

**Untersuchung von potentiellen NO-Donoren
hinsichtlich ihres NO-Freisetzungsmusters
und ihrer Stimulationsfähigkeit mittels
ausgewählter in-vitro Methoden**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität Hamburg
Fachbereich Chemie



vorgelegt von
Christin Erbach
aus Hamburg

Hamburg 1999

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

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. D. Geffken

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 16. Mai 2000

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pharmakologische Wirkungen von NO.....	1
1.1.1	Physiologische Rolle von NO.....	2
1.1.2	Pathologische Rolle von NO	3
1.2	Biosynthese von NO	4
1.2.1	Stimulation der konstitutiven NO-Synthase	7
1.2.2	Stimulation der induzierbaren NO-Synthase	9
1.2.3	Hemmung der konstitutiven NO-Synthase	10
1.2.4	Hemmung der induzierbaren NO-Synthase	10
1.3	Enzymunabhängige NO-Bildung in biologischem Gewebe	11
1.4	Eigenschaften von NO.....	11
1.4.1	Chemische und physikalische Merkmale.....	11
1.4.2	Physiologisch bedeutsame Merkmale.....	14
1.4.3	Physiologisch wichtige Zielstrukturen von NO	16
1.5	NO-Pharmaka.....	17
1.5.1	Bisher bekannte NO-Donoren.....	17
1.5.2	Ausblicke für neu zu entwickelnde NO-Pharmaka	19
1.5.2.1	NO-Konzentration senkende Pharmaka	19
1.5.2.2	NO-Donoren.....	19
1.6	Aufgabenstellung	21
2	UNTERSUCHTE SUBSTANZEN	22
2.1	Nitro-Verbindungen.....	22
2.1.1	Nifedipin.....	22
2.1.2	Bay-k8644	23
2.1.3	Bay-m4786.....	24

2.1.4	1-Nitropyren	25
2.1.5	2-Nitrofluoranthren	25
2.1.6	Misonidazol	26
2.1.7	Nitrofurantoin	27
2.1.8	Furazolidon	28
2.2	Nitrate	29
2.2.1	SE 145	29
2.2.2	SE 136	29
2.2.3	GTN	30
2.3	Hydroxylamine	31
2.3.1	Hydroxylaminhydrochlorid	31
2.4	Hydroxyimine	32
2.4.1	FK409 (NOR-3)	32
2.4.2	NOR-1	33
2.5	NONOate	33
2.5.1	DEA/NO	34
2.5.2	Alkylierte NONOate	34
2.5.2.1	V-Pyrro/NO	35
2.5.2.2	M-Pyrro/NO	36
2.5.2.3	E-Pyrro/NO	37
2.6	5-Ring-Heterozyklen	38
2.6.1	Furoxan: CAS 1609	38
2.6.2	3-Methyl-N-nitroso-5-sydnonimin	39
2.7	Sonstige	40
2.7.1	HE 12.2.B	40
3	CHEMILUMINESZENZ	41
3.1	Prinzip der Chemilumineszenz	41

3.2	Versuchsaufbau	42
3.2.1	Meßgerät der Firma Ansyco.....	43
3.2.2	Meßgerät der Firma Sievers	44
3.2.3	Direkte Messung von NO (für anaerobe Lösungen)	44
3.2.4	Messung von NO nach Nitrit-Reduktion (für aerobe Lösungen)	44
3.2.5	Messung von NO nach Nitrat-Reduktion (für aerobe Lösungen).....	45
3.3	Kalibrierung.....	45
3.3.1	Für die direkte NO-Bestimmung.....	45
3.3.1.1	Eichkurve für die direkte NO-Messung.....	46
3.3.1.1.1	Gerät der Firma Ansyco.....	46
3.3.1.1.2	Gerät der Firma Sievers.....	47
3.3.2	Für die Messung nach Nitrit-Reduktion.....	48
3.3.3	Für die Messung nach Nitrat-Reduktion.....	49
3.4	Optimierende Bedingungen.....	49
3.5	Auswahl der Kofaktoren	50
3.6	Ergebnisse.....	52
3.6.1	Nitro-Verbindungen.....	52
3.6.1.1	Bay-k8644	52
3.6.1.2	Bay-m4786, Nifedipin, 1-Nitropyren, Nitrofluoranthren, Misonidazol, Furazolidon	53
3.6.1.3	Nitrofurantoin	54
3.6.2	Nitrate	55
3.6.2.1	SE145, SE136.....	55
3.6.2.2	GTN.....	55
3.6.3	Hydroxylamine.....	57
3.6.3.1	HONH ₃ Cl	57
3.6.4	Hydroxyimine.....	58
3.6.4.1	NOR-3 = FK409	58
3.6.4.2	NOR-1.....	61
3.6.5	NONOates.....	62

3.6.5.1	DEA/NO.....	62
3.6.6	Alkylierte NONOates.....	63
3.6.6.1	M-Pyrro /NO, E-Pyrro /NO	63
3.6.6.2	V-Pyrro/NO	63
3.6.7	5-Ringheterozyklen	63
3.6.7.1	Furoxan: CAS1609.....	63
3.6.7.2	N-Methyl-N-nitrososydnonimin.....	65
3.6.8	Sonstige	66
3.6.8.1	HE 12.2 B.....	66
3.7	Fazit.....	67
4	LÖSLICHE GUANYLYL-CYCLASE.....	68
4.1	Funktion der löslichen Guanylyl-Cyclase.....	68
4.2	Prinzip des sGC-Assays.....	70
4.3	Optimierende Bedingungen	70
4.4	Versuchsaufbau.....	71
4.5	Ergebnisse	72
4.5.1	Die sGC stimulierende Pharmaka	73
4.5.2	In Mikrosomen-Anwesenheit sGC-stimulierende Pharmaka.....	77
4.5.3	Pharmaka, die GSNO-vermittelte Stimulation hemmen.....	80
4.5.4	Nicht reproduzierbare Stimulation der sGC	81
4.5.5	Keine Stimulation der sGC.....	81
4.6	Fazit.....	81
5	OXYHÄMOGLOBIN-ASSAY.....	82
5.1	Prinzip.....	82
5.2	Präparation des Rattenleberhomogenates sowie des Cytosols und der	

Mikrosomen.....	84
5.2.1 Leberhomogenat.....	84
5.2.2 Cytosol.....	84
5.2.3 Mikrosomen	84
5.3 Durchführung des Oxyhämoglobin-Assays.....	85
5.4 Kalibrierung.....	86
5.5 Optimierende Bedingungen.....	86
5.6 Ergebnisse.....	87
5.6.1 Mit Zusatz von Leberhomogenat, -cytosol oder -mikrosomen.....	87
5.6.1.1 V-Pyrro/NO.....	87
5.6.1.2 Andere Diazeniumdiolate.....	91
5.6.1.3 GTN und Molsidomin.....	92
5.6.2 Mit Zusatz von Aortenhomogenat	95
5.6.3 Mit Zusatz von Blutplasma	95
5.6.4 Mit Zusatz von Glattmuskelzellen.....	95
6 BEURTEILUNG AUSGEWÄHLTER SUBSTANZEN	96
6.1 Bay-k8644	96
6.2 Nitrofurantoin.....	97
6.3 GTN.....	98
6.4 Hydroxylaminhydrochlorid	99
6.5 FK409	101
6.6 NOR-1.....	103
6.7 DEA/NO.....	107
6.8 V-Pyrro/NO.....	110

6.9	CAS1609	113
6.10	N-Methyl-N-nitrososydnonimin	116
6.11	HE12.2B	117
7	ZUSAMMENFASSUNG	119
	SUMMARY	122
8	ANHANG	125
8.1	Geräte	125
8.1.1	NO-Bestimmung	125
8.1.1.1	Sievers NOA™280	125
8.1.1.2	Ansyco AC 30M	125
8.1.2	sonstige Bestimmungen	126
8.1.2.1	Elementaranalysen.....	126
8.1.2.2	IR-Spektren	126
8.1.2.3	Massenspektren	126
8.1.2.4	¹ H-NMR-Spektren.....	126
8.1.2.5	Dünnschichtchromatographie.....	126
9	GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS	127
10	LITERATURVERZEICHNIS	131
	DANKSAGUNG	170
	LEBENS LAUF	171

Abkürzungen

AA	Ascorbinsäure
Ach	Acetylcholin
Arg	Arginin
Asc	Ascorbinsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cNOS	konstitutive NO-Synthase
CO	Kohlenmonoxid
Cu	Kupfer
Cys	Cystein
DEA/NO	2-(N,N-Diethyl-amino)-diazon-1-ium-1,2-diolat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECD	Electron-capture-detector
E-Pyrro/NO	2-O-Ethyl-1-(pyrrolidin-1-yl)diazon-1-ium-1,2-diolat
ESR	Elektronenspinresonanz
GIT	Gastrointestinaltrakt
Glc	Glucose
GSH	Glutathion
GTN	Glyceroltrinitrat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HPLC	High performance liquid chromatography
5-HT	5-Hydroxytryptamin = Serotonin
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin (Phosphodiesteraseinhibitor)
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositoltriphosphat
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbidmononitrat
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat

NANC	non-adrenerg-non-cholinerg
NF κ B	nuclear factor κ B (ein Transkriptionsfaktor)
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
M-Pyrro/NO	2-O-Methyl-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat
NO	Stickstoffmonoxid
NONOat	Diazen-1-ium-1,2-diolat
nNOS	neuronale NO-Synthase
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PBN	Phenyl-tertiär-butyl-nitron (Spin-trap)
PLC	Phospholipase C
PP _i	Pyrophosphat = Diphosphat
sGC	lösliche Guanylyl-Cyclase
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin
SOD	Superoxiddismutase
Substanz P	Undecapeptid mit typ. Kininwirkung (u. a. Vasodilatation)
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPP	Tetraphenylporphyrin
V-Pyrro/NO	2-O-Vinyl-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat

1 Einleitung

1.1 Pharmakologische Wirkungen von NO

Nachdem bereits 1846 der italienische Chemiker Ascanio Sobrero aus Turin nach Mischung von Glycerol mit konzentrierter Salpeter- und Schwefelsäure das Nitroglycerin erhalten hatte, dauerte es 17 Jahre bis Alfred Nobel diese Substanz unter dem Namen „Nobels explosives Öl“ industriell herstellte und patentieren ließ. Als Alfred Nobel an Angina pectoris erkrankte, bekam er 1896 Nitroglycerin verschrieben. Er konnte sich keine Erleichterung seiner Schmerzen vorstellen, weil er von Sobrero wußte, daß Nitroglycerin starke Kopfschmerzen hervorrief („Nitrat-Kopfschmerz“). Er sah diese Verordnung als Ironie des Schicksals an, lehnte die Einnahme ab und starb an Angina pectoris im gleichen Jahr in San Remo [179].

1980 postulierte man ein endogenes Molekül, **EDRF** (endothelium-derived relaxing factor), das die acetylcholin-induzierte Wirkung der Vasodilatation vermittelt, die nur an Gefäßen mit intaktem Endothel auftritt [98,96,97].

Erst 1986 wurde EDRF durch zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen von Furchgott und Ignarro als Stickstoffmonoxid (NO) „enttarnt“ [138-141,158,231]. Noch einige Zeit später standen Nitrosothiole, Dinitrosyleisencystein-Komplexe, Nitroxylanionen und Hydroxylamin in der Diskussion, für die gefäßrelaxierenden Eigenschaften von EDRF verantwortlich zu sein. Es zeigte sich aber letztlich, daß nur die Eigenschaften von NO mit denen von EDRF identisch sind [219,94,289,83,145,298].

Etwa zum gleichen Zeitpunkt wurde die Wirkung von NO auf das Effektorenzym Guanylyl-Cyclase bewiesen, wohingegen die Hypothese der Wirkform NO aus dem Prodrug Nitroglycerin bereits 1978 aufgestellt wurde [217,143].

Für die Entdeckung der endothelvermittelten Relaxation durch NO und die Wirkungsweise dieses Signalmoleküls erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

1.1.1 Physiologische Rolle von NO

In der Folgezeit wurden eine Vielzahl weiterer NO-vermittelter Wirkungen aufgedeckt, wie z.B.:

- Eine an Thrombozyten antiaggregatorische Wirkung [89,117].
- Die Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, aber die Stimulation der Proliferation von Endothelzellen [181].
- Die Produktion größerer Mengen NO in Makrophagen, die bei der unspezifischen Immunabwehr wirken [223,175] (siehe Kap. 1.2.2).
- Die Regulation von Ventilation und Perfusion im Bronchialsystem; NO wird in der Atemluft von Säugern gefunden [13,180].
- Die Homöostase der Körperflüssigkeit im Urogenitalsystem, tubulo-glomeruläres Feedback; ferner scheint es sich bei dem Transmitter für die non-adrenerge-non-cholinerge (NANC) Innervation, um NO zu handeln [166]. Hier wird auch diskutiert, daß nicht das freie NO-Radikal beteiligt ist, sondern eventuell eine andere Redoxform (s. Kap. 1.4.1) [238].
- NO wird als Mediator der NANC-vermittelten Relaxation des glatten Muskels im Gastrointestinaltrakt für die Regulation der Peristaltik verantwortlich gemacht [251,178,315].
- Die Bildung von NO auf Stimulation des NMDA-Rezeptors im ZNS und darauf folgendem Calciumioneneinstrom. NO ist an Lernfähigkeit, Gedächtnisprozessen, zerebraler Ischämie, Morphintoleranz sowie Schmerzwahrnehmung beteiligt [8,101,113,152,224,230,276,316].
- Ferner wird eine Mitwirkung von NO bei der Migräne diskutiert, da NO nach Stimulation der 5-HT-Rezeptoren freigesetzt wird [226,88].
- Im neuroendokrinen und endokrinen System ist die Interleukin-2 stimulierte Corticotropin-Releasing-Hormon-Freisetzung als NO-abhängig entlarvt [257,237].
- In D-Glucose-Gegenwart wird NO von den pankreatischen β -Zellen ausgeschieden, wo es die Insulin-Freisetzung stimuliert [258].
- In der Schwangerschaft findet eine östrogen-induzierte Steigerung der NO-Produktion statt [33,237].
- In der Retina gebildetes NO scheint an der Signalübertragung über Transducin betei-

ligt zu sein [257].

- Im hinteren Bereich der Zunge wird eine Umwandlung von Nitrit zu NO als antimikrobieller Abwehrmechanismus des Mundraumes und oberen Gastrointestinaltraktes diskutiert [71].

1.1.2 Pathologische Rolle von NO

Wenn das vaskuläre Endothel z.B. durch Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus oder starkes Rauchen soweit geschädigt ist, daß eine für das hämodynamische Gleichgewicht notwendige NO-Produktion nicht mehr möglich ist, spricht man von endothelialer Dysfunktion [200]. Eine **mangelnde NO-Produktion** begünstigt u.a. das Auftreten von Atherosklerose, Thrombosen und essentieller Hypertonie [182].

Bei einer spontanen Hypertonie wird zwar eine erhöhte NO-Produktion, aber eine verstärkte Inaktivierung festgestellt, hingegen scheint bei einer salz-induzierten Hypertonie die NO-Bildung verringert und bei einer Atherosklerose findet mit den vermehrt gebildeten Superoxidradikalen eine Reaktion zum hochreaktiven Peroxynitrit statt [221].

Dagegen wirkt eine **NO-Überproduktion** zelltoxisch. Im vaskulären System kommt es zu Hypotonie, kardiovaskulärem Kollaps und Organversagen. Die stärkste NO-Überproduktion findet beim septischen Schock statt [107].

Akute und chronische Entzündungen können NO-vermittelt zu Herzbeschwerden, insulinabhängigem Diabetes, rheumatoider Arthritis, Glomerulonephritis und ulcerativer Kolitis führen. Hierfür ist eine Überexpression der induzierbaren NO-Synthase (i-NOS=NOSII) verantwortlich (s. 1.2.2) [43,209,290].

In chronisch entzündetem Gewebe kann es durch hohe NO-Konzentrationen zur Bildung von N-Nitrosaminen kommen, die wiederum an einer Tumorentstehung beteiligt sein können [205,222].

Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem ischämisch-hypoxischem Insult, der Alzheimer oder Huntington Krankheit wird ein neuronaler Zelltod aufgrund Glutamat-vermittelter Aktivierung der NMDA-Rezeptoren und anschließender NO-Freisetzung diskutiert [210].

Die Bildung von **Peroxynitrit (ONOO^-)** aus NO und Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\cdot -}$) birgt wohl das aggressivste Potential von NO-vermittelten Effekten in sich [216]. Nach Protonierung könnte die entsprechende peroxysalpetrige Säure (ONOOH) zu Hydroxylradikalen (OH^\bullet) und Stickstoffdioxidradikalen (NO_2^\bullet) zerfallen oder als Radikalkäfig ($[\text{NO}_2^\bullet\text{OH}^\bullet]$) weiterreagieren. Beide Spezies werden als stark bakterizid und tumorschädigend angesehen. Die homolytische Spaltung findet insbesondere im stark sauren Milieu ($\text{pH} < 2$) in Abwesenheit von Metallionen statt. Dagegen benötigt die heterolytische Spaltung eine hohe Aktivierungsenergie und scheint durch Metallionen, vor allem Kupfer(II)ionen, katalysiert zu werden. So findet im alkalischen Milieu der Zerfall zu Nitrit und Sauerstoff statt, im schwach sauren Bereich kommt es zur Isomerisierung und Nitratbildung [16]. In der Folge des Gehirnschlages kommt es zur stark cytotoxischen Peroxidation von Membranlipiden durch Peroxynitrit [279].

1.2 Biosynthese von NO

Diese vielfältigen Wirkungen von endogenem NO sind nur durch ein besonderes Zusammenspiel von Synthese und Regulation möglich.

Säugerzellen bilden NO aus einem terminalen Guanidinstickstoff (N^{O}) der Aminosäure L-Arginin mit molekularem Sauerstoff, wobei Citrullin entsteht (siehe Abbildung 1). Diese oxidative Umsetzung von L-Arginin (bisher waren nur nicht-oxidative bekannt, wie Hydrolyse zu Ornithin und Harnstoff im Harnstoffzyklus oder Spaltung zu Citrullin und Ammoniak) wird durch die Familie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert [146,255].

Für die Umsetzung eines Moleküls L-Arginin zu Citrullin werden $1\frac{1}{2}$ Moleküle NADPH verbraucht [46].

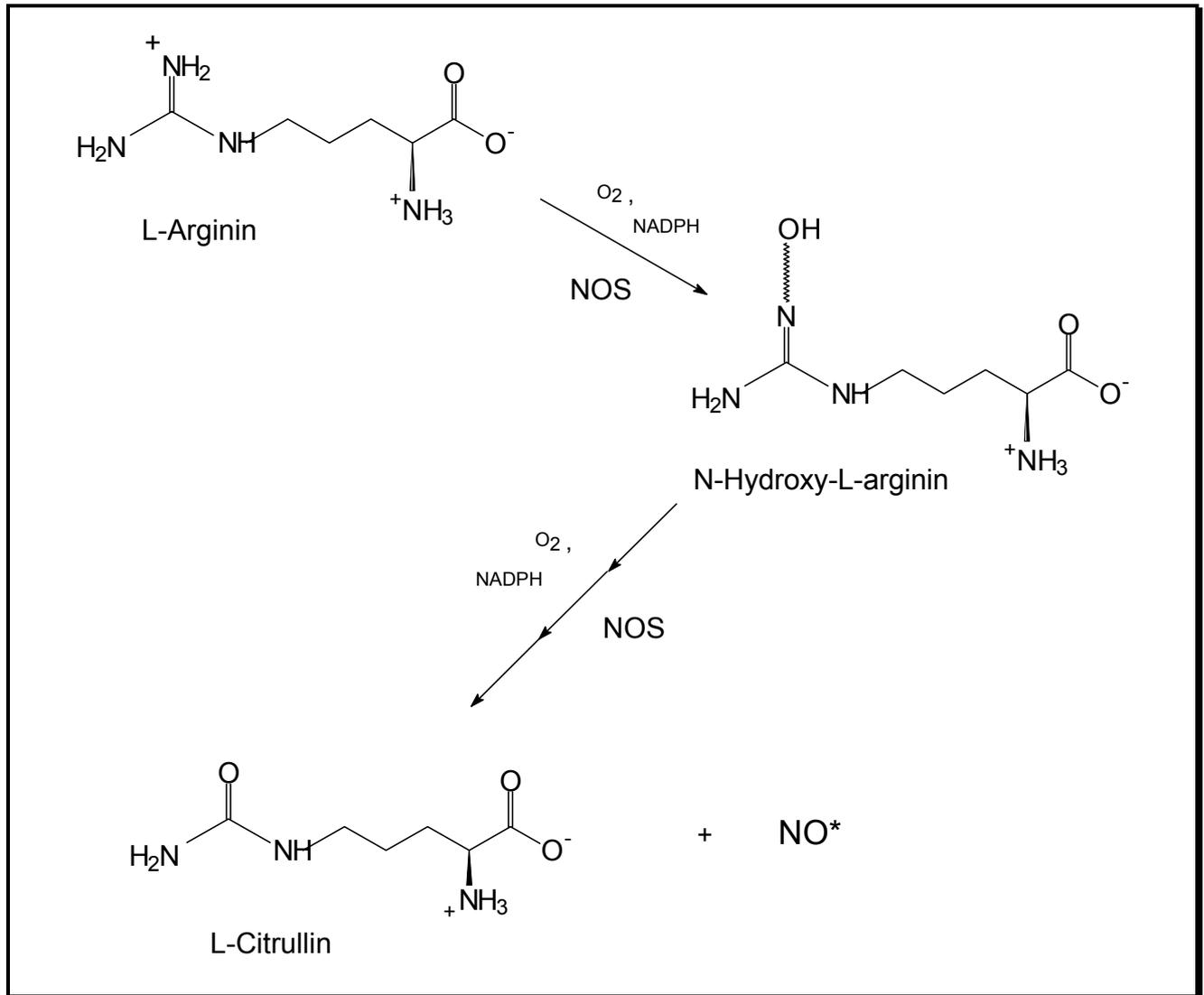


Abbildung 1: Biosynthese von NO aus L-Arginin

Eine Ausnahme bildet die neuronale NO-Synthase, wo die Reaktion von L-Arginin zu L-Hydroxyarginin als NADPH-unabhängig beschrieben wurde [40].

Um ihre vollständige Funktion entfalten zu können, müssen die NO-Synthasen als Dimer vorliegen [191,173].

Wie in der Abbildung 2 erkennbar, ist allen NO-Synthasen die Lokalisation bestimmter essentieller **Kofaktoren und Kosubstrate** gemeinsam. Sie lassen sich in zwei Domänen gliedern:

eine NADPH-Cytochrom-Reduktase-Domäne, mit:

- reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH),
- Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) und
- Flavin-adenin-mononucleotid (FMN),

eine Cytochrom-P450-Dömäne (Oxygenase-Domäne), mit:

- Tetrahydrobiopterin (BH₄) und
- Häm

sowie Calmodulin, [191]. Die Bindungsstelle des Tetrahydrobiopterins liegt vermutlich zwischen dem Häm und dem Flavin-adenin-mononucleotid.

Erst die Bindung des Calmodulins ermöglicht den Elektronenfluß vom NADPH zum Häm-Eisen (dieser kann z. B. durch Thiocitrullin oder Nitroargininmethylester gehemmt werden [1]).

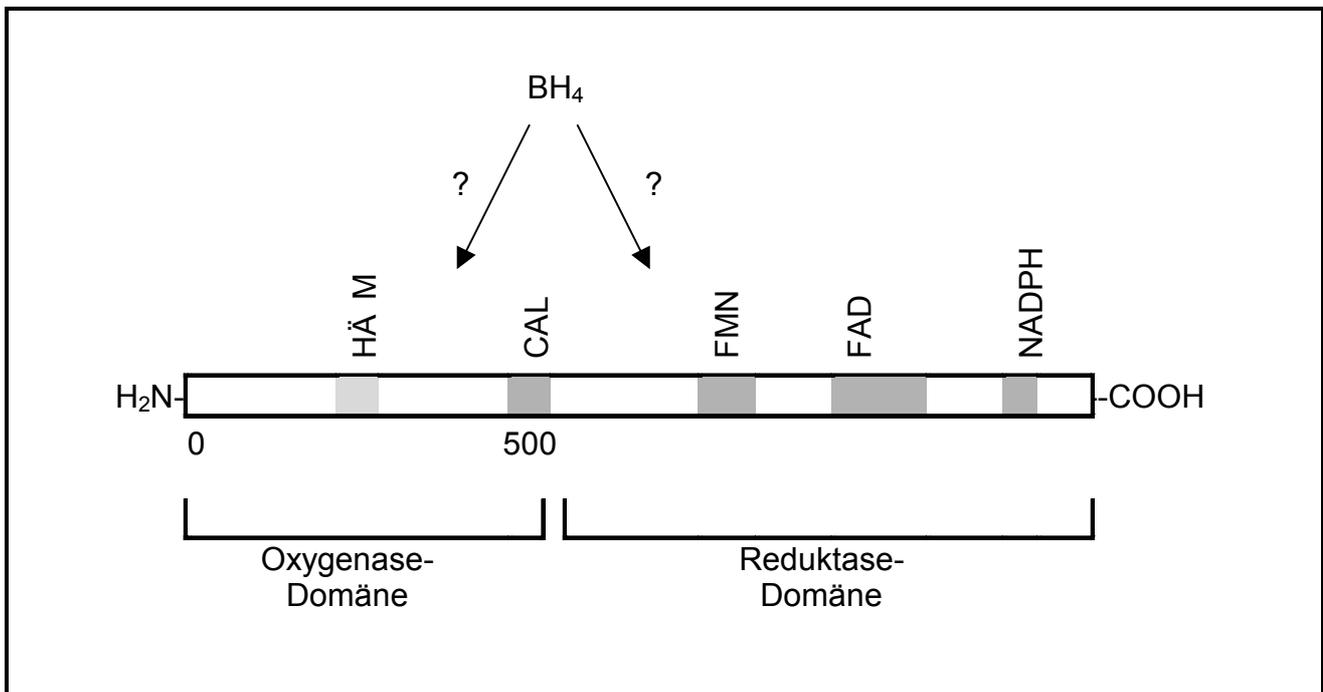


Abbildung 2: Aufbau der NO-Synthasen

Ein negatives Feedback von gebildetem NO zur Senkung der NO-Synthase-Aktivität scheint zwar möglich, wird aber in vivo durch die Instabilität eines NOS-Nitrosyl-Komplexes unter aeroben Bedingungen kaum von Bedeutung sein [136,190].

Es sind **drei verschiedene Isoenzyme** bekannt, die nach der Reihenfolge ihrer Entde-

ckung und Klonierung kurz als NOS I, II und III bezeichnet werden. Sie gleichen sich in Reaktionsmechanismus und kinetischen Eigenschaften, unterscheiden sich in ihrer Bildung, Genexpression, Regulation der enzymatischen Aktivität, relativen Molekülmasse und chromosomalen Lokalisation.

Typ I und III-Isoformen sind hauptsächlich in Nervenzellen (NOS I), Endothelzellen der Blutgefäße (NOS III), und Epithelzellen von Lunge, Niere und Magen zu finden.

Die **NO-Synthase II** befindet sich in Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen der Blutgefäße, Hepathozyten sowie pankreatischen β -Zellen.

1.2.1 Stimulation der konstitutiven NO-Synthase

Die NO-Synthasen I und III binden Calmodulin nur in Gegenwart erhöhter intrazellulärer Calciumionen-Konzentrationen und werden dadurch überwiegend in ihrer Aktivität reguliert [227]. Gebildet werden sie ständig, man spricht daher auch von **konstitutiven NO-Synthasen (cNOS= NOS I und NOS III)**.

Vasodilatierende Substanzen, wie Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Histamin und die Substanz P stimulieren die Phospholipase C. Dadurch entsteht aus Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat 1,2-Diacylglycerin und Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP_3), welches intrazelluläres Calcium freisetzt, daß nach Bildung eines Calcium-Calmodulin-NOS-Komplexes die NO-Synthase aktiviert [53].

Es ist zu beachten, daß beispielsweise Acetylcholin und Bradykinin auch die Freisetzung anderer Vasodilatoren, wie den „endothelial derived hyperpolarizing factor“ (EDHF) oder Prostacyclin (PGI_2) stimulieren können^[183,235].

Die neuronale NO-Synthase wird durch die Stimulation des NMDA-Rezeptors durch z. B. Glutamat und darauf folgendem Natriumionen-Einstrom sowie verzögertem Calciumionen-Einstrom aktiviert [15,130].

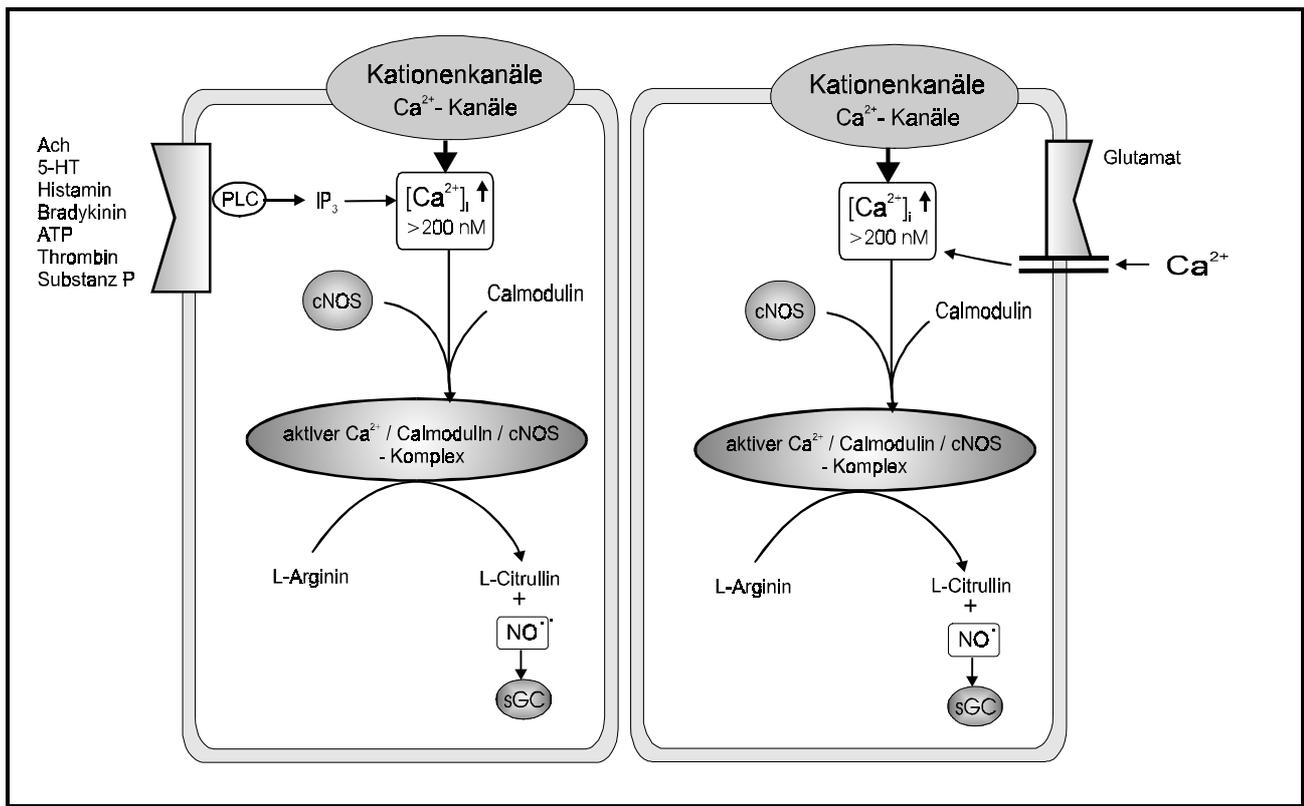


Abbildung 3: Schema zur cNOS-Aktivierung am Beispiel einer Endothelzelle und einer neuronalen Zelle

Entstandenes NO kann in der gebildeten Zelle oder in einer Nachbarzelle die lösliche Guanylyl-Cyclase (sGC) stimulieren.

1.2.2 Stimulation der induzierbaren NO-Synthase

Die NO-Synthase II wird gewebs-und zellspezifisch in ihrer Expression reguliert, man spricht deshalb auch von der **induzierbaren NO-Synthase (iNOS=NOSII)**. Eine Induktion wird durch bestimmte Entzündungsmediatoren (Interferon- γ , Interleukine, Tumornekrosefaktor- α =TNF- α) oder Endotoxine ausgelöst.

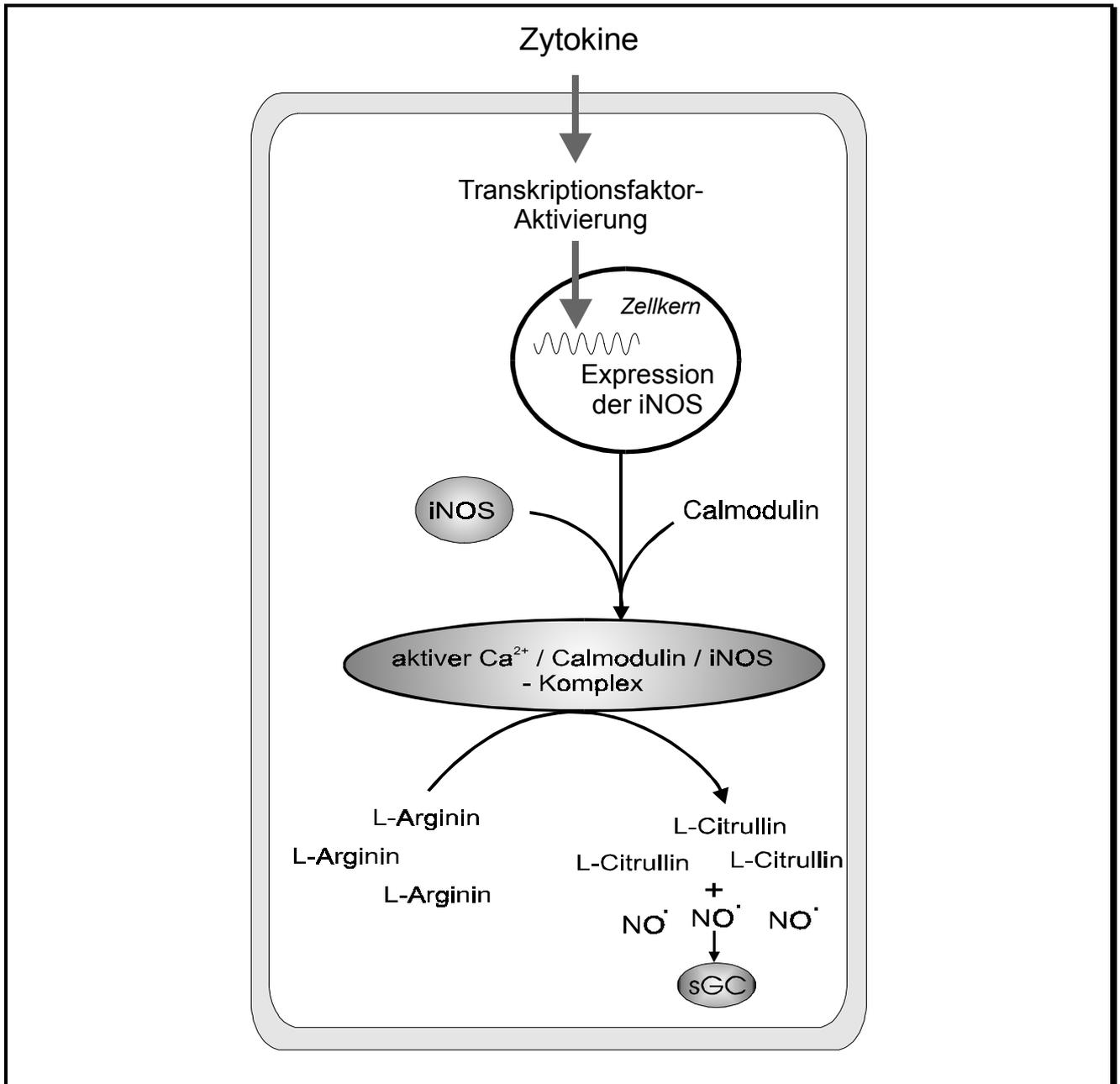


Abbildung 4: Schema zur iNOS-Aktivierung am Beispiel eines Makrophagen

Viele NF κ B (= nuclear factor κ B, Transkriptionsfaktor)-aktivierende Faktoren, wie proinflammatorische Zytokine, UV-Licht, virale und bakterielle Produkte (Lipopolysaccharide=LPS, etc.) produzieren reaktive Sauerstoffspezies. Der oxidative Streß führt zur DNA-Bindung von NF κ B und anschließender iNOS-Transkription [173]. Diese NO-Synthase produziert nach ihrer Aktivierung über 4-24 Stunden ca. 400-fach größere Mengen an NO als die konstitutiven NO-Synthasen [175].

Entstandenes NO kann ebenfalls in der selben Zelle oder in Nachbarzellen die sGC aktivieren [256].

1.2.3 Hemmung der konstitutiven NO-Synthase

Die **Hemmung der Aktivität der NO-Synthase I und III** ist durch verschiedene Arginin-derivate möglich. Es findet wahrscheinlich eine reversible Konkurrenz mit L-Arginin statt.

Die Mehrzahl der Inhibitoren ist am terminalen Guanidin-Stickstoff (N^ω) substituiert. Natürlich vorkommende Hemmstoffe sind u.a. N^ω-Methyl- und N^{ω,ω}-Dimethyl-arginin (hohe Konzentrationen befinden sich in Niere, Bauchspeicheldrüse und Leber) sowie N-Iminoethyl-L-Ornithin (Streptomyces). Synthetische Hemmstoffe sind z.B. N^ω-Nitro- oder N^ω-Amino-L-arginin [172].

Ferner ist eine selektive Hemmung der konstitutiven NO-Synthase durch Blockade der Calmodulin-Bindung an die NO-Synthase durch Calmidazolium möglich [291,99].

1.2.4 Hemmung der induzierbaren NO-Synthase

Aminoguanidin, Thiocitrullin und L-Canavanin (aus Canavalia ensiformis, der Jackbohne) **hemmen** überwiegend die **Aktivität der NO-Synthase II** [105]. Wenig selektiv, aber potente NO-Synthase II-Inhibitoren sind außerdem N-Iminoethyl-ornithin und N-Iminoethyl-lysin [173].

Gehemmt wird die Enzyminduktion durch Interleukin (IL)-4 und -10, „makrophage deactivating factor“ und „transforming growth factor- β “ [19,264].

Glucocorticoide können die NO-Synthase II ebenfalls in ihrer Expression hemmen, wohingegen die basale NO-Synthase der NO-Synthase I und III nicht beeinflusst wird.

1.3 Enzymunabhängige NO-Bildung in biologischem Gewebe

NO kann im ischämischen Herzen durch direkte **Reduktion aus Nitrit** unter den dort auftretenden stark sauren und reduzierenden Bedingungen entstehen. Längere ischämische Zustände können damit zu einer Nekrose und dem Verlust der kontraktile Funktion vorwiegend über diese Form der NO-Bildung führen [319,318].

Ferner ist eine NO-Produktion aus Ascorbinsäure (AA) und Nitrit in Nervenzellen postuliert, wobei Dehydroascorbinsäure (DHA) entsteht, die mit Sauerstoff wieder zu Ascorbinsäure reoxidiert werden kann [204].



Allerdings wird auch eine gesteigerte endotheliale NO-Bildung durch Ascorbinsäure diskutiert, vermutlich durch eine protektive Wirkung an der NO-Synthase oder erhöhte Verfügbarkeit der notwendigen Kofaktoren [123].

1.4 Eigenschaften von NO

1.4.1 Chemische und physikalische Merkmale

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften von NO lassen sich gut durch seine Elektronenverteilung veranschaulichen. In Abbildung 5 ist die Verteilung der Außenelektronen in einem Molekülorbitalschema wiedergegeben. Das NO-Radikal besitzt ein ungepaartes Elektron in einem antibindenden $2p\pi^*$ -Orbital. Somit erklärt sich die Bindungsordnung von 2,5: drei Bindungen der vollständig besetzten σ_z , π_x und π_y Molekülorbitale minus einer halben Bindung des antibindenden π^* -Orbitals. Da das höchst besetzte Orbital antibindender Natur ist, kann dieses Elektron leicht abgegeben werden, es entsteht NO^+ (Ionisierungspotential 9,25 eV) [93,69].

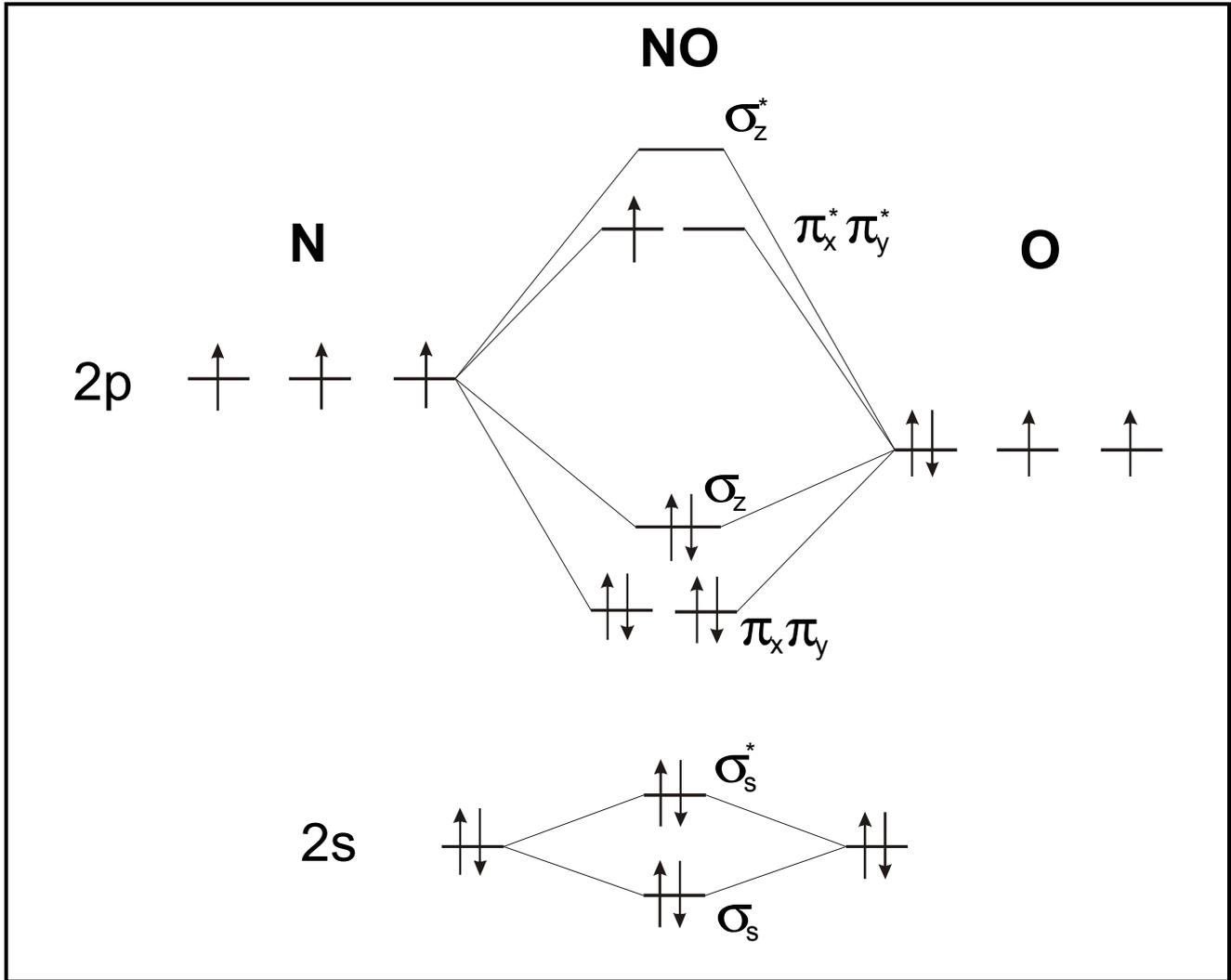


Abbildung 5: Molekülorbitalschema von NO^\bullet (äußere Elektronenschale)

Die NO-Bindungslänge im Stickstoffmonoxidradikal beträgt 1,15 Å, im Vergleich hierzu sind für das Nitrosoniumion (NO^+) 0,95 Å und für das Nitroxylanion (NO^-) 1,26 Å ermittelt worden [279]. Entsprechend liegen die Schwingungsfrequenzen der NO-Bindung bei 2300 cm^{-1} für NO^+ , bei 1840 cm^{-1} für das NO-Radikal und bei 1290 cm^{-1} für NO^- [51].

Das Nitrosoniumion ist zu reaktiv, um in wässriger Lösung zu existieren. Es entsteht sofort salpetrige Säure bzw. Nitrit:



Erst in stark saurer Lösung ist die Bildung von NO^+ aus Nitrit möglich.

Bedeutender aus physiologischer Sicht ist die Transnitrosierung, ein Nitrosothiol über-

trägt NO^+ auf ein anderes Thiol oder Nucleophil [34]:



Das Nitroxylanion ist unter physiologischen Bedingungen deutlich stabiler. Die Dimerisierung ist stark konzentrationsabhängig und wird bei den in Zellen auftretenden Konzentrationen nur sehr langsam stattfinden [34]:



Außerdem ist die Reaktion des Nitroxylanions mit Sauerstoff von Bedeutung, die zu einer deutlichen Erhöhung der Toxizität führt und auf der Bildung von Peroxynitrit beruht [16,307]:



Die Reduktion des NO-Radikals zum Nitroxylanion ist in vivo sehr unwahrscheinlich, da Sauerstoff, der in der Regel in einem 100-fachen Überschuß vorliegt, wesentlich schneller reduziert wird als NO^\bullet (Reduktionspotential zu NO^- bei pH 7,0 = 0,39 V). Trotzdem scheint ein Auftreten des Nitroxylanions durch (a) enzymatische Bildung über die NO-Synthase [125], (b) indirekt aus Hydroxyarginin durch Wasserstoffperoxid/Haemprotein-Anwesenheit oder [307] (c) heterolytische Spaltung aus S-Nitrosothiolen [9] möglich.

NO liegt bei Raumtemperatur als farbloses Gas vor (die z.T. vorkommende Beschreibung als blaues Gas ist auf Gegenwart von N_2O_3 -Spuren zurückzuführen), mit einem Siedepunkt von $-151,8^\circ\text{C}$ und einem Schmelzpunkt von $-163,6^\circ\text{C}$.

