett. **33**, 4949-4952 (1992).
- 85) **M. S. Chorghade, D. A. Dezaro, D. R. Hill, E. C. Lee, R. J. Pariza, J. V. Andersen, K. T. Hansen und D. H. Dolphin**, *Metalloporphyrins as chemical mimics of cytochrome P-450 systems*, Bioorg. Med. Chem. Lett. **4**, 2867-2870 (1994).
- 86) **D. Mansuy, P. Battioni und J. P. Battioni**, *Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases*, Eur. J. Biochem. **184**, 267-285 (1989).
- 87) **B. Meunier**, *Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage*, Chem. Rev. **92**, 1411-1456 (1992).
- 88) **D. Mansuy und P. Battioni**, *Diversity of Reactions catalyzed by Heme-Thiolate Proteins*. In: The Porphyrin Handbook (K. M. Kadish, K. M. Smith und R. Guilard, Hrsg.), S. 1-15, Academic Press, New York 2000.

- 89) **D. Mansuy und P. Battioni**, *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidation*, Marcel Dekker Inc., New York 1994.
- 90) **I. Tabushi**, *Reductive dioxygen activation by use of artificial P-450 systems*, *Coord. Chem. Rev.* **86**, 1-42 (1988).
- 91) **S. Riederer**, *Beiträge zum Mechanismus der Bioaktivierung von NO-Donatoren durch nicht-enzymatische Modellreaktionen*, Dissertation, Freie Universität Berlin 1998.
- 92) **H. J. Lucas, E. R. Kennedy und M. W. Formo**, *Iodosobenzene*, *Org. Synth. Coll. Vol.* **3**, 483-485 (1955).
- 93) **F. Lichtenberger, W. Nastainczyk und V. Ullrich**, *Cytochrome P450 as an oxene transferase*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **70**, 939 (1976).
- 94) **M. J. Clague, J. S. Wishnok und M. A. Marletta**, *Formation of N-d-cyanoornithine from N-G-hydroxy-L-arginine and hydrogen peroxide by neuronal nitric oxide synthase: Implications for mechanism*, *Biochemistry* **36**, 14465-14473 (1997).
- 95) **H. Sugimoto, H. C. Tung und D. T. Sawyer**, *Perchlorate in Acetonitrile. Model for the Reactive Intermediate of Cytochrome P-450*, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 2465-2470 (1988).
- 96) **H. Patzelt und W. D. Woggon**, *O-Insertion into nonactivated C-H bonds: The first observation of O₂ cleavage by a P-450 model in the presence of a thiolate ligand*, *Helv. Chim. Acta* **75**, 523-530 (1992).

- 97) **Y. Komori, J. J. Hyun, K. Chiang und J. M. Fukuto**, *The role of thiols in the apparent activation of rat brain nitric oxide synthase (NOS)*, J. Biochem. Tokyo **117**, 923-927 (1995).
- 98) **A. P. Dicks und D. L. H. Williams**, *Generation of nitric oxide from S-nitrosothiols using protein-bound Cu²⁺ sources*, Chem. Biol. **3**, 655-659 (1996).
- 99) **A. C. F. Gorren, A. Schrammel, K. Schmidt und B. Mayer**, *Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione*, Arch. Biochem. Biophys. **330**, 219-228 (1996).
- 100) **M. P. Gordge, D. J. Meyer, J. Hothersall, G. H. Neild, N. N. Payne und A. Noronha-Dutra**, *Copper chelation-induced reduction of the biological activity of S-nitrosothiols*, Br. J. Pharmacol. **114**, 1083-1089 (1995).
- 101) **D. L. H. Williams**, *The mechanism of nitric oxide formation from S-nitrosothiols (thionitrites)*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1996**, 1085-1090 (1996).
- 102) **S. Pou, W. S. Pou, D. S. Bredt, S. H. Snyder und G. M. Rosen**, *Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase*, J. Biol. Chem. **267**, 24173-24176 (1992).
- 103) **Y. Xia, L. J. Roman, B. S. S. Masters und J. L. Zweier**, *Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain*, J. Biol. Chem. **273**, 22635-22639 (1998).
- 104) **Y. Xia, A. L. Tsai, V. Berka und J. L. Zweier**, *Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase - A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process*, J. Biol. Chem. **273**, 25804-25808 (1998).

