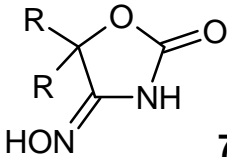
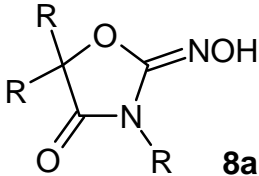
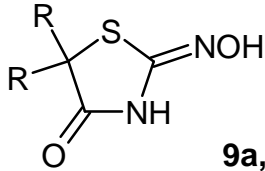
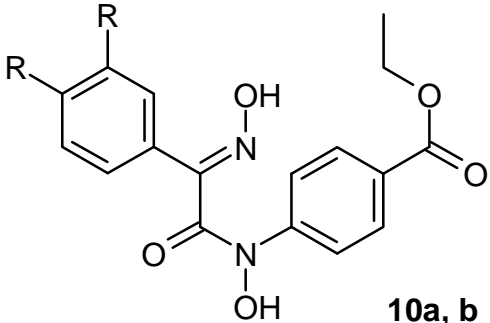


7 Zusammenfassung

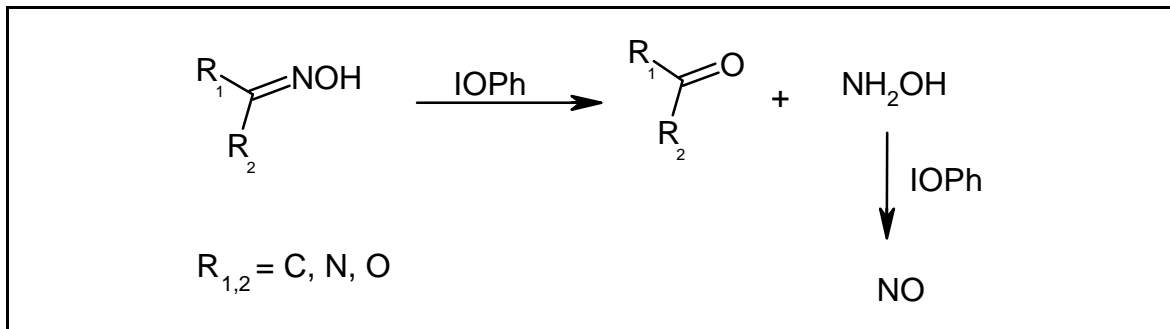
Die vorliegende Arbeit behandelt schwerpunktmäßig die NO-Freisetzung von bisher nicht untersuchten Verbindungsklassen mit Hydroxyimino-Partialstruktur unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.

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	 <p style="text-align: right;">7a - c</p>
N-Hydroxyisoharnstoffe	 <p style="text-align: right;">8a - f</p>
N-Hydroxyisothioharnstoffe	 <p style="text-align: right;">9a, b</p>
α -Hydroxyiminohydroxamsäuren	 <p style="text-align: right;">10a, b</p>

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 Hydroxyiminverbindungen 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.

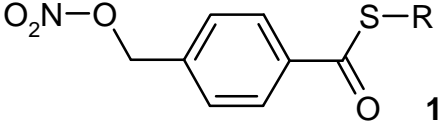
Anschließend wurde der oxidativen Entstehung von NO aus Hydroxylamin nachgegangen. Um aufzuklären, ob NO⁻ als Intermediat auftritt, wurde zunächst versucht, Peroxynitrit als Reaktionsprodukt von NO⁻ und O₂ nachzuweisen. Ein kolorimetrischer Nachweis von Peroxynitrit beruht auf der Oxidation von 2'-7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat. Obwohl H₂O₂, NO und O₂⁻ 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	 <p style="text-align: right;">11a, b</p>

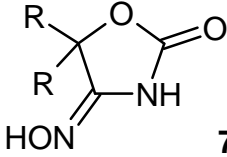
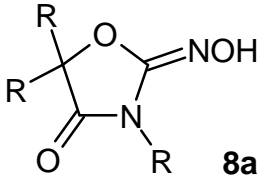
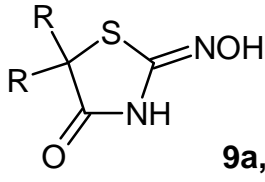
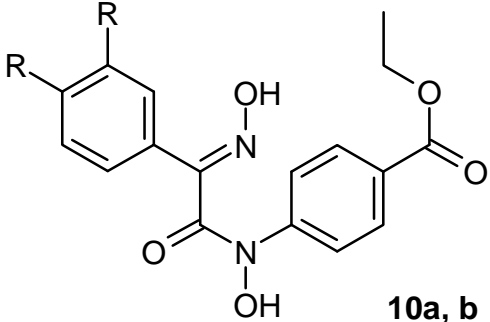
Generell war die Anwesenheit von externen Thiolen für die NO-Bildung unverzichtbar. Ein Einfluß der Thiolesterpartialstruktur auf die NO-Bildung konnte nicht beobachtet werden.

8 Summary

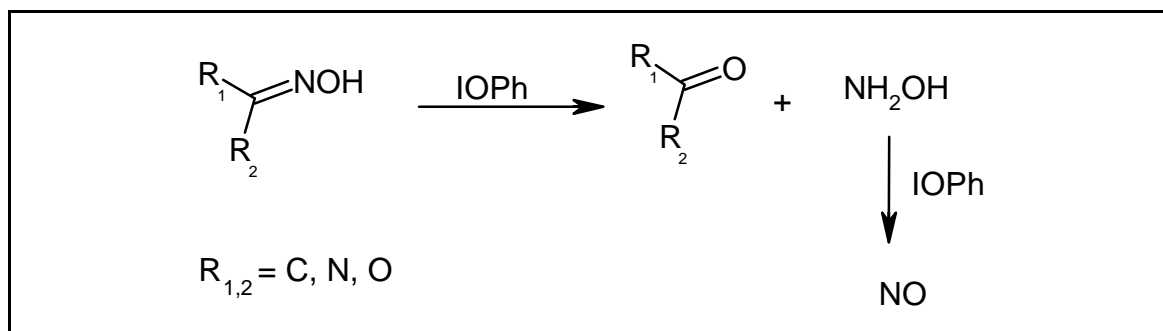
The main objective of this thesis was to investigate NO generation from compounds containing the hydroxyimino structural element under variation of reaction conditions, which, so far, has not been the focus of research.

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	 <p style="text-align: right;">7a - c</p>
N-Hydroxyisocarbamides	 <p style="text-align: right;">8a - f</p>
N-Hydroxyisothiocarbamides	 <p style="text-align: right;">9a, b</p>
α -Hydroxyiminohydroxamic acids	 <p style="text-align: right;">10a, b</p>

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-hydroxyquinoline 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.

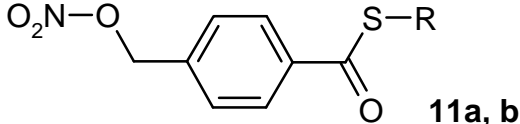
A significant increase in NO yield was observed since SOD catalyzes the oxidation of NO^- to NO.

In addition, it was tried to identify peroxyxynitrite as the reaction product of NO^- and O_2 . The colorimetric determination of peroxyxynitrite is based on an oxidation of 2',7'-dichloro-dihydrofluoresceine diacetate. Even though H_2O_2 , NO and O_2^- 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	 <chem>O=[N+]([O-])OCC1=CC=C(C(=O)SR)C=C1</chem> 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.