Die Wasserlöslichkeit bei 25°C und 1atm beträgt $1,9 \text{ mmol/l}$ [75].

Von physiologischer Bedeutung ist NO nur in wässriger Lösung. Der Diffusionskoeffizient in Wasser beträgt bei 37°C ca. $3 \text{ bis } 4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ [157]. Der Verteilungskoeffizient zwischen Gas und Wasser bei Raumtemperatur liegt bei etwa 20. Als Halbwertszeit von NO in luftgesättigtem Krebs-Henseleit-Puffer ($0,2 \text{ mM O}_2$) wurden ca. 6 Sekunden ermittelt [76].

An der Luft reagiert NO mit dem Luftsauerstoff zu NO_2 , welches als braunes Gas sicht-

bar wird [109]:



Im wässrigen Medium führt die Oxidation von NO nahezu ausschließlich zu Nitrit:



Die **Hydrolyse** von NO_2 müsste normalerweise zu einer äquimolaren Menge von Nitrit und Nitrat führen, da aber die Reaktion von NO mit NO_2 schneller ist, erhält man vor allem Nitrit [35].

Die Reaktion ist zweiter Ordnung in Bezug auf die NO-Konzentration und erster Ordnung hinsichtlich der Sauerstoffkonzentration, insgesamt dritter Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $6,3 \times 10^6 \text{ M}^{-2}/\text{s}^{-1}$ bei 20 °C [159]. Diese Geschwindigkeitskonstante ist damit 1000 mal größer als für die Gasphasenreaktion.

1.4.2 Physiologisch bedeutsame Merkmale

Im physiologischen Bereich spielt die Umsetzung von NO mit Oxyhämoglobin zu Nitrat eine große Rolle:



Diese Reaktion ist vor allem deshalb sehr wichtig, da sie sehr schnell stattfindet [142].

Im venösen Blut reagiert NO mit Hämoglobin zu Nitrosylhämoglobin.

Arterien haben eine höhere NO-Freisetzungsrage (der vaskuläre Tonus ist stärker NO-abhängig!) als Venen, diese haben dafür kompensatorisch einen höheren Spiegel an löslicher Guanylyl-Cyclase und zeigen damit auf Zugabe von NO-Donoren einen stärkeren vasodilatierenden Effekt [171]. Hiermit läßt sich auch der Nachteil der bisher ange-

wandten NO-Pharmaka, das venöse Pooling, erklären [246].

Physiologisch wichtige Reaktionspartner von NO sind in der Reihenfolge abnehmender Reaktionsgeschwindigkeit [16]:

- Hämoglobin (im Bioassay mit Oxyhämoglobin weniger als 100ms !) [156]
- L-Cystein
- Albumin
- molekularer Sauerstoff (10000 mal geringer als die Affinität zum Häm-Eisen im Hämoglobin)[234].

Nachfolgend werden einige nur kurz beschriebene Charakteristika aufgeführt:

- Die im Blut festgestellte biologische Halbwertszeit beträgt wenige Sekunden, sie scheint abhängig zu sein von der initialen Konzentration.
- Nach einer Endothelstimulation mit Bradykinin sind maximale NO-Konzentrationen von 450 nM aufgetreten, im glatten Muskel befinden sich daraufhin nach 90 Sekunden noch 130 nM NO [252]; nach Acetylcholin-Stimulation (100 nmol/min) wurden z. B. nach direkter Messung aus einer Handvene NO-Konzentrationen von ca. 250 nM gemessen [297].
- Die Zeit von einer Stimulation des Endothels mit Bradykinin oder ATP bis zur Freisetzung von NO beträgt im Modell etwa 15 s [156].
- Eine halbmaximale Stimulation am Endothel wurde mit einer Konzentration von 5 nM NO festgestellt [156].
- Die basale endotheliale NO-Bildung liegt bei etwa 8 nM [156].
- Eine Stimulation der induzierbaren NO-Synthase führt zu NO-Konzentrationen von bis zu 40 μ M [53].
- Der neuronale Aktionsradius von NO reicht maximal bis zu 100 μ m, womit ungefähr bis zu 2 Mio. Synapsen erreicht werden können [101].

1.4.3 Physiologisch wichtige Zielstrukturen von NO

NO hat eine große Affinität zu **Häm-Proteinen**, wie der löslichen Guanylyl-Cyclase, dem Hämoglobin, dem Myoglobin, der Catalase, der Peroxidase, den Cytochromen und der Cyclooxygenase [278,293,30,116].

Hier ist allerdings bewiesen, daß nicht allein die Affinität von NO zum Häm-Eisen ausschlaggebend ist, sondern z. B. beim Oxyhämoglobin auch eine Bindung von NO an einen speziellen Cysteinrest (Cys β 93) stattfindet [234]. Ferner ist eine Steigerung der NO-Freisetzung aus S-Nitrosohämoglobin durch niedermolekulare Thiole möglich [149,127].

Für die Superoxiddismutase (SOD[Cu]) ist beispielsweise eine Umwandlung vom Nitroxylanion (NO $^-$) in das NO-Radikal bewiesen [218].

Die Ribonucleotid-Reduktase (ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der **DNA-Biosynthese**, ein non-Häm-Eisen-Enzym) wird durch NO gehemmt [162]. Hohe Konzentrationen von NO führen zur **Deaminierung der DNA**, als häufigste Mutationen ergeben sich demzufolge Guanin/Cytosin zu Adenin/Thymin.

Hier wird eine Wechselwirkung von NO mit dem π -Elektronensystem der Purine und ein Wechsel der Orientierung zu den benachbarten DNA-Basen vermutet [6,244].

Die Wechselwirkung von Stickoxiden mit **Thiolen** ist für die Modulation von Rezeptoren, Ionenkanälen und Enzymen ebenso wie für die viel diskutierte Speicherung von biologisch verfügbarem NO verantwortlich [9,237]. So werden z. B. calciumabhängige Kaliumkanäle in den Gefäßmuskeln direkt durch NO aktiviert, worauf eine Relaxation des Muskels folgt [25,169]. Weiterhin ist im glatten Muskel der Bronchien eine Blockade der „gap-junctions“ durch NO nachgewiesen worden, die vermutlich auf eine Wechselwirkung von NO mit Thiolen zurückzuführen ist [208]. Weiterhin werden Nitrosothiole seit langem als mögliche Speicherform des NO angesehen. Hinweise hierzu sind z. B. die Hemmung der Relaxation von exogen zugeführtem NO durch Hydrochinon, während die durch NANC-Stimulation erreichte Relaxation hiermit nicht aufgehoben werden kann [126].

Ferner interagiert NO mit **Enzymen** der mitochondrialen Atmungskette (Komplex I und Komplex II) sowie des Citronensäure-Zyklus (Aconitase) durch direkte Reaktion mit den Eisen-Schwefel-Clustern [50,317].

1.5 NO-Pharmaka

1.5.1 Bisher bekannte NO-Donoren

Die bisher klinisch eingesetzten NO-Donoren (s. Abbildung 6) werden alle als Vasodilatoren bei koronarer Herzkrankheit angewandt. Die Senkung des peripheren Gefäßwiderstandes und die Abnahme des Sauerstoffverbrauches am Herzen führen zur Verbesserung der Belastbarkeit des Patienten, Häufigkeit und Schweregrad von Angina-pectoris-Anfällen werden reduziert [170].

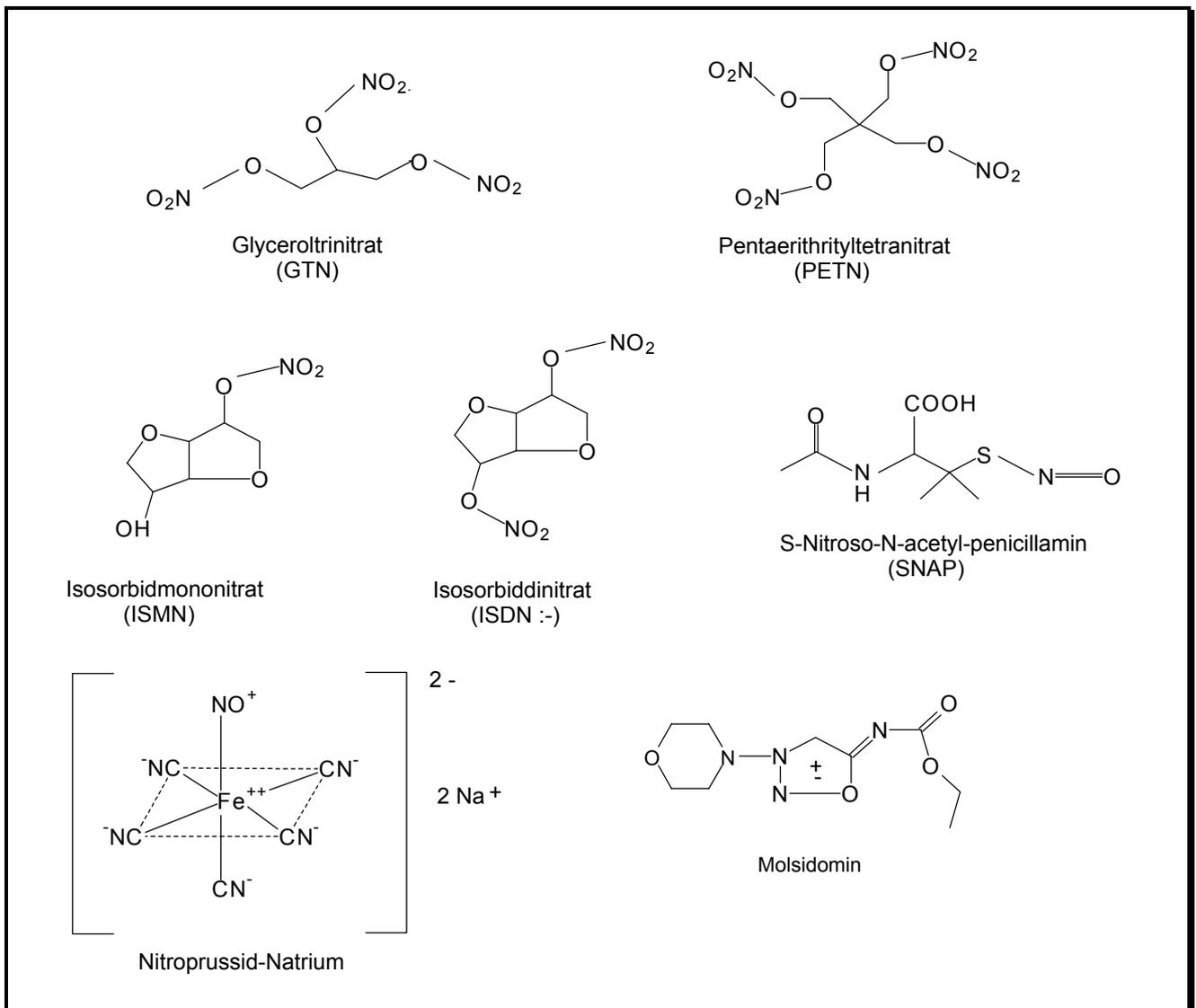


Abbildung 6: Bekannte NO-Donoren

Ein interessanter Aspekt zur Beurteilung dieser Prodrugs sind die verschiedenen Bioaktivierungswege, die zur Freisetzung des NO führen.

Für die Bioaktivierung der **Nitrate** zu NO ist eine reduktive Spaltung Voraussetzung; der Stickstoff in den Nitraten hat eine Oxidationsstufe von +5, die Oxidationsstufe des Stickstoffs im NO beträgt +2. Als Katalysatoren dieser Umsetzung könnten Enzyme der Cytochrom-Familie eine Rolle spielen [66].

Für eine nichtenzymatische Freisetzung ist eine Beteiligung von Thiolen, die dabei zu den entsprechenden Disulfiden reagieren, vielfach untersucht [236,59,294,110]. Ob diese in vivo als direkte Kofaktoren oder als Donoren von Reduktionsäquivalenten dienen ist schwer abzugrenzen [120].

Molsidomin spaltet dagegen erst nach Hydrolyse zum aktiven Metaboliten SIN-1 (mit einer formalen Oxidationsstufe des Stickstoffs von 0) und nachfolgender ebenfalls hydrolytischer Ringöffnung (zum Metabolit SIN 1A) mit Sauerstoff bzw. aktiviertem Sauerstoff NO ab [24,68].

Nitrosothiole, wie das S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP), deren Stickstoffatome eine Oxidationsstufe von +1 haben, setzen spontan, in der Regel innerhalb weniger Minuten, NO frei [215]. Eine maximale NO-Abspaltung wird überraschenderweise erst in Anwesenheit reduktiver Agentien erhalten, besonders Kupfer- und Eisen(II)-ionen steigern die Freisetzung [197,306]. Dies erklärt sich durch eine heterolytische Spaltung von Nitrosothiolen in Thiolatanionen und Nitrosylkationen, wodurch eine Stickstoffspezies mit der Oxidationsstufe +3 entsteht, die dann zu NO reduziert werden kann (siehe Gleichung 12).



Sowohl eine homolytische NO-Abspaltung (insbesondere für Nitrosocystein im Phosphatpuffer bestätigt) als auch die physiologisch bedeutsame heterolytische Bildung von NO^+ bzw. NO^- , je nach Redoxbedingungen, ist für die Nitrosothiole bewiesen [9].

Die Freisetzung von NO aus **Natriumnitroprussid** wird stark durch Thiole, wie z.B. L-Cystein, Dithiothreitol oder Glutathion stimuliert [120].

1.5.2 Ausblicke für neu zu entwickelnde NO-Pharmaka

1.5.2.1 NO-Konzentration senkende Pharmaka

Die endogene Überproduktion von NO, im wesentlichen durch die NO-Synthase II verursacht, kann zu einer Reihe von pathologischen Zuständen führen (s.1.1.2), die eine Eingriffsmöglichkeit in die NO-Synthese wünschenswert machen [192].

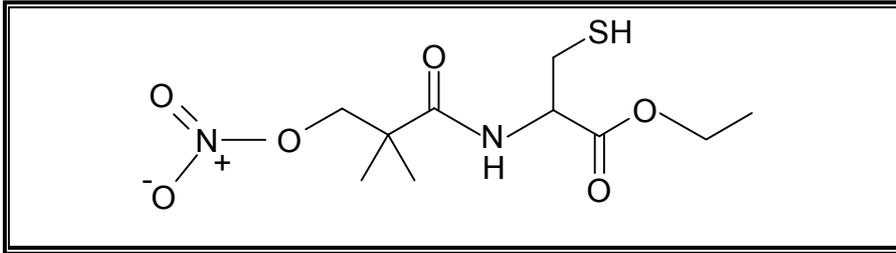
Auch ließe z. B. die **Hemmung der NO-Synthase II** theoretisch eine Therapie mit höheren effektiven Dosen des tumoriziden Interleukins-2 zu, dessen unerwünschte Wirkungen NO-vermittelt und gegenwärtig dosisbegrenzend für die Therapie sind [211].

Hier bieten sich die Möglichkeiten entweder die Aktivität oder die Expression der NO-Synthase zu hemmen. Die unter Kapitel 1.2 beschriebenen Hemmstoffe der NO-Synthasen sind bislang ohne klinische Bedeutung.

NO-Fänger, die NO direkt binden (Hämoglobin, Myoglobin, Pyocyanin, [2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid, Kaliumsalz]) oder dessen Zerfall durch Sauerstoffradikalbildung beschleunigen, haben bislang nur experimentelle Bedeutung.

1.5.2.2 NO-Donoren

Bisher angewandte NO-Donoren stellen im wesentlichen eine Substitutionstherapie von endogenem NO dar. Hier ist zu beachten, daß dies oft eine Dauertherapie darstellt und vor allem die bei Nitraten auftretende Toleranzentwicklung, die nur bei Pentaerythryl-tetranitrat nicht beobachtet wird [63,170], vermieden werden muß. Da die Erschöpfung des endogenen Thiol-Pools dabei eine Rolle spielen könnte, wurden Substanzen entwickelt, in denen **Thiol- und Nitrat-Struktur** vereint sind. Spontane NO-Freisetzung und scheinbar geringere Neigung zur Toleranzentwicklung bestätigen dies (siehe Formel 1) [167].



Formel 1: SPM3672, ein Hybrid-Pharmakon mit Nitrat- und Thiolstruktur

Um neben der koronaren Herzkrankheit weitere Indikationsgebiete für NO-Donoren zu erschließen, ist eine selektive NO-Freisetzung notwendig, für die es bislang noch wenig Ansätze gibt.

Ein Schritt in diese Richtung ist die Entdeckung, daß **S-Nitroso-glutathion**, ein stabiles Nitrosothiol, die Plättchenaggregation und -adhäsion in einem Dosisbereich hemmt, wo nur eine minimale Vasodilatation eintritt [54].

Da NO auf Tumorzellen zytotoxisch wirkt und sowohl die Wirkung ionisierender Strahlen als auch von Chemotherapeutika verstärkt, wird auch hier versucht eine möglichst tumorselektive NO-Freisetzung zu erreichen. Der erhöhte Glucosetransport in Tumorzellen war ein Ansatz zur Entwicklung von **glucose-konjugiertem SNAP** [29].

Die Inhalation von **NO-Gas** (5-80 ppm) eignet sich beispielsweise zur Behandlung der Bronchialverengung Neugeborener ebenso wie beim ARDS (adult respiratory distress syndrom) [87]. Eine Zulassung als Arzneimittel ist in nächster Zeit wahrscheinlich.

1.6 Aufgabenstellung

Wie oben aufgezeigt wurde, sind die vielfältigen Wirkungen von NO stark vom Wirkort abhängig. Um eine möglichst spezifische Wirkung zu erreichen, ist eine selektive NO-Freisetzung wünschenswert.

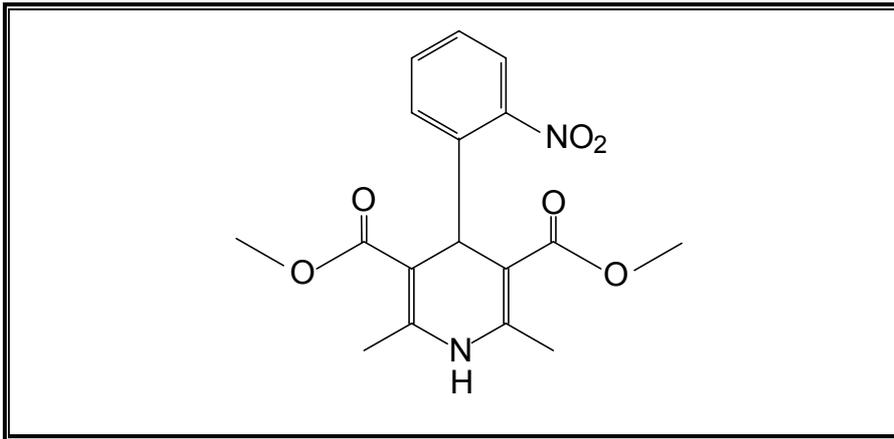
Im Rahmen dieser Arbeit sollten Möglichkeiten zur Aktivierung von NO-Donoren aufgezeigt werden. Hierbei ist vor allem auf bisher wenig untersuchte Substanzen einzugehen. Die getesteten potentiellen NO-Donoren sollten möglichst nicht spontan, sondern erst in Anwesenheit bestimmter Kofaktoren NO freisetzen bzw. durch diese eine deutliche Steigerung in der NO-Freisetzung erfahren. Als Kofaktoren kommen physiologisch relevante Verbindungen bzw. diese imitierende Substanzen in Frage. Besondere Bedeutung kommt Cytochrom-P450-imitierenden Substanzen zu, da die NO-Synthase selbst als Häm-haltiges Enzym Vorbild für eine derartige Stimulation ist [47,44,247,55,151,272].

Ausgehend von der Chemilumineszenzmethode als direkte in-vitro NO-Meßmethode sollten richtungsweisende Versuche etabliert werden, die dann zur Charakterisierung der potentiellen NO-Donoren herangezogen werden. Hierbei sollten auch die möglichen Endprodukte Nitrit und Nitrat Beachtung finden, denen eine intermediäre NO-Bildung zugrunde liegen könnte. Zur weiteren Beurteilung interessanterer NO-Freisetzungsmuster sind ergänzende Untersuchungsmethoden heranzuziehen.

2 Untersuchte Substanzen

2.1 Nitro-Verbindungen

2.1.1 Nifedipin



Formel 2 Nifedipin

1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-3,5-pyridincarbonsäuredimethylester,

$C_{17}H_{18}N_2O_6$, $M_r=346,3$ g/mol

gelbes Pulver, praktisch wasserunlöslich, in Aceton löslich, Lagerung vor Licht geschützt [32], in Lösung sehr lichtempfindlich

Nifedipin ist für die direkte Wirkung am 1,4-Dihydropyridin-Rezeptor des Calciumkanalproteins bekannt. Über eine Beeinflussung des Membranpotentials wird der Calciumeinstrom in den potentialabhängigen langsamen Calciumkanal gesenkt. Eine Verringerung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration führt zur Abnahme der Aktivität der Calcium-abhängigen Myosin-ATPase. Der gleiche Effekt führt zur Dilatation am glatten Gefäßmuskel [292,261,10].

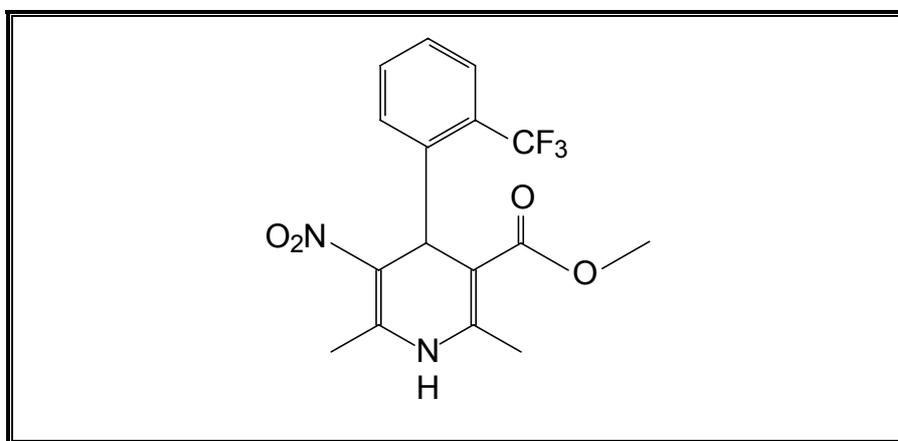
Die Arbeitsgruppen Robak und Berkels bewiesen deutliche hämolytische und antiaggregatorische Eigenschaften für Nifedipin [245,17]. Außerdem stellten Dhein und Mitarbeiter für Nifedipin eine arteriolare Dilatation und eine gesteigerte Mikrozirkulation fest, die durch Behandlung mit L-N^o-Nitroarginin antagonisiert werden kann [61].

Die starke Lichtempfindlichkeit von Nifedipin führt in Lösung überwiegend zum Nitroso-

phenylpyridin-Derivat [147,288,299,12,189,144]. In Gegenwart ungesättigter Fettsäuren entstehen stabile Nitrosylradikale [206]. 4-Aryl-substituierte 1,4-Dihydropyridine sind, obwohl sie sekundäre Amine sind, Substrate für Cytochrom P450, die über ein Aminium-Radikal aromatisieren [287].

Eine NO-Abspaltung vom Phenylring ist wenig wahrscheinlich, jedoch ist es sinnvoll Nifedipin als Vergleich zu BAY-k8644 auf eine NO-Freisetzung zu überprüfen.

2.1.2 Bay-k8644



Formel 3 Bay-k8644

1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-5-nitro-4-[2-(trifluoromethyl)-phenyl]-3-pyridincarbonsäuremethylester

$C_{16}H_{15}O_4NF_3$, $M_r=342,3$ g/mol

gelbe Kristalle, wasserunlöslich, in Aceton gut löslich, Lagerung vor Licht geschützt

Bay-k8644 ist ein Agonist am spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanal, der positiv inotrop und gefäßkonstringierend wirkt. Es besteht ein kompetitiver Antagonismus zu Nifedipin, nicht aber zu Verapamil und Diltiazem [259,260].

Bei den Dihydropyridinen führt der Ersatz der lipophilen Esterfunktion durch kleinere Substituenten mit negativem Potential bei einem Enantiomer zur Umkehr der Calcium-antagonistischen zur Calcium-agonistischen Wirkung. So wirkt das S-(-)-Enantiomer als Agonist, das R-(+)-Enantiomer als Antagonist und das Razemat agonistisch [284].

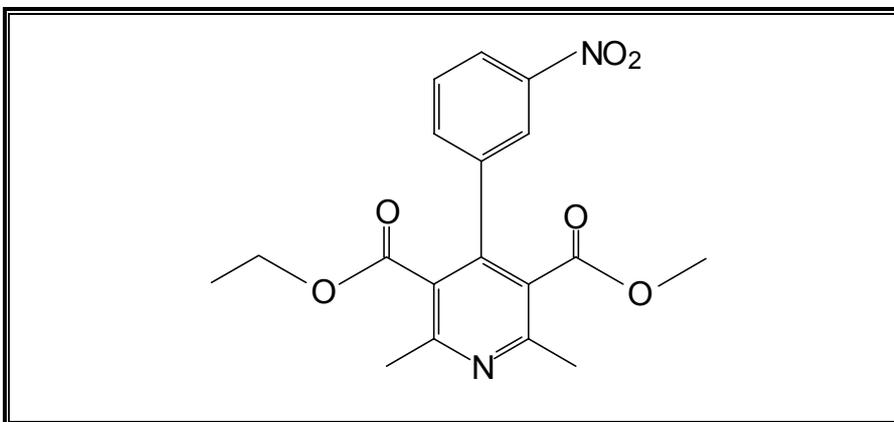
In höheren Konzentrationen wiederum fanden Rogg und Mitarbeiter [248] eine Calcium-

antagonistische Wirkung für diese Substanz.

Die Arbeitsgruppe Johnson und Mitarbeiter stellte eine Hemmung der Plättchenaggregation für BAY-k8644 fest, für die allein das R-(+)-Enantiomer verantwortlich zu sein scheint [150].

Eine isolierte Rattenaorta, die mit Bay-k8644 behandelt worden ist und eine Kontraktion zeigt, wird nach UV-Bestrahlung relaxiert. In Dunkelheit wird die Gefäßkontraktion wiederhergestellt [201,202,111]. Bei dieser Reaktion wird eine NO-Beteiligung diskutiert.

2.1.3 Bay-m4786



Formel 4 Bay-m4786

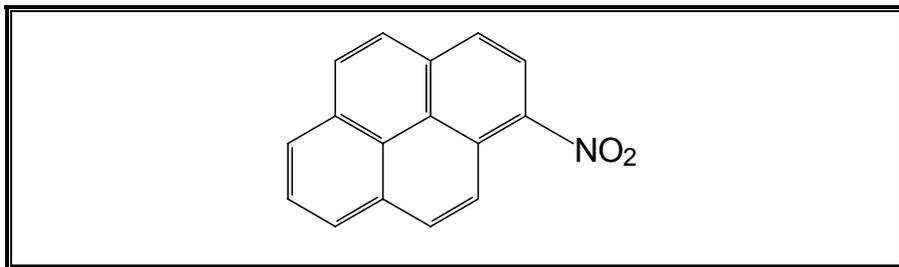
2,6-Dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridincarbonsäure-ethylmethylester,

$C_{18}H_{18}N_2O_6$, $M_r=358,4$ g/mol

weiße Kristalle, wasserunlöslich, in Aceton löslich

Diese Substanz wurde zum Test am Dihydropyridin-Rezeptor entwickelt und erscheint aufgrund ihrer Struktur als Vergleich zu Bay-k8644 und Nifedipin interessant.

2.1.4 1-Nitropyren



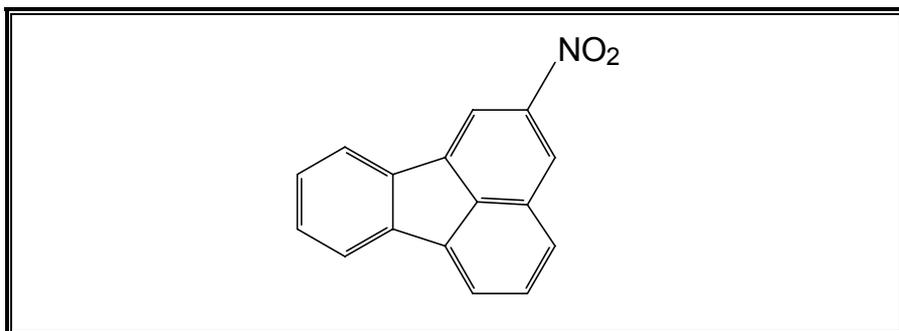
Formel 5 1-Nitropyren

$C_{16}H_9NO_2$, $M_r=247,3$ g/mol

weißes Pulver, gut löslich in DMSO

Nitropolycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe sind als Verbrennungsprodukte mit hohem genotoxischem Potential bekannt [26,41,42]. Mutagenität in *Salmonella typhimurium* mit und ohne aktivierende Systeme sind ebenfalls hinreichend bekannt [242]. Als Metabolisierungsprodukte sind 1-Aminopyren, 1-N-Acetylamino-pyren, sowie deren 3-,6- und 8-hydroxylierte Derivate, 1-Nitropyren-9,10-dihydrodiol und N-Hydroxy-1-aminopyren beschrieben. Letzteres wird für Mutagenität und DNA-Bindung verantwortlich gemacht [92]. Ob eventuell noch weitere Bioaktivierungswege, die über eine NO-Freisetzung führen, möglich sind, schien interessant.

2.1.5 2-Nitrofluoranthren



Formel 6 2-Nitrofluoranthren

$C_{16}H_9NO_2$, $M_r=247,3$ g/mol

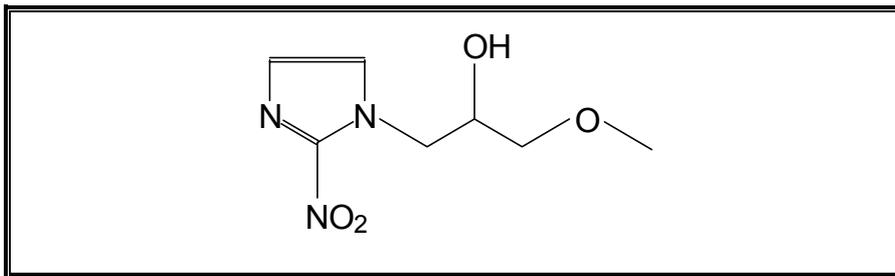
weißes Pulver, gut löslich in DMSO

Fluoranthren ist in der Atmosphäre gefunden worden und wird dort über einen radikalischen Mechanismus nitriert. Hauptsächlich entsteht dabei 2-Nitrofluoranthren. Dagegen werden bei Verbrennungsprozessen 3-, 7- und 8-Nitro-Derivate als Hauptprodukte über einen ionischen Mechanismus gebildet.

2-Nitrofluoranthren macht bis zu 5% des direkt mutagenen organischen Materials aus, welches an verschiedenen Stellen der USA und Europas gesammelt wurde. Nach aerober Metabolisierung in Rattenleber erhält man vorwiegend 8- und 9-Hydroxy-2-nitrofluoranthren, wohingegen bei anaerober Metabolisierung 2-Aminofluoranthren entsteht [91,207,128].

Ob und inwieweit auch aus dieser Verbindung eine NO-Freisetzung möglich ist, ist kaum vorherzusagen.

2.1.6 Misonidazol



Formel 7 Misonidazol

1-Methoxy-3-(2-nitro-1-imidazolyl)-2-propanol,

$C_7H_{11}N_3O_4$, $M_r = 201,2$ g/mol

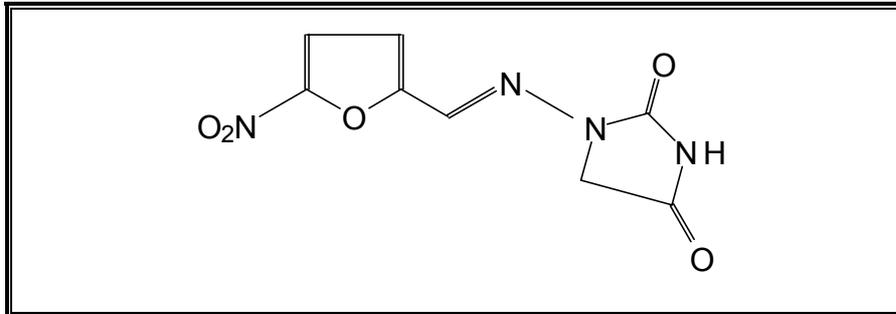
gelbe Kristalle, schlecht wasserlöslich, gut löslich in Aceton und DMSO

Misonidazol und andere 2-Nitroimidazole sind als Radiosensitizer bekannt. Sie wirken nach bio-reduktiver Aktivierung cytotoxisch. Die größere Toxizität gegenüber hypoxischem Gewebe läßt diese Substanzen zur Therapie bestimmter solider Tumoren geeignet erscheinen, zu deren Behandlung sie unmittelbar nach der Bestrahlung appliziert werden [48,49,267,2].

Es konnte gezeigt werden, daß verschiedene Enzyme, wie z.B. Cytochrom-P450, die Cytochrom c-Reduktase und die Xanthin-Oxidase, an der Nitroreduktion beteiligt sind [303,36]. Ferner sind Ascorbat, Serotonin und Catecholamine in der Lage sowohl 5-

Nitroimidazole als auch 5-Nitrofurane zu den entsprechenden Radikalanionen zu reduzieren [241,240,300].

2.1.7 Nitrofurantoin



Formel 8 Nitrofurantoin

1-[(5-Nitrofurfuryliden)amino]-2,4-imidazolidindion,

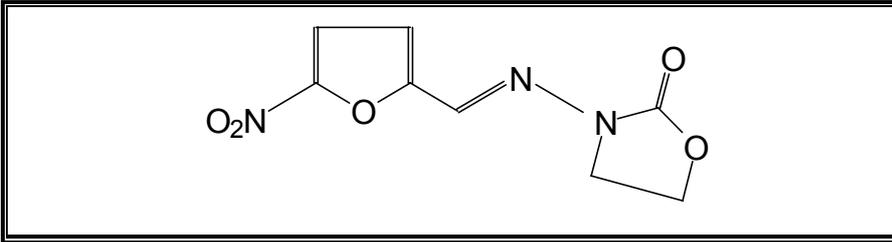
$C_8H_6N_4O_5$, $M_r=238,2$ g/mol

gelbes kristallines Pulver, wasserunlöslich, gut löslich in Aceton und DMSO

Nitrofurantoin ist ein Chemotherapeutikum gegen Harnwegsinfektionen, das bakterizid auf proliferierende und ruhende Keime wirkt sowie eine antimykotische und trichomonadenhemmende Wirkkomponente besitzt. Das Wirkungsoptimum liegt bei pH=5,5 [74].

Als Wirkungsmechanismus der Nitrofurane wird ein Reduktion der Nitrogruppe angesehen, wobei die antimikrobielle Aktivität mit dem Oxidationspotential steigt. Bakterielle 5-Nitro-Reduktasen können die Nitrogruppe reduzieren, die entstehenden aktiven Metaboliten schädigen die Mikroorganismen durch Chromosomenbrüche und Interaktionen mit dem Zitrat-Zyklus sowie der RNA-, DNA- und Proteinbiosynthese [5,115]. Es ist ein Redoxmechanismus beschrieben, der nach oxidativer und reduktiver Metabolisierung zu einem Radikalanion führt, ähnlich der Aktivierung der Nitroimidazole [194,213,212,240,249].

2.1.8 Furazolidon



Formel 9 Furazolidon

3-(5-Nitrofurfurylidenamino)-2-oxazolidinon,

$C_8H_7N_3O_5$, $M_r=225,2$ g/mol

gelbe Kristalle, leicht löslich in Ethanol und Wasser, praktisch unlöslich in Wasser von pH=6

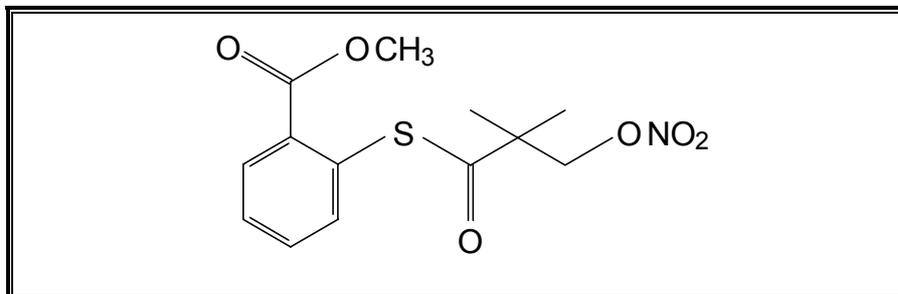
Furazolidon ist in der Tiermedizin als Chemotherapeutikum zur Therapie und Prävention von intestinalen Infektionen, vor allem mit Protozoen, bekannt. Es wird als mutagen und cancerogen beschrieben [301,302]. Eine Nitroreduktion findet ebenfalls wie für Nitrofurantoin und Misonidazol (s.o.) unter den oben beschriebene Bedingungen statt [239,241,240]. Weiterhin ist auch die Produktion von Superoxid und Wasserstoffperoxid sowie die Lipidperoxidation beschrieben [282]. Ebenso findet eine Substitution der Nitrogruppe mit Glutathion unter Freisetzung von Nitrit statt [4,27,134]. Die Erschöpfung der Glutathionspeicher ist 2,3 mal größer als bei Nitrofurantoin.

Unter den Bedingungen des Magensaftes wird die CH=N-Bindung nur zu einem geringen Teil gespalten, bei pH=1,6 und 37°C sind nach 4 Stunden nur 16 % 5-Nitro-2-furaldehyd nachweisbar. Es kommt zu einer im Vergleich zu Nitrofurantoin fast 17-fach erhöhten Abatmung von Ethylen, die aus der Lipidperoxidation zellulärer und intrazellulärer Membranen resultiert, welche aufgrund von Nitroradikalanionen oder der Spaltung des Oxazolidindionringes entsteht [232].

Eine NO-Freisetzung ist für Furazolidon bisher nicht beschrieben, ist jedoch nach den von Hunt und Reid an anderen Nitrofuranen gemachten Beobachtungen denkbar [135].

2.2 Nitrate

2.2.1 SE 145



Formel 10 SE 145

O-(3-Nitrooxypivaloyl)-thiosalicylsäuremethylester

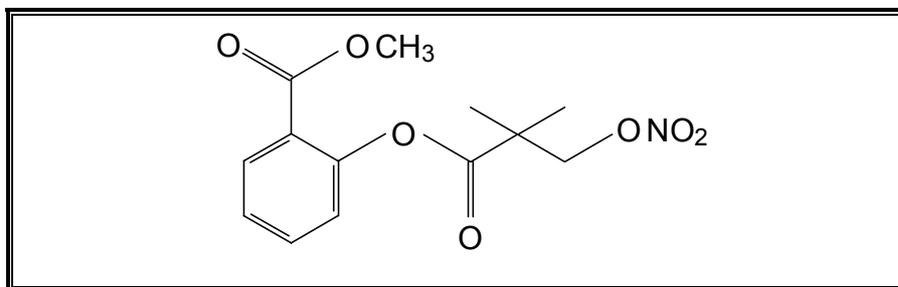
$C_{13}H_{15}NO_6S$, $M_r=313,4$ g/mol

weißes Pulver, schlecht wasserlöslich, gut löslich in DMSO

Da es bei der Langzeitanwendung organischer Nitrate zu einer Toleranzentwicklung kommt, deren Ursache möglicherweise die Entleerung intrazellulärer Thiol-speicher ist, wurden Hybridmoleküle entwickelt, die Thiol- und Nitratstruktur vereinen (s. 1.5.2.2). SE 145 könnte in diesem Sinne als Prodrug eines solchen Hybridmoleküls fungieren.

Diese Substanz wurde mir freundlicherweise vom Arbeitskreis Lehmann aus Bonn überlassen.

2.2.2 SE 136



Formel 11 SE 136

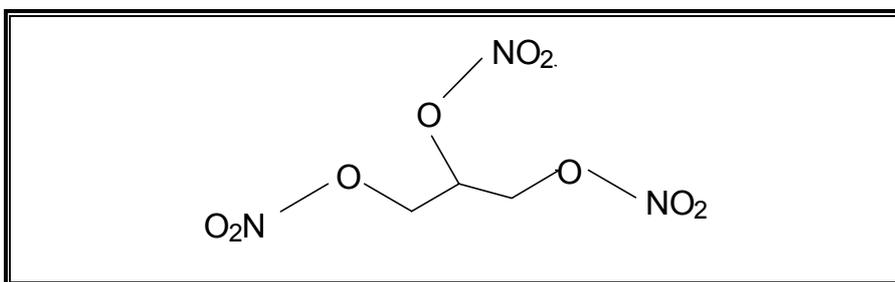
O-(3-Nitrooxypivaloyl)-salicylsäuremethylester

$C_{13}H_{15}NO_7$, $M_r=297,3$ g/mol

weißes Pulver, schlecht wasserlöslich, gut löslich in DMSO

SE 136 ist als Vergleichssubstanz zu SE 145 sinnvoll, weil hier keine Thiolfunktion entstehen kann. Es sind allein die Eigenschaften des organischen Nitrates zu erwarten. Diese Verbindung wurde ebenfalls vom Arbeitskreis Lehmann zur Verfügung gestellt.

2.2.3 GTN



Formel 12 Glyceroltrinitrat = GTN

1,2,3-Propantrioltrinitrat

$C_3H_5N_3O_9$, $M_r=227,1$ g/mol

Flüssigkeit, äußerst explosiv (unterliegt dem Sprengstoffgesetz, 75% ige Mischung mit Kieselgur ergibt Dynamit), gut mischbar u.a. mit Ethanol, Aceton und Eisessig

Glyceroltrinitrat ist als Koronardilatator mit kurzer Halbwertszeit schon vor dem ersten Weltkrieg bekannt geworden. Bei sublingualer Applikation tritt die Wirkung bereits nach 1-2 min. ein, daher stellt es das Mittel der Wahl bei akutem Angina-pectoris-Anfall dar. Eine orale Applikation ist wegen des hohen First-Pass-Effektes wenig sinnvoll. Es kommt zur Dilatation aller Gefäße, in niedriger Konzentration zunächst der Koronararterien und der Gefäße der Haut. Charakteristische Nebenwirkung ist deshalb die Rötung des Gesichtes und Kopfschmerz („Nitratkopfschmerz“).

Glyceroltrinitrat wird, wie andere Salpetersäureester in der Leber stufenweise hydrolysiert. Es kommt zur renalen Elimination der Mono- und Dinitrate des Glycerols und der entsprechenden Glucuronide [10,32,244].

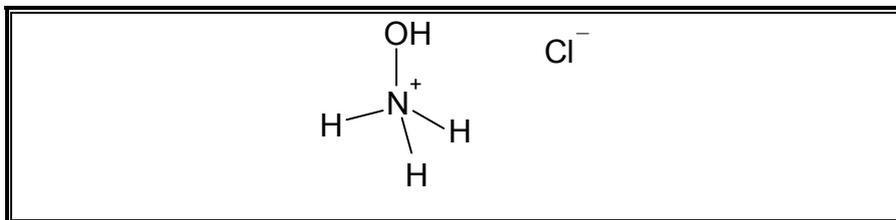
Die Metabolisierung dieses Prodrugs ist sowohl in verschiedenen Organen und Geweben beschrieben, als auch durch einzelne Enzymsysteme, wie Glutathion-S-transferase

und NADPH-abhängige Monooxygenasen, charakterisiert worden [270,176,66,82]. Ebenso ist als nicht-enzymatischer Bioaktivierungsweg eine thiolabhängige NO-Bildung untersucht, wobei insbesondere hohe Konzentrationen von Cystein als wirkungsvoll beschrieben worden sind und dagegen ein Großteil anderer Thiole überwiegend zur Nitritbildung führt [262]. In welchen Mengenverhältnissen in den einzelnen Geweben die Bioaktivierung zu NO und die Inaktivierung zu Nitrit auftreten, ist daher schwierig einzugrenzen.

Da einige Untersuchungen zu diesem Mechanismus anhand von Chemilumineszenzmessungen schon von unserer Arbeitsgruppe erarbeitet wurden, sind hier nur ergänzende NO-Bestimmungen mittels Chemilumineszenz sowie mittels Oxyhämoglobinasay an Leber- und Aortenhomogenat und an cytosolischer und mikrosomaler Leberfraktion gemacht worden [243].

2.3 Hydroxylamine

2.3.1 Hydroxylaminhydrochlorid



Formel 13 Hydroxylaminhydrochlorid

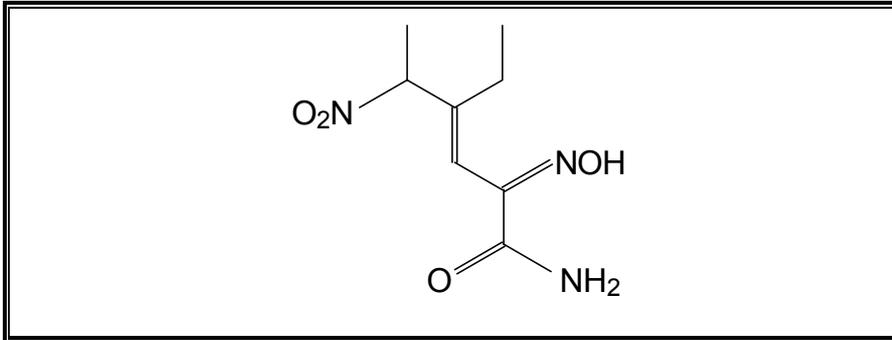
$\text{H}_2\text{NOH}\cdot\text{HCl}$, $M_r=69,49$ g/mol

weiße Kristalle, giftig, gut wasserlöslich, löslich in Ethanol und Glycerol

Hydroxylaminhydrochlorid findet Anwendung als Reduktionsmittel, Antioxidans und Entwickler. Mit Aldehyden und Ketonen werden Oxime gebildet. Früher wurde es bei Hautleiden angewandt. Die Arbeitsgruppe DeMaster hat für Hydroxylamin eine Vasodilatation an Aortenstreifen - sowohl mit als auch ohne Endothel - nachweisen können [60]. Die Metabolisierung zu NO ist folglich sehr wahrscheinlich.