- 105) **B. Mayer, P. Klatt, E. R. Werner und K. Schmidt**, *Kinetics and mechanism of tetrahydrobiopterin-induced oxidation of nitric oxide*, J. Biol. Chem. **270**, 655-659 (1995).
- 106) **J. M. McCord**, *Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase*, Science **185**, 529-531 (1974).
- 107) **M. E. Murphy und H. Sies**, *Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 10860-10864 (1991).
- 108) **A. J. Bune, M. P. Brand, S. J. R. Heales, J. K. Shergill, R. Cammack und H. T. Cook**, *Inhibition of Tetrahydrobiopterin Synthesis Reduces in Vivo Nitric Oxide Production in Experimental endotoxic Shock*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **220**, 13-19 (1996).
- 109) **B. Heinzl, M. John, P. Klatt, E. Böhme und B. Mayer**, *Ca²⁺/Calmodulin dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase*, Biochem. J. **281**, 627-630 (1992).
- 110) **H. Kimura, C. K. Mittal und F. Murad**, *Activation of guanylyl cyclase from rat liver and other tissues by sodium azide*, J. Biol. Chem. **251**, 8016-8022 (1975).
- 111) **P. Nicholls**, *The Reactions of Azide with Catalase and their Significance*, Biochem. J. **90**, 331-343 (1964).
- 112) **P. A. Craven, F. R. De Rubertis und D. W. Pratt**, *Electron spin resonance study of the role of NO•. Catalase in the activation of guanylate cyclase by NaN₃ and NH₂OH*.

- Modulation of enzyme responses by heme proteins and their nitrosyl derivatives*, J. Biol. Chem. **254**, 8213-8222 (1979).
- 113) **K. Shibuki**, *An Electrochemical Microprobe for Detecting Nitric Oxide Release in Brain Tissue*, Neurosci. **9**, 69-76 (1990).
- 114) **K. Tsuchiya, M. Takasugi, K. Minakuchi und K. Fukuzawa**, *Sensitive quantitation of nitric oxide by EPR spectroscopy*, Free Radical Biol. Med. **21**, 733-737 (1996).
- 115) **N. K. Menon, J. Pataricza, T. Binder und R. J. Bing**, *Reduction of Biological Effluents in Purge and Trap Micro Reaction Vessels and Detection of Endothelium-derived Nitric Oxide (EdNO) by Chemiluminescence*, J. Mol. Cell. Cardiol. **23**, 389-393 (1991).
- 116) **J. P. Griess**, *Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt. "Über einige Azoverbindungen"*, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **12**, 426-428 (1879).
- 117) **M. Kelm, R. Dahmann, D. Wink und M. Feelisch**, *The nitric oxide superoxide assay - Insights into the biological chemistry of the NO/O₂⁻ interaction*, J. Biol. Chem. **272**, 9922-9932 (1997).
- 118) **U. Förstermann und K. Ishii**, *Measurement of cyclic GMP as an indicator of nitric oxide production*. In: Methods in nitric oxide research (M. Feelisch und J. Stamler, Hrsg.), S. 555-566, Wiley, New York 1996.
- 119) **F. Yang, E. Troncy, M. Francoeur, B. Vinet, P. Vinay, G. Czaika und G. Blaise**, *Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence*, Clin. Chem. **43**, 657-662 (1997).

- 120) **R. Marley, M. Feelisch, S. Holt und K. Moore**, *A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols*, *Free Radical Res.* **32**, 1-9 (2000).
- 121) **R. A. Pufahl, J. S. Wishnok und M. A. Marletta**, *Hydrogen peroxide-supported oxidation of N-G-hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase*, *Biochemistry* **34**, 1930-1941 (1995).
- 122) **D. Mansuy, J. L. Boucher und B. Clement**, *On the mechanism of nitric oxide formation upon oxidative cleavage of C=N(OH) bonds by NO-synthases and cytochromes P450*, *Biochimie* **77**, 661-667 (1995).
- 123) **M. Akhtar, P. LeeRobichaud, M. E. Akhtar und J. N. Wright**, *The impact of aromatase mechanism on other P450s*, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **61**, 127-132 (1997).
- 124) **M. Modolell, K. Eickmann und G. Soler**, *Oxidation of N-G-hydroxyl-L-arginine to nitric oxide mediated by respiratory burst: An alternative pathway to NO synthesis*, *FEBS Lett.* **401**, 123-126 (1997).
- 125) **B. Clement, M.-H. Schultze-Mosgau und H. Wohlers**, *Cytochrome P450 dependent N-Hydroxylation of a guanidine (Debrisoquinone), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the N-Hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative*, *Biochem. Pharmacol.* **46**, 2249-2267 (1993).
- 126) **B. Clement, M. Immel, S. Schmitt und U. Steinmann**, *Biotransformations of Benzanidine and Benzanidoxime in vivo*, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **326**, 807-812 (1993).