2.4 Hydroxyimine

2.4.1 FK409 (NOR-3)



Formel 14 FK409 = NOR-3

(+)-(E)-Ethyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexenamid

C₈H₁₃N₃O₄, M_r=215,2 g/mol

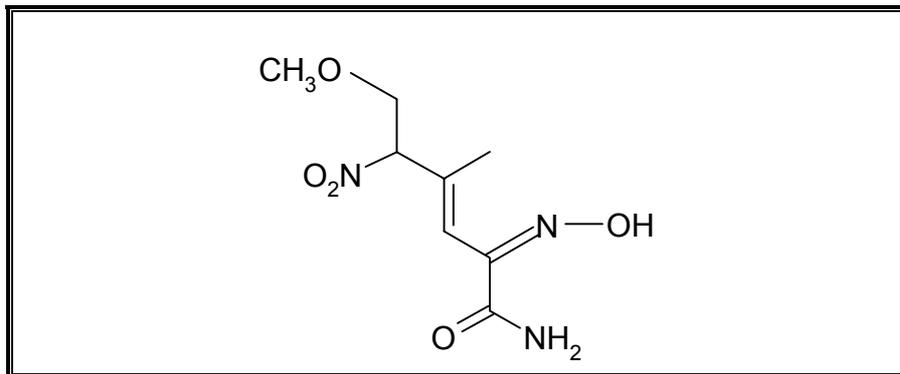
weißes kristallines Pulver, licht- und feuchtigkeitsempfindlich, gut löslich in DMSO

FK409 ist ein durch saure Fermentation aus *Streptomyces griseosporus* isolierter Naturstoff. FK409 hat einen stark gefäßdilatierenden Effekt (300-fachgrößere Aktivität als Isosorbiddinitrat!), ist ein potenter Hemmstoff der Plättchenaggregation und zeigt sowohl antianginöse als auch cardioprotektive Effekte im Ischämie/Reperfusionssystem [164]. Im Vergleich zu Glyceroltrinitrat gleicher Konzentration werden vor allem die großen Koronararterien dilatiert und die Vorlast gesenkt, FK 409 ist aber ca. 3 mal weniger potent in seiner Wirkung als systemischer und koronar-arteriolarer Vasodilatator [64]. Außerdem zeigten Seki und Mitarbeiter, daß FK 409 die glatte Muskelzellproliferation hemmen kann [269].

Die Arbeitsgruppe Yamada und Mitarbeiter bestätigte ein von Sato und Mitarbeitern schon entdecktes Charakteristikum: es kommt zu keiner Toleranzentwicklung nach FK409-Gabe, auch besteht keine Kreuztoleranz zu Nitroglycerin [253,311].

Weiterhin wird angenommen, daß FK409 eine spezifische Agonist-induzierte intrazelluläre Calciummobilisation, die unabhängig von einer Inositol-3-phosphat-produktion ist, hemmt, ebenso wie einen Calciumeinstrom durch selektive Agonist-regulierte Calciumkanäle [271].

2.4.2 NOR-1



Formel 15: NOR-1

[(±)-(E)-Methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamid]

$C_{18}H_{13}N_3O_5$, $M_r=231,2$ g/mol

weißes kristallines Pulver, licht- und feuchtigkeitsempfindlich, in DMSO gut löslich

Für NOR-1 ist im wässrigen Medium bei pH= 7,4 und Raumtemperatur eine Halbwertszeit der NO-Abspaltung von 1,7 Minuten ermittelt worden [164]. Dieses im Vergleich zu FK409 weitaus weniger bekannte und weniger untersuchte Hydroxyiminderivat wurde hier zu Vergleichszwecken herangezogen.

2.5 NONOate

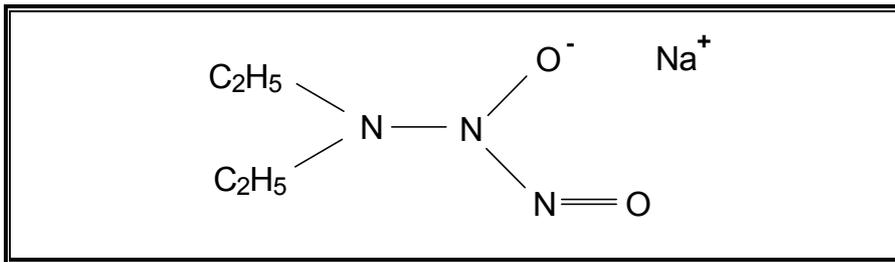
NONOate (=Diazen-1-ium-1,2-diolate) sind für ihre spontane NO-Freisetzung nach einer Reaktion erster Ordnung bekannt. Verbindungen mit Halbwertszeiten von 2 min. bis zu ca. 20 Stunden bei pH=7,4 und 37°C sind untersucht. Es können bis zu zwei Moleküle NO pro Molekül NONOat frei werden, bei pH=7,4 sind es weniger. In vivo ist damit zusätzlich eine enzymatische Aktivierung denkbar.

Die NO-Freisetzungsrates wird beeinflusst durch die nucleophile Komponente des Restmoleküls, die Temperatur und den pH-Wert. pH-Werte über 9 führen zu extrem langsamer NO-Bildung, pH-Werte unter 5 haben sofortige NO-Freisetzung zur Folge. Die Protonierung zur [(NO)NO]H-Gruppe scheint folglich erforderlich zur NO-Abspaltung [286,82]. NONOate sind relativ einfach aus den entsprechenden Nucleophilen und NO-Gas zu synthetisieren:



Nucleophile sind in der Regel Amine (primäre, sekundäre, Polyamine), aber auch Sulfit ist als Reaktionspartner möglich [129,215,275].

2.5.1 DEA/NO



Formel 16 DEA/NO

2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid, Natriumsalz

2-(N,N-Diethyl-amino)-diazem-1-ium-1,2-diolat

DiethylaminNONOat

$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$, $M_r=155,1$ g/mol

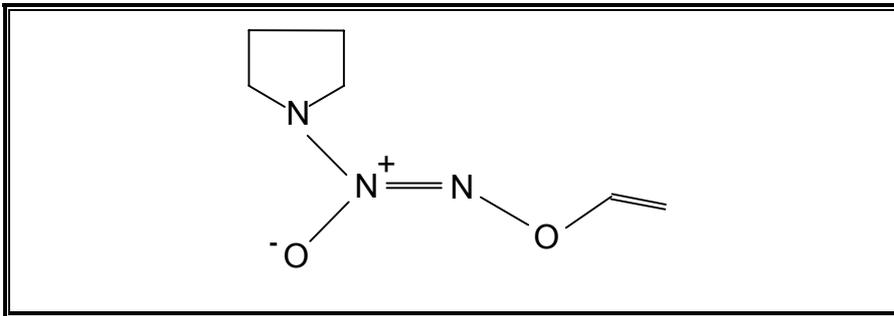
weiße Kristalle, wasserlöslich

DEA/NO ist als NO-Donor mit sehr kurzer Halbwertszeit bekannt; 2,1 min. bei pH=7,4 und 37°C sind u. a. von der Arbeitsgruppe Morley und Mitarbeiter festgestellt worden [215]. Basische Lösungen von DEA/NO (in 0,01M NaOH) sind stabil und können bei 0°C 24 Stunden gelagert werden. Vasorelaxierende Effekte sind ebenso wie cytostatische Effekte in Melanomzellen für DEA/NO bewiesen [187,188,118].

2.5.2 Alkylierte NONOate

Da NONOate in der Regel eine relativ kurze Halbwertszeit haben und NO nicht selektiv freisetzen, scheint es sinnvoll diese Gruppe von NO-Donoren zu modifizieren.

2.5.2.1 V-Pyrro/NO



Formel 17 V-Pyrro/NO

1-Vinyloxy-2-oxo-(1-pyrrolidinyl)diazen

2-O-Vinyl-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat

1-Vinyloxy-2-oxo-2-pyrrolidinyl-hydrazin

C₆H₁₁N₃O₂, M_r=157,2 g/mol

leicht gelbliche ölige Flüssigkeit, gut löslich in Aceton und DMSO, weniger gut wasserlöslich

Für ein ähnliches NONOat, das Prolinaddukt (PROLI/NO), daß zwei Moleküle NO freisetzt, ist die relativ kurze Halbwertszeit von 67 Sekunden festgestellt worden [250]. Hier verhindert aber die Vinylgruppe am terminalen Sauerstoffatom eine spontane NO-Freisetzung. Durch Cytochrom P450 wäre in der Leber eine metabolische Abspaltung der Vinylfunktion denkbar und damit dort eine lokale NO-Bildung möglich. Die Untersuchungen von Billiar und Mitarbeitern korrelieren hiermit gut, eine Nitrit- und Nitratfreisetzung aus V-Pyrro/NO wurde nur in Anwesenheit von Hepatozyten festgestellt [20].

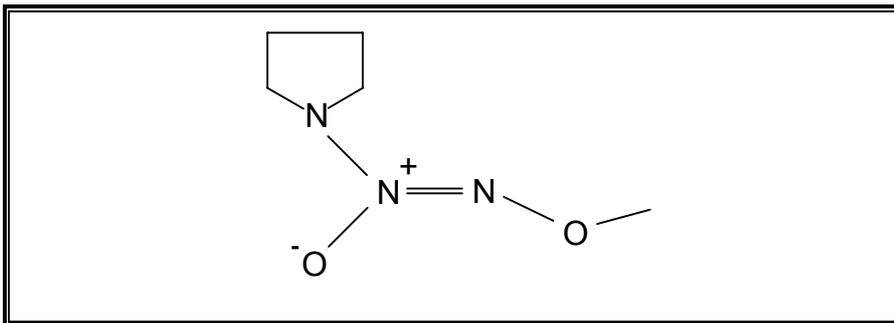
In der Leber können sowohl Kupferzellen als auch Hepatozyten NO synthetisieren [52,100]. Es werden als intrazelluläre Funktionen von NO die Proteinsynthese, der mitochondriale Elektronentransport und Teile des Zitronensäurezyklusses beschrieben. Zusätzlich fungiert NO interzellulär bei der Arzneistoffmetabolisierung und der Speicherung von Blut, welches die Leber als stark expandierbares venöses Organ in Steßsituationen wieder in den Kreislauf freisetzen kann [203]. Decker und Mitarbeiter fanden eine durch TNF- α stimulierte endogene NO-Freisetzung nach einer partiellen Hepatektomie [56]. Bei einer Endotoxämie sind z. B. leberprotektive Effekte durch eine entsprechend gesteiger-

te NO-Synthese bewiesen. Außerdem scheint die zytokin-vermittelte NO-Bildung unter den Bedingungen des oxidativen Stresses durch die Stimulation der Glutathionsynthese einen protektiven Effekt auf die Leberzellen zu haben [174]. Eine verringerte nicht-parenchymale NO-Produktion spielt eine Rolle bei der Leberschädigung durch Alkoholfuhr [220].

Eine leberspezifische NO-Freisetzung aus einem NO-Donor kann folglich zur Leberregeneration sinnvoll sein. Auch zur Behandlung von Lebertumoren könnte die zytotoxische Wirkung größerer Mengen NO gezielt eingesetzt werden (s. Kap. 1.5.2.2).

Diese Verbindung ist ebenso wie die alkylierten Derivate M-Pyrro/NO und V-Pyrro/NO von der Arbeitsgruppe Keefer zur Verfügung gestellt worden.

2.5.2.2 M-Pyrro/NO



Formel 18 M-Pyrro/NO

1-Methoxy-2-oxo-(1-pyrrolidinyl)diazen

2-O-Methyl-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat

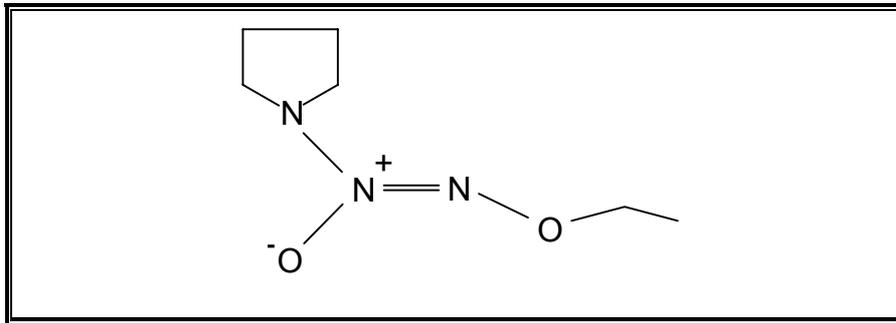
1-Methoxy-2-oxo-2-pyrrolidinyl-hydrazin

$C_5H_{11}N_3O_2$, $M_r=145,2$ g/mol

leicht gelbliche, ölige Flüssigkeit, bei -4°C fest, gut löslich in Aceton und DMSO, weniger gut wasserlöslich

Da auch hier ein alkyliertes NONOat vorliegt, die Abspaltung der Methylgruppe unter physiologischen Bedingungen aber eher unwahrscheinlich erscheint, ist diese Substanz vor allem als Vergleich zu V-Pyrro/NO wichtig.

2.5.2.3 E-Pyrro/NO



Formel 19 E-Pyrro/NO

1-Ethoxy-2-oxo-(1-pyrrolidinyl)diazen

2-O-Ethyl-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat

1-Ethoxy-2-oxo-2-pyrrolidinyl-hydrazin

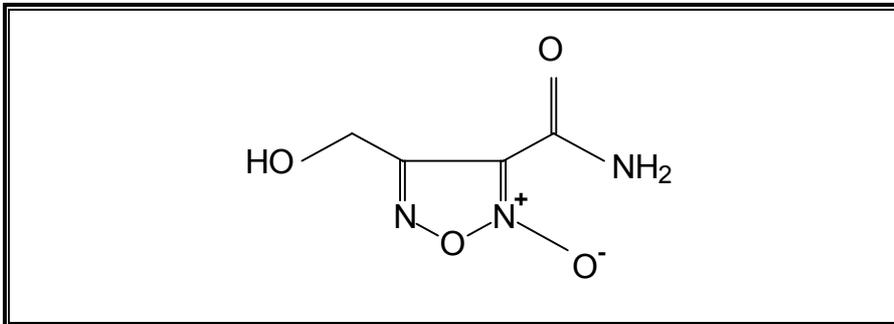
$C_6H_{13}N_3O_2$, $M_r=159,2$ g/mol

leicht gelbliche, ölige Flüssigkeit, gut löslich in Aceton und DMSO, weniger gut wasserlöslich

Für diese Substanz gilt das Gleiche wie für das oben genannte Methyl-Derivat, eine Abspaltung der Ethylgruppe unter physiologischen Bedingungen ist nicht zu erwarten, aber ein Vergleich zu V-Pyrro/NO ist ebenfalls sinnvoll.

2.6 5-Ring-Heterozyklen

2.6.1 Furoxan: CAS 1609



Formel 20 Furoxan CAS 1609

4-Hydroxymethyl-furazan-3-carbonamid-2-oxid

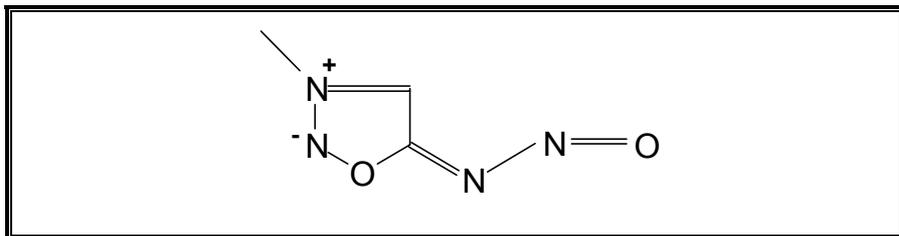
$C_4H_5N_3O_4$, $M_r=159,1\text{g/mol}$

weiße Kristalle, wasserlöslich

Furoxane sind für ihre Plättchenaggregationshemmung, Vasodilatation und damit verbundene Blutdrucksenkung [106,84,103,45,23] ebenso wie für ihre Zytotoxizität, Bakteriostase, Immunsuppression und Mutagenität bekannt [39]. NO-Freisetzung und Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase sind als Mechanismus dieser Wirkungen nachgewiesen [38,104,102,199,137].

Von Hecker und Mitarbeitern ist eine direkte Wechselwirkung von CAS 1609 mit dem calciumsensitiven Kaliumkanal als zusätzlicher Mechanismus der Vasodilatation festgestellt worden[122]. In der Arbeitsgruppe Fruttero wurde für verschiedene Furoxan-Derivate eine zusätzliche α_1 -antagonistische Komponente an den Gefäßen bestimmt [90].

2.6.2 3-Methyl-N-nitroso-5-sydnonimin



Formel 21 3-N-Methyl-N-nitroso-5-sydnonimin

$C_3H_4N_4O_2$, $M_r=128,1\text{g/mol}$

gelbes Pulver, gut löslich in Aceton und Ethanol, schlecht löslich in Wasser

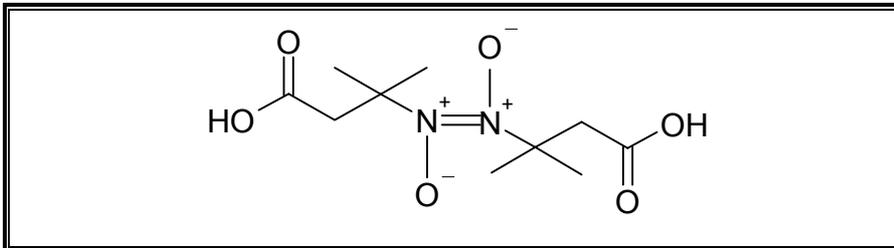
Als bekannter Vertreter der Sydnonimine ist Molsidomin mit einer charakteristischen, im Vergleich zu den Nitraten längeren Halbwertszeit mit dieser wenig bekannten Substanz zu vergleichen. Sydnonimine sind als spontane NO-Donoren bekannt, deren Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase von Thiolen unabhängig ist [80]. Die Arbeitsgruppe Bohn und Schönafinger bewies für Molsidomin eine Bildung von Superoxidradikalanionen aus Sauerstoff, die eine autokatalytische Wirkung auf den Zerfall des Molsidominmetaboliten SIN-1A ausüben [24].

Es bleibt hier zu untersuchen, inwieweit eine Übertragung der für die Sydnonimine gefundenen NO-Freisetzungswege auf die oben genannte Substanz möglich ist oder ob lediglich die Charakteristika einer N-Nitrosoverbindung, wie die spontane NO-Bildung, auftreten.

Diese Substanz wurde freundlicherweise von Schleifer aus dem Arbeitskreis Rehse zur Verfügung gestellt [254].

2.7 Sonstige

2.7.1 HE 12.2.B



Formel 22: HE 12.2B

(E)-3,3'-Azobis-(3-methyl-butansäure)N,N'-dioxid

$C_{10}H_{18}N_2O_6$, $M_r=262,3$ g/mol

weißes Pulver, in Lösung blau, schwer wasserlöslich, gut löslich in DMSO

C-Nitroso-Verbindungen tendieren zur Dimerisierung. Sie liegen im festen Zustand als Dimere vor, während wässrige Lösungen in physiologischem Puffer zu den entsprechenden Monomeren reagieren und eine leichte Blaufärbung der Lösung verursachen [281].

C-Nitroso-Verbindungen, bei denen sich die Nitrosogruppe an tertiären Kohlenstoffatomen befindet, können NO nach photochemischer oder thermischer Aktivierung freigeben [274]. Zusätzlich ist eine enzymatische Metabolisierung zu NO denkbar.

Der Arbeitskreis Rehse stellte freundlicherweise diese Substanz zur Verfügung [124].

3 Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz stellt ein sehr selektives Nachweisverfahren für NO dar. Es läßt sich hiermit auch durch die entsprechend vorgeschaltete Reduktion Nitrit oder Nitrat bestimmen.

Daneben stehen zum direkten NO-Nachweis die NO-Elektroden und die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie zur Verfügung.

Sowohl Nickelporphyrinelektroden als auch modifizierte Clark-Sauerstoffelektroden besitzen den Nachteil großer Empfindlichkeit gegenüber kleinsten Temperaturschwankungen und elektromagnetischen Feldern. Ferner reagieren sie auf Nitrit, nicht aber auf Nitrat. Die Empfindlichkeit liegt bei ca. 0,5 nmol [119].

Mit der Elektronenspinresonanz läßt sich NO mit einer Empfindlichkeit von 10-100 pmol nachweisen [295]. Verbindungen wie spezielle Übergangsmetallkomplexe oder Phenyltert.-butylnitron (PBN, sog. Spin-Fallen) liefern stabile Addukte mit NO, die charakteristische ESR-Spektren aufweisen.

Weiterhin sind HPLC-Methoden in Kombination mit UV-ECD-Detektion zur Bestimmung von Nitrit und Nitrat, also zur indirekten NO-Bestimmung mit einer Empfindlichkeit von ca. 20 nM beschrieben [266].

3.1 Prinzip der Chemilumineszenz

Bei der Gasphasenchemilumineszenz wird gasförmiges NO unter Ausschluß von Sauerstoff mit Ozon umgesetzt. Es entsteht zunächst angeregtes NO_2^* , daß bei der Rückkehr in den Grundzustand (NO_2) Lichtquanten emittiert [108] [78], deren Intensität proportional zur freigesetzten Menge NO ist.



Das Maximum des emittierten Lichtes liegt bei 1200 nm [233].

Die Umsetzung von molekularem Sauerstoff mit NO ergibt zwar eine ca. 1000-fach höhere emittierte Lichtenergie, das Maximum bei 600 nm ist aber für die Auswertung ungünstig, da bei dieser Wellenlänge auch andere Chromophore aus Nebenreaktionen detektiert werden.

3.2 Versuchsaufbau

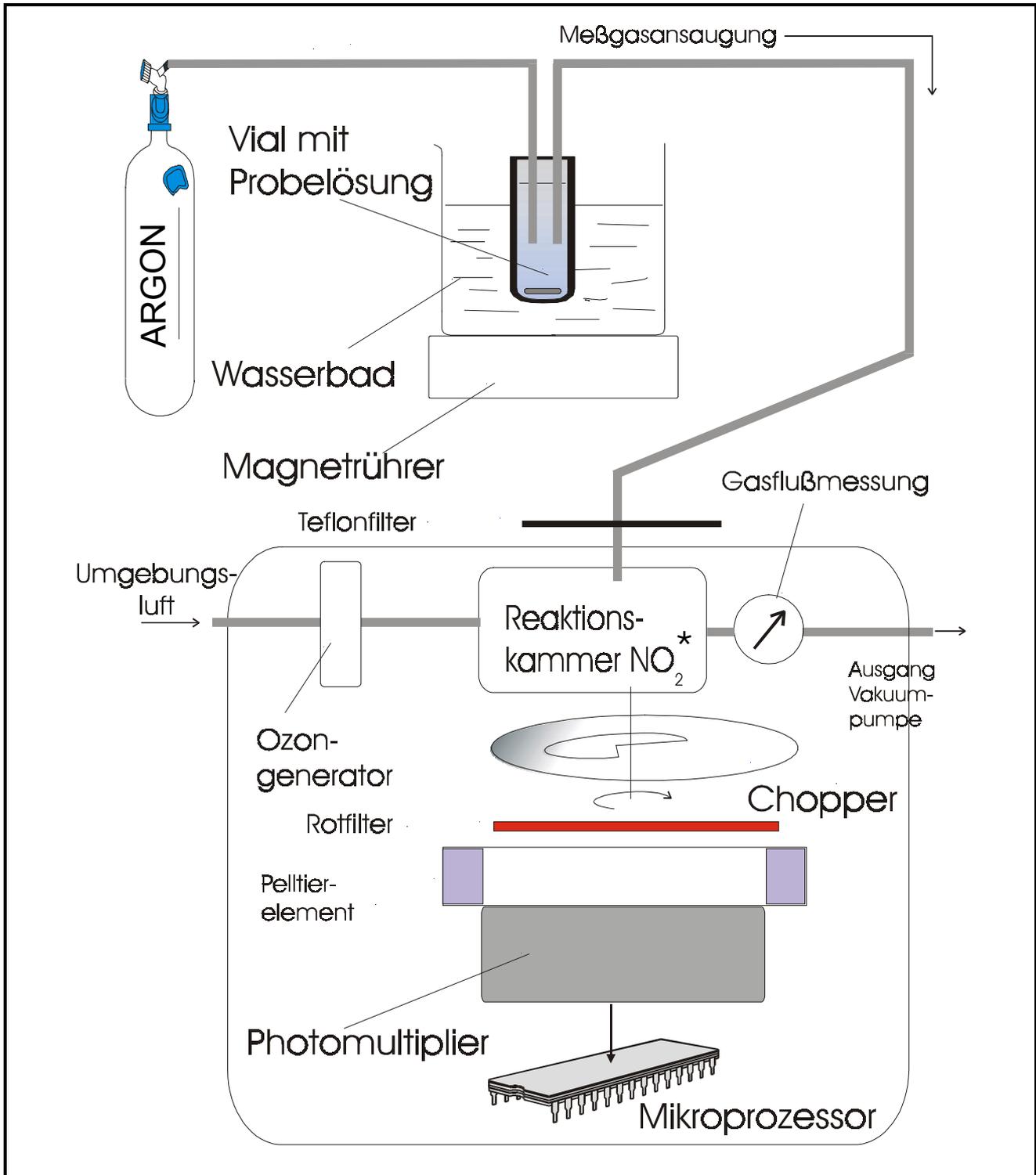


Abbildung 7: Schema zur NO-Messung mittels Chemilumineszenz (Fa. Ansyco)

Wie in Abbildung 7 zu sehen, werden Probenlösungen in gasdichten Vials in einem Wasserbad auf $37,0^{\circ}\text{C}$ genau temperiert. Mit dem generierten Ozon wird gebildetes NO in der Meßkammer zu angeregtem NO_2^* umgesetzt, wo es eine bestimmte, der Reaktionsgeschwindigkeit angepaßte Zeit verbleibt und dem aufgesetzten Photomultiplier zugänglich ist. Die einzelnen optischen Signale werden von einem Chopper erzeugt, der Segmente für die NO-Kammer und den Dunkelstrom enthält. Der Chopper dreht sich mit 250 U/ min., d. h. es werden ca. vier Meßwerte pro Sekunde erhalten. Durch die permanente Dunkelstromkompensation wird ein nahezu driffreier Nullpunkt erreicht. Ein Rotfilter zwischen Chopper und Photomultiplier eliminiert Lumineszenzwellenlängen von weniger als 610 nm, die durch Chromophore aus der Reaktion von Ozon mit Ethylen und ähnlichen Verbindungen entstehen.

Es wurden im Laufe der Untersuchungen zwei verschiedene Meßgeräte verwandt, die sich vor allem in der Nachweisgrenze und in der Auswertung unterscheiden. Beiden Geräten liegt das gleiche Reaktionsprinzip zugrunde.

3.2.1 Meßgerät der Firma Ansyco

Die Temperatur der Reaktionskammer beträgt 38°C . Der Photomultiplier wird auf eine Temperatur von $+12^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Der Druck in der Meßkammer beträgt ca. 600 Torr. Der Meßgasfluß liegt bei 150 ml/min.

Zur Auswertung lassen sich hier nur Peakhöhen heranziehen. Für dieses Gerät hat sich als günstig erwiesen, jeweils fünf Minuten zu inkubieren und dann für zwei Minuten einen Meßgasfluß zu analysieren. Durch Einleiten von Argonträgergas in die Probenbehälter und Ansaugen von Meßgas mittels einer Vakuumpumpe wird gebildetes NO in das Analysegerät überführt. Jedes Probenvial wird vier dieser Meßzyklen unterzogen und somit über 28 Minuten vermessen. Nach dieser Zeitspanne war für alle untersuchten Substanzen die NO-Freisetzung abgeschlossen. Die Überführung von NO direkt aus dem Probenvial mittels Argonträgergas in die Meßkammer erfordert die relativ lange Meßdauer [7].

3.2.2 Meßgerät der Firma Sievers

Der Photomultiplier arbeitet bei einer Temperatur von -10°C . Der Druck in der Meßkammer liegt bei < 100 Torr. Der Meßgasfluß beträgt hier ca. 200 ml/min.

Hier findet die Auswertung über die Integration der Peakflächen statt. Es wird alle 5/100 Sekunde ein Meßwert aufgezeichnet. Die Analysedauer einer Probe liegt im Bereich von einer Minute. Eine Prüfung auf abgeschlossene NO-Freisetzung im Inkubationsvial kann durch erneute Injektion festgestellt werden. Bei den hier untersuchten Substanzen war, bis auf das Hydroxyimin FK409, nach 10 Minuten bei 37°C die maximale NO-Bildung erreicht; solange wurde die Inkubation im gasdichten Vial vorgenommen, danach mittels gasdichter Spritze eine bestimmte Menge der Probe in das von der Firma Sievers entwickelte Reaktionsgefäß ("purge-and-trap-vessel") überführt und analysiert [273].

3.2.3 Direkte Messung von NO (für anaerobe Lösungen)

Je nach Meßgerät wird direkt aus dem Probenvial die gesamte Gasphase in das Gerät überführt (Ansyco) oder über eine gasdichte Spritze ein nur bestimmter Teil der Gasphase transferiert (Sievers).

3.2.4 Messung von NO nach Nitrit-Reduktion (für aerobe Lösungen)

Da unter physiologischen Bedingungen entstandenes NO mit Sauerstoff sehr schnell zu Nitrit weiterreagiert (s. Kap. 1.4), ist hier die Bestimmung von NO nach Nitrit-Reduktion sinnvoll.

Es wird zunächst in einem Vial die Inkubation bei 37°C vorgenommen, dann wird ein Teil der nitrihaltigen Lösung in eine Mischung aus konzentrierter Essigsäure mit Kaliumiodid überführt, die sich in einem anaeroben Probengefäß befindet, wo die Reduktion zu NO stattfindet. Entstandenes NO wird wiederum mittels Argon in das Meßgerät gebracht.



Diese vollständige Reduktion erlaubt eine sehr genaue Bestimmung kleinster Ni-

tritrmengen.

3.2.5 Messung von NO nach Nitrat-Reduktion (für aerobe Lösungen)

In aeroben Lösungen wird in Anwesenheit von Häm-Eisen bzw. imitierenden Komplexen (s. Kap. 1.4.2, 1.5.1 und 3.5) entstandenes NO unmittelbar zu Nitrat oxidiert. Um diese Mengen NO dennoch mit Hilfe der Chemilumineszenz zu erfassen, ist eine Reduktion zu NO mit Vanadium(III)chlorid (gesättigt) in 1 M-HCl bei 95 °C möglich. Wie bei der Nitrit-Reduktion (s. o.) wird die inkubierte Lösung in das anaerobe Gefäß mit dem Reduktionsgemisch überführt und das entstandene NO über einen Kondensator zur Entfernung salzsaurer Gase durch NaOH (1 M) mittels Inertgas in die Meßzelle transferiert.



Möglicherweise entstandenes Nitrit wird ebenfalls reduziert.



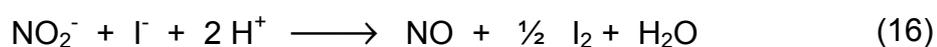
Hierbei werden ebenfalls sehr genau kleinste Nitrat- und Nitritmengen erfaßt [313,73].

Zu beachten ist hierbei auch eine durch Vanadium(III)chlorid katalysierte NO-Freisetzung aus S-Nitrosothiolverbindungen, sowie eine langsamere und nichtquantitative NO-Bildung aus bestimmten Nitroverbindungen wie Nitroarginin, Natriumnitroprussid und Glyceroltrinitrat, die zu einer markant erhöhten Basislinie führen.

3.3 Kalibrierung

3.3.1 Für die direkte NO-Bestimmung

Zur Kalibrierung wurde die Messung von Lösungen, in denen definierte Mengen NO gebildet werden, angewandt. Die Reduktion von Nitrit mit Iodid verläuft quantitativ zu NO nach (Gleichung Nr.16):



(wobei eine 0,05 mM KNO₂-Lösung mit einer Lösung aus 0,5 M KI mit 0,5 M H₂SO₄ und

0,7 M K_2SO_4 gemischt werden).

Zur Auswertung der NO-Donorsignale wurde eine Eichkurve aus fünf Lösungen verschiedener NO-Konzentrationen erstellt, wobei wie bei den übrigen Messungen über 28 Minuten gebildetes Gas analysiert wurde, d. h. die Addition von vier Meßwerten (s. 3.2) wurde ausgewertet. Durch gleiche Volumina von Meßlösungen und Kalibrierlösungen wird die Wasserlöslichkeit von NO von ca. 2 mM berücksichtigt.

Zwischen den Messungen wurde die Kalibrierung mittels Analyse von NO-Prüfgas kontrolliert.

3.3.1.1 Eichkurve für die direkte NO-Messung

3.3.1.1.1 Gerät der Firma Ansyco

Vor und nach Wartung des Gerätes wurden verschiedene Eichkurven ermittelt (s. Abbildung 8). Die Justierung des Gerätes wurde so vorgenommen, daß reines Argon-trägergas bereits ein Signal von 0,12 bis 0,16 Skalenteilen ergibt (demzufolge vier Meßwerte 0,55 bzw. 0,63).

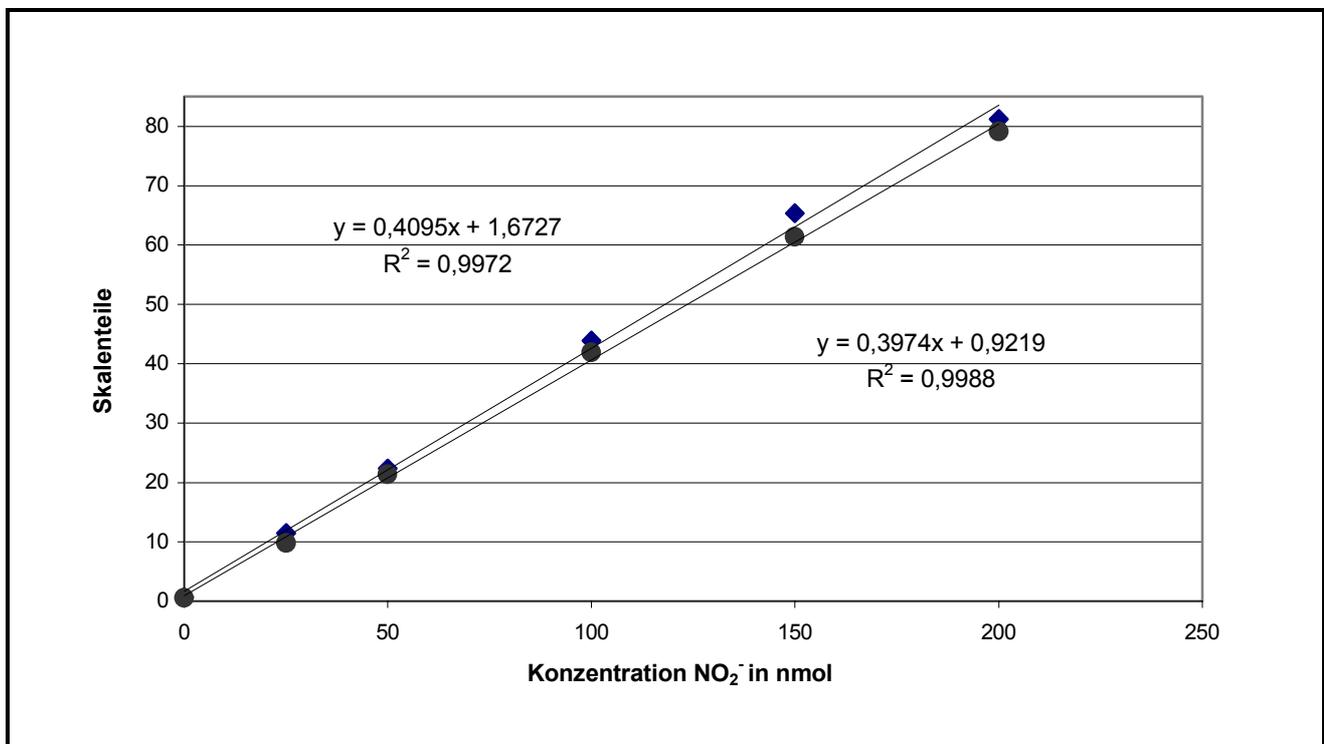


Abbildung 8: Eichkurve 1 zur Chemilumineszenz (Gerät der Firma Ansyco)

3.3.1.1.2 Gerät der Firma Sievers

Die Abbildung 9 zeigt das Beispiel einer Eichkurve, die aus verschiedenen Volumina NO-Gas (10 ppm) in Stickstoff erhalten wurde.

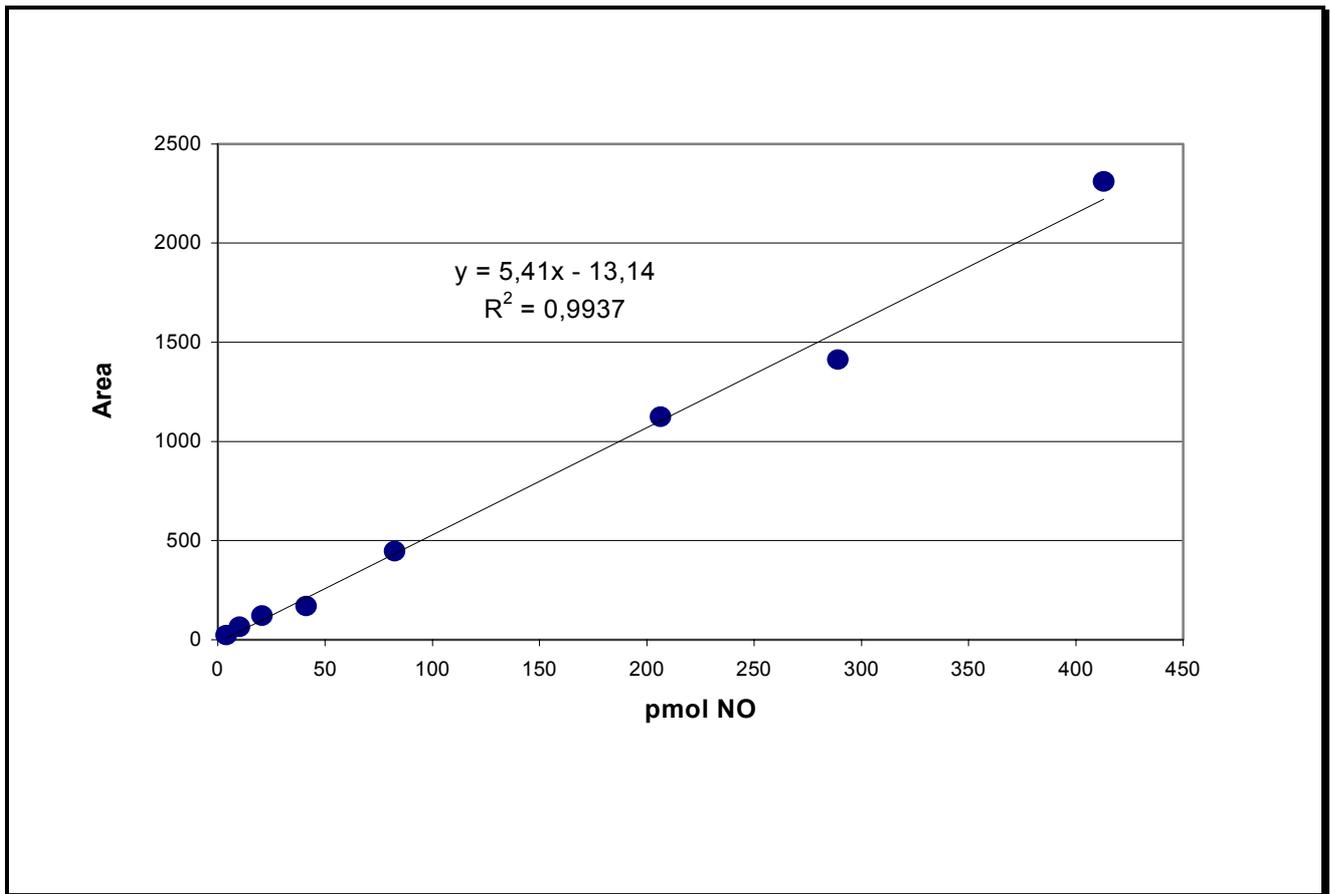


Abbildung 9: Eichkurve 2 zur Chemilumineszenz (Gerät der Firma Sievers)

3.3.2 Für die Messung nach Nitrit-Reduktion

Diese Messungen konnten nur mit dem Meßgerät der Firma Sievers durchgeführt werden, da ein spezielles Reaktionsgefäß und der entsprechende Probeneinlaß vorhanden waren.

Es wurden bestimmte Mengen einer 100 µM Natriumnitrit-Lösung in das anaerobe „purge-and-trap-vessel“ überführt und dort mit Kaliumiodid in Eisessig reduziert (s. Kap. 3.2.4). Die Abbildung 10 zeigt eine entsprechende Eichgerade, hier in Abhängigkeit injizierter nmol Nitrit.

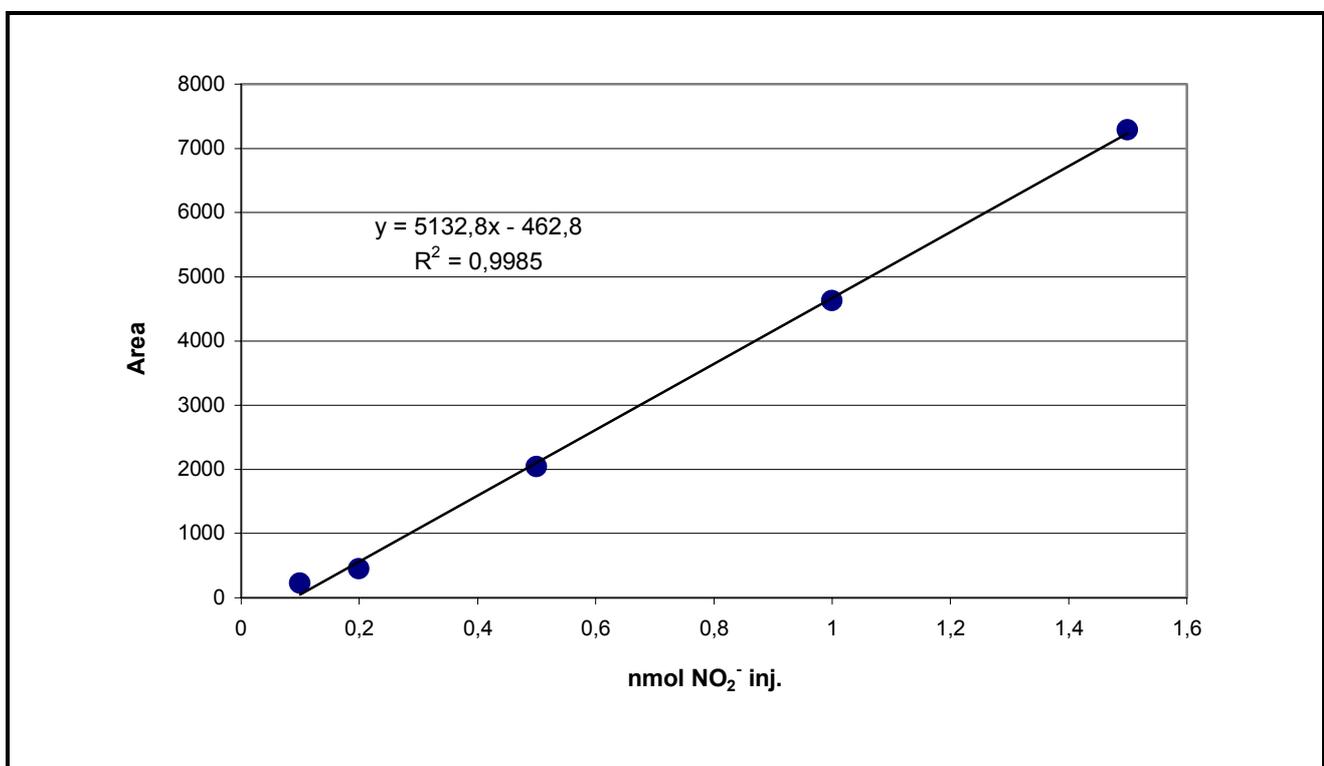


Abbildung 10: Eichkurve 3 zur Chemilumineszenz nach Nitrit-Reduktion

3.3.3 Für die Messung nach Nitrat-Reduktion

Die NO-Bestimmung nach Nitrat-Reduktion ist ebenfalls nur mit dem Gerät der Firma Sievers möglich gewesen.

Unterschiedliche Volumina einer 1 μM Natriumnitratlösung wurden durch Reduktion mit Vanadium(III)chlorid in NO überführt. Die Abbildung 11 gibt eine entsprechende Eichkurve wieder.

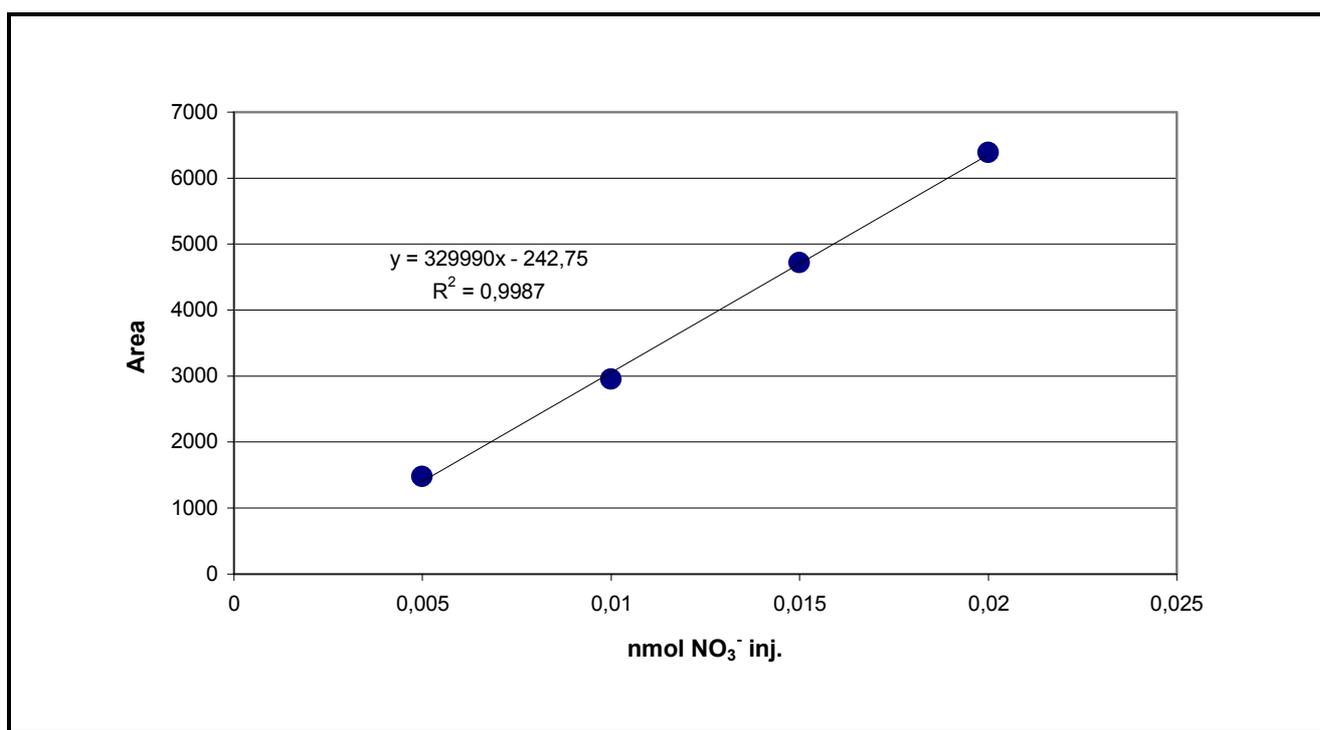


Abbildung 11: Eichkurve 4 zur Chemilumineszenz nach Nitrat-Reduktion

3.4 Optimierende Bedingungen

Da für die quantitative NO-Messung ein Sauerstoffausschluß wichtig ist, werden die Vials durch 30 minütiges Spülen mit Argon anaerobisiert und Lösungen über gasdichte Spritzen zum Reaktionsstart vereint. Argon besitzt gegenüber den anderen Inertgasen den Vorteil einer größeren Dichte als Luft, legt sich somit schützend über die Oberfläche der Lösung.