- 127) **J. Hauptmann, M. Paintz, B. Kaiser und M. Richter**, *Reduction of benzamidoxime derivative to the corresponding benzamidine in vivo and in vitro*, *Pharmazie* **43**, (1988).
- 128) **K. Rehse, S. Bade, A. Harsdorf und B. Clement**, *New NO-donors with Antithrombotic and Vasodilating Activities, Part 17 - Arylazomidoximes and 3-Arylazo-1,2,4-oxadiazol-5-ones*, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **330**, 392-398 (1997).
- 129) **K. Rehse und F. Brehme**, *New NO donors with Antithrombotic and Vasodilating Activities, Part 26 - Amidoximes and Their Prodrugs*, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **331**, 375-379 (1998).
- 130) **J. M. Fukuto, D. J. Stuehr, P. L. Feldman, M. P. Bova und P. Wong**, *Peracid Oxidation of an N-Hydroxyguanidine Compound - A Chemical Model for the Oxidation of NW-Hydroxy-L-Arginine by Nitric Oxide Synthase*, *J. Med. Chem.* **36**, 2666-2670 (1993).
- 131) **N. Sennequier, J. L. Boucher, P. Battioni und D. Mansuy**, *Superoxide anion efficiently performs the oxidative cleavage of C=NOH bonds of amidoximes and N-hydroxyguanidines with formation of nitrogen oxides*, *Tetrahedron Lett.* **36**, 6059-6062 (1995).
- 132) **A. Jousserandot, J. L. Boucher, Y. Henry, B. Niklaus, B. Clement und D. Mansuy**, *Microsomal cytochrome P450 dependent oxidation of N-hydroxyguanidines, amidoximes, and ketoximes: Mechanism of the oxidative cleavage of their C=N(OH) bond with formation of nitrogen oxides*, *Biochemistry* **37**, 17179-17191 (1998).
- 133) **C. Riederer**, *Zur Synthese von Tetrahydro-oxazolo[4,3-c]-1,2,4-oxadiazol-5-onen und Tetrahydro-oxazolo[4,3-c]-1,2,4-*

- oxadiazol-6-onen aus 4-Hydroximino-oxazolidin-2-onen*, Dissertation, Universität Hamburg 1999.
- 134) **R. Pacelli, J. Taira, J. A. Cook, D. A. Wink und M. C. Krishna**, *Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide*, *Lancet* **347**, 900 (1996).
- 135) **J. J. Jiang, S. J. Jordan, D. P. Barr, M. R. Gunther, H. Maeda und R. P. Mason**, *In vivo production of nitric oxide in rats after administration of hydroxyurea*, *Mol. Pharmacol.* **52**, 1081-1086 (1997).
- 136) **H. Aurich und H. G. Scharpenberg**, *Sterisch bedingte Umwandlung von N-Hydroxyharnstoffen und N-Hydroxyguanidinen*, *Chem. Ber.* **106**, 1881-1886 (1973).
- 137) **D. L. Vesely, L. E. Rovere und G. S. Levey**, *Activation of Guanylate Cyclase by Streptozotocin and 1-Methyl-1-nitroso-urea*, *Cancer Res.* **37**, 28-31 (1977).
- 138) **J. Turk, J. A. Corbett, S. Ramanadham, A. Bohrer und M. L. McDaniel**, *Biochemical Evidence for Nitric Oxide Formation from Streptozotocin in Isolated Pancreatic Islets*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197**, 1458-1464 (1993).
- 139) **D. Geffken**, *Synthese von 6,6-disubstituierten 2,5-Dioxodihydro-4H-1,3,4-dioxazinen und ihre Umwandlung in 3-Amino- bzw. 3-Alkyl(Aryl)-2,4-dioxotetrahydro-1,3-oxazole*, *Synthesis* 38-40 (1981).
- 140) **R. Pöstges**, *2-Funktionalisierte 3-Arylamino-oxazolidin-4-one*, Dissertation, Universität Hamburg 1992.