In Vials mit 22 ml Gesamtvolumen werden 3 ml Probenlösung, bestehend aus:

- 0,1 ml NO-Donor-Lösung
- (je) 0,1 ml „Aktivator-Lösung“
- Phosphatpuffer bzw. Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt.

Für einige NO-Donoren ist eine lichtinduzierte NO-Freisetzung bzw. Photorelaxation am Endothel bekannt [195,14,67,274]. Es bleibt hierbei sicherlich zu diskutieren, inwieweit tatsächlich eine verstärkte NO-Bildung oder eine erhöhte NO-Freisetzung aus NO-Speicherformen, wie z. B. Nitrosothiolen oder gar eine Überführung anderer NO-Redoxformen in das bei dieser Methode gemessene NO-Radikal stattfindet [279,34].

Diese Stimulation wurde mit einer 120 W Wolframlampe (Wellenlängenbereich 380-780 nm) durchgeführt, während die übrigen Reaktionsansätze vor Licht geschützt blieben.

Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist es unbedingt notwendig eine konstante Temperatur während der Messung zu gewährleisten. Dies ist insbesondere bei der Bestrahlung zu beachten. Temperaturunterschiede von 0,1°C wirken sich bereits beträchtlich in den Meßergebnissen aus.

3.5 Auswahl der Kofaktoren

Bei der Auswahl stimulierender Kofaktoren sollten zum einen bisher bekannte Aktivatoren der NO-Freisetzung berücksichtigt werden, zum anderen sollten bisher nicht untersuchte, möglichst physiologische Substanzen, vor allem im Hinblick auf ihre möglichen Redoxeingenschaften getestet werden (s. Kap. 1.6).

Niedermolekulare Thiole sind von verschiedenen Arbeitsgruppen als Katalysatoren der NO-Freisetzung aus Nitraten und Furoxanen beschrieben worden^[81,120]. Hier sind die Wirkungen für Cystein gut belegt, welches auch physiologisch am stärksten vertreten ist und deshalb im folgenden eingesetzt wurde.

Ferner untersuchten McAninly und Mitarbeiter sowie eine Reihe weitere Arbeitsgruppen die Wirkungen kleinster Mengen von Metallkationen auf den Zerfall von Nitrosothiolen, wobei sich Kupfer(I)ionen als ausgesprochen günstig erwiesen [197,112,114,305].

Außerdem sind Cytochrome, insbesondere Cytochrom P450, als Stimulatoren der NO-Freisetzung aus Nitraten bekannt [58,68,66].

Da Ascorbinsäure und Glucose als physiologische Reduktionsmittel in relativ hohen Konzentrationen vorhanden sind, wurden sie in die Untersuchungen miteinbezogen [3,31,304].

Für einen Großteil der zu untersuchenden Substanzen, die einer Reduktion bedürfen, wurden nun weitere, möglichst in ausreichender physiologischer Konzentration vorhandene Kofaktoren gesucht. Insgesamt erschienen als reduktive Aktivatoren sinnvoll:

- Ascorbinsäure (im Blut ca. 1,7 mM)
- Glucose (im Blut ca. 3,3-6,1 mM)
- Cystein (im Blut ca. 33 μ M)
- Cu(I)-ionen (im Serum ca. 1,4 mM für ges. Cu)
- 5,10,15,20-Tetrakis-(pentafluorophenyl)-21H,23H-porphin Eisen(III)-chlorid (im folgenden mit TPP-Fe^{III} bezeichnet) mit NaBH₄, zur Erzeugung eines oxidierbaren TPP^{II}-Komplexes, zur Simulation des reduktiven Teils des Cytochrom P-450 Systems [65,44]

Seltener erfordern NO-Donoren eine oxidative Aktivierung; diese ist bisher auch weniger untersucht. Für Molsidomin bzw. seinen aktiven Metaboliten SIN-1A ist eine gesteigerte NO-Bildung insbesondere mit Singulett-Sauerstoff (¹O₂) bestätigt [70].

Um eine mögliche oxidativ stimulierte NO-Freisetzung zu erhalten, wurden folgende Kofaktoren eingesetzt:

- 5,10,15,20-Tetrakis-(pentafluorophenyl)-21H,23H-porphin Eisen(III)-chlorid (=TPP-Fe^{III}) als Imitator eines Cytochromsystems
- Co-Salen/O₂ als Singulett-Sauerstoffdonor (eine planare Schiffsche Base)
- Iodosobenzol
- H₂O₂ als mittelstarkes Oxidationsmittel.

3.6 Ergebnisse

Die angegebene NO-Freisetzung in % steht für die gemessenen mol NO – je nach Methode eventuell nach Nitrit-oder Nitrat-Reduktion - bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge NO-Donor (100%).

Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen, die kleinen Balken stellen die Standardabweichung dar.

3.6.1 Nitro-Verbindungen

3.6.1.1 Bay-k8644

Eine NO-Freisetzung aus BAY-k 8644 ist mit den ausgewählten Kofaktoren in Dunkelheit nicht möglich. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, findet erst nach Bestrahlung eine maximale NO-Freisetzung von 5,6 % statt, die allerdings mit den eingesetzten Kofaktoren nicht weiter zu steigern ist, mit dem Reduktionsmittel Natriumborhydrid erreicht man 5,7 % NO-Freisetzung.

In Anwesenheit von Cystein kann eventuell gebildetes NO als Nitrosothiol vorliegen und damit der Messung nicht zugänglich sein, wobei Nitrosothiole in Anwesenheit von Licht homolytisch gespalten werden können [243].

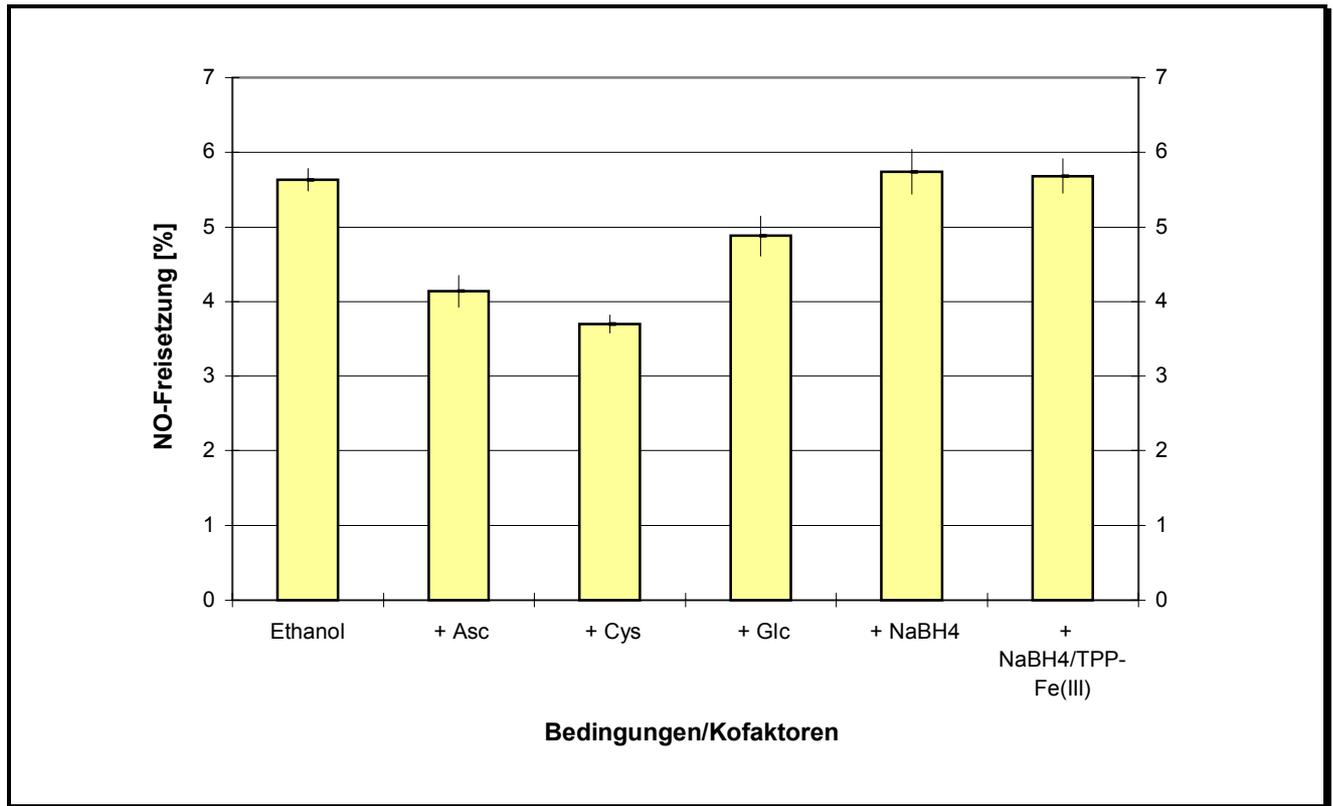


Abbildung 12: NO-Freisetzung aus BAY-k8644 unter Lichteinfluß und anaeroben Bedingungen

3.6.1.2 Bay-m4786, Nifedipin, 1-Nitropyren, Nitrofluoranthen, Misonidazol, Furazolidon

Diese Substanzen setzen weder spontan noch in Gegenwart der Kofaktoren im Dunkeln oder bestrahlt NO frei.

3.6.1.3 Nitrofurantoin

Bei Nitrofurantoin ist eine NO-Bildung in Dunkelheit selbst in Anwesenheit der Kofaktoren nicht feststellbar.

Die Abbildung 13 zeigt, daß nach Bestrahlung im Lösungsmittel Ethanol bereits 13,6 % NO frei werden. In Gegenwart von Ascorbinsäure steigert sich die NO-Bildung geringfügig auf 14,0 %. Am meisten NO erhält man nach Natriumborhydridzugabe, 17,8 %.

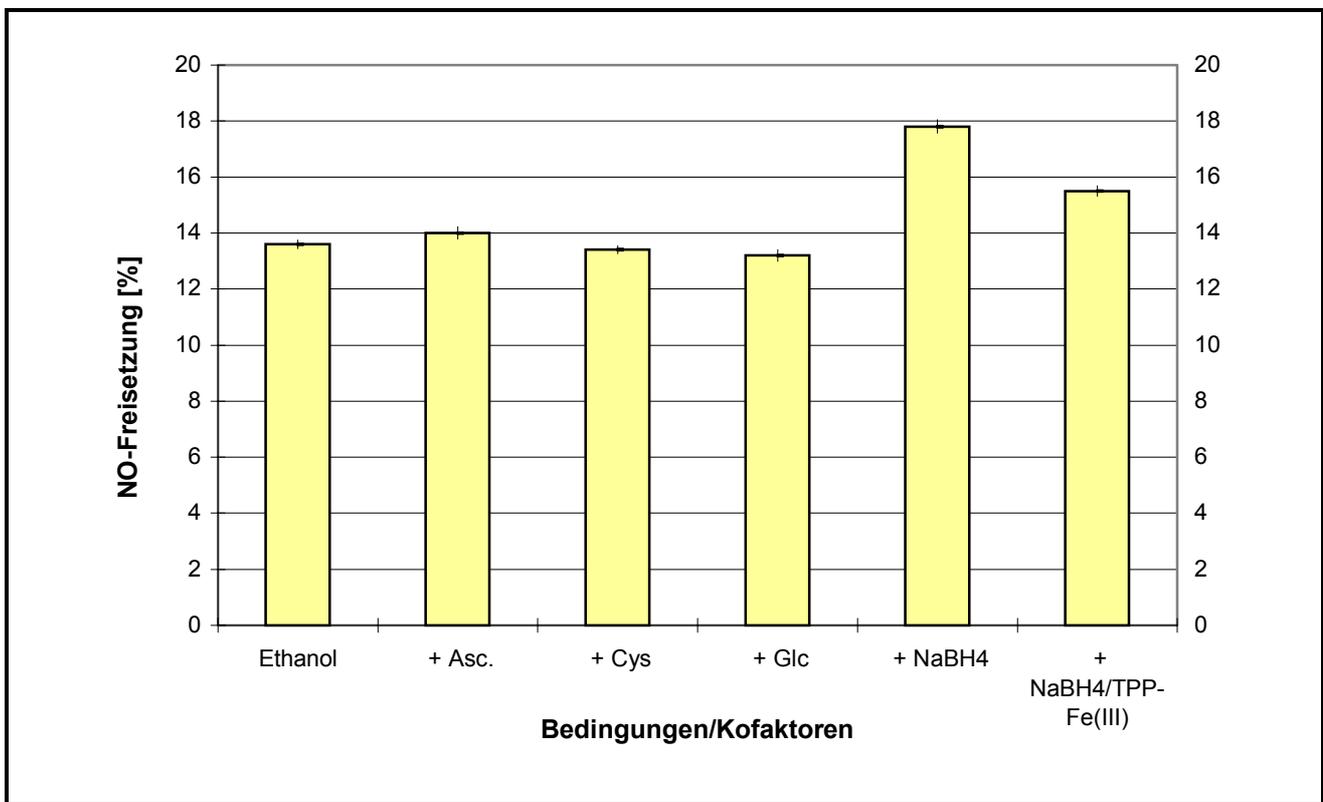


Abbildung 13: NO-Freisetzung aus Nitrofurantoin unter Lichteinfluß und anaeroben Bedingungen

3.6.2 Nitrate

3.6.2.1 SE145, SE136

Weder SE145 noch SE136 geben in Dunkelheit oder bei Bestrahlung NO ab. Auch die eingesetzten Kofaktoren sowie saure oder basische pH-Werte können keine NO-Freisetzung stimulieren.

3.6.2.2 GTN

Glyceroltrinitrat wurde schon eingehend in unserer Arbeitsgruppe untersucht, wobei aufgrund der apparativen Gegebenheiten nur NO-Bestimmungen durchgeführt werden konnten [243]. Da für diesen NO-Donor reduktive Bedingungen für die NO-Bildung sinnvoll erscheinen, können diese in Sauerstoffabwesenheit vollzogenen Messungen als durchaus maßgeblich für die Freisetzung gelten. Von Riederer wurden maximale NO-Freisetzungen bei Bestrahlung aus Glyceroltrinitrat in Anwesenheit eines Eisentetraphenylporphyrins mit Natriumborhydrid und Cystein von 7,03% ermittelt, für Eisentetraphenylporphyrin mit Natriumborhydrid nur 1,5%.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden hier zusätzlich Inkubationen in Sauerstoffanwesenheit und nachfolgender Reduktion von Nitrit bzw. Nitrat untersucht.

Überraschenderweise zeigen die Bestimmungen in Luftsauerstoffanwesenheit nach Nitrit-Reduktion nur sehr geringe Ausbeuten an gebildetem NO (s. Abbildung 14). Ohne Kofaktoren wird kein NO gebildet, in Anwesenheit von Ascorbinsäure werden nur 1,2% NO frei, mit Cystein nur 0,6% NO. Erst die Gegenwart von Tetraphenylporphyrinen ergibt eine stärkere Stimulation, wobei die höchsten Werte mit den reduktiven Zusätzen Ascorbinsäure (10,5%) und NADPH (6,7%) erhalten werden.

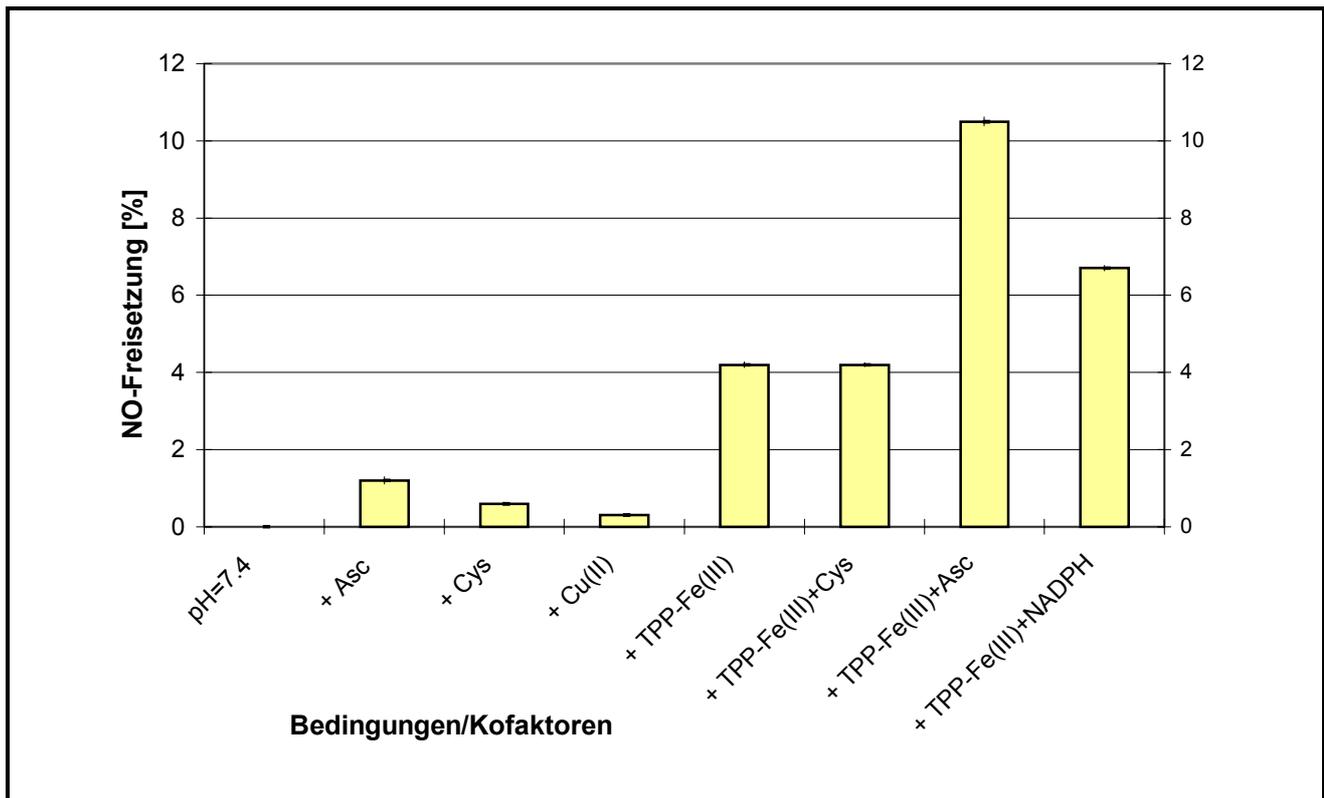


Abbildung 14: NO-Freisetzung aus GTN in Sauerstoffanwesenheit nach Nitrit-Reduktion

Da NO in Gegenwart von Cytochrom-P450 bzw. -imitierenden Komplexen und Sauerstoff zu Nitrat oxidiert werden könnte, scheint hier eine NO-Bestimmung nach Nitrat-Reduktion notwendig, um die vollständige NO-Freisetzung zu erfassen. Die Abbildung 15 zeigt den wohl optimalsten NO-Freisetzungsweg aus GTN durch Eisentetraphenylporphyrin und NADPH mit einer Ausbeute von 100%. NADPH ist dabei zur Bereitstellung der Reduktionsäquivalente Ascorbinsäure und Cystein deutlich überlegen, die gemessene Menge Nitrat in Gegenwart von Eisentetraphenylporphyrin liegt in diesen Fällen nur bei ca. 16,6%.

Die anderen Kofaktoren, einschließlich Tetraphenylporphyrin, zeigen ohne Reduktionsäquivalente keine relevante NO-Freisetzung.

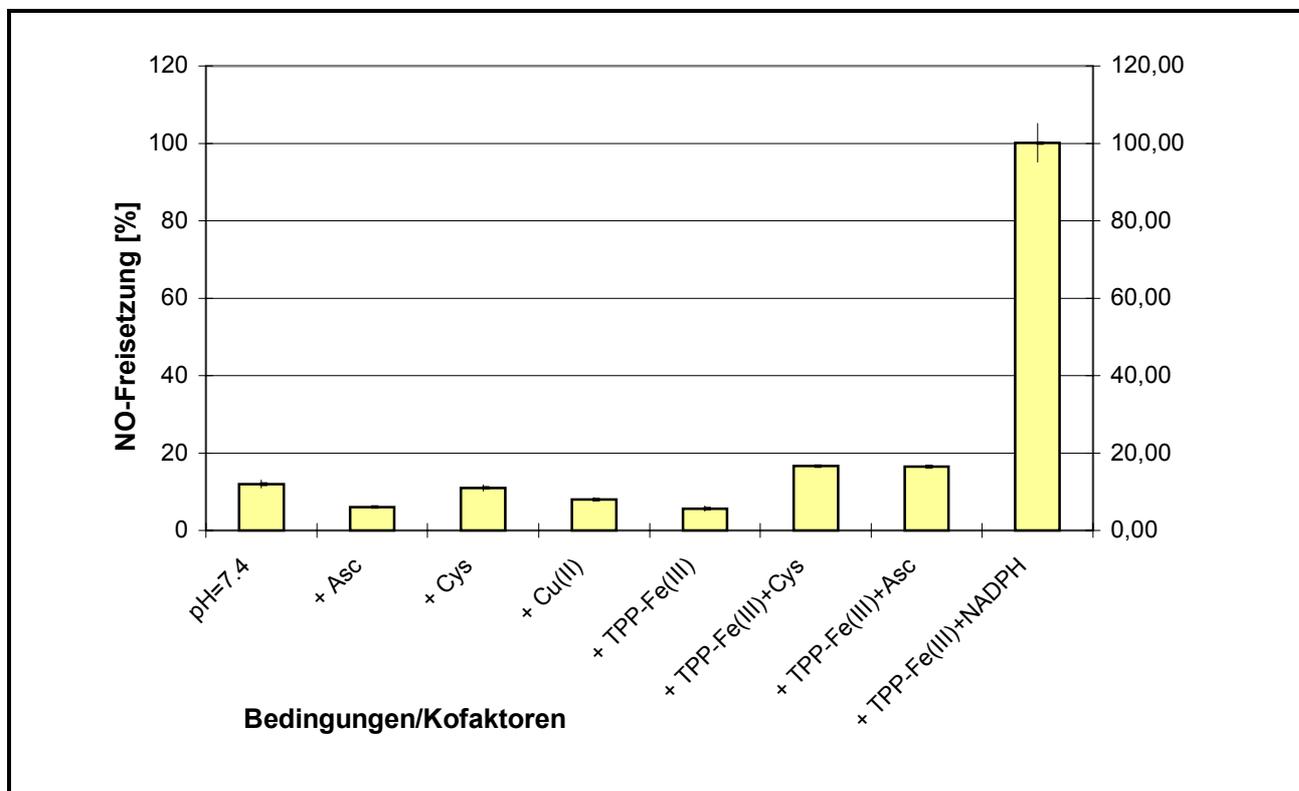


Abbildung 15: NO-Freisetzung aus GTN in Sauerstoffanwesenheit nach Nitrat-Reduktion

3.6.3 Hydroxylamine

3.6.3.1 HONH₃Cl

Die Abbildung 16 zeigt, daß aus Hydroxylaminhydrochlorid in Gegenwart von Luftsauerstoff nach Nitrit-Reduktion nur sehr geringe Mengen NO detektierbar sind. Ein neutraler pH-Wert scheint dem sauren oder basischen Medium überlegen, außerdem sind Cu(I)ionen in der Lage die NO-Freisetzung um ca. 60% des im neutralen gebildeten zu erhöhen. Weiterhin verhalten sich nur Cu(II)ionen und der Eisen(III)tetraphenylporphyrin-komplex als NO-Freisetzung stimulierende Kofaktoren.

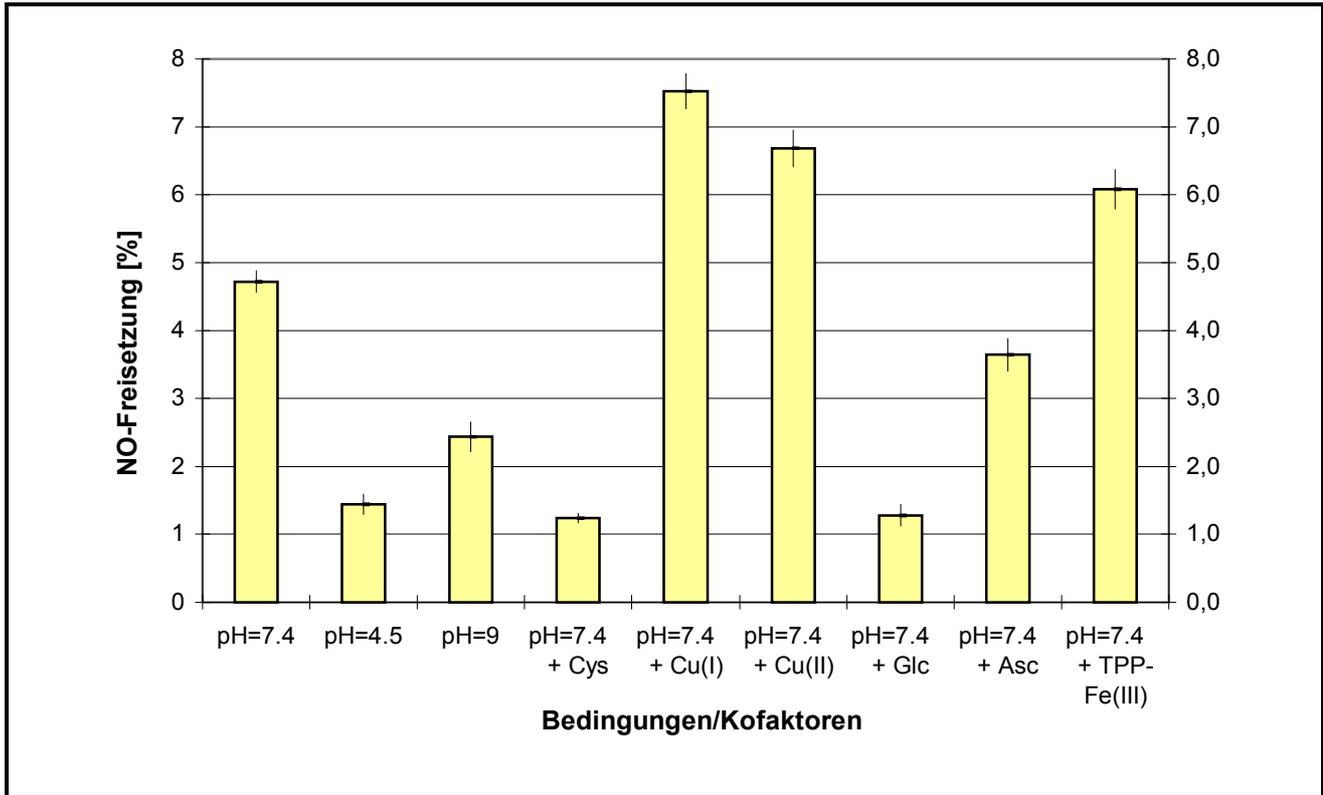


Abbildung 16: NO-Freisetzung aus HONH_2Cl in Sauerstoffanwesenheit nach Nitrit-Reduktion

Erstaunlicherweise ist in Sauerstoffanwesenheit nach Nitrat-Reduktion ein Anteil von 100% NO detektierbar, der sich in Gegenwart des Eisen-TPP-Komplexes auf nur 2,6% reduziert.

3.6.4 Hydroxyimine

3.6.4.1 NOR-3 = FK409

Für die Hydroxyimine ist eine Oxidation des Stickstoffs zur NO-Bildung notwendig, die Inkubation unter Sauerstoffausschluß und der direkte NO-Nachweis erwiesen sich erwartungsgemäß als hinfällig zur Betrachtung der NO-Freisetzung.

Erst in Gegenwart von Luftsauerstoff werden nach Reduktion gebildeten Nitrits beträchtliche Mengen von NO gemessen.

Im Gegensatz zu allen anderen hier vermessenen NO-Donoren ist hier eine längere Inkubationszeit von zwei Stunden notwendig, dies entspricht der vierfachen, von der Arbeitsgruppe Décout ermittelten, Halbwertszeit [57]. Aus Abbildung 17 wird ersichtlich, daß auch hier die höchste Freisetzungsrate von 86% bei basischem pH auftritt, im neutralen Bereich wird fast nur noch ein Drittel dessen und bei einem sauren pH von 4,5 nur noch 5,2% NO gebildet. Der Zusatz von Cu(I)-ionen steigert im neutralen Medium die NO-Freisetzung um mehr als das Doppelte auf einen Wert von 70%, ferner ist noch mit Ascorbinsäure eine deutliche Steigerung auf 50%, mit Cystein lediglich auf 38% NO zu verzeichnen. In Anwesenheit von Eisen(III)tetraphenylporphyrin liegt die Menge an freigesetztem NO bei nur 9,2%.

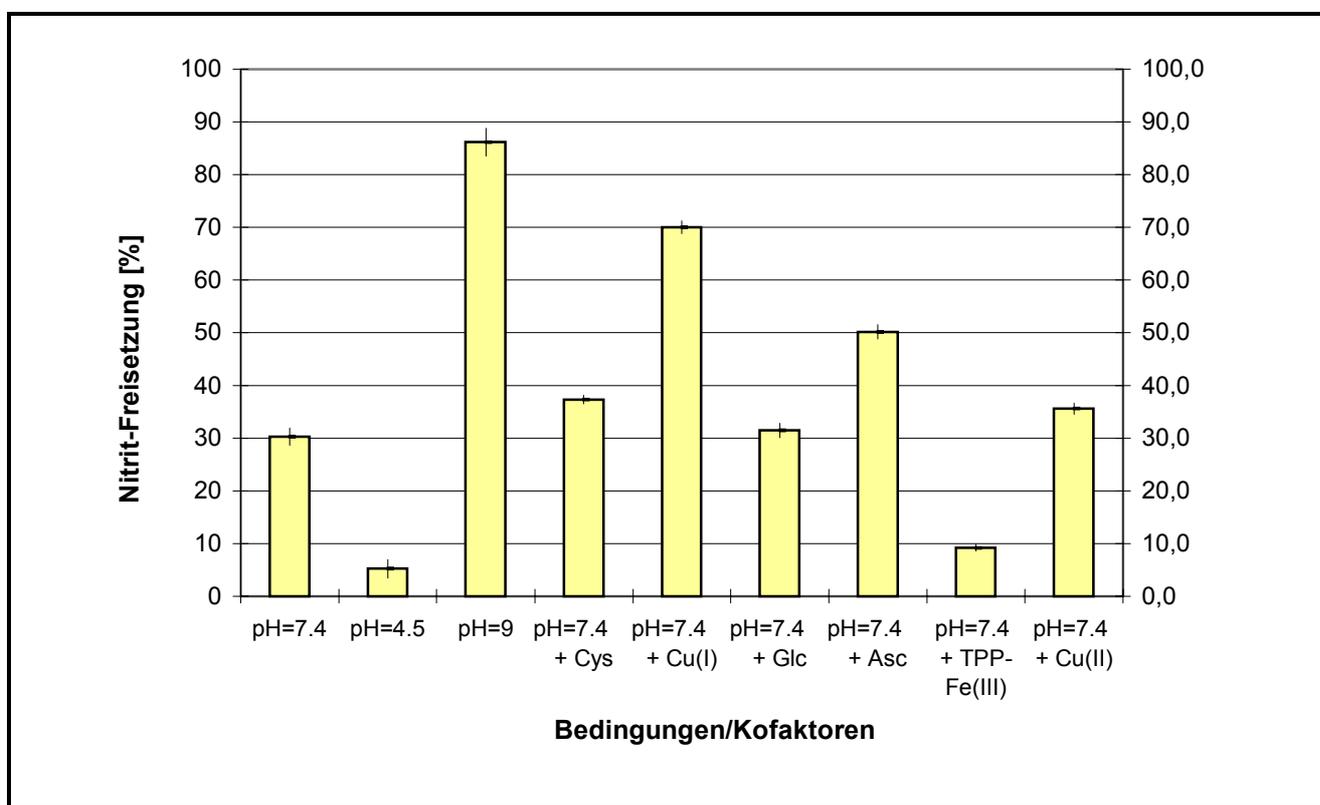


Abbildung 17: NO-Freisetzung aus FK409 in Sauerstoffanwesenheit nach Nitrit-Reduktion

Zur Kontrolle einer möglichen Eisentetraphenylporphyrin-katalysierten NO-Bildung wurden auch hier in Sauerstoffanwesenheit NO-Messungen nach Nitrat-Reduktion vorgenommen. Unter diesen Bedingungen wurden für FK409 allein 90,4% NO, in Gegenwart von Eisen(III)TPP 79% NO detektiert. Ohne Anwesenheit von Kofaktoren entspricht der Wert nach Nitrat-Reduktion in etwa dem nach Nitrit-Reduktion, folglich ist hier nur auf Nitritbildung zu schliessen. Dagegen scheint der Eisen(III)tetraphenylporphyrinkomplex in der Lage eine Oxidation zum Nitrat zu katalysieren. Da im Nitritassay lediglich 9,2% NO gemessen werden, kann man hier von ca. 70% Nitratbildung ausgehen.

3.6.4.2 NOR-1

NOR-1 verhält sich dem FK409 recht ähnlich, in Sauerstoffabwesenheit ist eine zu vernachlässigende NO-Bildung zu verzeichnen.

Die Abbildung 18 veranschaulicht die in Sauerstoffgegenwart nach Nitrit-Reduktion ermittelte NO-Bildung aus NOR-1. Die Deprotonierung des Hydroxyimins bei basischen pH-Werten scheint das ausschlaggebende Kriterium zur NO-Freisetzung zu sein. Bei einem pH von 9 werden 109% NO detektiert, wohingegen bei einem pH von 4.5 nur 29% NO im untersuchten Zeitraum von 10 Minuten frei werden. Der Zusatz von Kofaktoren (hier nur bei pH=7,4 gezeigt) senkt deutlich die meßbare NO-Konzentration und ist auch bei andere pH-Werten nicht relevant (Daten hier nicht gezeigt).

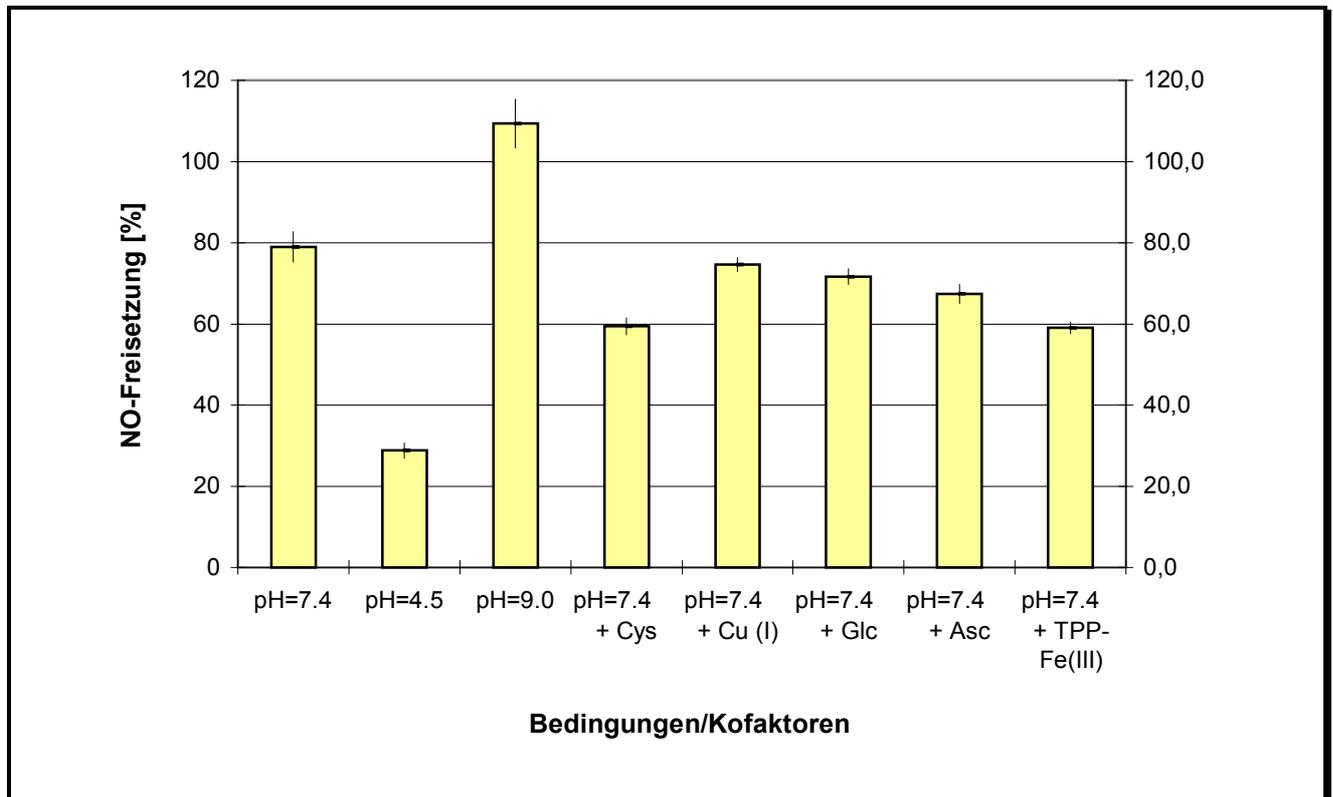


Abbildung 18: NO-Freisetzung aus NOR-1 in Sauerstoffanwesenheit nach Nitrit-Reduktion

Eine Nitratbestimmung zum Nachweis einer eventuellen Tetraphenyleisenporphyrin-stimulierbaren NO-Freisetzung zeigt ebenfalls deutlich keine derartige Aktivierbarkeit. In Sauerstoffanwesenheit werden nach Nitrat-Reduktion 146,1% NO, dagegen mit dem Zusatz von Eisen(III)tetraphenylporphyrin nur 66,2% NO detektiert.

3.6.5 NONOates

3.6.5.1 DEA/NO

Für DEA/NO ist eine spontane NO-Freisetzung bekannt, hier wurde zur Verdeutlichung nur die Darstellung in Sauerstoffanwesenheit nach Nitrit-Reduktion gewählt. Die Abbildung 19 stellt klar heraus, daß die Abwesenheit von Kofaktoren zur stärksten NO-Bildung von 161% führt, die Gegenwart von Cystein z. B. erniedrigt diesen Wert um ca. ein Drittel, auf 105% und von Eisentetraphenylporphyrin auf 110%.

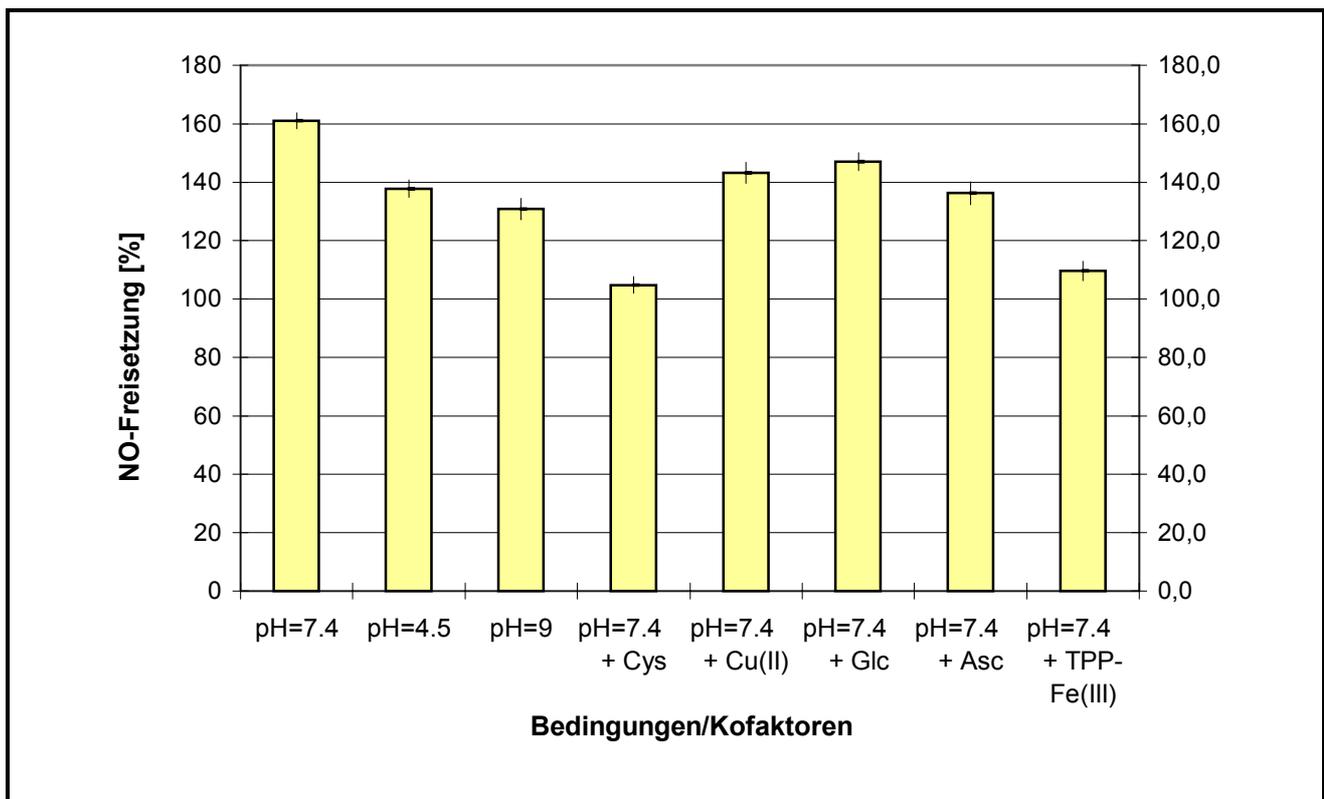


Abbildung 19: NO-Freisetzung aus DEA/NO in Sauerstoffanwesenheit nach Nitrit-Reduktion

Bei einer NO-Bestimmung nach Nitratreduktion wurde ohne Kofaktoren wiederum die größte Menge an NO, mit 169%, ermittelt, wohingegen in Eisentetraphenylporphyrin-anwesenheit etwas weniger, nämlich 150 % NO frei werden.

3.6.6 Alkylierte NONOates

3.6.6.1 M-Pyrro /NO, E-Pyrro /NO

Bei allen alkylierten NONOaten wird weder spontan noch in Gegenwart von Kofaktoren in Dunkelheit oder bei Bestrahlung NO abgegeben.

3.6.6.2 V-Pyrro/NO

V-Pyrro/NO zeigt ohne Zusatz von Kofaktoren keinerlei NO-Freisetzung, auch nicht nach Nitrit- oder Nitrat-Reduktion.

Von den eingesetzten Kofaktoren stimuliert nur Eisentetraphenylporphyrin die NO-Bildung. Es werden 146 % NO nach Nitrat-Reduktion gemessen. Weitere Kofaktoren zusätzlich zum Eisen-TPP-Komplex erhöhen diese NO-Freisetzung nicht.

3.6.7 5-Ringheterozyklen

3.6.7.1 Furoxan: CAS1609

In Sauerstoffabwesenheit ist für das Furoxan CAS1609 auch in Anwesenheit der Kofaktoren weder in Dunkelheit noch bei Bestrahlung eine NO-Bildung festzustellen.

Erst in Luftsauerstoffanwesenheit werden nach Nitrit-Reduktion in Dunkelheit sehr geringe Mengen NO ermittelt (siehe Abbildung 20). Wobei im neutralen pH-Bereich von 7,4 lediglich 2 % NO frei werden; dieser Anteil wird, zwar sehr gering, nur durch den Zusatz von Cystein erhöht.