- 141) **T. Kurz**, *Fünfgliedrige heterocyclische Bindungssysteme aus funktionalisierten Malonsäureestern*, Dissertation, Universität Hamburg 1999.
- 142) **T. Kurz und D. Geffken**, *Cyclization of thiocyanato malonates with hydroxylamines to 5-carboxyalkyl-4-oxo-thiazoli(di)nes*, *Heterocycl. Commun.* **5**, 325-328 (1999).
- 143) **H. G. Weger und J. A. Lynnes**, *Nitrite production from the oxidation of salicylhydroxamic acid by peroxidase or Mn(II)*, *Phytochemistry* **48**, 415-420 (1998).
- 144) **S. Shibata, N. Satake, N. Sato, M. Matsuo, Y. Koibuchi und R. K. Hester**, *Characteristics of the vasorelaxing action of (3E)-4-ethyl-2-hydroximino-5-nitro-3-hexamide FK 409, a new vasodilator isolated from microbial sources, in isolated rabbit arteries*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17**, 508-518 (1991).
- 145) **J.-L. Decout, B. Roy, M. Fontecave, J.-C. Muller, P. H. Williams und D. Loyaux**, *Decomposition of FK 409, a new vasodilator: Identification of nitric oxide as metabolite*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 973-978 (1995).
- 146) **M. Köthemann**, *N-Arylierte α -Oxoarylacetohydroxamsäuren und 2-Hydroxybenzohydroxamsäuren*, Dissertation, Universität Hamburg 2000.
- 147) **F. P. Guengerich, A. D. N. Vaz, G. N. Raner, S. J. Pernecky und M. J. Coon**, *Evidence for a role of a perferryl-oxygen complex, FeO^{3+} , in the N-oxygenation of amines by cytochrome P450 enzymes*, *Mol. Pharmacol.* **51**, 147-151 (1997).

- 148) **E. Southam und J. Garthwaite**, *Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices.*, *Neurosci. Lett.* **130**, 107-111 (1991).
- 149) **M. Markert, B. Carnal und J. Mael**, *Nitric Oxide Production by Activated Human Neutrophils Exposed to Sodium Azide and Hydroxylamine: The Role of Oxygen Radicals.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1245-1249 (1994).
- 150) **F. Beauvais, L. Michel und L. Dubertret**, *The nitric oxide donors, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils*, *FEBS Lett.* **361**, 229-232 (1995).
- 151) **E. G. DeMaster, L. Raij, S. L. Archer und E. K. Weier**, *Hydroxylamine is a vasorelaxant and a possible intermediate in the oxidative conversion of L-arginine to nitric oxide*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 527-533 (1989).
- 152) **S. Pou, W. S. Pou, G. M. Rosen und E. E. El-Fakahany**, *N-Hydroxylamine is not an intermediate in the conversion of L-arginine to an activator of soluble guanylate cyclase in neuroblastoma N1E-115 cells*, *Biochem. J.* **273**, 547-552 (1991).
- 153) **J. H. Anderson**, *The Copper-catalyzed Oxidation of Hydroxylamine*, *Analyst.* **89**, 357-362 (1964).
- 154) **D. Geffken**, *3-Alkoxyoxazolidin-2,4-dione aus N-Alkoxy-2-hydroxycarbonsäureamiden und 1,1'-Carbonyldiimidazol*, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **313**, 817-825 (1980).
- 155) **R. Berg und E. Becker**, *Ein neuer Nachweis von Hydroxylamin durch Bildung von Chinolinchinon-(5.8)-[8-oxy-*

- chinolyl-5-imidJ*-(5), genannt "Indo-oxin", Ber. Dtsch. Chem. Ges. **73B**, 172-173 (1940).
- 156) **H. Metzger**, *Oxime*. In: Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl, Hrsg.), S. 269-273, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968.
- 157) **F. T. Bonner und N. Y. Wang**, *Reduction of NO by hydroxylamine. 1. Kinetics and mechanism*, Inorg. Chem. **25**, 1858-1862 (1986).
- 158) **H. Erlenmeyer, C. Flierl und H. Sigel**, *Zur Cu²⁺-katalysierten Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und Hydrazin bzw. Hydroxylamin*, Chimia **22**, 433-434 (1968).
- 159) **Y. Kono**, *Generation of Superoxid Radical during Autoxidation of Hydroxylamine and an Assay for Superoxide Dismutase*, Arch. Biochem. Biophys. **186**, 189-195 (1978).
- 160) **M. N. Hughes und H. G. Nicklin**, *Autoxidation of Hydroxylamine in Alkaline Solutions*, J. Chem. Soc. (A) 164-168 (1971).
- 161) **G. Yagil und M. Anbar**, *The formation of Peroxinitrite by oxidation of Chloramine, Hydroxylamine and Nitrohydroxamate*, J. Inorg. Nucl. Chem. **26**, 453-460 (1964).
- 162) **M. N. Hughes und H. G. Nicklin**, *The Chemistry of Peroxonitrites. Part II. Copper(II)-catalyzed Reaction between Hydroxylamine and Peroxonitrite in Alkali*, J. Chem. Soc. (A), 925-928 (1970).
- 163) **F. T. Bonner, L. Dzelzkalns und J. A. Bonucci**, *Properties of Nitroxyl as an Intermediate in the Nitric Oxide-*