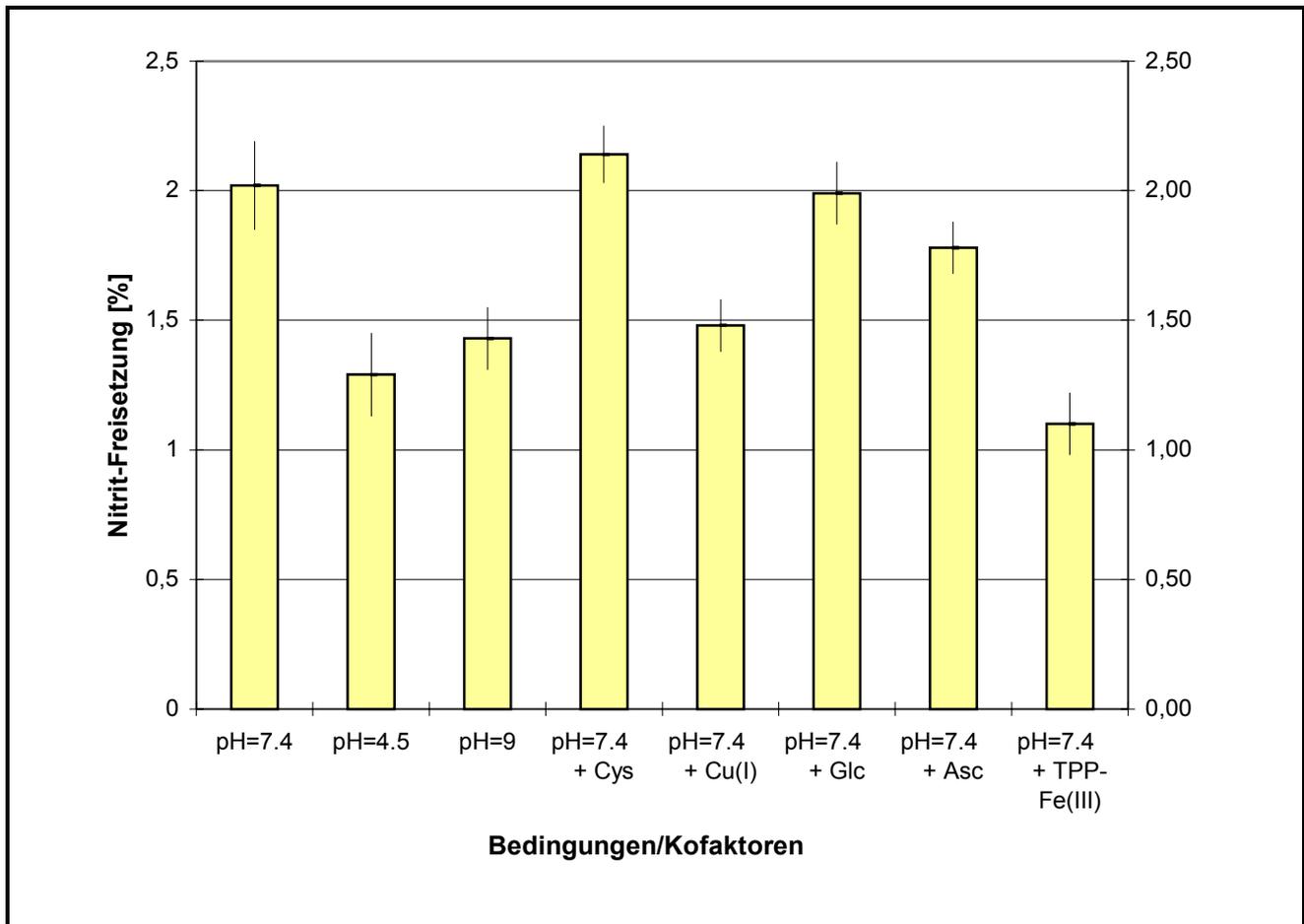


Abbildung 20: NO-Freisetzung aus CAS 1609 in Sauerstoffanwesenheit nach Nitrit-Reduktion

Die NO-Bestimmung nach Nitrat-Reduktion zeigt dagegen schon ohne Kofaktoren einen Anteil von 20,4 % NO. Die maximale Menge NO, 113,2 %, wird in Gegenwart von Eisentetraphenylporphyrin frei. Auch hier erhöhen weitere Kofaktoren zusätzlich zum Eisen-TPP-Komplex die NO-Bildung nicht.

3.6.7.2 N-Methyl-N-nitrososydnonimin

Das Sydnonimin setzt unter anaeroben Bedingungen nur unter Lichteinwirkung NO frei. Die Abbildung 21 zeigt, daß im Phosphatpuffer bereits 13,9 % NO gebildet werden. Kofaktoren können die Freisetzung erhöhen, z.B. der Zusatz von Ascorbinsäure führt zu einer NO-Bildung von 17,0 %, Glucose zu 20,0 % und Eisen(III)-Tetraphenylporphyrin zu 17,6 %.

Die Hydrolyse des Ringsystems spielt ebenfalls eine wichtige Rolle zur NO-Bildung. Ein saurer pH von 4,5 erhöht die NO-Freisetzung auf 20,9 %, während ein pH von 9 nur 14,7 % NO entstehen läßt.

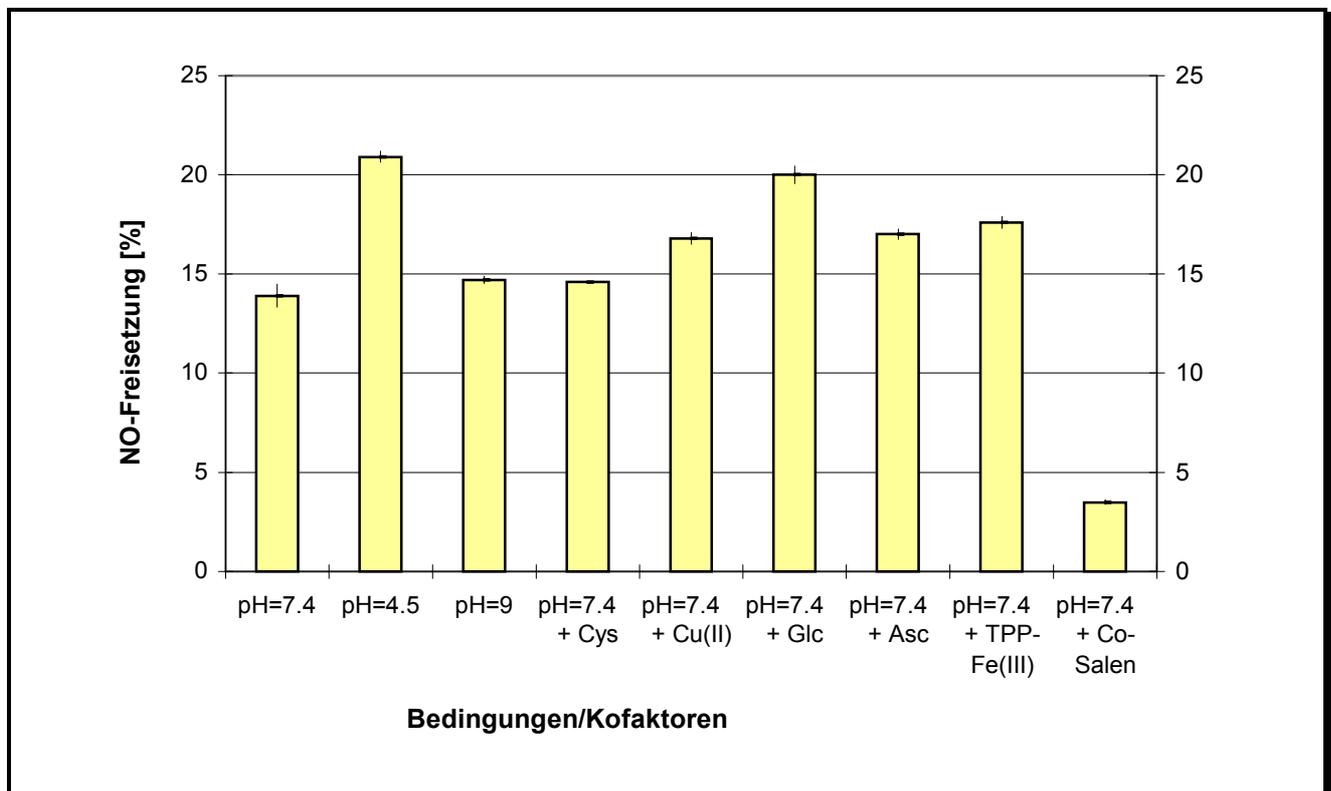


Abbildung 21: NO-Freisetzung aus 3-Methyl-N-nitroso-sydnonimin unter Lichteinfluß und anaeroben Bedingungen

Das N-Nitrososydnonimin setzt in Luftsaauerstoffanwesenheit sehr ähnliche Mengen NO frei (Daten hier nicht gezeigt). Interessant ist wieder die Stimulation der NO-Bildung beim Nitratassay. Es werden 67,6% NO bereits ohne Anwesenheit der Kofaktoren frei,

mit Eisentetraphenylporphyrin sind es nur 60%.

3.6.8 Sonstige

3.6.8.1 HE 12.2 B

Die in wässriger Lösung entstehende C-Nitroso-Verbindung setzt bestrahlt und unter Ausschluß von Luftsauerstoff nur ca. 1,2 % NO frei. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, erhöht sich in Gegenwart von Ascorbinsäure der NO-Anteil auf nur 1,43%. Die anderen Kofaktoren erweisen sich als ähnlich irrelevant zur Stimulation der NO-Bildung.

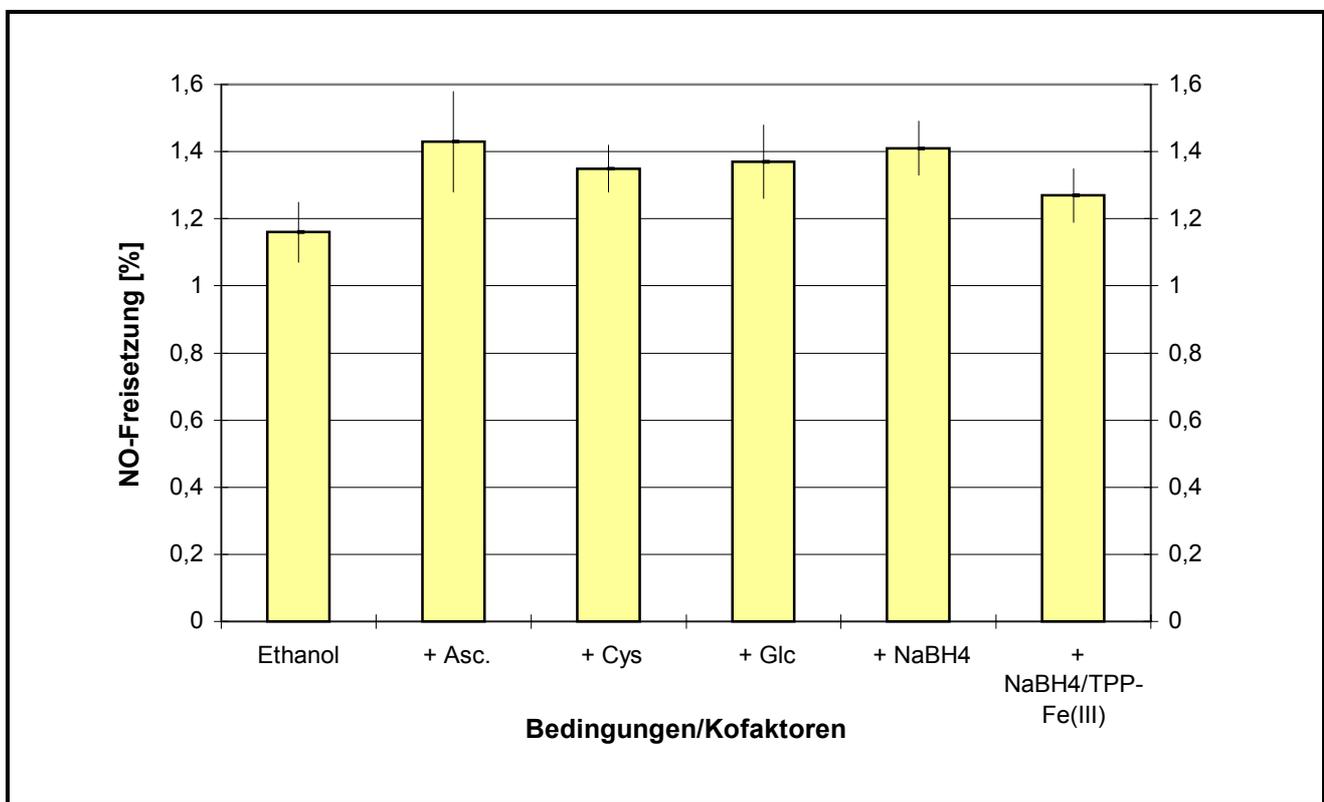


Abbildung 22: NO-Freisetzung aus HE 12.2 B unter Lichteinfluß und anaeroben Bedingungen

Auch hier ändert sich das NO-Freisetzungsverhalten gravierend im Nitratassay. In Sauerstoffanwesenheit ist nach Nitrat-Reduktion ein Anteil von 113% NO ohne Kofaktoren zu detektieren. Die Anwesenheit von Eisentetraphenylporphyrin erhöht diesen Wert

nochmals auf 142,5%. Der Zusatz von Iodosobenzol zum Eisen-TPP-Komplex führt zu nur 128% NO.

3.7 Fazit

Da die Freisetzung vieler NO-Donoren enzymatisch vermittelt zu sein scheint, wäre es sinnvoll die entsprechenden Verbindungen mit z.B. Cytochrom-P450 umzusetzen. Der hohe Anteil an Thiol-Gruppen in Enzymen fängt durch sehr schnelle Reaktion das gebildete NO weg (s.1.4.2), so daß ein Nachweis mittels Chemilumineszenz aus der Gasphase kaum möglich ist.

Deshalb wurden hierzu Messungen an der löslichen Guanylyl-Cyclase sowie der Oxy-Hämoglobin-Assay durchgeführt.

4 Lösliche Guanylyl-Cyclase

4.1 Funktion der löslichen Guanylyl-Cyclase

Eine der wichtigsten Zielstrukturen von NO ist die Stimulation eines Häm-Enzyms, der löslichen Guanylyl-Cyclase (= sGC = GTP-Phosphat-Lyase). Sie stellt die molekulare Basis einer Vielzahl der NO-vermittelten Wirkungen dar, wie z.B. Gefäßdilatation, Hemmung der Plättchenaggregation und -adhäsion, einige Bereiche der Langzeit-Modulation synaptischer Plastizität im ZNS sowie nitrenerge Neurotransmission im peripheren glatten Muskelgewebe (GIT, Urogenitaltrakt).

Das sGC-cGMP-System (s. u.) ist als Haupt-Effektor-System sowohl für endogenes NO, als auch für Vasodilatoren wie z.B. organische Nitratester, Natrium-nitroprussid, Sydnonimine u.a. bekannt [21].

Die Guanylyl-Cyclase katalysiert die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Das entstandene cGMP bewirkt z.B. über cGMP-abhängige Protein-Kinasen eine indirekte Hemmung der Phospholipase C und des Phosphoinositoltriphosphat-Rezeptors [257].

In den Mukosazellen des Darmes kommt vor allem die plasmamembrangebundene, partikuläre Enzymform vor, für die das atrionatriuretische Peptid (ANP) einen potenten Stimulator darstellt. In den Thrombozyten findet man allein die lösliche, zytosolische Form, die durch NO und CO (die Hämoxxygenase 2 setzt bei ihrem Abbau von Häm zu Biliverdin CO frei) aktiviert wird. Glatte Gefäßmuskeln weisen beide Enzymformen auf.

Das Enzym ist ein Heterodimer, bei dem jede Untereinheit ein pentakoordiniertes Häm-Eisen enthält. Die Interaktion von NO mit der prosthetischen Häm-Gruppe der sGC führt zur Aktivierung des Enzymes (ca. 130-fache Stimulation!), wobei ein ebenfalls pentakoordinierter Nitrosyl-Häm-Komplex entsteht. Im Gegensatz dazu bildet CO einen hexakoordinierten Häm-Eisen-Komplex, der die sGC nur etwa vierfach stimuliert [280].

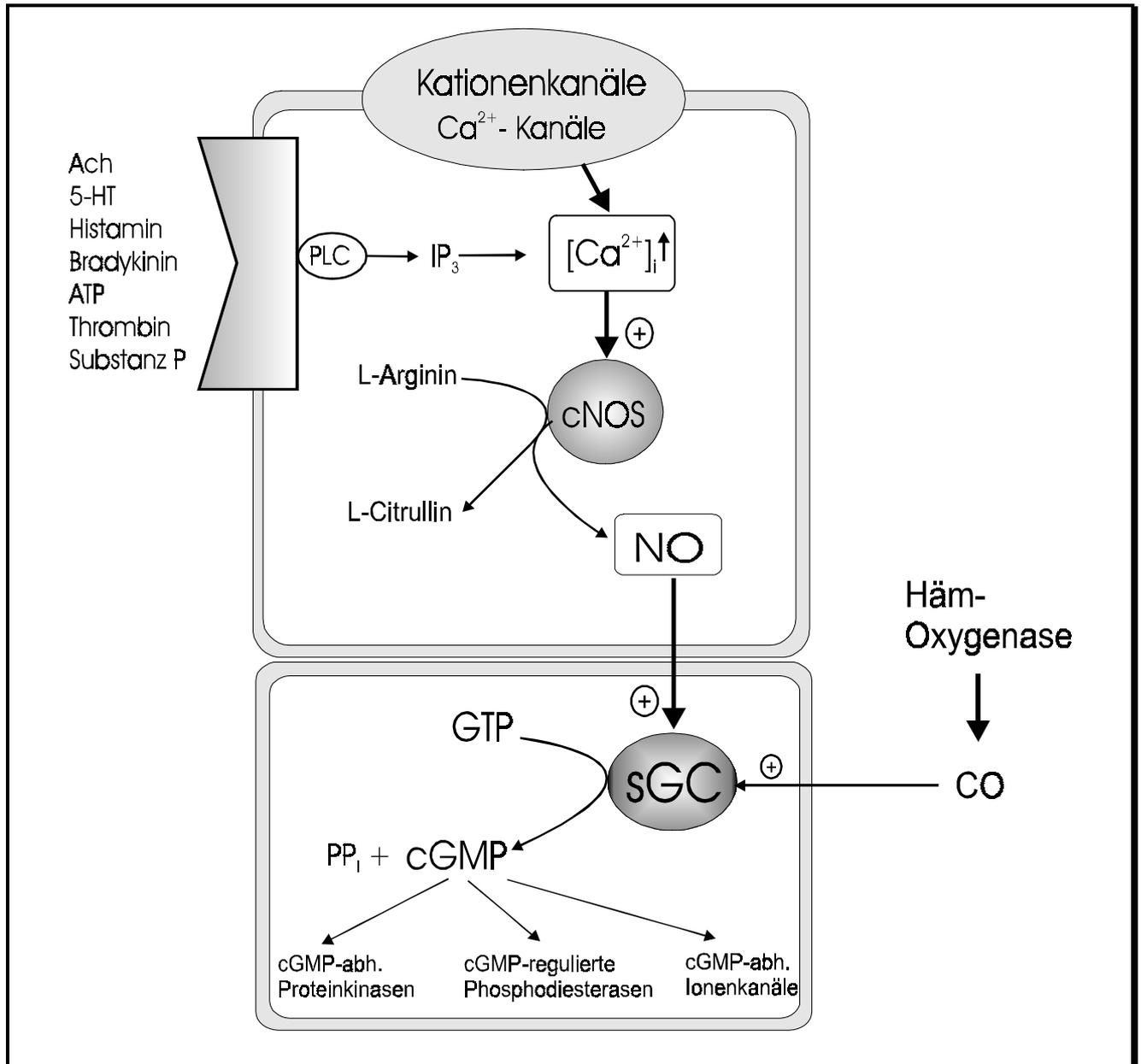


Abbildung 23: Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase

Da diskutiert wird, ob das NO-Radikal die einzige Redoxform des Stickstoffmonoxids ist, die von der NO-Synthase freigesetzt wird und Klassifikationen nach NO⁺-, NO⁻ - und NO-Donoren zur Charakterisierung ihrer Wirkung gemacht werden, ist eine Untersuchung von Dierks und Burstyn interessant, die das NO-Radikal als einzige Redoxform zur Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase fanden [62].

Mayer und Mitarbeiter fanden auch für Peroxynitrit eine Stimulation der sGC in Gegen-

wart von Glutathion [196]. Inwieweit Peroxynitrit die Guanylyl-Cyclase direkt stimuliert oder ob entstehende Nitrosothiole die eigentliche Wirkform darstellen, bleibt noch zu klären.

4.2 Prinzip des sGC-Assays

Bei dieser Methode wird die Menge von radioaktiv markiertem [^{32}P]cGMP bestimmt, welches sich aus [α - ^{32}P]GTP gebildet hat.



Als katalysierende Metallionen (Me^{2+}) können Magnesiumionen oder Manganionen verwendet werden.

Den Metallkationen werden konformatorische Einflüsse am allosterischen Zentrum der sGC und ferner Mangan(II) Redoxeigenschaften zugeschrieben. Bei dem Zusatz von Manganionen erhält man bereits eine höhere basale Enzymaktivität, die maximale Stimulation durch den NO-Donor fällt aber geringer aus. Es folgen kleinere Michaeliskonstanten.

Gebildetes cGMP wird nach Versuchsende vom GTP und den Phosphaten abgetrennt, indem mit Zinkcarbonat die 5'-Nucleotide, anorganisches Phosphat sowie Pyrophosphat gefällt werden. Der Überstand wird über einer sauren Aluminiumoxid-Säule gereinigt [265,86].

4.3 Optimierende Bedingungen

Für die Bestimmung wird gereinigtes Enzym verwendet, um die große Zahl möglicher Nebenreaktionen zu minimieren.

Die Zugabe von Proteinen (hier Albumin verwandt) schützt das gereinigte Enzym.

Der Zerfall von markiertem cGMP durch cyclische Nucleotid-Phosphodiesterasen kann durch Zusatz von unmarkiertem cGMP oder IBMX (=3-Isobutyl-1-methylxanthin, ein Phosphodiesterase-Inhibitor) verringert werden.

Zeit- und sauerstoffabhängige Eigenaktivierung der sGC sowie Oxidation des Enzyms werden durch Thiol-Zusatz vermieden. Die cGMP-Bildung wird damit über längere Zeit linear gehalten [265].

4.4 Versuchsaufbau

Aus Rinderlunge wird durch Ultrazentrifugation, Anionenaustauschchromatographie und Bindung an immobilisierte Antikörper die sGC gewonnen und gereinigt [168]. Nach 1:1 Verdünnung mit Glycerol sowie Zugabe von Dithiothreitol (1,5 mM) werden zu einem Enzym-Mix mit 1 μ l sGC verarbeitet:

Triethanolamin/HCl-Puffer: Endkonzentration 50 mM

Rinderserumalbumin: Endkonzentration 0,5 mg/ml

Dithiothreitol: Endkonzentration 3mM

Zum Starten der Umsetzung wird ein Reagenzien-Mix angesetzt aus:

cGMP: Endkonzentration 1mM

GTP: Endkonzentration 0,5 mM

[α -³²P]GTP: Endkonzentration 0,05 mM

Weiterhin wird die Lösung des Metallsalzes (Magnesiumchlorid) vorbereitet, das in einer Endkonzentration von 3mM vorliegt.

Lösungen des NO-Donors werden von 0,03 μ M bis 1000 μ M angesetzt.

Nach dem Mischen der vier Lösungen, wird der Reaktionsansatz (100 μ l) 10 min. bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.

Der Reaktionsstop erfolgt durch Fällung mit Zinkacetat (0,12mM) und Natriumcarbonat (0,12 mM).

4.5 Ergebnisse

Für jede Substanz wurden mindestens drei verschiedene Ansätze untersucht, wobei auch für jede Konzentration Mittelwerte aus drei Messungen herangezogen wurden.

Die Aktivitäten der löslichen Guanylyl-Cyclase sind im folgenden in Abhängigkeit von den Konzentrationen der NO-Donoren aufgeführt. Die maximale sGC-Stimulation, der Quotient aus maximaler sGC-Aktivität durch die basale Aktivität, ist in der Regel bei 10 mM NO-Donor ermittelt worden. Zum Vergleich der Enzymaktivität des jeweiligen Ansatzes wurde eine maximale Stimulation mit Nitrosoglutathion (100%) bestimmt. Es wurden prozentuale Werte bezogen auf diese Maximalstimulation berechnet.

4.5.1 Die sGC stimulierende Pharmaka

Für das **Furoxan-Derivat CAS1609** wurde eine Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase festgestellt, wie auch von einigen anderen Arbeitsgruppen bestätigt [23].

Die sGC konnte nach Einwirkung der höchsten Konzentration des Furoxan um das 70-fache stimuliert werden, wie in Abbildung 24 zu sehen ist (bei einer maximalen Stimulation von 180-fach mit Nitrosoglutathion). Dies entspricht ca.39% der Maximalstimulation. Bei niedrigeren Konzentrationen, z.B. 100 μM , tritt eine nur ca. 3-fache Steigerung der Enzymaktivität ein. Charakteristisch ist hier ein steiler Anstieg der sGC-Stimulation ab einer Konzentration von 300 μM des Furoxans.

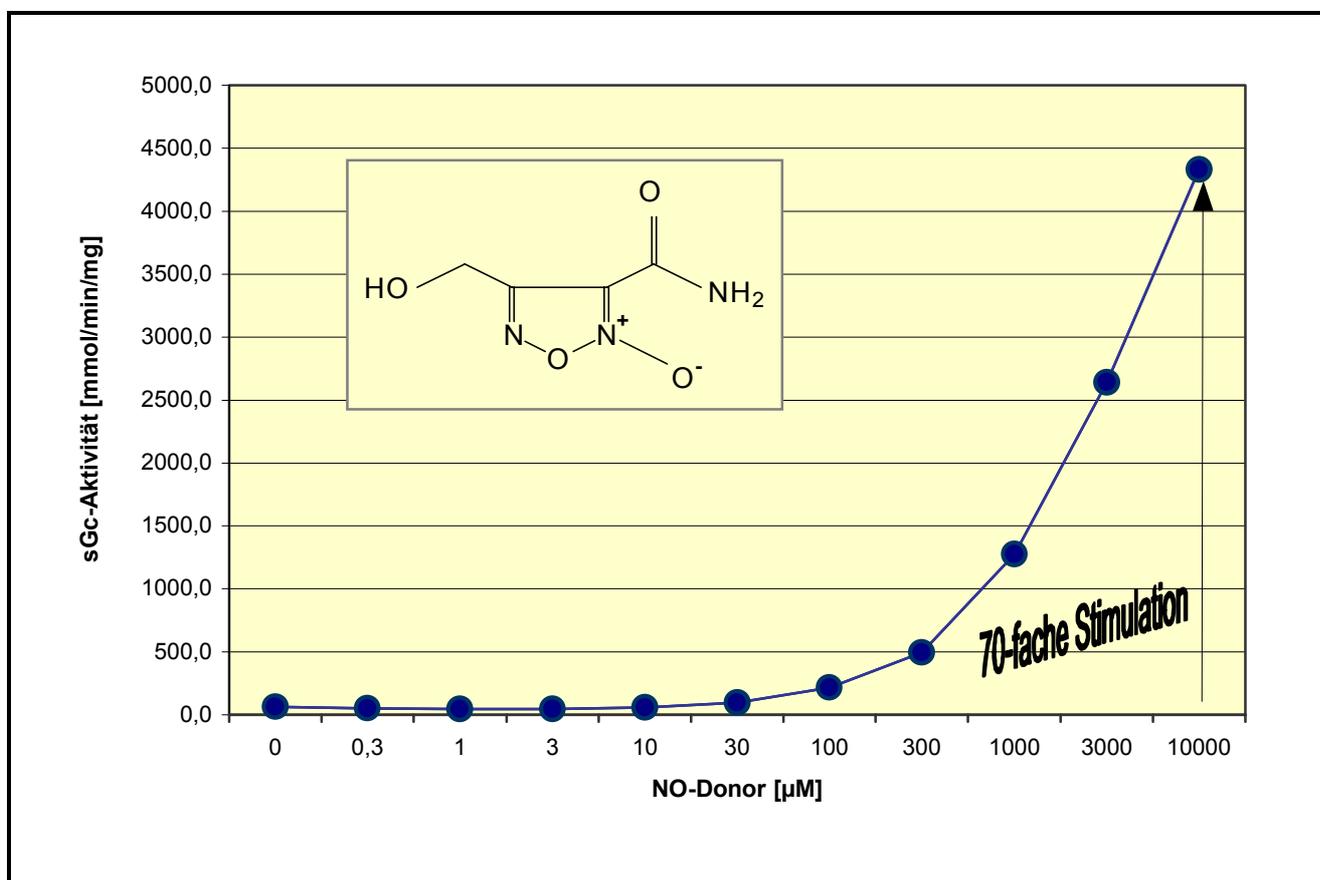


Abbildung 24: sGC-Stimulation mit CAS 1609

Die Abbildung 25 zeigt, daß das **NONOat DEA/NO** in der Lage ist, die sGC-Aktivität bis zum 143-fachen zu steigern, bei einer sGC-Fraktion die sich maximal 146-fach aktivie-

ren läßt. Folglich werden hier 98% der Maximalstimulation erreicht.

Eine deutlicher Anstieg der Enzymaktivität ist schon bei einer Konzentration von 10 µM zu erkennen (25-fach), bei 100µM ist die Stimulation bereits um das 85-fache erhöht, die maximale Umsetzung findet ab etwa 1000 µM DEA/NO statt. Es liegt ebenfalls ein sehr steiler Kurvenverlauf der NO-Donor-konzentrationsabhängigen sGC-Stimulation vor.

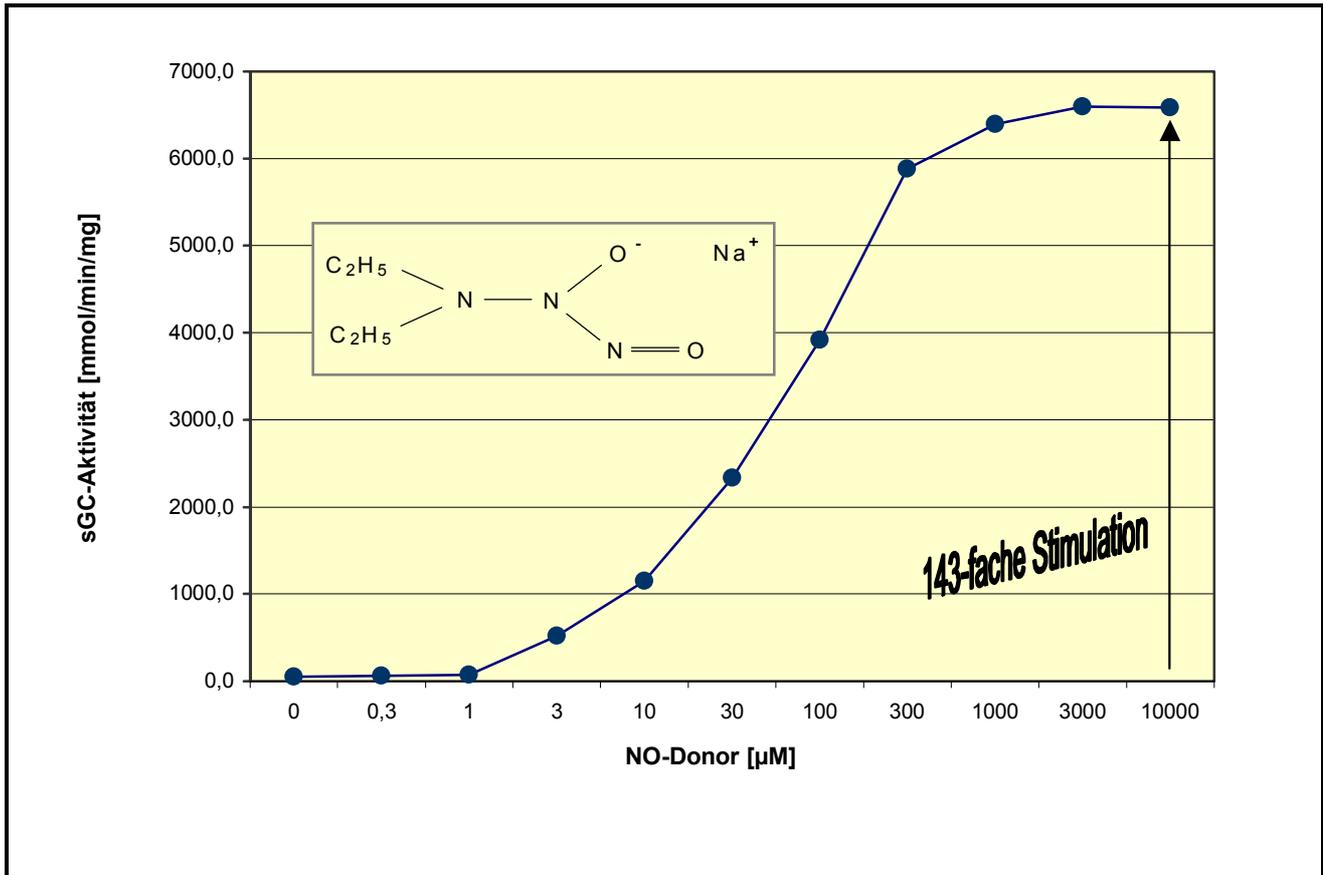


Abbildung 25: sGC-Stimulation mit DEA/NO

Das **3-Methyl-N-nitroso-5-sydnonimin** stimuliert die sGC um das 26-fache (s. Abbildung 26). Dies entspricht 16% der mit Nitrosoglutathion bestimmten maximalen Stimulation (164-fach). Bei niedrigeren Konzentrationen, wie beispielsweise 100 μM , wird nur eine ca. 2-fache Steigerung der Umsetzung erreicht.

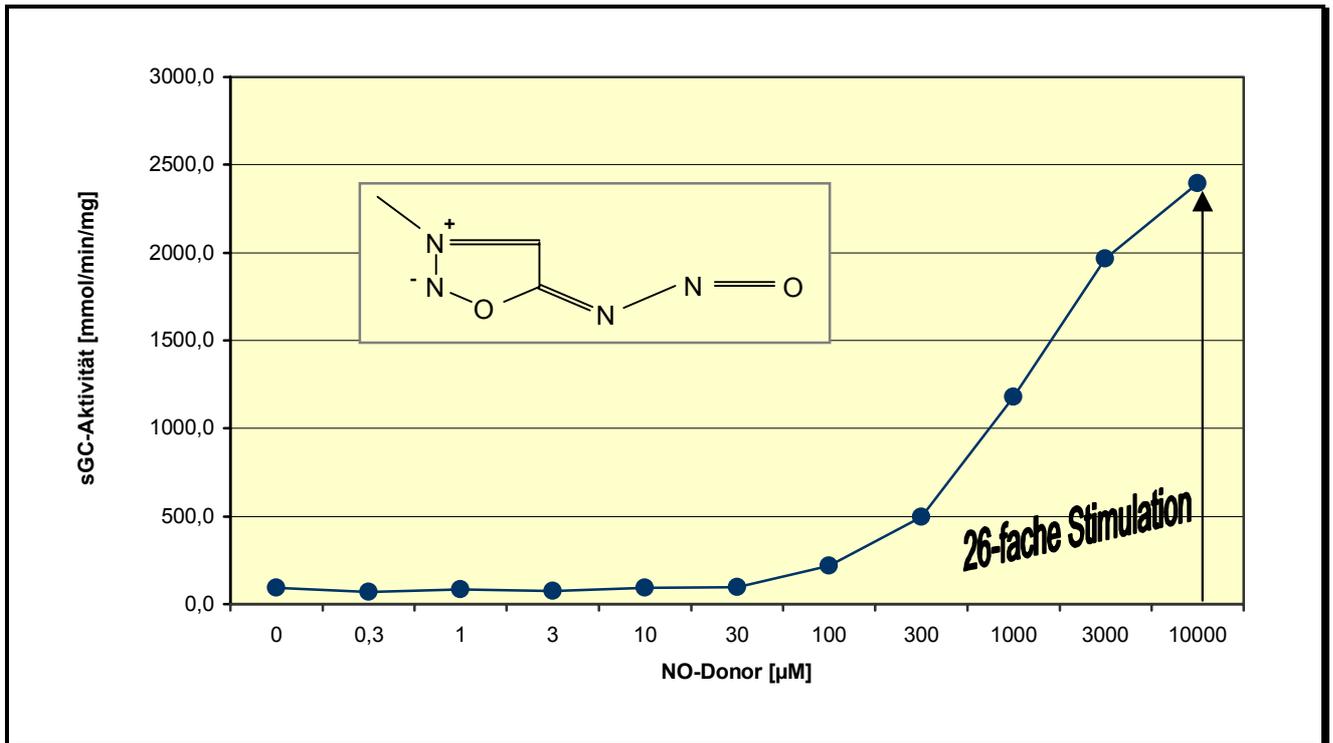


Abbildung 26: sGC-Stimulation mit Methyl-Nitroso-sydnonimin

Die Substanz **HE12.2B** führt zu einer nur 6-fachen Aktivierung der sGC (s. Abbildung 27), wobei Nitrosoglutathion eine 152-fache Aktivitätssteigerung erreichte. Nur 4% der Maximalstimulation waren erzielbar. Die getestete Maximalkonzentration lag aus Löslichkeitsgründen bei 1000 μM . Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Verbindungen ist allerdings auch im niedrigen Konzentrationsbereich um 100 μM kaum eine nennenswerte Aktivitätssteigerung zu erkennen.

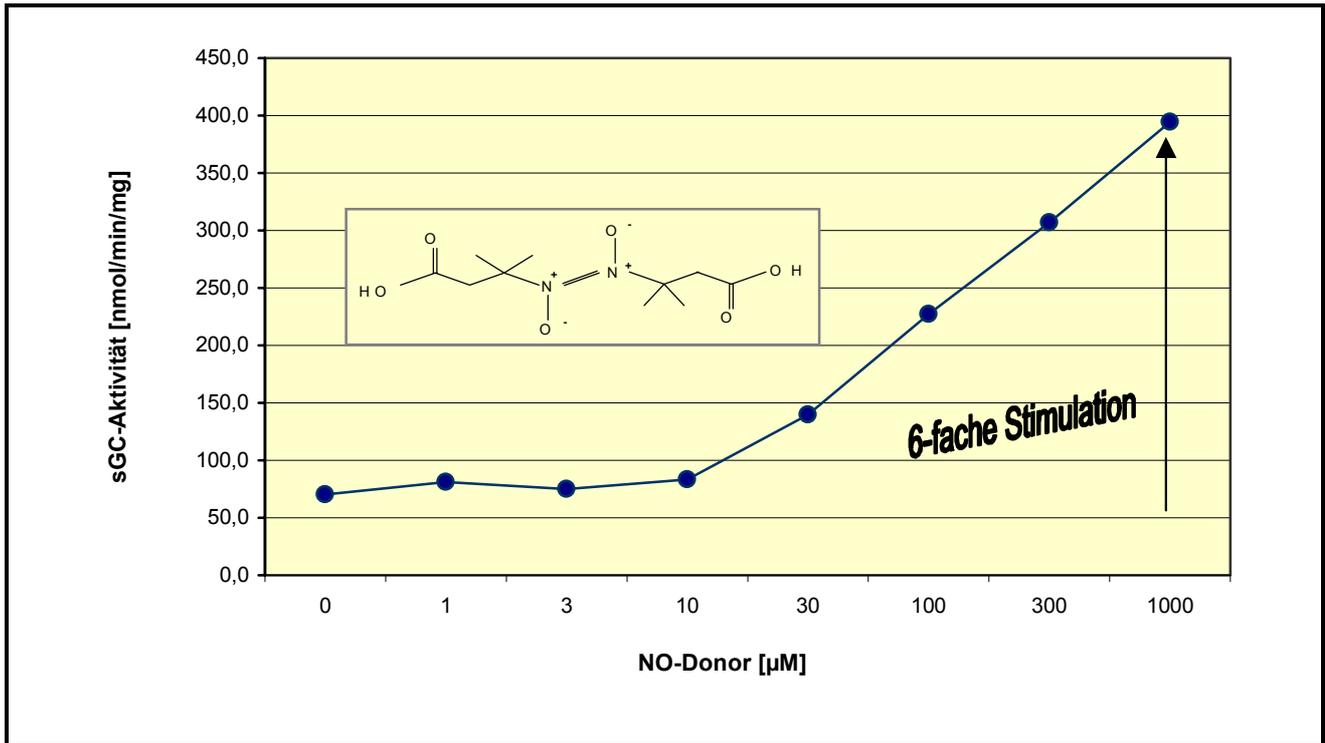


Abbildung 27: sGC-Stimulation mit HE12.2B

4.5.2 In Mikrosomen-Anwesenheit sGC-stimulierende Pharmaka

Für eine Reihe von Pharmaka ist bekannt, daß sie NO nur mit Hilfe von Enzymen der Cytochrom-P450-Familie freisetzen [270,58,66,70,151,186,225]. Eine Stimulation der NO-Donoren wurde deshalb mit Leber-Mikrosomen, die eine hohe Konzentration an Cytochrom-P450 besitzen, erreicht.

Dazu wurden Rattenlebern 24 Stunden nach der letzten Injektion von Pentobarbital isoliert und mittels Ultrazentrifugation nach einer Methode von Jefcoate präpariert [148]. Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt [184]. Die Cytochrom P-450-Konzentrationen wurden nach Omura und Sato ermittelt [228]. Da Mikrosomen mit ihrem hohen Anteil an thiolgruppen-haltigen Aminosäuren sehr potente NO-Fänger sind, sinkt der für die sGC-Aktivierung zur Verfügung stehende NO-Anteil und damit die Umsetzung von GTP.

Als Vergleiche wurden deshalb für die Maximalstimulation der einzelnen Ansätze Nitrosoglutathion-Mikrosomen-Mischungen verwandt. Hierfür ließen sich **maximale** Stimulationen der löslichen Guanylyl-Cyclase um das **41-fache** ermitteln.

FK409, eine Verbindung mit Hydroxyimin-Struktur, steigert die sGC-Aktivität um das **40-fache** nach Mikrosomen-Zugabe. Dies entspricht nahezu der Maximalstimulation.

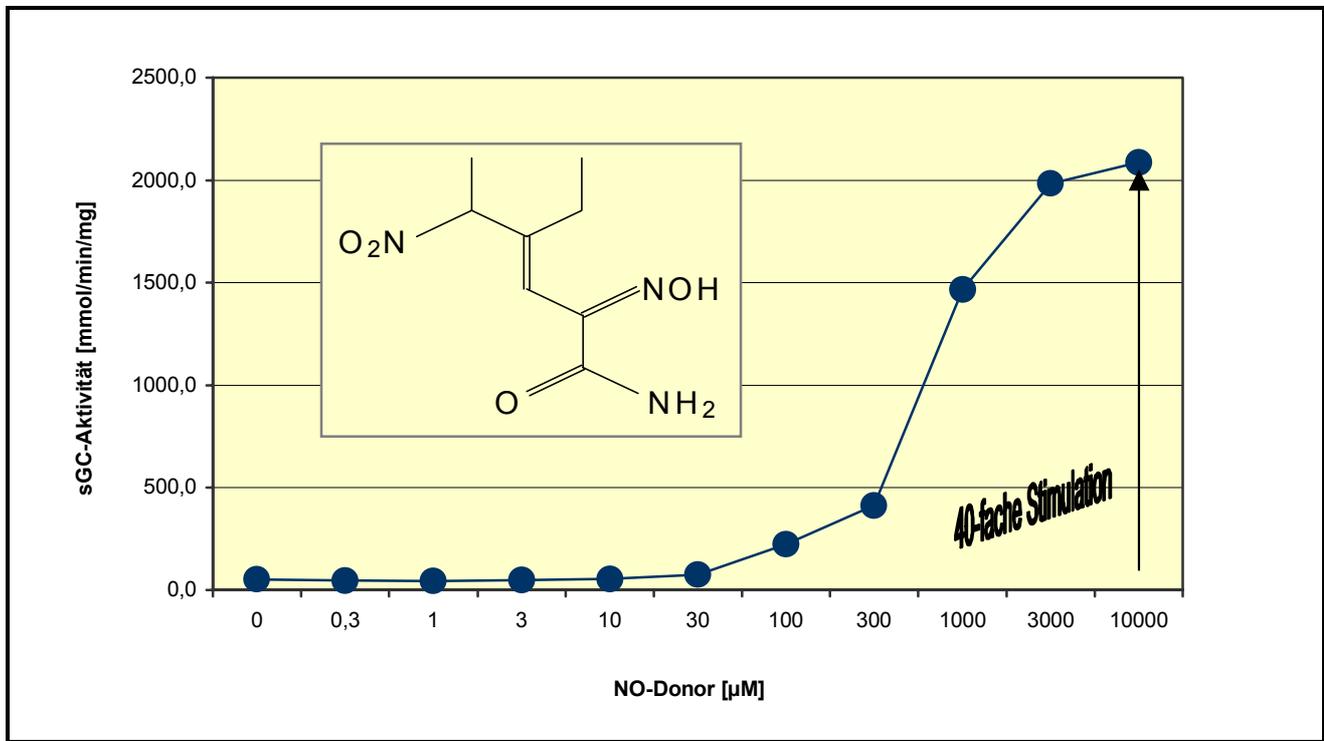


Abbildung 28: sGC-Stimulation mit FK409 in Gegenwart von Mikrosomen

V-Pyrro/NO, ein geschütztes NONOat, aktiviert ebenfalls erst nach Mikrosomen-Zugabe die sGC, maximal um das **24-fache**. Mit V-Pyrro/NO ist unter diesen Bedingungen höchstens 59% der Maximalstimulation zu erreichen.

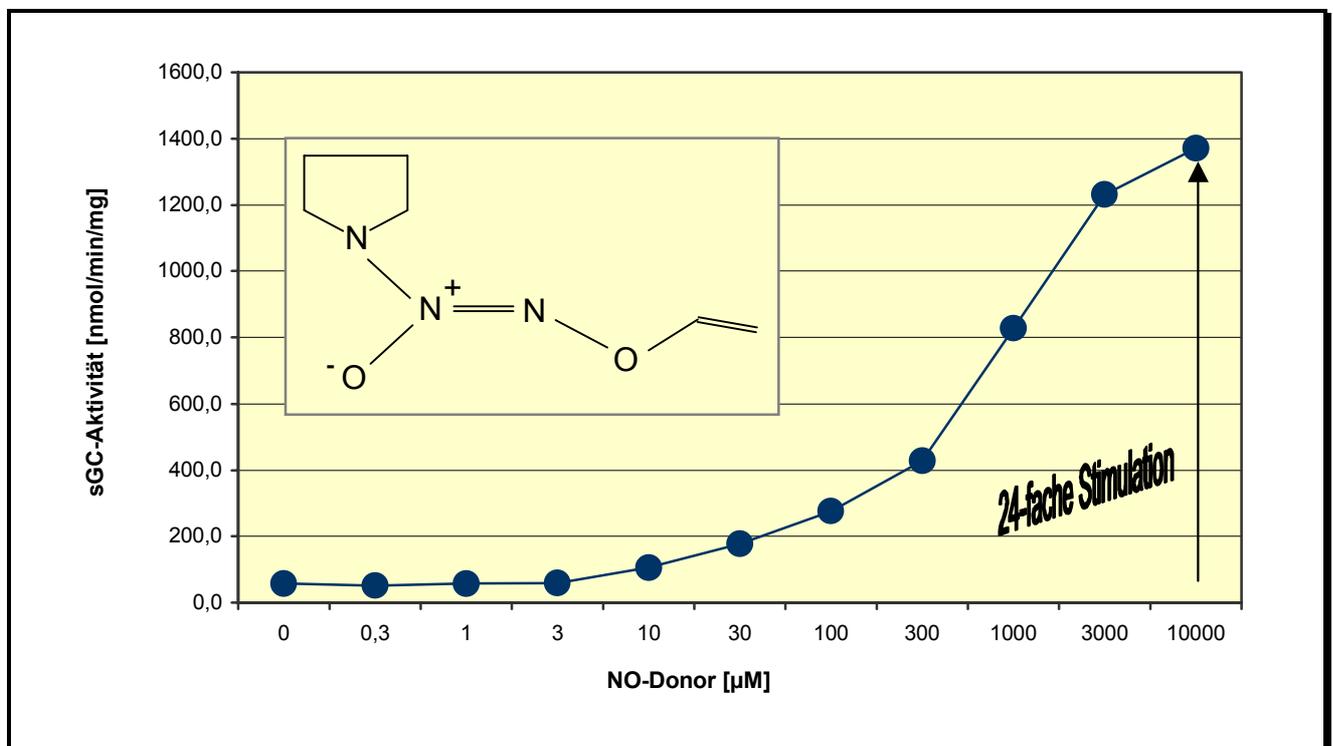


Abbildung 29: sGC-Stimulation mit V-Pyrro/NO in Gegenwart von Mikrosomen

Die Substanz **SE 145**, ein Nitrat mit Thiol-Struktur, stimuliert in Anwesenheit von Mikrosomen die lösliche Guanylyl-Cyclase um das **4,5-fache**. Demzufolge werden ca. 11% der maximalen Stimulation erreicht.

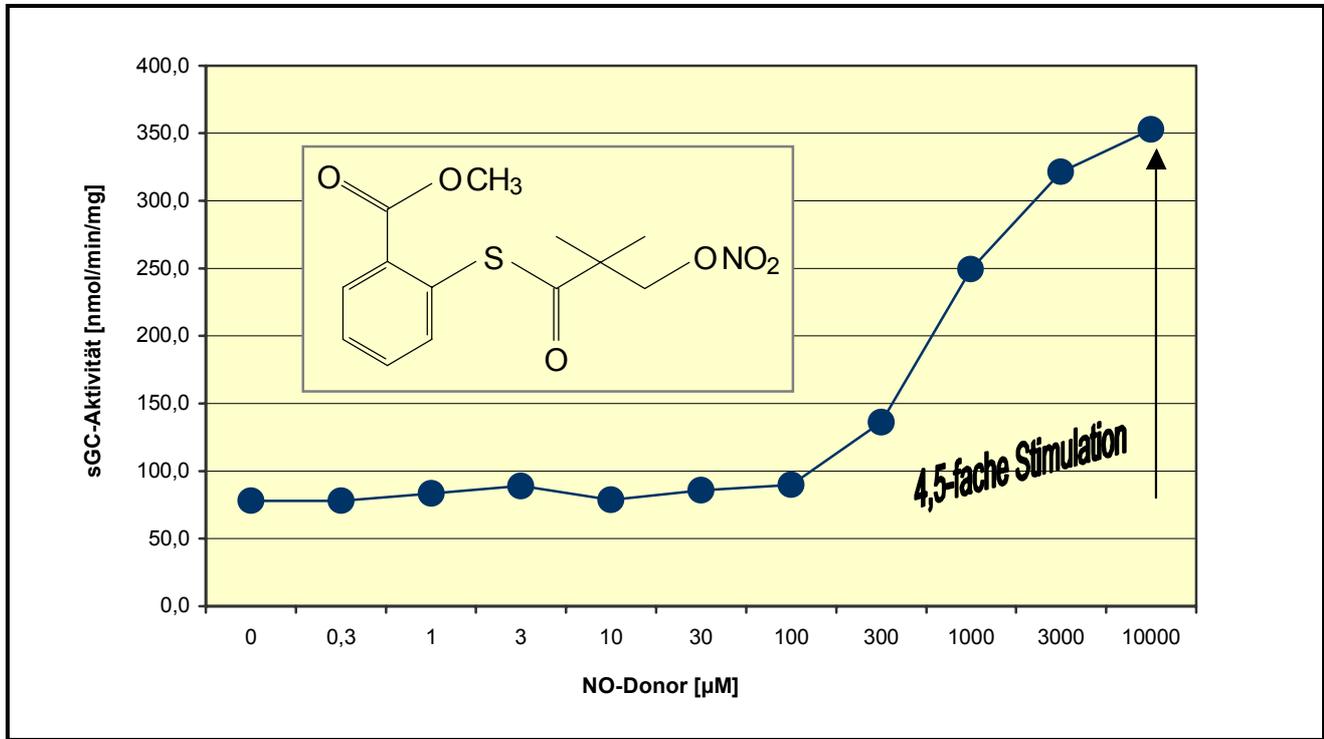


Abbildung 30: sGC-Stimulation mit SE 145 in Gegenwart von Mikrosomen

4.5.3 Pharmaka, die GSNO-vermittelte Stimulation hemmen

Um Wechselwirkungen einiger untersuchter Substanzen, die keinen cGMP-Anstieg bewirken können, mit dem Guanylyl-Cyclase-Assay zu erfassen, wurden diese zusammen mit Nitrosoglutathion zum Enzym gegeben.

Auffallend ist für alle C-Nitroverbindungen eine Hemmung der ansonsten durch Nitrosoglutathion hervorgerufenen Guanylyl-Cyclase-Aktivität. Die durch das Nitrosothiol hervorgerufene Aktivierung der Guanylyl-Cyclase wurde in Gegenwart von Nitrofurantoin um 93%, von Misonidazol um 41% und von Bay-k8644 um 45% verringert.

Hier bleibt die Frage offen, ob eventuell gebildetes NO von den C-Nitroverbindungen weggefangen wird oder eine Wechselwirkung mit dem Enzym auftritt.

4.5.4 Nicht reproduzierbare Stimulation der sGC

Sowohl Hydroxylaminhydrochlorid als auch Methylhydroxylamin bewirken in einigen Ansätzen eine geringe Stimulation des Enzyms, in anderen Ansätzen führen sie zu keiner Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase.

4.5.5 Keine Stimulation der sGC

Die lösliche Guanylyl-Cyclase läßt sich nicht stimulieren durch:

- SE136
- M-Pyrro
- E-Pyrro .

Auch die Anwesenheit von Mikrosomen konnte zu keiner Aktivierung führen.

4.6 Fazit

Erwartungsgemäß konnten die Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen bestätigt werden.

Zusätzlich wurde in diesem Assay ein weiterer Aktivierungsschritt vieler NO-Donoren nachahmbar, nämlich die Cytochrom-P450-vermittelte NO-Freisetzung mit Hilfe von Lebermikrosomen. Dies kann in Chemilumineszenzversuchen nicht nachvollzogen werden, da die Reaktion des gebildeten NO mit den Thiol-Gruppen der Proteine zu schnell ist, um einen ausreichenden Übertritt von NO in die Gasphase und damit eine Meßbarkeit zu ermöglichen.

5 Oxyhämoglobin-Assay

Der Oxyhämoglobin-Assays erlaubt die Detektion von NO unter aeroben Bedingungen und in Gegenwart von Proteinen und ist damit gut geeignet für Messungen in biologischem Material.

5.1 Prinzip

Die stöchiometrische Reaktion von Oxyhämoglobin mit NO zu Methämoglobin und Nitrat wird spektrophotometrisch ausgewertet (siehe Gleichung Nr.11).

Die Eisen(II)-Sauerstoff-Wechselwirkung im Oxyhämoglobin zeigt teils ionischen Charakter und lässt sich durch einen Ein-Elektronentransfer vom Fe^{2+} zum Sauerstoff erklären. Die anschließende Reaktion mit NO erinnert an eine Reaktion mit $\text{O}_2^{\cdot-}$, die zu Peroxynitrit führt.



Diese Reaktion ist 26 mal schneller als die Reaktion von NO mit Sauerstoff im wässrigen Medium.

Für Hämproteine ist eine charakteristische Absorptionsbande als Soret-Bande lange bekannt. Dieses Maximum liegt für Oxyhämoglobin bei 415 nm ($\epsilon_{415} 131 \text{ mM}^{-1}$) und wird auch als γ -Bande bezeichnet. Das Methämoglobin-Spektrum sieht ähnlich aus, ist aber stark pH-abhängig und besitzt ein Maximum der Soret-Bande bei 406 nm ($\epsilon_{406} 162 \text{ mM}^{-1}$).

Beim Übereinanderlegen der Spektren fallen vereinzelt Wellenlängen auf, bei denen die Absorptionsintensitäten gleich sind, diese Punkte werden **isosbestische Punkte** genannt. Auffällig ist im Bereich der Soret-Bande der isosbestische Punkt bei 410,5 nm (siehe Abbildung 31). Die größte Differenz der Absorption ist bei 401 nm zu finden.

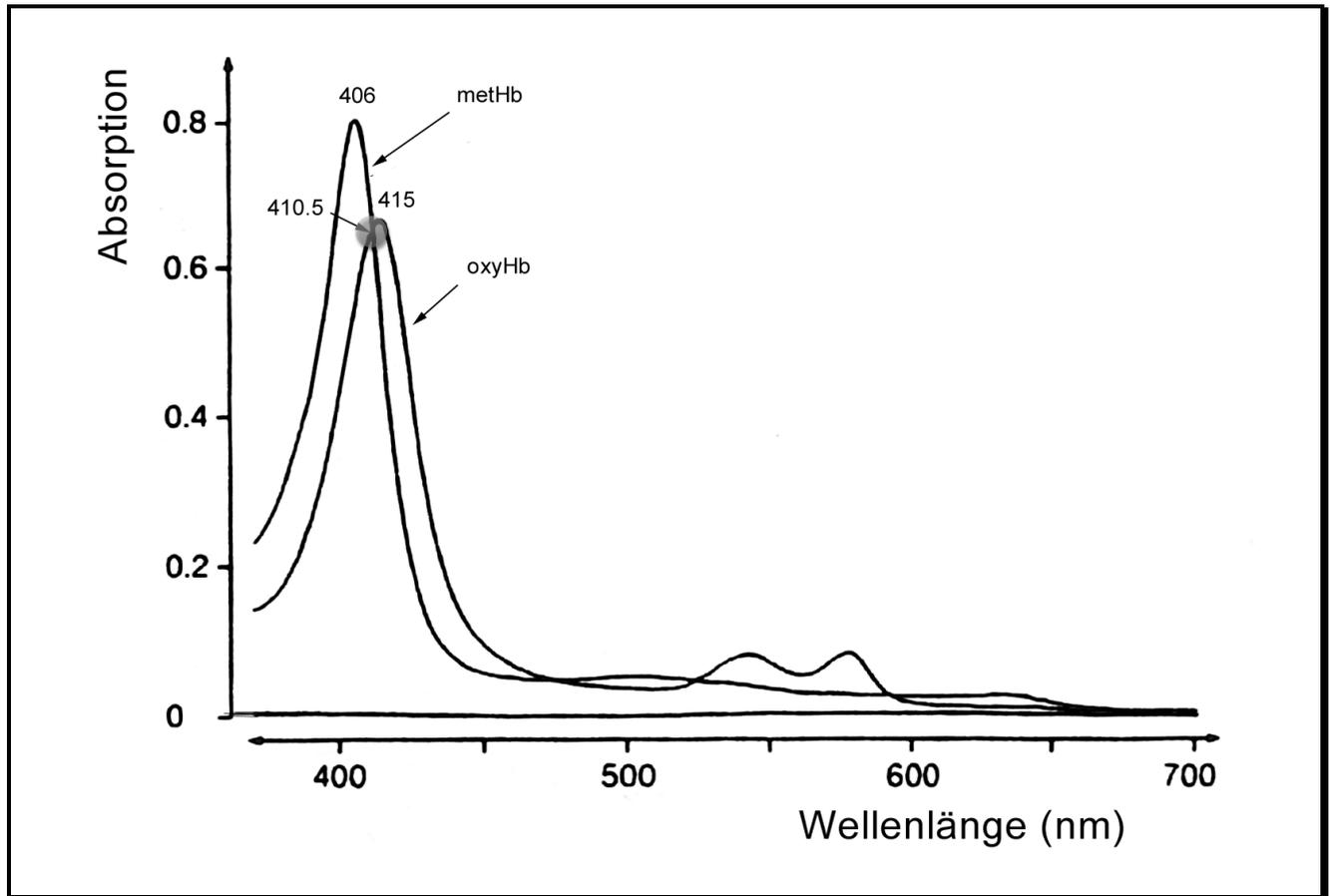


Abbildung 31: Spektren von Oxyhämoglobin und Methämoglobin

Die ideale Meßmethode der Methämoglobinbildung ist für trübe und subzelluläre Proben die Bestimmung der Absorption bei einer zweiten Wellenlänge als interne Referenz. Es wird also gleichzeitig mit einem Zweiwellenlängen-Spektrophotometer die Absorption bei 401 und 411 nm gemessen; die in NO-Anwesenheit über die Versuchsdauer steigende Methämoglobinkonzentration ergibt eine steigende Absorptionsdifferenz proportional zur gebildeten Menge an NO [79,77].

$$\Delta C_{\text{metHb}} = \Delta (\Delta A_{401-410,5}) / \Delta \epsilon_{401-410,5}(\text{metHb-oxyHb})$$

Obwohl hier die Differenzen zweier Wellenlängen verglichen werden, ist das Ergebnis die Absorptionsänderung bei 401 nm, da die Absorption am isosbestischen Punkt bei 411nm konstant bleibt.

5.2 Präparation des Rattenleberhomogenates sowie des Cytosols und der Mikrosomen

Männliche Wistar-Ratten zwischen 280 und 350 g werden mit einer subkutanen Injektion von 0,4 ml Heparin (5,000 U/ml) behandelt, nach 30 Minuten mit Pentobarbital (60-80 mg/kg) anaesthetisiert und die Leber nach einer Methode von Seglen perfundiert [268].

5.2.1 Leberhomogenat

Vier Rattenlebern werden nach Perfusion in Tris/Sucrose-Puffer (250 mM Sucrose, 20 mM Tris= Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 1 mM EDTA, pH=7,5 mit HCl) bei 4°C in einem Potter homogenisiert. Wobei eine ausreichende Homogenisation nach 8-10 mal bei 500 rpm (rounds per minute) und 3-4 mal bei 2000 rpm Auf- und Abbewegung des Gefäßes erreicht ist. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 2000 g wird der Überstand nochmals 20 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand ist das Leberhomogenat.

Der Proteinanteil des Homogenates beträgt bei dieser Aufarbeitung ca. 1/3 des Leberproteinanteils. Aus vier Lebern werden 100-150 ml Homogenat erhalten.

5.2.2 Cytosol

Das Leberhomogenat wird bei 40000 g für 45 Minuten zentrifugiert, der Überstand ist das Cytosol.

Das Cytosol ist bei einer Lagerung bei -80°C 1-2 Wochen stabil.

5.2.3 Mikrosomen

Das Pellet, das bei der Zentrifugation des Homogenates zum Cytosol gebildet wird, stellt die angereicherte Mikrosomenfraktion dar. Diese wird im Tris-Sucrose-Puffer pH=7,5 (s.5.2.1) aufgenommen (10 ml) und im Potter bei 4°C 4-5 mal bei maximaler Drehzahl im niedrigen Tourenbereich homogenisiert. Auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt wird nun erneut bei 10000 g für 20 Minuten und der Überstand bei 40000 g für 45 Minuten zentrifugiert. Um die Verunreinigungen cytosolischer Bestandteile so gering wie möglich

zu halten, wird das Pellet nochmals suspendiert, homogenisiert und bei 40000 g 45 Minuten zentrifugiert. Zur Lagerung wird das Pellet in einem glycerolhaltigen HEPES-Puffer (154 mM KCl, 10 mM HEPES=N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, 0,1 mM EDTA, 20 % Glycerin) aufgenommen und im Potter homogenisiert.

Die Mikrosomen sind bei -80°C 2 Wochen stabil.

5.3 Durchführung des Oxyhämoglobin-Assays

Die Freisetzung von NO und Bildung von Methämoglobin wurde über 10 bis 15 Minuten als kontinuierliche Messung der Extinktionsdifferenz zwischen 401 und 411 nm bestimmt (Zweiwellenlängen-Spektrophotometer, Shimadzu).

Die NO-Bildung wird aus der Steigung der über die Meßdauer wachsenden Absorptionsdifferenz bestimmt.

In 4 ml Küvetten mit 1 cm Schichtdicke wurden bei 37°C unter kontinuierlichem Rühren Probenlösungen eines Gesamtvolumens von 2 ml eingesetzt mit:

	Endkonzentration
NO-Donor: V-Pyrro/NO, E-Pyrro/NO,	100 µM
M-Pyrro/NO, GTN, Molsidomin <i>oder</i>	100 µM
DEA/NO	1 µM
Kofaktor: NADH, NADPH <i>oder</i>	100 µM
GSH	1 µM
Oxyhämoglobin	7 µM
Homogenat , für Leber entspr. 3,4-4,5 mg Protein	100 µl
<i>oder</i> Aorta entspr. 5,2-6,7 mg Protein	100 µl
<i>oder</i> Mikrosomen entspr 18 mg Protein	100 µl
<i>oder</i> Cytosol entspr. 28 mg Protein	100 µl
in Phosphatpuffer	100 mM

Unter den gleichen Bedingungen wird eine Lösung ohne NO-Donor als Leerwert vermessen, der ein Maß für die Oxyhämoglobin-Autoxidation ist.

Die Oxyhämoglobin-Lösung wird aus 1,2 mM in destilliertem Wasser gelöstem humanen Hämoglobin hergestellt, welches mit Sauerstoff equilibriert und mit einem 1,5 molaren Überschuß an Natriumdithionit reduziert wird. Es erfolgt eine Reinigung über eine Sephadex G 25-Säule, wobei mit 50 mM Phosphatpuffer eluiert wird [79].

5.4 Kalibrierung

Für die Methämoglobinbildung wird als Differenz des molaren Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon_{401-411} = 49,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ermittelt.

5.5 Optimierende Bedingungen

Unter Bedingungen, die höhere Konzentrationen $\text{O}_2^{\cdot -}$ entstehen lassen, ist ein Zusatz von Superoxid-Dismutase (SOD) ratsam. Zum einen wird die Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin nicht beeinträchtigt, zum anderen wird sowohl die Oxidation von Oxyhämoglobin als auch die Reduktion von Methämoglobin verhindert. Bei den hier durchgeführten Messungen ist aber die Superoxidanionproduktion des Leberhomogenates bzw. der Mikrosomen gering genug, so daß Superoxiddismutase und Catalase-Anwesenheit keine Änderungen der NO-Freisetzung erkennen ließen.

Ferner wurde durch einen Blindwert der Leberhomogenatfraktion festgestellt, daß keine detektierbaren Spuren von Hämoglobin hierin enthalten sind.

Die Möglichkeit, daß Thiole NO durch Bildung von Nitrosothiolen wegfangen, ist aufgrund der dafür notwendigen geschwindigkeitsbestimmenden NO-Autoxidation nicht gegeben, da die Reaktion von NO mit Sauerstoff wesentlich langsamer ist als die Reaktion mit Oxyhämoglobin [308].

Weiterhin ist zu beachten, daß durch schnelles „Wegfangen“ des NO Feedback-Mechanismen oder Gleichgewichtsreaktionen gestört werden können und damit auf die insgesamt freigesetzte NO-Menge Einfluß nehmen [79,77].

Als Kofaktoren wurden NADPH und NADH für Cytochrom-katalysierte Reaktionen verwendet, sowie GSH für Umsetzungen durch z. B. Glutathion-S-Transferase [214,176].

5.6 Ergebnisse

Von drei Fraktionen einer Art biologischen Materials sind die Mittelwerte jeder einzelnen Fraktion (aus mindestens drei Meßwerten) gemittelt angegeben. Fehlerbalken in den Diagrammen sind daher Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M.).

5.6.1 Mit Zusatz von Leberhomogenat, -cytosol oder -mikrosomen

Nach der erfolgreichen Stimulation von V-Pyrro/NO mit der Cytochrom P-450-imitierenden Modells substanz Eisentetraphenylporphyrin im Chemilumineszenz-Assay (s. Kap. 3.6.5.2), ist diese Methode besonders gut geeignet zur Untersuchung von V-Pyrro/NO in Gegenwart von Leberhomogenat bzw. Mikrosomen.

5.6.1.1 V-Pyrro/NO

Aus diesem vinylgeschützten NONOat wird NO erst durch zugesetztes Leberhomogenat gebildet. In Abwesenheit des Leberhomogenates entsteht kein NO. Von den eingesetzten Kofaktoren ist NADPH am effizientesten, die initiale Freisetzungsrates beträgt 436,4 nM NO/min•mg Protein (s. Abbildung 32). In Gegenwart von NADH beträgt die NO-Bildung nur 34 nM NO/min•mg Protein. GSH ist nicht fähig die NO-Freisetzung zu stimulieren.

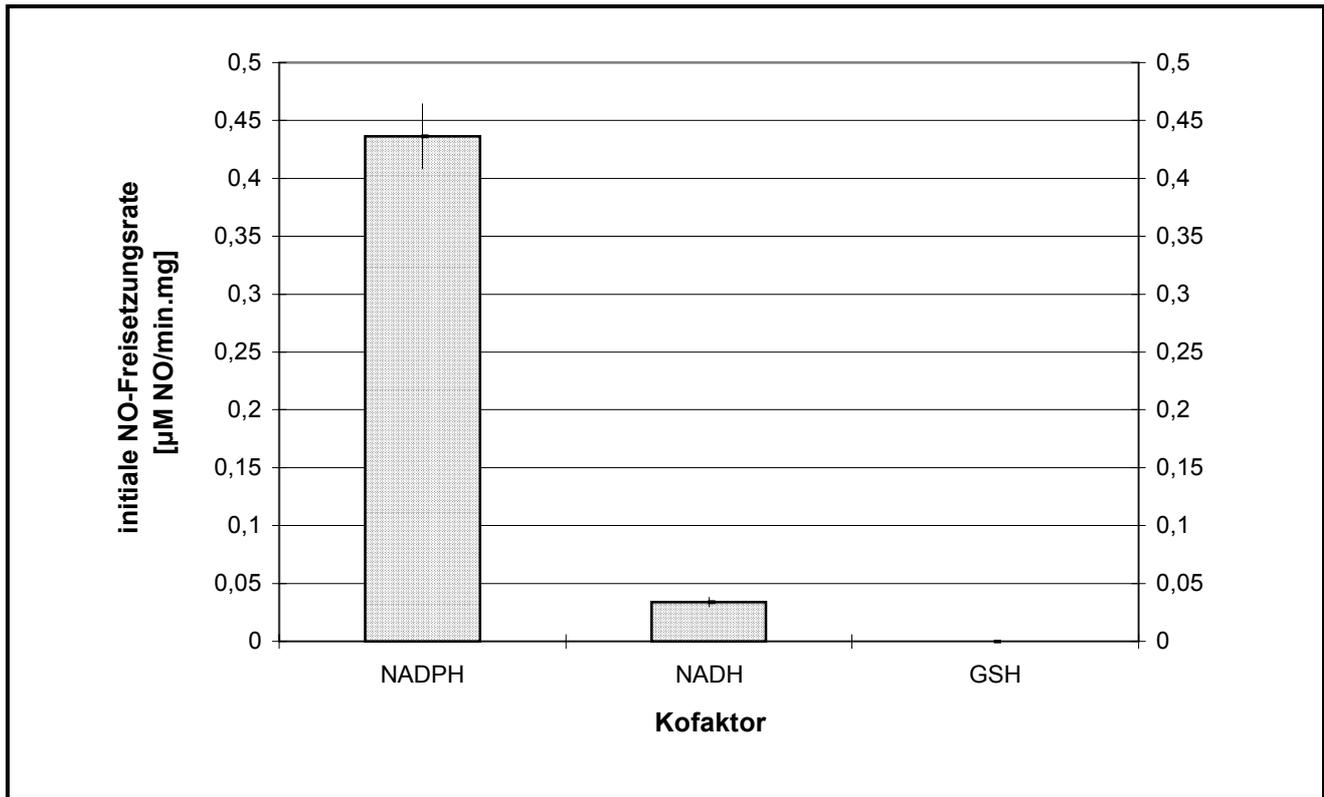


Abbildung 32: NO-Freisetzung aus V-Pyrro/NO (100 μM) in Gegenwart verschiedener Kofaktoren (100 μM) und Leberhomogenat (100 μl), Werte sind Mittelwerte ± S.E.M.

Um die maximale NO-Freisetzung aus V-Pyrro/NO sowie die Konzentrationsabhängigkeit von Leberhomogenat und NADPH zu ermitteln, sind außerdem die doppelten, halben und viertel dieser oben eingesetzten Mengen untersucht worden. Als maximale initiale NO-Freisetzungsraten wurden 681 nM NO/min·mg Protein bei 200 µl Mikrosomen mit 200 µM NADPH erhalten. Die resultierenden Werte der initialen NO-Freisetzungsraten über der Leberhomogenat/ NADPH-Menge verlaufen weitestgehend als Gerade, mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,989 (s. Abbildung 33).

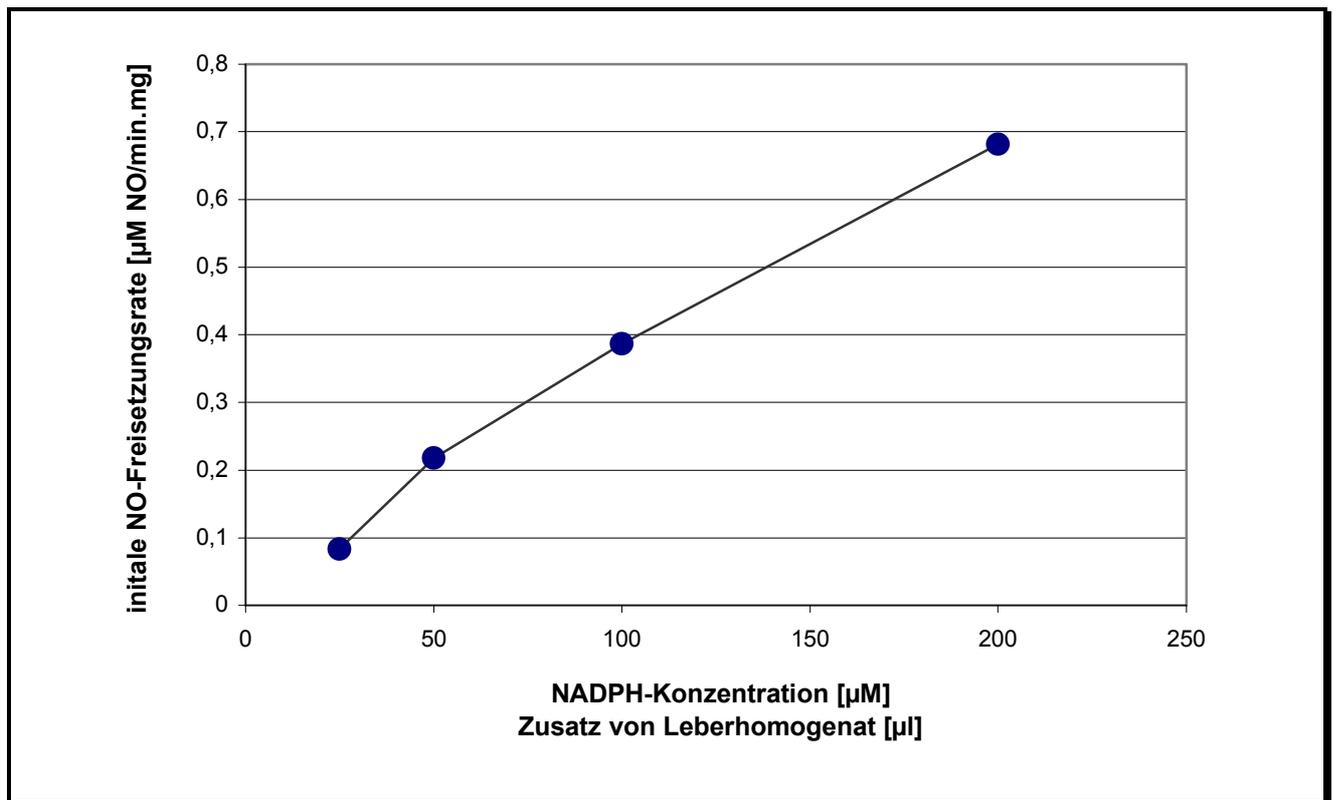


Abbildung 33: NO-Freisetzung aus V-Pyrro/NO ($100\mu\text{M}$) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen NADPH und Leberhomogenat

Um sicher die Beteiligung von Cytochrom P-450 an der NO-Bildung aus V-Pyrro/NO zu bestätigen, wurde die Leberhomogenatfraktion nochmals in Cytosol und Mikrosomen aufgetrennt. Es wird deutlich nur in Anwesenheit von Mikrosomen und NADPH eine NO-Abspaltung stimuliert, während der Zusatz von Cytosol auch mit anderen Kofaktoren zu keiner NO-Freisetzung führt (s. Abbildung 34). Somit ist die Wirkung des Cytochrom P-450-Enzymsystems bewiesen.

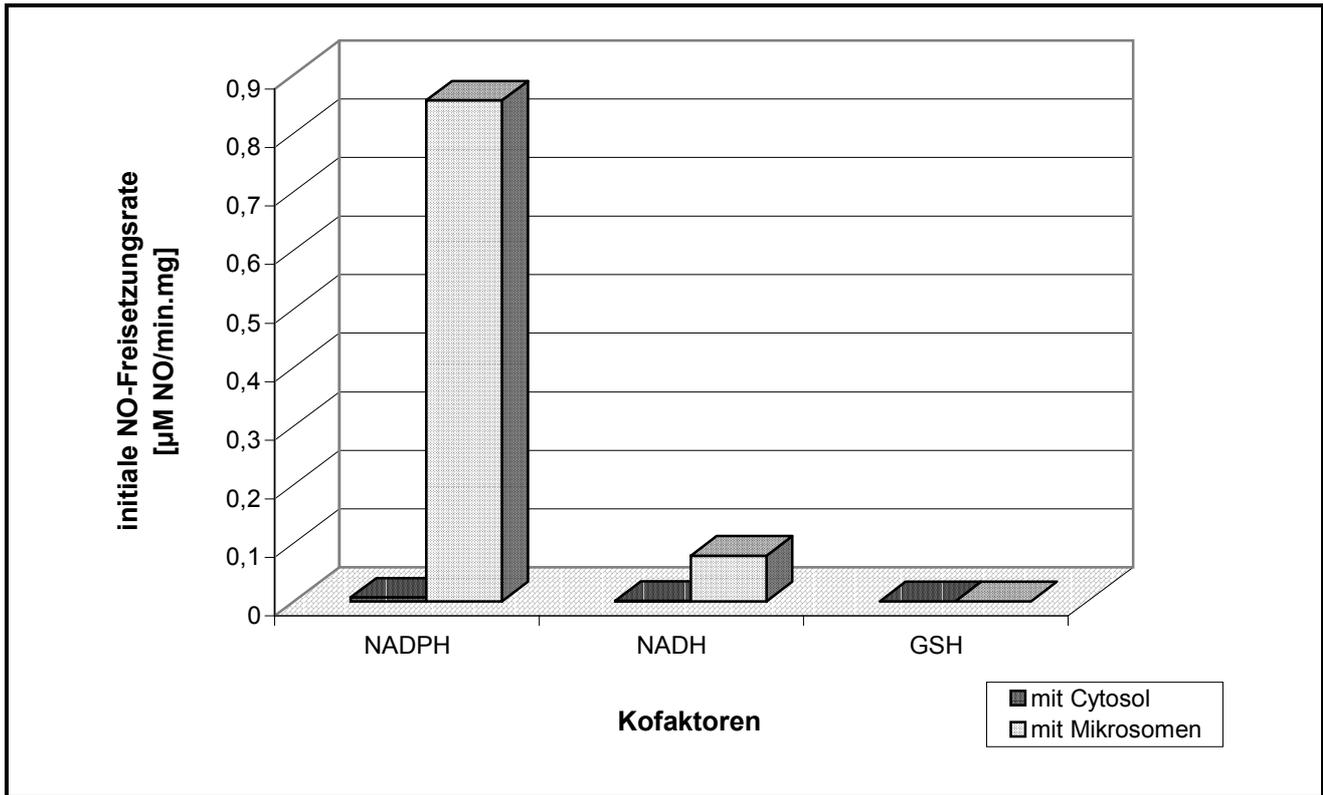


Abbildung 34: NO-Freisetzungsrates aus V-Pyrro/NO (100 µM) in Gegenwart verschiedener Kofaktoren (100 µM) sowie Cytosol oder Mikrosomen (je 100 µl)

5.6.1.2 Andere Diazeniumdiolate

Die schon zur Chemilumineszenzmessung als Vergleich herangezogenen geschützten Diazeniumdiolate **M-Pyrro/NO** und **E-Pyrro/NO** sind auch hier in Gegenwart erhöhter Konzentrationen von Leberhomogenat und NADPH nicht zur NO-Bildung fähig. Die in Abbildung 35 aufgezeigte äußerst geringe Freisetzungsrates, die für E-Pyrro/NO ermittelt wurde, ist auf Artefakte zurückzuführen.

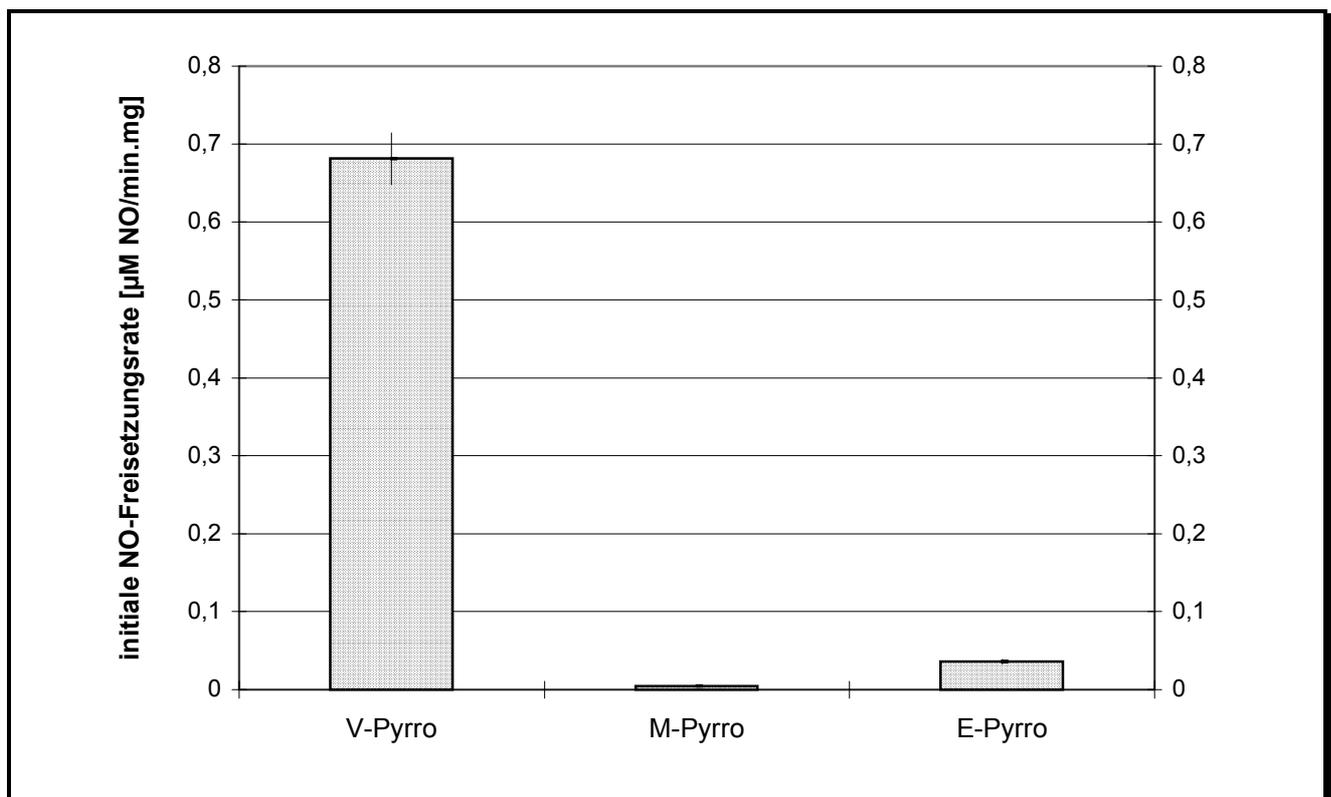


Abbildung 35: NO-Freisetzung aus verschiedenen geschützten Diazeniumdiolaten (100 µM) im Vergleich in Gegenwart von NADPH (200µM) und Leberhomogenat (200µl)

Als weiterer wichtiger Vergleich wurde **DEA/NO**, ein spontaner NO-Donor, in Anwesenheit von Leberhomogenat und NADPH (100 µl beziehungsweise 100 mM) untersucht. Es ergab sich bereits bei einer Konzentration von 1 µM eine initiale NO-Freisetzungsrates von 77,9 nM NO/min•mg Protein. Die Abwesenheit von Homogenat und NADPH führt zu einer geringfügig höheren Absorptionsdifferenz (entsprache einer NO-Bildungsrates von 98,7 nM NO/min•mg Protein.), die der geringeren Trübung der Probenlösung beizumes-

sen ist.

5.6.1.3 GTN und Molsidomin

Aus Abbildung 36 wird ersichtlich, daß Glyceroltrinitrat mit Leberhomogenat die höchste NO-Freisetzungsrates in Gegenwart von GSH (39 nM NO/min•mg Protein) zeigt. Etwas weniger NO wird in NADPH-Anwesenheit frei (36,4 nM NO/min•mg Protein). Auch NADH führt noch zu deutlicher NO-Bildung. Insgesamt liegt die Größenordnung der Leberhomogenat-induzierten NO-Freisetzung bei nur etwa 1/10 der aus V-Pyrro/NO unter den selben Bedingungen erhaltenen.

Für Molsidomin ist nur in NADPH-Gegenwart eine signifikante NO-Freisetzungsrates zu beobachten, die allerdings bei nur 5,2 nM NO/min•mg Protein liegt.

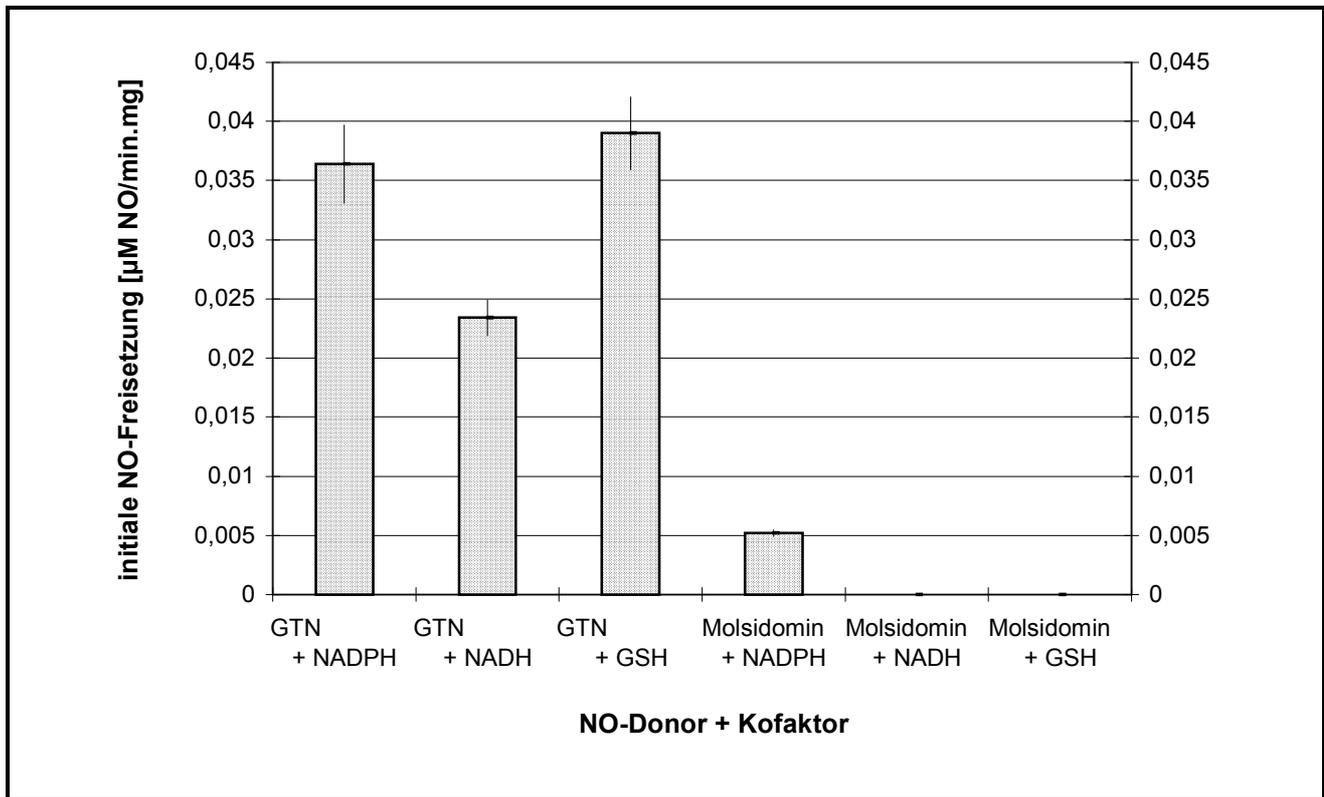


Abbildung 36: NO-Freisetzung aus GTN und Molsidomin (je 100 μM) in Gegenwart verschiedener Kofaktoren (100 μM) und Leberhomogenat (100 μl), Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M.

Da auch für Glyceroltrinitrat die Metabolisierung durch das Leberhomogenat erheblich

und die außerdem relativ starke GSH-Stimulation der NO-Bildung interessant ist, wurde auch hier zur genaueren Lokalisierung der metabolisierenden Enzyme das Homogenat in cytosolische und mikrosomale Fraktionen aufgetrennt.

Einen Überblick über die NO-Freisetzungsraten aus verschiedenen Konzentrationen Glyceroltrinitrat in Anwesenheit von NADPH (100 μ M) und Cytosol (200 μ l) bzw. Mikrosomen (100 μ l) gibt die Abbildung 37.

Insgesamt wird in Gegenwart von Mikrosomen wesentlich mehr NO gebildet als durch cytosolische Enzyme. Die maximale NO-Freisetzungsraten betragen 210 nM NO/min \cdot mg Protein für Mikrosomen und 62 nM NO/min \cdot mg Protein für das Cytosol. Die mikrosomale Metabolisierung führt bei einer Steigerung der GTN-Konzentration um das 10-fache zu jeweils einer Erhöhung der NO-Freisetzungsraten um ca. das Doppelte.

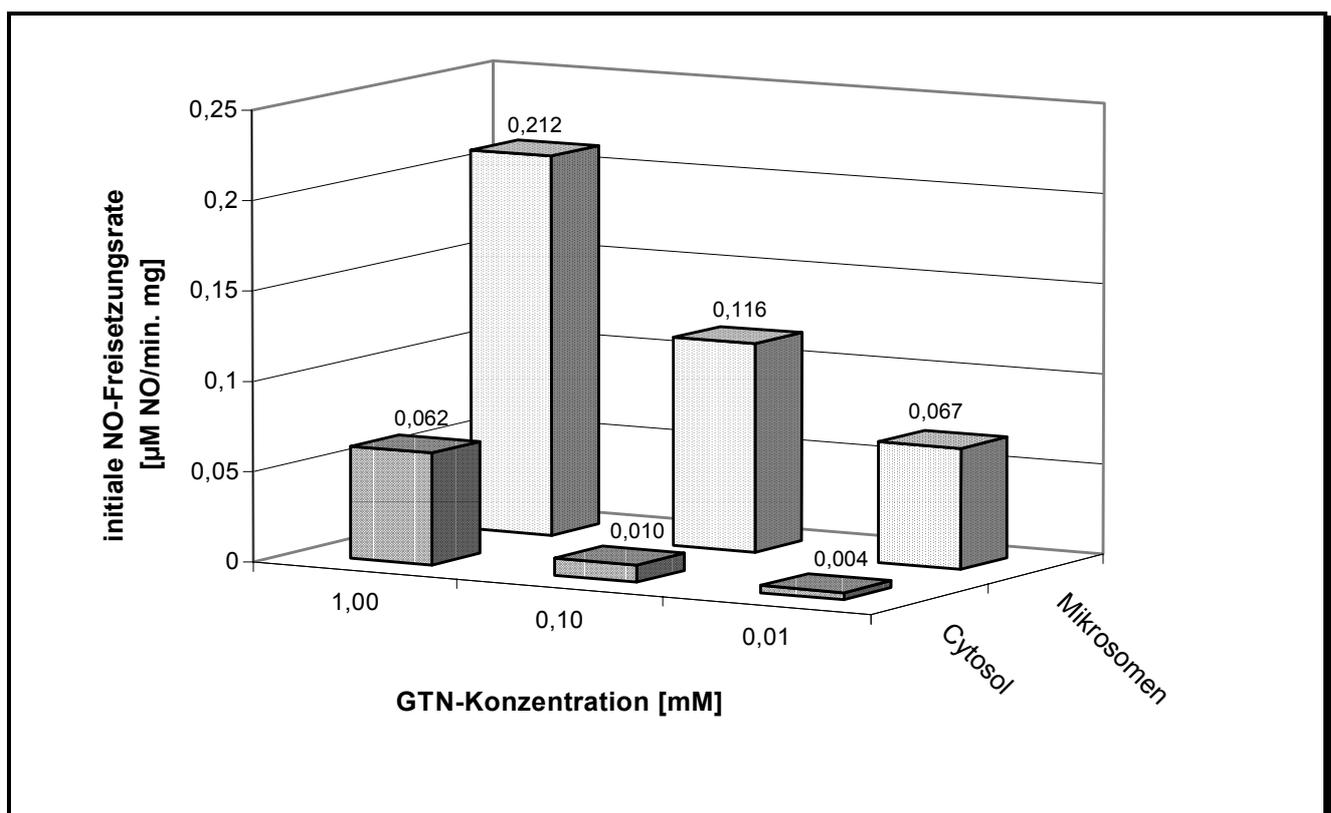


Abbildung 37: NO-Freisetzung aus verschiedenen Konzentrationen GTN in Gegenwart von NADPH (100 μ M) und Cytosol (200 μ l) oder Mikrosomen (100 μ l)

Als Kontrolle wurde für eine Inkubation von 1 mM Glyceroltrinitrat mit Mikrosomen ohne

NADPH oder andere Kofaktoren die initiale NO-Freisetzungsrates von 36 nM NO/min·mg Protein ermittelt.