- Hydroxylamine Reaction and in Trioxodinitrate Decomposition*, Inorg. Chem. **17**, 2487-2494 (1978).
- 164) **H. H. H. W. Schmidt**, *No NO from NO synthase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 14492-14497 (1996).
- 165) **A. J. Hobbs, J. M. Fukuto und L. J. Ignarro**, *Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: Direct enhancement of generation by superoxide dismutase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 10992-10996 (1994).
- 166) **J. S. Southern, G. L. Hillhouse und A. L. Rheingold**, *Preparation of a nitroxyl (HN=O) complex of rhenium by selective oxidation of coordinated hydroxylamine*, J. Am. Chem. Soc. **119**, 12406-12407 (1997).
- 167) **K. Stolze und H. Nohl**, *Detection of Free Radicals as Intermediates in the Methemoglobin Formation from Oxyhemoglobin Induced by Hydroxylamine*, Biochem. Pharmacol. **38**, 3055-3059 (1989).
- 168) **C. Erbach, I. Runge und H.-J. Duchstein**, *Model reactions for the release of nitric oxide and other nitrogen species from hydroxylamine and derivatives under oxidative conditions*, Nitric Oxide **4**, 276 (2000).
- 169) **J. W. Coddington, J. K. Hurst und S. V. Lymar**, *Hydroxyl radical formation during peroxynitrous acid decomposition*, J. Am. Chem. Soc. **121**, 2438-2443 (1999).
- 170) **J. P. Crow**, *Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine 123 are Sensitive Indicators of Peroxynitrite in Vitro: Implications for Intracellular Measurement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species*, Nitric Oxide **1**, 145-156 (1997).

- 171) **S. L. Ischiropoulos, A. Gow, S. R. Thom, N. W. Kooy, J. A. Royall und J. P. Crow**, *Detection of Reactive Nitrogen Species using 2,7-Dichlorodihydrofluorescein and Dihydro-rhodamine 123*, Meth. Enzymol. **301**, 367-373 (1999).
- 172) **S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. OMalley, D. A. Wessels und D. M. Flaherty**, *Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: Comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydro-rhodamine 123*, Free Radical Biol. Med. **27**, 146-159 (1999).
- 173) **M. N. Hughes und H. G. Nicklin**, *The chemistry of Pernitrites, Part I. Kinetics of Decomposition of Pernitrous Acid*, J. Chem. Soc. (A), 450-452 (1968).
- 174) **H. Schröder**, *Organische Nitrate. Neue Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus einer alten Substanzklasse*, Med. Monatschr. Pharm. **15**, 134-139 (1992).
- 175) **W. Forth, D. Hentschler und W. Rummel**, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin 1998.
- 176) **H. Steudel**, *Pharmakokinetik und Stoffwechsel organischer Nitrate*, Z. Kardiol. **74**, 1-7 (1988).
- 177) **M. Braun, T. Grosser und K. Schrör**, *Bioactivation of nitroglycerin in vascular smooth muscle cells is different from that in non-vascular tissue*, Eur. J. Pharmacol. **276**, 239-245 (1995).
- 178) **M. A. Kurz, T. D. Boyer, R. Whalen, T. E. Peterson und D. G. Harrison**, *Nitroglycerin metabolism in vascular tissue:*