Abbildung 38 veranschaulicht die initiale NO-Freisetzungsrates aus GTN in Gegenwart verschiedener Konzentrationen GSH und Cytosol (100 µl) oder Mikrosomen (200 µl). Beide Leberfraktionen geben inkubiert mit 1 mM GSH eine etwa gleiche proteinbezogene NO-Freisetzungsrates von 120 nM NO/min·mg Protein. Jedoch ist durch das Cytosol mit steigender GSH-Konzentration eine höhere NO-Freisetzungsrates verbunden, wohingegen bei Mikrosomen mit sinkendem GSH-Anteil mehr NO entsteht. Für die Umsetzung mittels cytosolischer Enzyme ist somit GSH als Kofaktor bewiesen. Die mikrosomale Metabolisierung ist dagegen NADPH-abhängig und führt zu einer höheren NO-Bildungsrates.

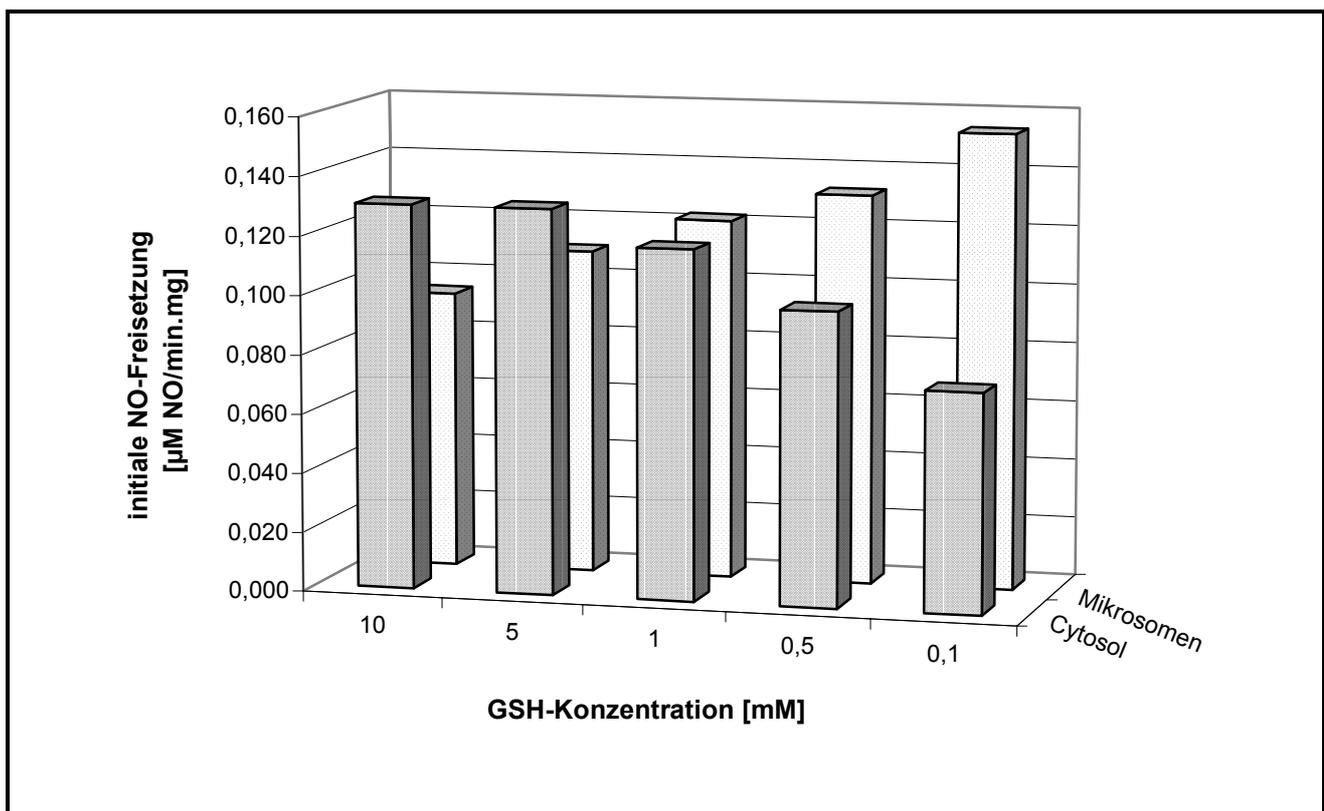


Abbildung 38: NO-Freisetzung aus GTN (1 mM) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen GSH und Mikrosomen (100 µl) oder Cytosol (200 µl)

5.6.2 Mit Zusatz von Aortenhomogenat

Zur Untersuchung eventuell metabolisierender Enzymsysteme aus den Gefäßen wurde der Zusatz von Aortenhomogenat zu den geschützten NONOaten V-Pyrro/NO, M-Pyrro/NO und E-Pyrro/NO sowie zu den bekannten NO-Donoren Glyceroltrinitrat und Molsidomin getestet.

Bis auf Glyceroltrinitrat mit einer sehr geringen NO-Freisetzungsrate von 68 nM NO/min•mg Protein, ist für alle untersuchten Substanzen in Anwesenheit von NADPH keine Bildung von NO zu beobachten.

5.6.3 Mit Zusatz von Blutplasma

Für Glyceroltrinitrat läßt sich als einzigem hier untersuchten NO-Donor noch in weiteren Geweben eine NO-Freisetzung vermuten. Deshalb wurde auch eine mögliche NO-Bildung im Blutplasma untersucht.

Abweichend von den Leberhomogenatuntersuchungen wurde hier eine GTN-Konzentration von 1 mM und eine Blutplasmamenge von 200 µl verwendet. Als Kofaktor wurde NADPH in der üblichen Konzentration von 0,1 mM zugesetzt. Die gemessene proteinbezogene Freisetzungsrate betrug lediglich 20 nM NO/min•mg Protein.

5.6.4 Mit Zusatz von Glattmuskelzellen

Da eine Bioaktivierung von Glyceroltrinitrat nahe am Wirkort zu suchen ist, wurden hierfür auch in Gegenwart glatter Muskelzellen Untersuchungen durchgeführt. Für die GTN-Konzentration von 1 mM und 100 µl Membranfraktion sind in Anwesenheit von NADPH (0,1 mM) weniger als ein Zehntel der in Mikrosomengegenwart detektierten Menge NO gefunden worden, für GSH (5 mM) geringfügig mehr.

6 Beurteilung ausgewählter Substanzen

6.1 Bay-k8644

Die aus dem 5-Nitro-dihydropyridin-Derivat nur unter reduktiven Bedingungen zu erwartende NO-Freisetzung hat sehr geringe Ausmaße in der Chemilumineszenzmeßmethode gezeigt. Maximal wurden unter anaeroben Bedingungen ohne Kofaktoren oder mit Natriumborhydrid 5,7% NO detektiert. Die übrigen getesteten Kofaktoren haben keine Steigerung in der NO-Bildung gegenüber der kofaktorfreen Lösung gegeben.

Von Bauer und Fung wurden nach UV-Bestrahlung in Gegenwart von Luftsauerstoff mittels Chemilumineszenz ein Anteil von 0,02% NO gefunden. Eventuell stimulierende Zusätze wurden nicht untersucht. Lediglich in Dunkelheit sind noch geringere Werte gemessen worden, die einem Zehntel des NO-Anteils der bestrahlten Lösungen entsprechen [14].

Unter den in Kapitel 4 beschriebenen Bedingungen des Guanylyl-Cyclase-Assays wurde keine Aktivierung festgestellt. Baik und Mitarbeiter zeigten, daß durch bestimmte 5-Nitrodihydropyridine, wie Bayk8644, eine UV-lichtinduzierte Relaxation glatter Gefäßmuskulatur stattfindet. Sie machen für den im folgenden gemessenen cGMP-Anstieg aus den Dihydropyridinen entstandene Spaltprodukte verantwortlich [11]. Die Arbeitsgruppe Mikkelsen konnte allerdings die lichtinduzierte Relaxation von Bayk8644 stimulierten Gefäßen in der Dunkelheit wieder vollständig umkehren. Sie folgerten daraus eine unterschiedliche Affinität der Dihydropyridine zu den Proteinbindungsstellen bei Bestrahlung und in Dunkelheit [202].

Insgesamt kann diese Verbindung kaum als NO-Prodrug eingestuft werden, da eine NO-Freisetzung zu gering ist und nur unter unphysiologischen Bedingungen eintritt.

6.2 Nitrofurantoin

Für die hier untersuchten Nitroverbindungen zeigt Nitrofurantoin die stärkste NO-Freisetzung. Unter Ausschluß von Luftsauerstoff wurden in Gegenwart von Natriumborhydrid 14% NO gemessen, unter gleichen Bedingungen im Lösungsmittel Ethanol 13,6%.

Die von anderen Arbeitsgruppen gemachten Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus lassen das Auftreten von NO oder hieraus resultierenden Spezies vermuten. Bironaitte und Mitarbeiter bewiesen, daß die Ein-Elektronen-Reduktion zu einem Anionradikal führt, welches durch Sauerstoff reoxidiert wird, wobei aktive Sauerstoffspezies entstehen [22]. Die Beteiligung bestimmter Enzymsysteme an der Aktivierung des Nitrofurantoins wurde von Youngman und Mitarbeitern untersucht. Sie fanden bei der Aktivierung über die Xanthin-Oxidase Superoxidanionen als Zwischenstufe, wohingegen bei einer Metabolisierung über die Cytochrom c-Reduktase keine aktiven Sauerstoffspezies beteiligt zu sein schienen [314]. Außerdem kann das Cytochrom P450-System eine Nitroradikalanionbildung katalysieren [240,36]. Die Arbeitsgruppe Biel und Mitarbeiter stellte cardiotoxische Effekte von Nitrofurantoin aufgrund von oxidativem Streß fest [18]. Symons und Mitarbeiter stellten fest, daß das Nitroradikalanion im alkalischen Medium wesentlich stabiler ist [283].

Boyland und Speyer fanden für einige 2-substituierte 5-Nitrofurane eine Umsetzung mit Glutathion-Transferase zu einem Glutathionkonjugat und Nitrit [4,27].

Eine Hydrolyse der CH=N-Bindung findet im Magensaft nur zu einem geringen Teil statt; bei pH=1,6 und 37°C entstehen nach vier Stunden nur 14 % 5-Nitro-2-furaldehyd [232].

Hunt und Reid beschreiben für 2-Nitrofurane eine photochemische Umwandlung zu den 3-Hydroxyiminofuran-2(3H)-onen, die über die entsprechenden Nitrite zu Furyloxy-Radikalen und NO führen [135]. Die Arbeitsgruppe Hassan und Mitarbeiter zeigte für Sonnenlicht ausgesetzte Proben von 5-Nitrofuranen einen Zerfall zu 5-Nitrofuraldehyd als eine Reaktion erster Ordnung [121].

Eine echte Bedeutung von Nitrofurantoin als NO-Prodrug scheint dennoch kaum denkbar.

6.3 GTN

Die Chemilumineszenzmessungen des Glyceroltrinitrats zeigen deutlich, daß keine spontane NO-Freisetzung stattfindet. Erst der Zusatz des Cytochrom-P450-imitierenden Komplexes in Verbindung mit NADPH ist als der herausragende Metabolisierungsweg anzusehen. Hier werden nach Nitrat-Reduktion 100% NO detektiert. Es ist auch deutlich abzugrenzen, daß in Eisenporphyringegenwart eine Oxidation von gebildetem NO zum Nitrat stattfindet, da unter gleichen Bedingungen nach Nitrit-Reduktion nur 6,7% detektiert werden. Die von einigen Arbeitsgruppen festgestellte allein durch Thiole katalysierte NO-Freisetzung wurde nicht beobachtet.

Zum Teil ist die Bioaktivierung von Glyceroltrinitrat als Cytochrom P-450-abhängig, jedoch auch als Glutathion-S-Transferase-abhängig beschrieben worden [270,263,177,198,243]. Dabei werden jedoch keine vergleichenden Quantifizierungen beider Wege aufgezeigt.

Die mittels Oxyhämoglobinassay untersuchte Lebermetabolisierung zeigt sowohl einen GSH- als auch einen NADPH-abhängigen Metabolisierungsweg (siehe Abbildung 39). Bei der Glyceroltrinitratmetabolisierung durch das Leberhomogenat ist die GSH-abhängige Bioaktivierung zu NO dem NADPH-abhängigen Weg leicht überlegen, 39 pM NO/min•mg Protein, respektive 36,4 pM NO/min•mg Protein. Interessanterweise stellt sich erst nach Trennung des Leberhomogenates in cytosolische und mikrosomale Fraktionen heraus, daß der NADPH-Mikrosomen-abhängige Metabolisierungsweg dem GSH-Cytosol-abhängigen Weg deutlich überlegen ist. Bei einer 1mM Glyceroltrinitratlösung wurde für den mikrosomal-NADPH-abhängigen Bioaktivierungsweg eine Freisetzungsrates von 0,212 $\mu\text{M NO/min}\cdot\text{mg}$, hingegen für die cytosolisch-GSH-abhängige Variante 0,11 $\mu\text{M NO/min}\cdot\text{mg}$ ermittelt.

Die GTN-Metabolisierung zu NO über Mikrosomen wurde mit steigender Konzentration GSH leicht gehemmt. Die Ursache müßte in einer Behinderung des Enzyms liegen, da eine Nitrosothiolbildung nach NO-Freisetzung aus Glyceroltrinitrat bedeutend langsamer stattfände als die Methämoglobinbildung [109,160].

Die Arbeitsgruppe Braun bewies dagegen, daß in arteriellen glatten Muskelzellen die GTN-induzierte Relaxation nicht durch Hemmstoffe der Glutathion-S-Transferase oder Cytochrom P-450 vermindert wird [28]. In nicht-vaskulären Geweben scheint also die

GTN-Biotransformation zu NO über die genannten Enzymsysteme stattzufinden, während sie in vaskulärem Gewebe nicht auftritt. Dies korreliert gut mit den extrem geringen NO-Freisetzungsraten, die in glatten Muskelzellen vom Schwein gefunden wurden (siehe Kap. 5.6.4).

Als Endprodukt ist vor allem das 1,2-Glyceroldinitrat gefunden worden [243].

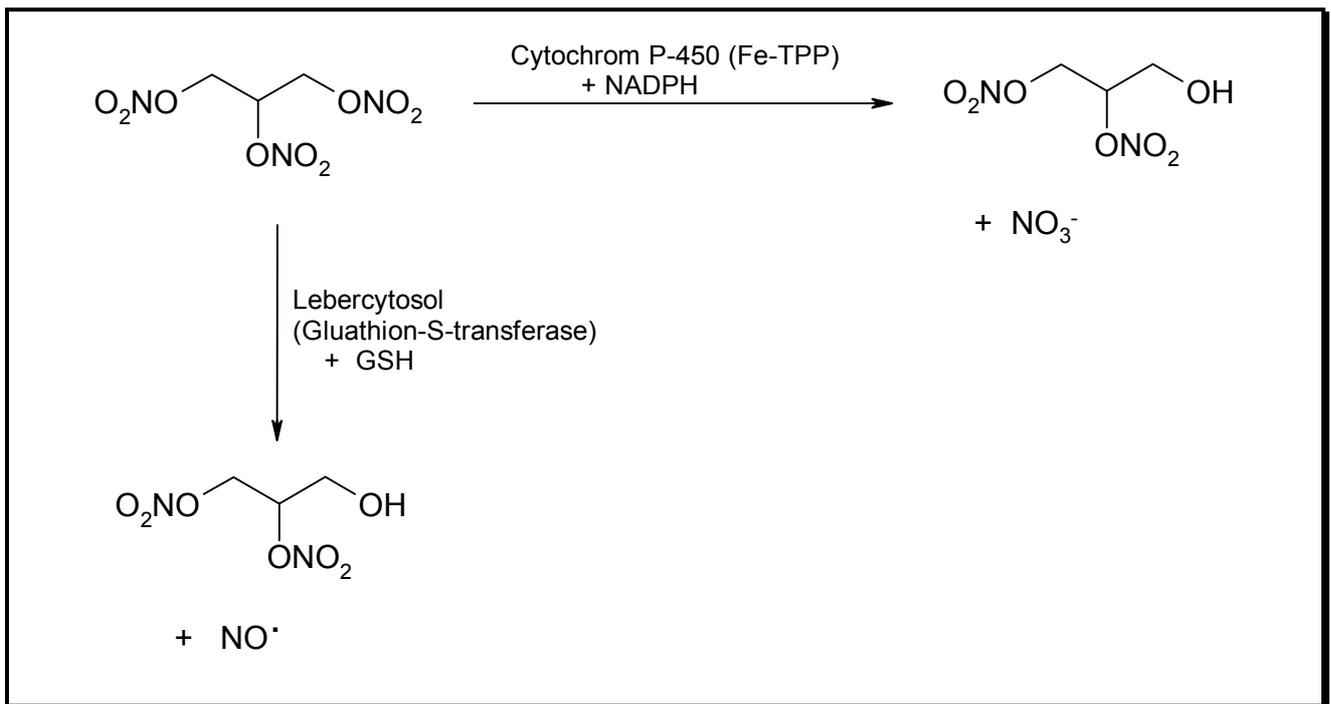


Abbildung 39: Mechanismus zur Aktivierung von Glyceroltrinitrat

6.4 Hydroxylaminhydrochlorid

Für Hydroxylaminhydrochlorid konnten erst im Nitritassay geringe Mengen NO detektiert werden. Der neutrale pH-Bereich zeigte sich zwar gegenüber dem sauren und alkalischen Medium überlegen, es wurde aber nur ein Anteil von 4,7% NO frei. Der Zusatz von Cystein verringerte die NO-Bildung auf 1,2%, dagegen wurden mit Kupfer(I)ionen 7,5%, mit Kupfer(II)ionen 6,7% und mit Eisen(III)tetraphenylporphyrin 6,1% NO gemessen. Überraschenderweise zeigte sich nach Nitrat-Reduktion im neutralen Medium eine NO-Bildung von 100%, diese wurde durch den Eisen(III)-TPP-Komplex auf 2,6% abgeschwächt.

NO- sowie Nitritbildung sind folglich unerheblich. Der Anstieg des detektierten NO bei Kupferionen-Zugabe deutet auf einen oxidativen Zerfall hin. Dies, und die im Nitratassay festgestellte vollständige Umwandlung von Hydroxylamin zu Nitrat lassen eine Peroxynitritbildung mit nachfolgender Umwandlung zu Nitrat vermuten. Damit würde sich auch das eigenwillige Verhalten im Guanylyl-Cyclase-Assay erklären lassen, hier wurde z.T. eine geringe Aktivierung des Enzyms festgestellt, wie sie von verschiedenen Arbeitsgruppen auch für Peroxynitrit ermittelt wurde [216,196,285]. Einige Ansätze führten jedoch zu keiner Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase, hier könnte bereits eine Umlagerung zu Nitrat stattgefunden haben, bevor die NO-Donorlösung mit dem Enzym inkubiert wurde. Die Abbildung 40 gibt die Möglichkeiten des Hydroxylaminzerfalls wieder.

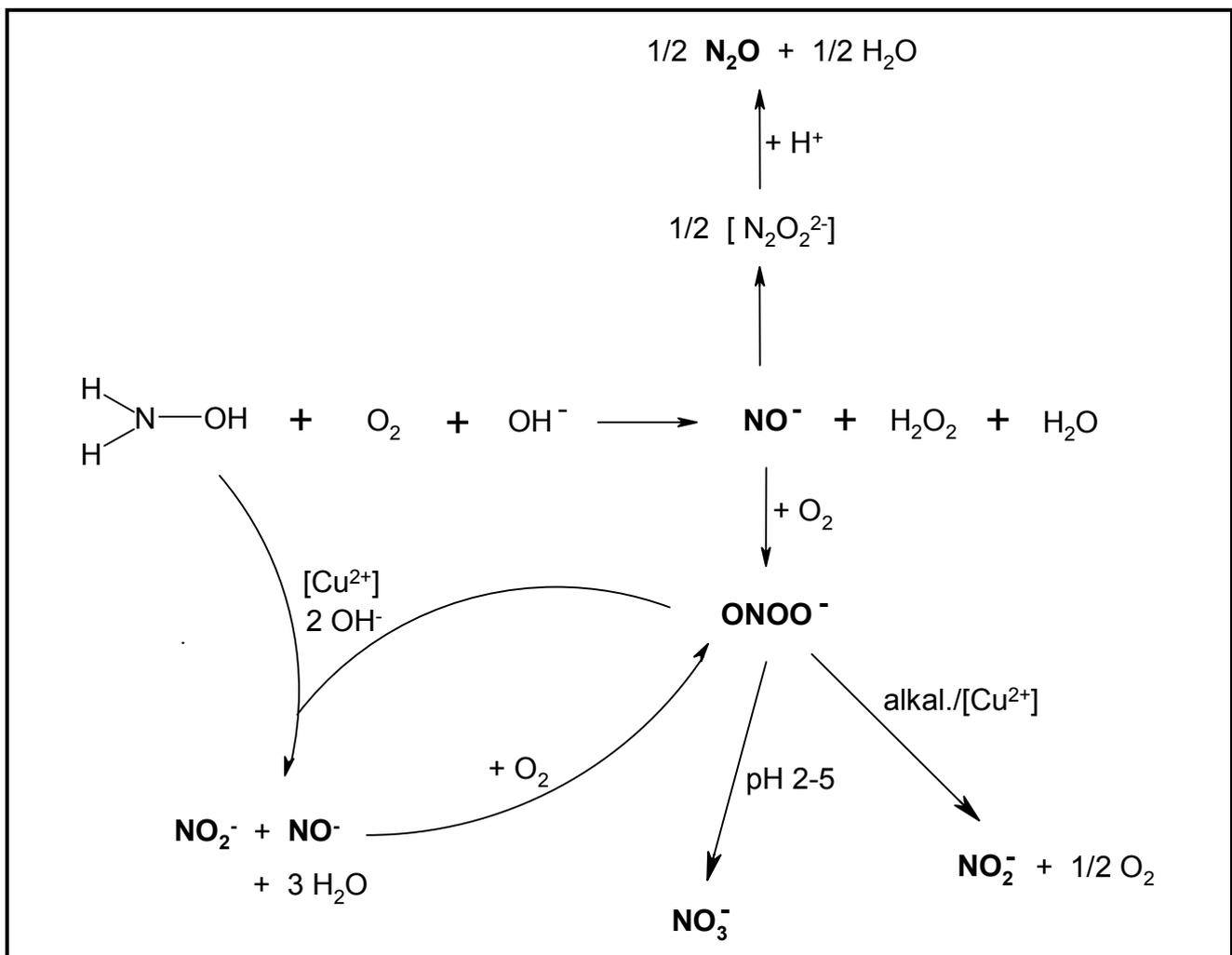


Abbildung 40: Mechanismus zur Aktivierung von Hydroxylamin

Es ist anzunehmen, daß das Nitroxylanion ein Zwischenprodukt für alle Zerfallsprodukte des Hydroxylamins ist. Unter anaeroben Bedingungen findet hieraus eine Dimerisierung zum Hyponitrit statt, wobei nur die cis-Form die anschließende Bildung von Distickstoffmonoxid ermöglicht [131,133]. Die Reaktionsmöglichkeiten in Sauerstoffanwesenheit sind weitaus vielfältiger. Zunächst ist die Bildung von Peroxynitrit vor allem von physiologisch-toxikologischer Bedeutung, aus diesem kann im sauren bis neutralen Medium durch Umlagerung Nitrat gebildet werden, im alkalischen Bereich, besonders in Anwesenheit von Metallionen, ist die Entstehung von Nitrit nachgewiesen [310,16,72]. Ferner ist unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Metallionen, insbesondere Kupfer(II)-Ionen, die Reaktion von Hydroxylamin mit gebildetem Peroxynitrit zu Nitrit und Nitroxylanion möglich [132,296].

Der geringe Anteil detektierten NO's in Eisentetraphenylporphyringegenwart könnte auf der Bildung eines Eisen-TPP-NO-Adduktes beruhen, was ebenfalls durch eine Analogie zu Peroxynitrit-Quenchern wie Mangan(III)tetrakis(4-benzoesäure)porphin (MnTBAP) auf den oben beschriebenen Mechanismus hindeutet.

Trotz des häufigen Gebrauchs von Hydroxylamin in der experimentellen Pharmakologie ist der molekulare Mechanismus der NO-Bildung bzw. Gefäßrelaxation wenig untersucht. DeMaster und Mitarbeiter diskutieren eine Bioaktivierung im glatten Gefäßmuskel durch Katalase und Wasserstoffperoxid, diese soll vermutlich nach Keilin und Mitarbeitern über einen Ferrikatalase-Nitroxyl-Komplex, der sich zum Ferrokatalase-NO-Komplex umlagert, stattfinden [155,60].

6.5 FK409

Das Hydroxyimin ist als spontaner NO-Donor bekannt. Die Halbwertszeit bei pH=7,4 im wässrigen Medium bei Raumtemperatur beträgt 30 min., deshalb wurde hier auch abweichend von den übrigen NO-Donoren eine Inkubation von zwei Stunden (entspricht ca. der vierfachen Halbwertszeit) durchgeführt. Die Zersetzung findet nach einer Reaktion erster Ordnung statt. Als Endprodukt nach der NO-Abspaltung entsteht das gelb gefärbte Diketon [57].

Nach den Chemilumineszenzmessungen liegt die NO-Bildung im neutralen pH-Bereich bei 31%, im sauren pH von 4,5 bei nur 5,2% und im alkalischen bei 86%. FK409 ist also

im sauren Medium relativ stabil, während bei alkalischem pH die Zersetzung wesentlich schneller stattfindet. Die Deprotonierung in 5-Position scheint also der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die NO-Abspaltung zu sein [95].

Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von Kita, die eine deutlich erhöhte Bildung von Nitrit in Gegenwart von Cystein fanden, konnte hier nur eine geringe Erhöhung des gemessenen NO auf 38% im neutralen Bereich nach Nitrit-Reduktion festgestellt werden [163]. Dagegen sind andere Kofaktoren, wie Ascorbinsäure und Kupfer(I)-Ionen mit Freisetzungen von 50 bzw. 70%, potentere Katalysatoren der NO-Bildung.

In der Anwesenheit des Eisen-TPP-Komplexes zeigen sich nur 9,2% NO nach Nitrit-Reduktion, hingegen 79% nach Nitrat-Reduktion. Im neutralen pH-Bereich wird nur 90,4% NO nach Nitrat-Reduktion gemessen. Die Ergebnisse des Nitratassays fallen deutlich höher aus. Dies kann sowohl auf einer intermediären Nitroxylanionbildung mit nachfolgender Reaktion zu Peroxynitrit und Nitrat beruhen, als auch durch die Bedingungen der Nitrat-Reduktion verursacht sein. Wobei letztere in der Regel nur zu sehr langsamen NO-Freisetzungen führen.

Im Vergleich zu NOR-1 scheint also unter diesen Bedingungen kaum eine NO-Bildung aus der Nitrogruppe stattzufinden. Die für einige andere Hydroxyimine gefundene Cytochrom P-450-katalysierte NO-Freisetzung ist hier nicht zu beobachten, [186].

Andere Alkyl- oder Aryloxime haben nach Untersuchungen von Thomas und Ramwell nur sehr geringe Vasoaktivität [289]. Daher postulierten Feilisch und Mitarbeiter die elektronenziehende Nitrogruppe, die über eine Vinylgruppe in Verbindung zur Oximgruppe steht, als notwendiges Strukturmerkmal zur NO-Abspaltung [82].

Ein Analogon von FK 409, mit einer 3-Pyridincarboxamid-Struktur anstelle der Säureamidfunktion (FR144420), welches synthetisiert wurde, um eine Substanz mit längerer Halbwertszeit zu erhalten, zeigte eine gleich schnelle, aber nur halb so starke NO-Freisetzung [165]. Es scheint folglich die Säureamidfunktion zur Mesomeriestabilisierung eines Zwischenproduktes notwendig.

Hier ist ebenfalls die Möglichkeit einer Nef-Reaktion zu diskutieren, wobei die Hydrolyse der Nitrogruppe über ein Nitroxylanion (NO^-) zu N_2O bzw. Peroxynitrit führt. Interessant scheint in diesem Zusammenhang auch, daß ein Derivat, welches anstelle der Hydroxyiminogruppe eine Ketogruppe trägt, mehr Nitrit freisetzt bei nur sehr geringer Vasodilatation [57].

In Abbildung 41 sind die möglichen Reaktionswege aufgezeigt.

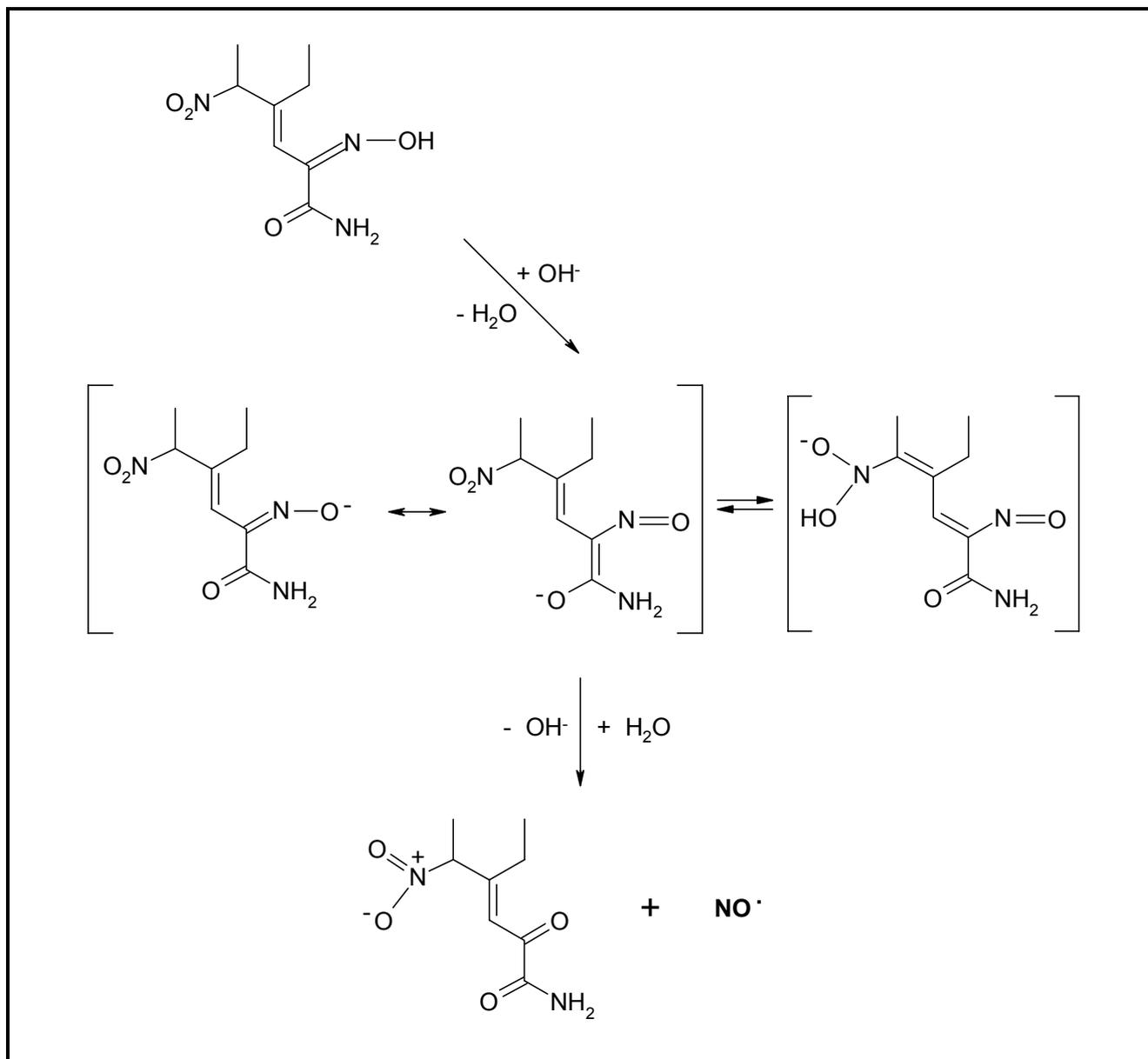


Abbildung 41: Mechanismus zur Aktivierung von FK409=NOR-3

6.6 NOR-1

Für das Hydroxyimin NOR-1 wurde mittels Chemilumineszenzmethode eine maximale NO-Bildung im basischen pH-Bereich gefunden. Bei einem pH von 9,0 sind 109% NO detektiert worden. Im Gegensatz dazu wurden im neutralen Medium 79% NO und bei

einem sauren pH-Wert von 4,5 nur noch 28,8% NO im beobachteten Zeitraum von zehn Minuten gemessen. Der Zusatz von Kofaktoren verringerte in jedem Fall den Anteil des detektierten NO.

Für die Gegenwart von Cystein ist ein Wegfangen des gebildeten NO zu Nitrosothiolen denkbar, was etwa 25% auszumachen scheint.

Die Deprotonierung des Hydroxyimins scheint folglich geschwindigkeitsbestimmend für die NO-Freisetzung zu sein.

Erstaunlicherweise ist nach Nitrat-Reduktion ohne weitere Kofaktoren im neutralen Medium eine Freisetzung von 146% NO zu beobachten. Dies läßt sich nur auf eine Abspaltung der Nitrogruppe in 5-Position zurückführen. Da C-Nitrogruppen im Nitratassay nicht grundsätzlich zu detektierbarem NO führen (siehe 6.1 und 6.2), müssen hier strukturelle Besonderheiten vorliegen. Außerdem bleibt zu diskutieren, ob aus der C-Nitrogruppe aufgrund der strukturellen Besonderheit der Vinylogie zur Hydroxyiminogruppe das Nitrat gebildet wird oder erst die Bedingungen des Nitratassays eine Reaktion hierzu katalysieren.

Bei der von Décout und Mitarbeitern für das Analogon FK409=NOR-3 diskutierten Nef-Reaktion (saure Nitroalkan-Spaltung) würde aus der Nitrogruppe intermediär NO^- entstehen, daraus dann N_2O und das entsprechende Keton (siehe Abbildung 42). Da sie feststellten, daß ein FK409-Derivat ohne Hydroxyimino-Gruppe nicht in der Lage ist ein Tyrosylradikal zu nitrosieren, folgerten sie, daß keine NO-Bildung aus der 5-Nitrogruppe stattfindet [57]. Dies spricht demnach für den unten postulierten Mechanismus, bei dem aus der Nitrogruppe das Nitroxylanion und nachfolgend Distickstoffmonoxid gebildet wird. Da primäre und sekundäre Nitroalkane aufgrund des -I-Effektes eine leichte Abspaltbarkeit des Protons vom α -C-Atom aufweisen, besitzen diese deutlich saure Eigenschaften. In wässriger Alkalilösung gehen sie unter Salzbildung in Lösung.

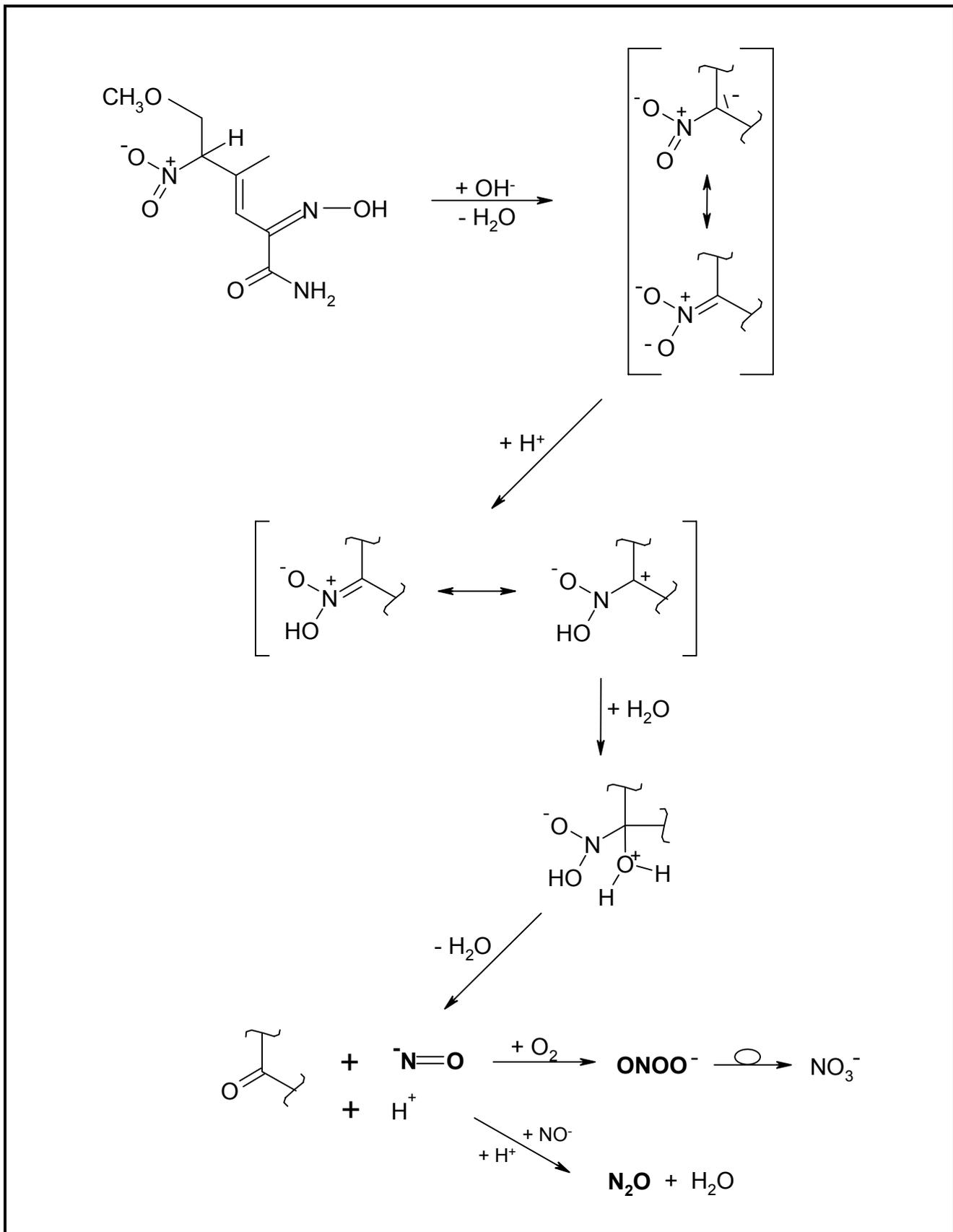


Abbildung 42: Nef-Reaktion der Nitrogruppe im NOR-1

Da die Bildung von Distickstoffmonoxid in der Regel über das Nitroxylanion als Intermediärprodukt abläuft, könnte sich letzteres in Sauerstoffanwesenheit über Peroxynitrit zu Nitrat umlagern. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den relativ hohen NO-Anteil nach Nitrat-Reduktion.

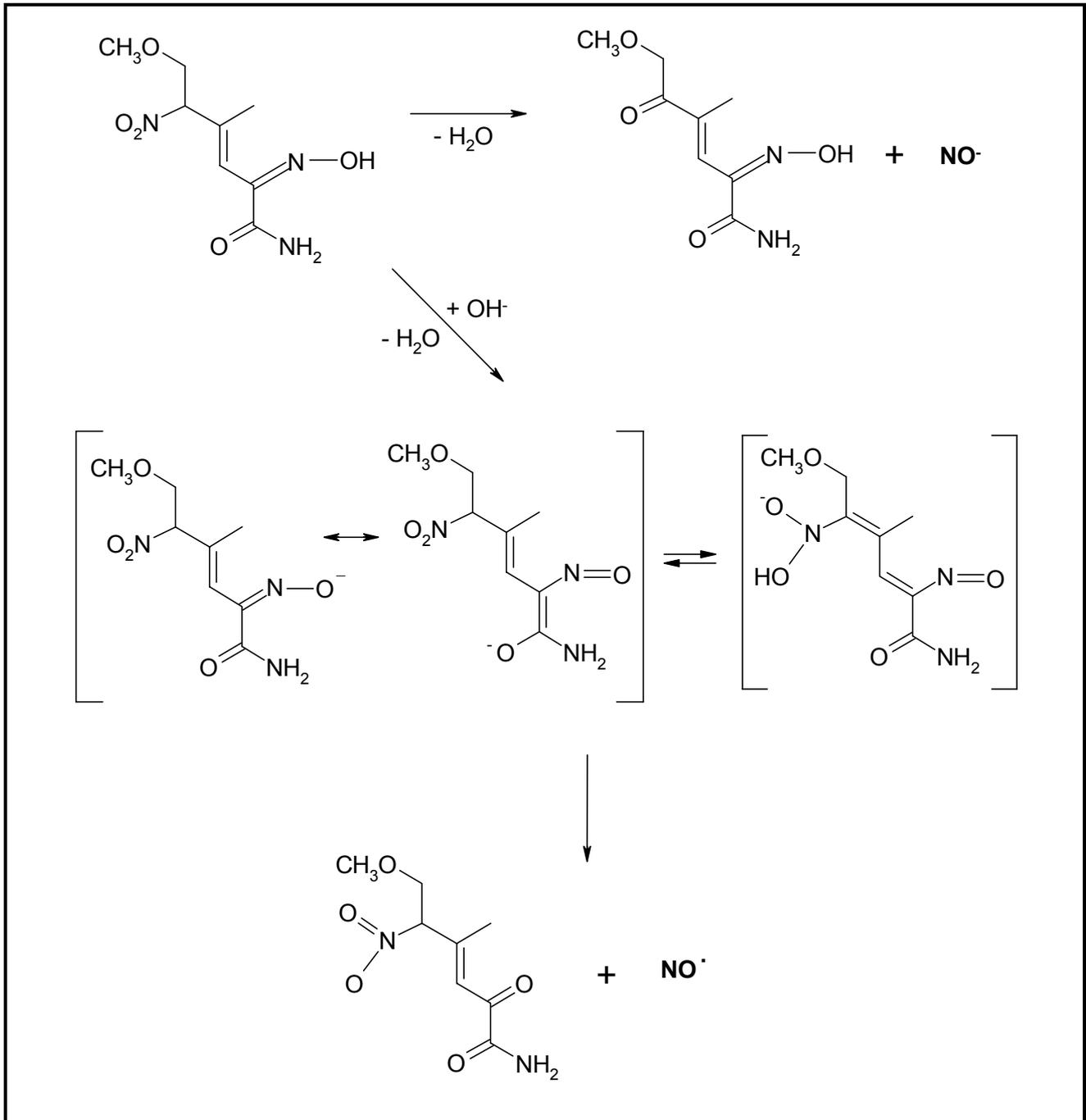


Abbildung 43: Mechanismus zu Aktivierung von NOR-1

6.7 DEA/NO

Die für Diazeniumdiolate charakteristische spontane NO-Freisetzung konnte bestätigt werden. In Anwesenheit von Luftsauerstoff sind ohne Kofaktoren nach Nitrit-Reduktion bereits 161% NO gemessen worden. DEA/NO ist damit deutlich von den anderen NO-NOaten, wie Diethylentriamin(DETA)NONOat, Methylaminohexylmethylamin(MAHMA)-NONOat und Ammoniopropyl-n-propylamino(PAPA)-NONOat abzugrenzen, die 2 mol NO pro Molekül NO-Donor freisetzen [154,153]. Bei DEA/NO ist im Nitritassay in Gegenwart von Kofaktoren wie Cystein oder dem Eisen-TPP-Komplex eine geringere Menge NO detektiert worden, 105% bzw. 110% NO. Es könnte gebildetes NO als Nitrosocystein bzw. als Nitroso-Eisen-TPP-Komplex abgefangen werden. Dies deckt sich mit den von Maragos und Mitarbeitern gemachten Untersuchungen, wonach DEA/NO mit Glutathion eine geringere halbmaximale Stimulation an der löslichen Guanylyl-Cyclase erreicht als ohne Thiolzugabe [187].

Außerdem kommt die Möglichkeit der von der Arbeitsgruppe de Master vorgeschlagenen Reaktion der Sulfensäure- und Distickstoffmonoxidbildung in Frage [59] (siehe Abbildung 44).

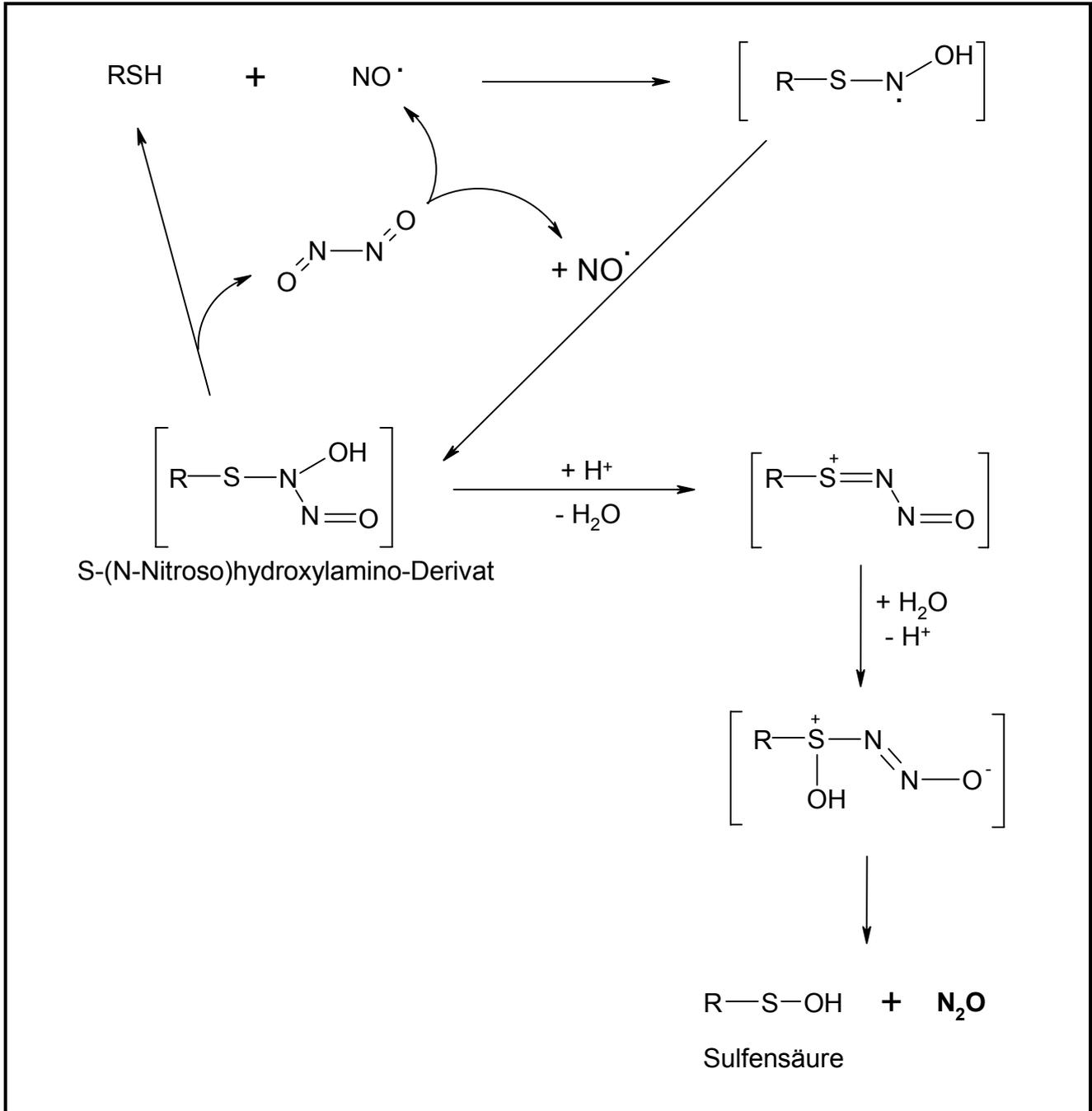


Abbildung 44: Oxidation freier Thiolgruppen durch NO^+

Im Nitratassay sind ähnliche Ergebnisse erfaßt worden; ohne Kofaktoren im neutralen Medium werden nach Nitrat-Reduktion 169% NO detektiert, in Anwesenheit des Eisentetraphenylporphyrin-Komplexes 150%.