- role of glutathione S-transferases and relationship between NO• and NO₂⁻ formation*, Biochem. J. **292**, 545-550 (1993).
- 179) **D. Servant, M. Delaforge, C. Ducrocq, D. Mansuy und M. Lenfant**, *Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: Involvement of cytochrome P-450*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **163**, 1210-1216 (1989).
- 180) **L. J. Ignarro und C. A. Gruetter**, *Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite. Possible involvement of S-nitrosothiols*, Biochim. Biophys. Acta **631**, 221-231 (1980).
- 181) **M. Feelisch**, *Experimentelle Untersuchungen zum intrazellulären Wirkungsmechanismus der Nitrovasodilatoren und der endothelabhängigen Gefäßregulation. Beweis für die Bildung von Stickoxid (NO) als gemeinsamem, intermediärem Wirkungsvermittler*, Dissertation, Universität Düsseldorf 1988.
- 182) **A. R. Butler und P. Rhodes**, *Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols*, Anal. Biochem. **249**, 1-9 (1997).
- 183) **S. R. Kenkare und L. Z. Benet**, *Tolerance to nitroglycerin in rabbit aorta - Investigating the involvement of the mu isozyme of glutathione S-transferases*, Biochem. Pharmacol. **51**, 1357-1363 (1996).
- 184) **S.-J. Chung und H.-L. Fung**, *Relationship between nitroglycerin-induced vascular relaxation and nitric oxide production. Probes with inhibitors and tolerance development*, Biochem. Pharmacol. **45**, 157-163 (1993).

- 185) **H. L. Fung, E. Chong und K. Kovaluk**, *Mechanism for the Pharmacologic Interaction of Organic Nitrates with Thiols: Existence of an Extracellular Pathway for the Reversal of Nitrate Tolerance by N-Acetylcysteine*, J. Pharmacol. Exp. Ther. **245**, 524-530 (1988).
- 186) **C. Fonger**, *Zur Synthese und Pharmakologie organischer Nitrate mit Cystein-Teilstruktur*, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität 1999.
- 187) *Amtliche Ausgabe Deutsches Arzneibuch 1997*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart und Govi Verlag GmbH, Frankfurt a.M. 1997.

11 Anhang: Gefahrstoffe

Lösungsmittel	Gefahrensymbole	Sicherheitsratschläge
Aceton	F	9-16-2-3.2-33
Chloroform	Xn	36/37
Dichlormethan	Xn	23.2-24/25-6/37
Diethylether	Xn	22-36/38
Dimethylsulfoxid	Xi	26
Eisessig	C	2-23-26
Ethanol	F	7-16
Ethylacetat	F	16-23.2-29-33
Methanol	T	7-16-24-45
n-Hexan	Xn, F	9-16-24/25-29-51
Petrolether	Xn	9-16-29-33
Salzsäure 1 N		26-45
Salzsäure konz.	C	2-26

Reagenzien	Gefahrensymbole	Sicherheitsratschläge
5, 10, 15, 20-Tetraphenyl- 21H,23H-porphin Eisen(III)chlorid		26-37/39
Ammoniumformiat	Xi	26-36
Ascorbinsäure	----	----
Cystein		26-36
Dinatriumhydrogenphosphat	----	----
Kaliumdihydrogenphosphat	----	----
Kaliumiodid		22-26-36
Kaliumnitrat	O, Xn	22-24-41
Kaliumnitrit	O, T	45
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat		22
Natriumhydroxid	C	26-37/39-45
Natriumsulfat	----	----
Vanadium(III)chlorid		45-26-28-27-36/37/39
Wasserstoffperoxid	C	3-26-36/37/39-45

Über den größten Teil der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen liegen keine toxikologischen Daten im Sinne des Chemikaliengesetzes vor. Diese Verbindungen sind mit der für gefährliche Chemikalien üblichen Vorsicht zu behandeln.

12 Lebenslauf

Name	<u>Isabell</u> Carola Amadea Runge
Geburtsdatum	26.10.1969
Geburtsort	Harderberg jetzt Georgsmarienhütte
Familienstand	ledig
Schulbildung	1976 – 1980 Grundschule Sutthausen, Osnabrück 1980 – 1982 Orientierungsstufe Dom, Osnabrück 1982 – 1989 Gymnasium Carolinum, Osnabrück Abitur am 11.5.1989
Ausbildung	10. 1989 – 10. 1993 Studium der Pharmazie an der FU-Berlin 10.1995 – 03.1996 Chemiestudium an der FU Berlin
Pharmaziepraktikum	1.6.1994 – 30.11.1994 in der Zentralapotheke des Krankenhauses Spandau, Berlin 1.12.1994 – 31.5.95 in der Condor- Apotheke, Kiel
Approbation zum Apotheker	7.12.1995
Wissenschaftliche	1.4.1996 – 31.7.2000 wiss.

Tätigkeiten

Mitarbeiterin am Fachbereich
Pharmazie der Universität Hamburg
seit 1.4.1996 Anfertigung einer
Dissertation am Institut für Pharmazie
der Universität Hamburg unter der
Leitung von Prof. Dr. H.-J. Duchstein