Ein von Taylor und Mitarbeitern postulierter Mechanismus legt für Diazeniumdiolate mit nucleophilem Rest für die zur Aktivierung notwendige protonierte Form eine planare An-

ordnung zugrunde, die über Distickstoffdioxid zu NO führt [286]. Keefer postulierte eine teilweise Umsetzung des aus DEA/NO gebildeten NO mit Sauerstoff zu N₂O₄, welches dann das zuvor gebildete sekundäre Amin wieder nitrosieren kann [153]. Demzufolge kann der in Abbildung 45 aufgeführte Mechanismus angenommen werden:

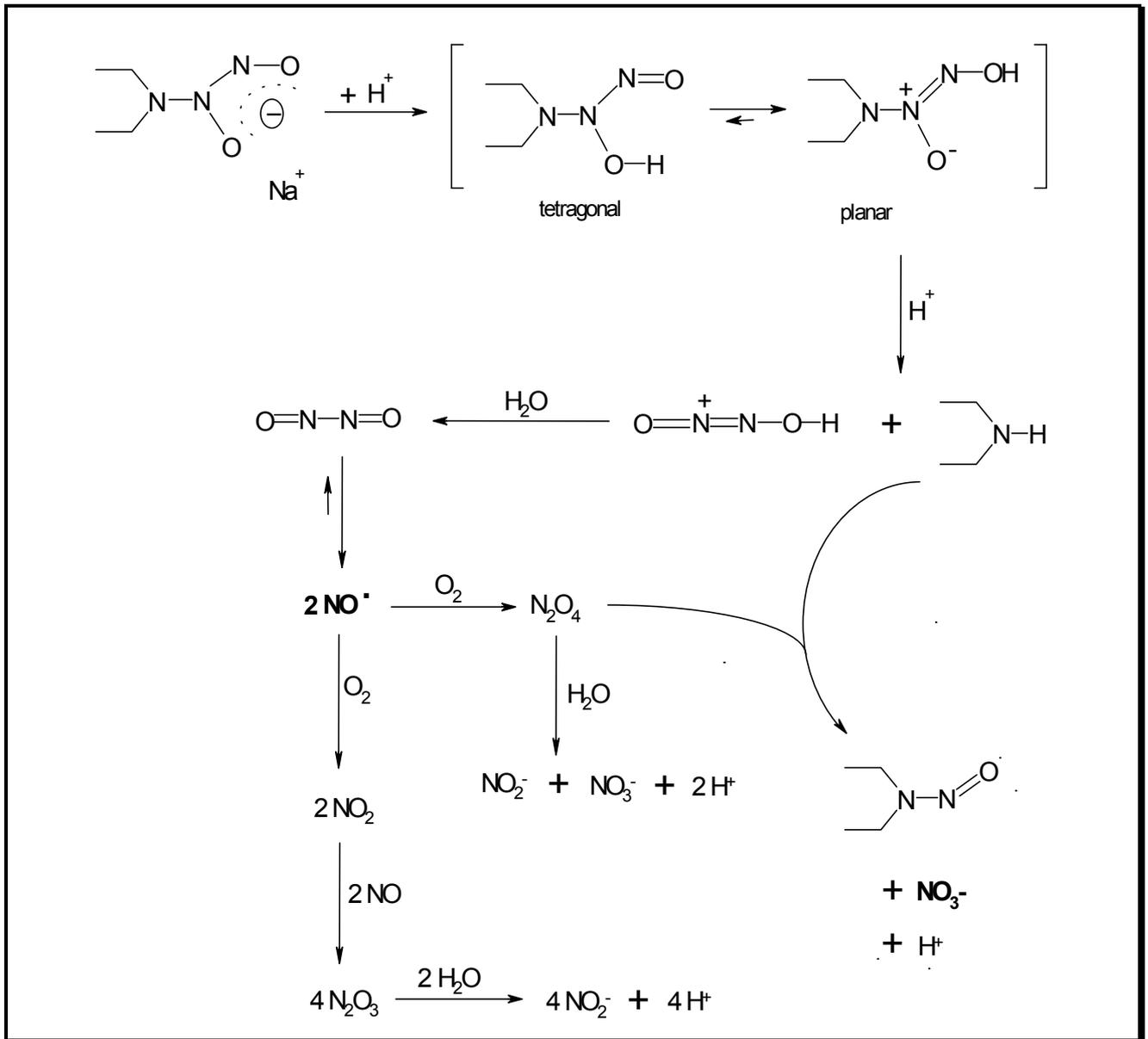


Abbildung 45: Mechanismus zur Aktivierung von DEA/NO

6.8 V-Pyrro/NO

Sowohl die Chemilumineszenzmessungen als auch der Guanylyl-Cyclase-Assay und der Oxyhämoglobin-Assay haben gezeigt, daß dieses alkylierte Diazeniumdiolat keine spontane Bioaktivierung zu NO zeigt. Im Chemilumineszenz-Assay zeigte sich allein der Cytochrom P-450-imitierende Eisentetraphenylporphyrin-Komplex in der Lage die Zersetzung zu katalysieren. Erwartungsgemäß konnte erst in Anwesenheit des Eisen-TPP-Komplexes nach Reduktion von Nitrat NO detektiert werden (s. Kap. 1.1.2). Hierbei ist eine maximale Freisetzung von ca. 1,5 mol NO pro Molekül V-Pyrro/NO erfaßt worden, bei einer Inkubationszeit von zehn Minuten.

Saavedra und Mitarbeiter fanden für ein nicht-vinyliertes Analogon aus der Aminosäure Prolin, PROLI/NO (Di-Natriumsalz), die bislang kürzeste Halbwertszeit aller NONOate, von 1,8 Sekunden, bei 37°C und einem pH-Wert von 7,4. Sie konnten PROLI/NO ebenfalls in basischer Lösung stabilisieren, im neutralen wurde die Dissoziation zu 2 mol NO und Prolin festgestellt [250].

Ob die geringen strukturellen Unterschiede zwischen Pyrrolidin-NONOate und Prolin-NONOat als Ursache für die unterschiedliche Freisetzung anzusehen ist oder eher die Cytochrom P450-simulierende Aktivierungsreaktion vom vinylierten zum freien Diazeniumdiolat zu einer geringeren NO-Bildung führt, bleibt zu klären. Es kann der in Abbildung 46 aufgeführte Mechanismus zur Aktivierung von V-Pyrro/NO angenommen werden.

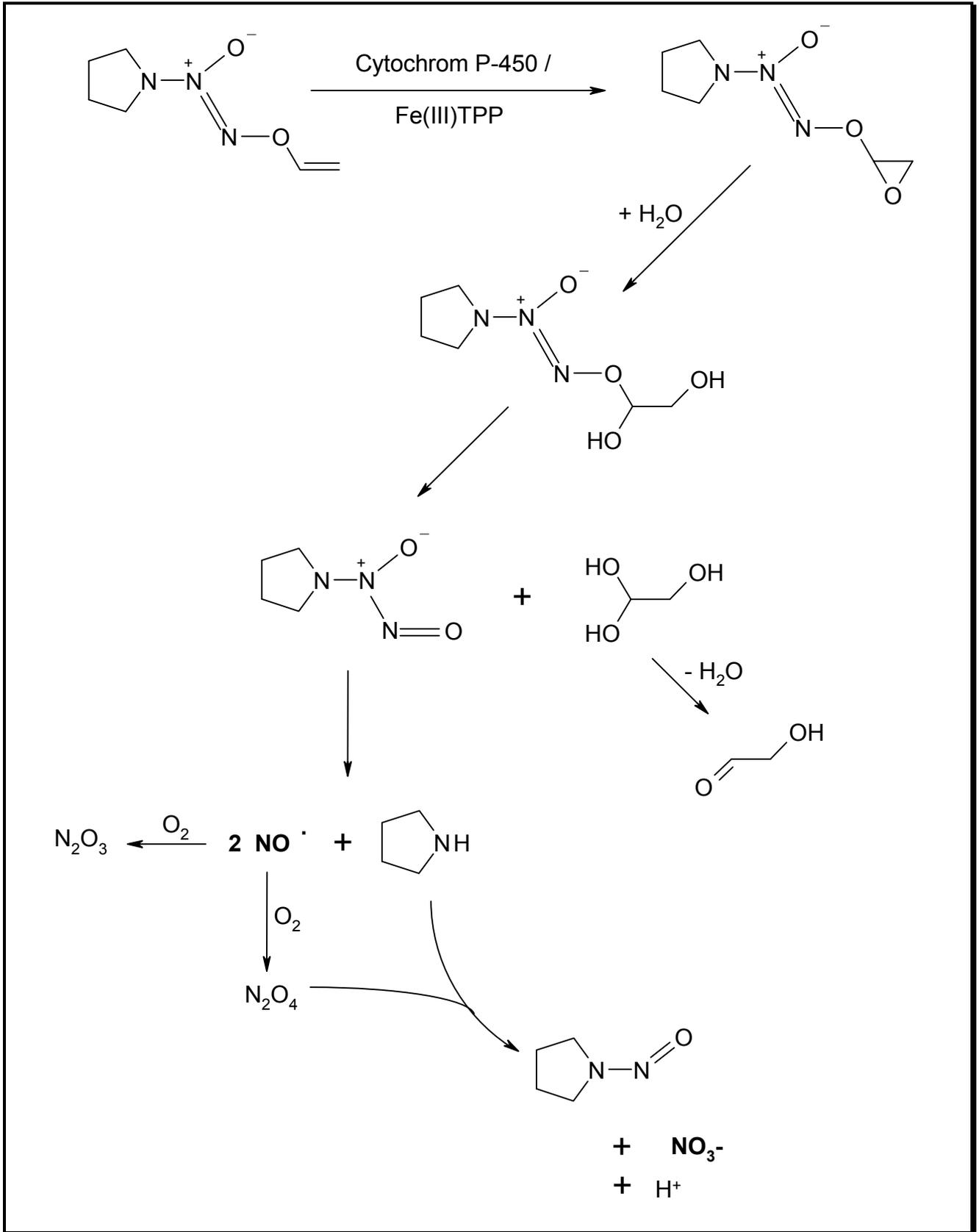


Abbildung 46: Mechanismus zur Aktivierung von V-Pyrro/NO

Die entsprechende Wirkung an der Guanylyl-Cyclase, eine 24-fache Stimulation in Gegenwart von Mikrosomen, ist vom sicherlich eher geringen Ausmaß in Hinblick auf die für die beiden Enzyme sehr verschiedenen optimalen Redoxbedingungen zu relativieren. Die Abspaltung der Vinylgruppe durch Cytochrom P-450 erfordert oxidative Bedingungen, die Umsetzung von Guanosintriphosphat zu cyclischem Guanosinmonophosphat durch die lösliche Guanylyl-Cyclase erfordert reduktive Bedingungen.

Es bleibt auch zu diskutieren, inwieweit eine Hemmung der Cytochrom P-450-Aktivität durch gebildetes NO eine Rolle spielt. Bei einer Aktivierung der iNOS durch Lipopolysaccharide und Cytokine wurde eine deutliche Senkung der Aktivität bestimmter Cytochrome gefunden. In-vitro Versuche haben sowohl eine reversible als auch eine irreversible Hemmung von Cytochrom P-450 durch NO gezeigt, wobei diese von der NO-Konzentration abhängig waren. Es wurde spekuliert, daß die irreversible Hemmung auf einer kovalenten Änderung des Proteinanteils im Cytochrom beruht, die reversible Hemmung auf einer Bildung eines Häm-NO-Komplexes [309,277,229].

Im Oxyhämoglobinassay konnte zusätzlich ein direkter NO-Nachweis nach V-Pyrro/NO-Metabolisierung durch Leberhomogenat erbracht werden. Hier ist keine NO-Freisetzung ohne Leberhomogenat beobachtet worden. Der Zusatz von Leberhomogenat und NADPH führte zu einer Freisetzungsrate von 436,4 pM NO/min·mg Protein. GSH als Kofaktor war nicht in der Lage die NO-Bildung zu stimulieren. Außerdem konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der NO-Freisetzungsrates von der eingesetzten Menge Leberhomogenat und NADPH festgestellt werden. Nach Auftrennung des Homogenates in Cytosol und Mikrosomen ist das metabolisierende Enzymsystem in der mikrosomalen Fraktion bestätigt worden.

Das Aortenhomogenat zeigte, wie zu erwarten, keine Wirkung auf das alkylierte NONOat.

Somit ist die Wirkung von V-Pyrro/NO als leberspezifischer NO-Donor bewiesen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die von Kim und Mitarbeitern gefundene Up-Regulation protektiver Enzyme in den Hepatozyten durch NO unter oxidativen Bedingungen. Dies ist für die Hämoxygenase-1 sowie für Ferritin (wird diskutiert „loses Eisen“ zu binden und damit einer Fentonreaktion zu entziehen) und Billirubin (potentes Antioxidans) bewiesen worden [161].

Zur Beurteilung der Mutagenität waren uns freundlicherweise Scherer und Westendorf mit einem UDS-Test sowie ein Ames-Test zu V-Pyrro/NO behilflich. Hier zeigte sich bei einer Konzentration von 10 µg/ml keine Toxizität [193,37].

6.9 CAS1609

Das Furoxanderivat CAS1609 setzt unter anaeroben Bedingungen kein NO frei. Nach Nitrit-Reduktion einer in Sauerstoffgegenwart inkubierten Lösung werden lediglich 2% NO, mit Cystein geringfügig mehr und in Anwesenheit anderer Kofaktoren deutlich weniger NO detektiert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hecker und Mitarbeitern, die verschiedene Furoxane mit Hilfe der ESR-Spektroskopie auf ihre NO-Freisetzung untersuchten. Hier wurden nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C in Dithiothreitol enthaltenem HEPES-Puffer ebenfalls nur ca. 2% NO gemessen [122]. Nach Feelisch und Mitarbeitern stellten sich andere Furoxane bei pH 7,4 und Raumtemperatur als relativ stabil heraus. Es wurde eine Möglichkeit zur Stimulation der NO-Bildung mit Thiolen beschrieben. Im Gegensatz zur thiolvermittelten NO-Freisetzung aus organischen Nitraten ist hier keine Toleranzentwicklung beobachtet worden [81]. Erst nach Nitrat-Reduktion der Probenlösung erhält man, bereits ohne Zusatz von Kofaktoren, eine NO-Bildung von 20,4%. Der Cytochrom P450-imitierende Komplex führt zu 113,2% NO. Hecker und Mitarbeiter untersuchten den Einfluß eines Cytochrom P-450-Inhibitors auf die Furoxanvermittelte Gefäßrelaxation. Im Gegensatz zu anderen Furoxanen wurden für CAS1609 keine signifikanten Änderungen festgestellt und der Schluß gezogen, daß hier keine Cytochrom P-450 katalysierte Metabolisierung auftritt. Es könnten jedoch, die in diesem Assay zu geringen Enzymkonzentrationen in der Arterie, Ursache für die Differenz zu den oben beschriebenen Ergebnissen sein.

Erstaunlich ist hier auch die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase, das Enzym wird 70 fach stimuliert. Dies entspricht der Hälfte des spontan freisetzenden NO-Donors DEA/NO. Hierbei ist zu beachten, daß bei dem Guanylyl-Cyclase-Assay zum Schutz des Enzyms erhebliche Mengen Thiole zugesetzt sind. Es sind pro Ansatz 3 mM Dithiothreitol, was der doppelten Menge Thiolgruppen entspricht, sowie 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin enthalten. Zwar scheint die thiolkatalysierte Bioaktivierung im Chemilumineszenzassay einen sehr geringen Anteil auszumachen, die in vivo Verhältnisse könnten je-

doch anders aussehen.

Nach Untersuchung verschiedener Furoxan-Derivate auf ihre Stimulationsfähigkeit der löslichen Guanylyl-Cyclase haben Substanzen mit elektronenziehenden Substituenten in 3- und besonders in 4-Position eine stärkere Aktivität [85].

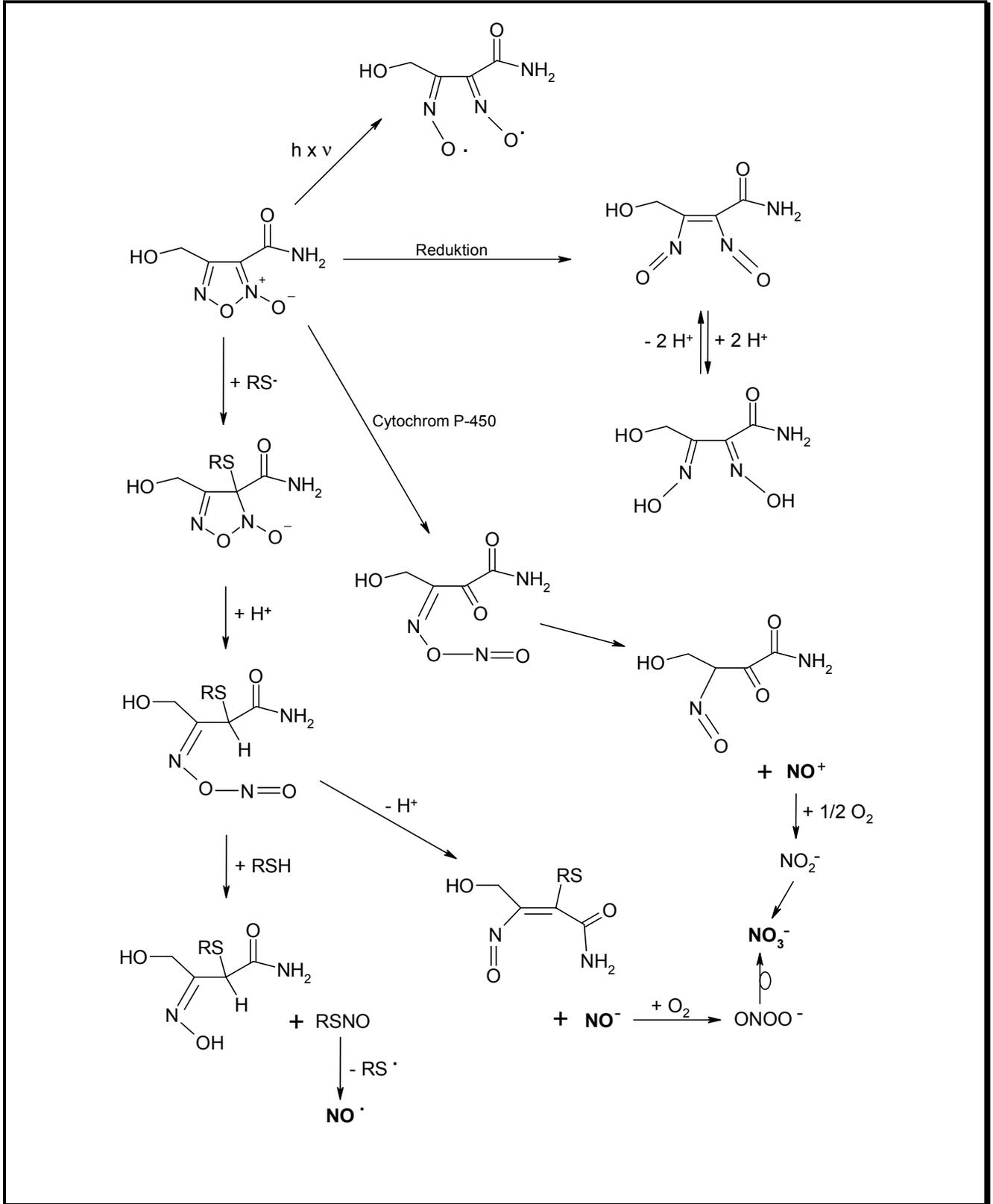


Abbildung 47: Mechanismus zur Aktivierung von CAS1609

6.10 N-Methyl-N-nitrososydnonimin

Eine lichtinduzierte NO-Abspaltung aus dem hier untersuchten Nitrososydnonimin ist bereits von Schleifer und Lüdtke beobachtet worden [254,185]. Hier durchgeführte Untersuchungen mit unterschiedlichen Kofaktoren und pH-Werten zeigten, daß bei Bestrahlung und unter Sauerstoffausschluß das N-Methyl-N-nitrososydnonimin im neutralen pH-Bereich ca. 14% NO freisetzt. Etwas höhere Werte von ca. 20% lassen sich mit reduzierenden Kofaktoren erzielen, ebenso stark aktivierend wirkt ein saurer pH-Wert von 4,5. Ein gravierender Unterschied tritt erst in Sauerstoffgegenwart nach Nitrat-Reduktion auf, es werden 67,6% NO ohne Kofaktoren detektiert und in Anwesenheit des Cytochrom P450-imitierenden Komplexes 60% NO. Hier bleibt zunächst zu diskutieren, inwieweit die Bedingungen des Nitratassays eventuell den Zerfall dieser Verbindung katalysieren. Zur Beurteilung der Eisentetraphenylporphyrin-Wirkung kann eine von Yang und Mitarbeitern gemachte Studie zur Metabolisierung von N-Nitrosoverbindungen herangezogen werden, wonach diese durch Cytochrom P-450 zwar metabolisiert werden, aber nicht zu einer NO-Bildung führen [312]. Dies scheint auch für die Werte im Chemilumineszenzassay nachvollziehbar. Es wäre möglich, daß ein Teil des gebildeten NO sich der Messung durch Bildung eines Eisen-TPP-Adduktes entzöge.

Die für Sydnonimine klassische Bioaktivierung wird bei physiologischem pH und stärker noch im alkalischen Medium als eine Ringöffnung zwischen dem Sauerstoff und dem Kohlenstoff in 5-Position beschrieben, in deren Folge das entstehende N-Nitrosohydrazin-Derivat in Sauerstoffanwesenheit zu einem Kationradikal reagiert, welches NO abspaltet. Hierbei entstehen stöchiometrische Mengen an Superoxidanionen, die wiederum den Sydnoniminzerfall beschleunigen [24,80,243].

Der Guanylyl-Cyclase-Assay zeigt mit einer 26-fachen Stimulation des Enzyms eine Aktivierung im geringeren Bereich.

In Abbildung 48 werden die möglichen Mechanismen zur NO-Freisetzung aus dem Nitrososydnonimin gezeigt.

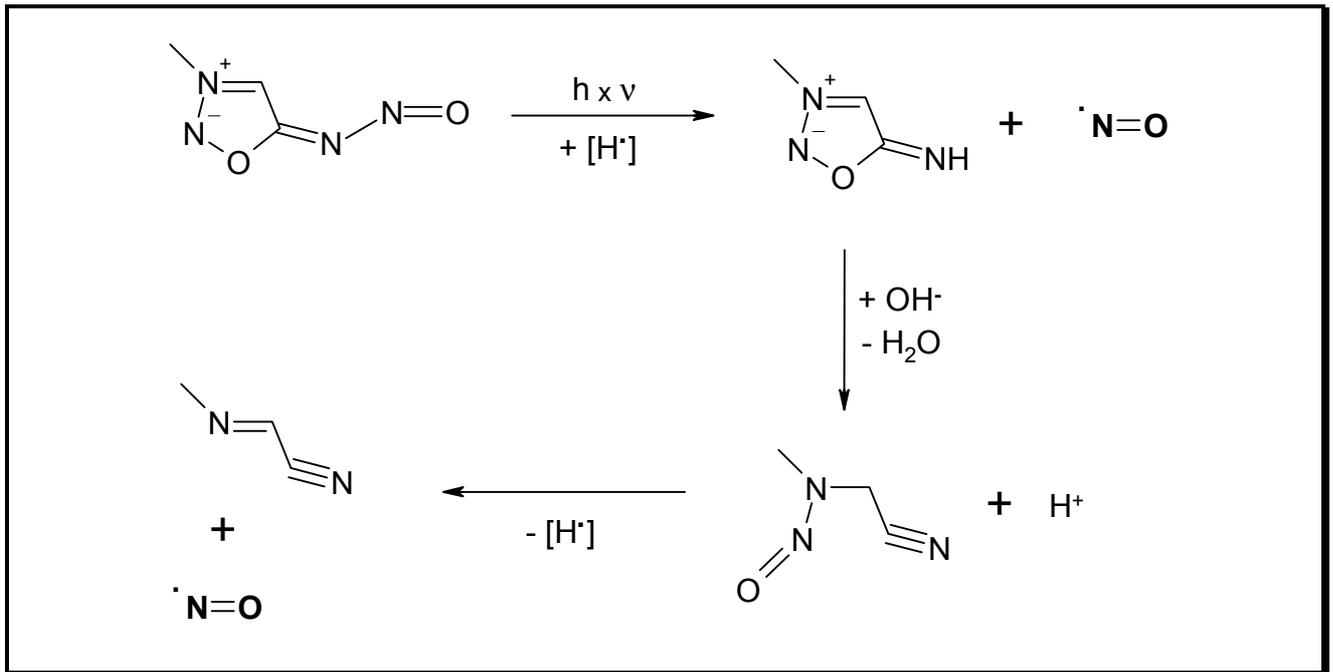


Abbildung 48: Mechanismus zur Aktivierung von N-Methyl-N-nitrososydnonimin

6.11 HE12.2B

Anaerobe Versuchsbedingungen führten auch nach Bestrahlung im Chemilumineszenzassay zu sehr geringen NO-Freisetzungen von ca. 1,2%. Erst bei aerober Inkubation sind im Nitratassay 113% NO gemessen worden, auch hier konnte durch Eisentetraphenylporphyrin Gegenwart der NO-Anteil erhöht werden, 142,5% wurden detektiert. Das im festen Zustand vorliegende Dimer wird in wässriger Lösung in das blau gefärbte Monomer überführt. Aus diesem kann sich durch homolytische Spaltung das NO-Radikal und ein tertiäres Kohlenstoffradikal bilden - bei einem primären oder sekundären Kohlenstoff würde vorwiegend das stabilere tautomere Oxim vorliegen. Dieser Zerfall wäre vor allem durch thermische und photochemische Aktivierung denkbar, scheint aber unter den vorliegenden Bedingungen nur einen extrem geringen Anteil auszumachen.

Der nach Nitrat-Reduktion sehr hohe NO-Anteil lässt eine Nitroxylanionbildung vermuten, welches dann in Sauerstoffgegenwart über Peroxynitrit zu Nitrat reagieren könnte. Die Entstehung von Peroxynitrit aus Nitroxylanion im Triplettzustand unter aeroben Bedin-

gungen ist auch von der Arbeitsgruppe Beckman beschrieben [16]:



Die Abbildung 49 gibt den postulierten Mechanismus des gesamten Zerfalls dieser C-Nitrosoverbindung wieder.

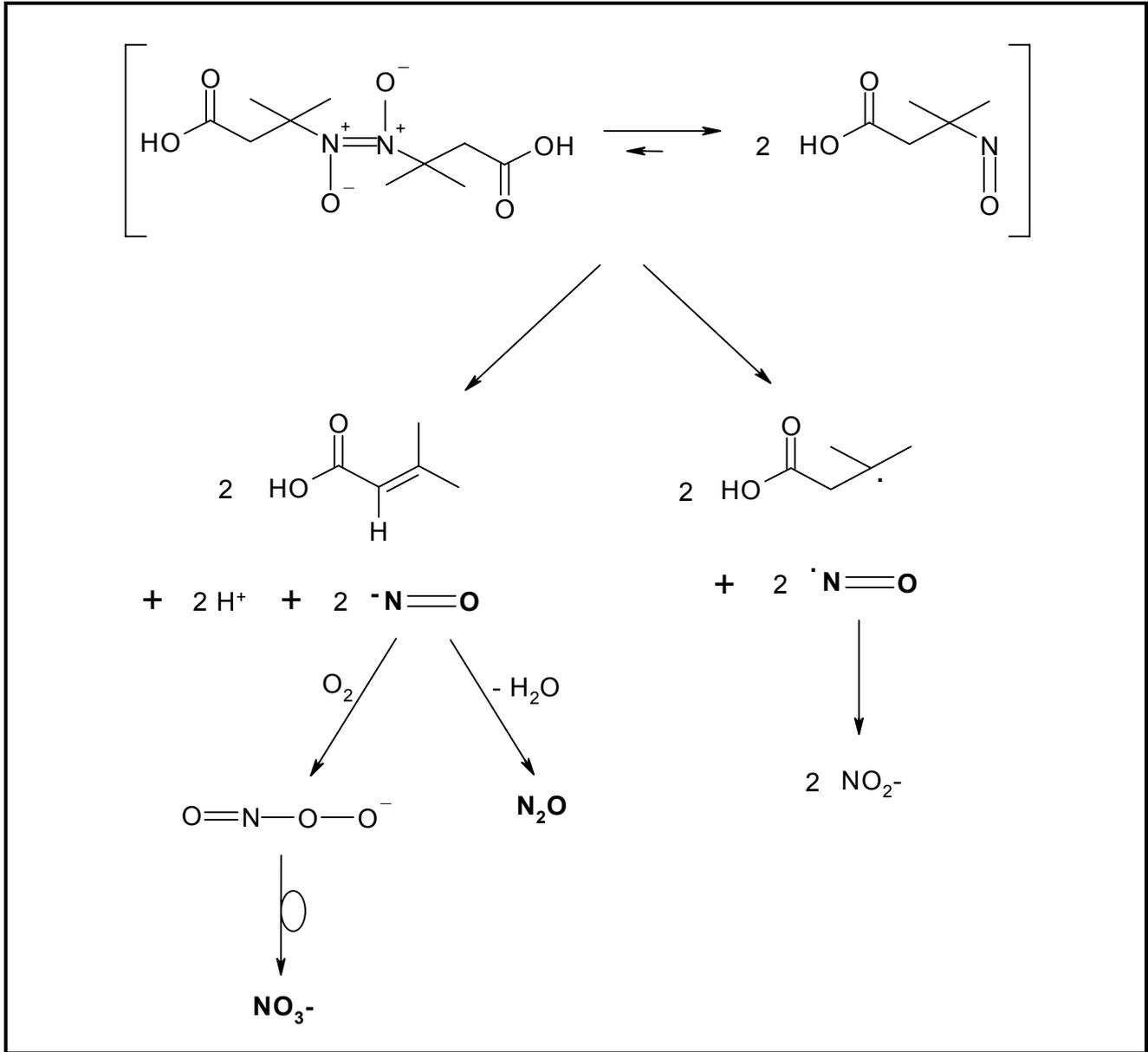


Abbildung 49: Mechanismus zur Aktivierung von HE12.2B

Die sehr geringe Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase durch diese C-Nitroso-Verbindung kann als Bestätigung des oben beschriebenen Mechanismus aufgefaßt werden.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Substanzklassen (siehe Tabelle 1) zunächst mittels Chemilumineszenz auf ihre NO-Freisetzung untersucht.

Hierzu wurde sowohl die direkte NO-Bestimmung unter anaeroben Bedingungen herangezogen, als auch die indirekte NO-Bestimmung, die nach entsprechender Reduktion des unter aeroben Bedingungen entstandenen Nitrits und Nitrats zu NO möglich ist.

Strukturmerkmal	Strukturformel
Nitro-Verbindung	
Nitrat	
Hydroxylamin	
Hydroxyimin (mit vinyloger NO ₂ -Gruppe)	
NONOat (Diazeniumdiolat)	
alkyliertes NONOat (alkyl. Diazeniumdiolate)	
C-Nitroso-Verbindung	
Nitrososydnonimin	
Furazan-2-oxid (Furoxan)	

Tabelle 1: Untersuchte Strukturen

Nitroverbindungen sowie die Verbindung mit C-Nitrosostruktur zeigten eine vernachlässigbare NO-Bildung.

Von den untersuchten Nitraten setzte allein Glyceroltrinitrat eine relevante Menge NO frei, die vor allem in Gegenwart des Cytochrom P-450-Mimetikums Eisen (III)-tetraphenylporphyrin (TPP) mit NADPH nach Nitrat-Reduktion zu beobachten war (100% NO berechnet auf die Menge eingesetzten Glyceroltrinitrats; zum Vergleich: unter allen übrigen Bedingungen blieb der NO Anteil unter 17 %).

Hydroxyimine setzten spontan die äquimolare Menge NO frei. Die Freisetzungsgeschwindigkeit ließ sich mit erhöhtem pH-Wert steigern. Zu einem geringen Teil ist auch die NO-Abspaltung aus der vinylogenen Nitrogruppe möglich.

Für das Hydroxylamin konnten nach Nitrat-Reduktion 100% NO detektiert werden. Alle übrigen Bedingungen führten zu einem Anteil von weniger als 8% NO.

Die NONOate sind für ihre spontane NO-Bildung bekannt. Statt der möglichen 2 mol NO pro mol NO-Donor (200%) wurden bei DEA/NO lediglich 1,5 mol NO (150%) freigesetzt. Die alkylierten Derivate E-Pyrro/NO und M-Pyrro/NO ließen sich nicht zur NO-Abspaltung aktivieren. Für das vinylierte V-Pyrro/NO wurden in Gegenwart des Eisen(III)-TPP-Komplexes nach Nitrat-Reduktion ca. 1,5 mol NO pro mol NO-Donor (150%) gemessen, dagegen führten andere Bedingungen zu keiner Stimulation der NO-Bildung.

Das Nitrososydnonimin-Derivat zeigte ebenso wie das Furoxan und die C-Nitrosoverbindung erst nach Nitrat-Reduktion relevante NO-Freisetzung – ca. 68% ohne Kofaktoren bzw. 113% und 143% in Eisen(III)-TPP-Anwesenheit.

Um den Zusammenhang zu der physiologischen Wirkung herzustellen, wurden einige NO-Donoren an der löslichen Guanylyl-Cyclase (sGC) auf ihre Stimulationsfähigkeit untersucht. Einige Beispiele sind in der folgenden Tabelle 2 gegeben. Sie gibt Aufschluß über den Anteil der Enzymaktivierung im Verhältnis zur maximalen Stimulation, die mit Nitrosoglutathion (100%) ermittelt wurde. Zum Teil wurden Mikrosomen zu den Inkubationsansätzen hinzugefügt, die Cytochrom P-450-katalysierte Umwandlungen bewirken konnten.

NO-Donor	Aktivierung der sGC [%]
nichtalkyl. NONOat (DEA/NO)	100
Furoxan	39
Nitrososydnonimin	16
C-Nitroso-Verbindung	4
Hydroxyimin (FK409) + Mikrosomen	100
Vinyliertes NONOat (V-Pyrro/NO) + Mikrosomen	60
Hydroxylamin	nicht-reproduzierbar !

Tabelle 2: Wirkung ausgesuchter NO-Donoren an der löslichen Guanylyl-Cyclase

Für die Verbindungen geringer oder nicht-reproduzierbarer Guanylyl-Cyclase-Aktivierung, die außerdem nur nach Nitrat-Reduktion hohe Mengen an NO freisetzen, wird eine intermediäre Bildung von Peroxynitrit postuliert.

Um die beträchtliche Aktivierung einiger NO-Donoren mit Cytochrom P-450 auch mittels direkter NO-Messung nachzuweisen, wurde die Methode der Methämoglobinbildung aus Oxyhämoglobin durch NO (Oxyhämoglobin-Assay) angewandt. Eine deutliche Abstufung der NO-Donoraktivität zeigte sich bei der Inkubation mit Leberhomogenat und NADPH. Das vinylierte NONOat V-Pyrro/NO verursachte eine um das zwölffache stärkere NO-Abspaltung als Glyceroltrinitrat und eine 87-fach höhere NO-Bildung als Molsidomin. Das bislang bekannteste Beispiel Molsidomin für eine leberspezifische NO-Bioaktivierung wird deutlich von dem vinylierten NONOat übertroffen.

Mechanistische Vorstellungen zur Freisetzung von NO aus den verschiedenen NO-Donoren wurden diskutiert (siehe Kapitel 6).

Summary

In the first part of this work the NO-release of different NO-donor classes (see table 1) was investigated by the chemiluminescence method. Anaerobic incubation mixtures allowed direct NO-measurement, whereas nitrite and nitrate, which were generated in the presence of oxygen, were determined after specific reduction to nitric oxide (NO).

Characteristic	Structure
Nitro-compound	
Nitrate	
Hydroxylamin	
Hydroxyimine (+ vinylogous NO ₂ -group)	
NONOate (Diazeniumdiolate)	
alkylated NONOate (alkyl. Diazeniumdiolate)	
C-Nitroso-compound	
Nitrososydnonimine	
Furazan-2-oxid (Furoxan)	

Table 1: Investigated structures

Nitro compounds as well as the substance with C-nitroso-structure showed a negligible NO-formation.

In the nitrate-group only glyceroltrinitrate (GTN) released relevant quantities of NO, especially in the presence of the cytochrome P-450-mimetic Fe^{III} -TPP (= iron-tetraphenylporphyrin-complex) with NADPH after nitrate reduction (=100% NO, related to the amount of GTN; other conditions led to NO-formation below 17%).

Hydroxyimines produced spontaneously equimolar amounts of NO. Increasing pH enhanced the velocity of NO-release. To a small part the NO-release of the vinylogous nitro-group seems possible.

Incubating the hydroxylamine detection of 100% NO were seen after nitrate reduction; all other conditions showed less than 8% NO.

NONOates are well known for their spontaneous NO-generation. Instead of the possible 2 mol NO per mol NO-donor DEA/NO produced only 1,5 mol NO (150%).

The alkylated derivatives E-Pyrro/NO and M-Pyrro/NO could not liberate any NO.

Detection of 1,5 mol NO per mol of the vinylated V-Pyrro/NO incubated with Fe^{III} -TPP and NADPH were observed after nitrate reduction, otherwise no stimulation of NO-generation was seen by this compound.

The nitrososydnonimine-derivative, like the furoxan and the C-nitroso-compound, showed relevant amounts of NO only after nitrate reduction, 68% without any cofactors, respectively 113% for the furoxan and 143% for the C-nitroso-compound, both in Fe^{III} -TPP-presence.

NO-mediated physiological effects include mostly stimulation of the soluble guanylate-cyclase (sGC). Therefore some NO-donors are investigated for their ability to activate this enzyme (see table 2), related to maximum stimulation reached with nitrosoglutathion (100%). In certain cases microsomes were added to the incubation mixture for catalysing cytochrome P-450-related reactions.

NO-Donor	% Activation of sGC
Nonalkyl. NONOate (DEA/NO)	100
Furoxan	39
Nitrososydnonimin	16
C-Nitroso-compound	4
Hydroxyimine + Microsomes	100
Vinylated NONOate (V-Pyrro/NO) + Microsomes	60
Hydroxylamine	Not reproducible!

Table 2: Effect on the soluble guanylate-cyclase

Compounds, stimulating the sGC to a low or not reproducible extend and which in addition showed high amounts of NO only after nitrate-reduction, are supposed to intermediate production of peroxynitrite.

To ascertain the cytochrom-P450-mediated activation of several NO-donors another method was applied. The formation of methemoglobin from oxyhemoglobin in the presence of NO was detected by UV-spectroscopy. A good example for the distinct graduation of liver-specific NO-donors was seen by the incubation with liverhomogenate and NADPH. The vinylated NONOate V-Pyrro/NO showed a twelve times more extensive NO-release than GTN and a 87-times higher NO-formation than molsidomin. The so far most prominent example of a liveractivated NO-Donor was molsidomin. This compound is clearly and strongly surpassed by V-Pyrro/NO.

Pathways for the NO-release from the different NO-donors are discussed (see chapter 6).

8 Anhang

8.1 Geräte

8.1.1 NO-Bestimmung

8.1.1.1 Sievers NOA™280

Sievers Instruments, Boulder, USA

Spezifikation:

- 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 verwendet.

Zur Ozongeneration wurde Carbogen (95 % O₂/ 5 % CO₂) ebenfalls von der Firma Linde verwendet. NO-Kalibriergas wurde von der Firma AGA als Mischung 10 ppm NO (2.0) in Stickstoff 5.0 bezogen.

Es wurde eine Methode mit einem Meßbereich von 1-400 pmol angewandt. Die Peakintegration wurde i.a. bei einem Schwellenwert von 5 und einer Peakbreite von 20 ausgewertet.

8.1.1.2 Ansycos AC 30M

Analytische Systeme und Komponenten GmbH, Karlsruhe

Spezifikation:

- Empfindlichkeit: 2 nmol
- Meßbereich: 0-1 ppm
- Wiederholbarkeit: 1 %

Die Ozongeneration aus getrockneter Raumluft findet an Elektroden mit einer angelegten Spannung von 4,5 kV statt.

Als Inertgas wurde Argon 5.0 der Firma AGA verwendet.

Die Überprüfung der Kalibrierung wurde mit NO-Kalibriergas der Konzentration 19,7

ppm NO in Stickstoff der Firma AGA durchgeführt.

8.1.2 sonstige Bestimmungen

8.1.2.1 Elementaranalysen

Perkin-Elmer Elementaranalysator 240 B und C

8.1.2.2 IR-Spektren

Perkin-Elmer Ratio Recording IR-Spektrophotometer

8.1.2.3 Massenspektren

EI-MS: CH-7A-Varian MAT (70eV), Verdampfungstemperatur in °C

FAB-MS: CH-5-DF MAT-Varian in den angegebenen Lösungsmitteln, Reaktandgas Xenon

8.1.2.4 ¹H-NMR-Spektren

Bruker WM-250 und Perkin-Elmer WM 300-500

8.1.2.5 Dünnschichtchromatographie

DC-Alufolien 60 F254 (Merck)

9 Gefahrstoffverzeichnis

Aceton:

R: 11

S: (2)-9-16-23-33

Cystein:

R: 22-36/37/38

S: 26-36

Dimethylsulfoxid:

R: 36/37/38

S: 26-36-23

Dithiothreitol = threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol (DTT):

R: 20/21/22-36/37/38

S: 26-36

Essigsäure 99,99%:

R: 10-35

S: 23-26-45

Ethanol:

R: 11

S: 7-16

Glutathion, oxidierte Form:

R: 36/37/38

S: 26-37/39

Guanosintriphosphat:

R: 23/24/25-36/37/38

S: 45-26-36-22

Kaliumiodid:

R: 63-42/43-36/37/38

S: 22-26-36

Kaliumnitrat:

R: 8-22-36/37/38

S: 17-26-36-7

Kaliumnitrit, ebenso Natriumnitrit:

R: 8-25

S: 45

Kupfer(II)sulfat Pentahydrat:

R: 22-36/38

S:22

Mangan(II)chlorid:

R: 20/21/22-36/37/38-40

S: 26-27-36/37/39

Natriumhydroxid:

R: 35

S: 26-37/39-45

Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, Nicotinamid-adenin-dinucleotid:

R: 36/37/38

S: 26-36

Nitrofluoranthen:

R: 20/21/22-40

S: 22-45-36/37-39-3/7

Nitrofurantoin:

R: 45-46-23/24/25-42/43

S: 53-45-36/37/39-22-3/7

Natriumnitrat:

R: 8-23/24/25-36/37/38

S: 17-26-27-36/37/39

1-Nitropyren:

R: 45-46-20/21/22

S: 53-22-45-36/37/39-3/7

Nitrosoglutathion:

R: 20/21/22-36/37/38-40

S: 36-26-22

Pentobarbital-Natriumsalz:

R: 23/24/25-63

S: 45-36/37/39-22

Salzsäure, 1 N:

R: 36/37/38

S: 26-45

Schwefelsäure, 0,5 N:

R: 49-23/24/25-34

S: 53-23-45-36/37/39-3/7

5, 10, 15, 20-Tetrakis-(pentafluorophenyl)-21H,23H-porphin Eisen(III)chlorid:

R: 36/37/38

S: 26-37/39

Triethanolamin:

R: 36/37/38

S: 26-36

Vanadium(III)chlorid:

R: 34-20/21/22

S: 45-26-28-27-36/37/39

Wasserstoffperoxid (30%):

R: 8-34

S: 3-28-36/39-45

Zinkacetat:

R: 36/38

S: 26-36

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.

10 Literaturverzeichnis

- [1] **Abu-Soud, H. M., Feldman, P. L., Clark, P. und Stuehr, D. J.** (1994). Electron transfer in the nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 269(51): 32318-32326.
- [2] **Adams, G. E. und Stratford, I. J.** (1994). Bioreductive drugs for cancer therapy: the search for tumor specificity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29 No. 2: 231-238.
- [3] **Aebi, H.** (1982). Einführung in die praktische Biochemie, Karger Verlag.
- [4] **Al-Kassab, S., Boyland, E. und Williams, K.** (1963). An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem J* 87(4): 4-9.
- [5] **Ames, J. R., Ryan, M. D. und Kovacic, P.** (1986). Mechanism of antibacterial action: electron transfer and oxy radicals. *J Free Rad Biol Med* 2: 337-391.
- [6] **Anbar, M.** (1995). Nitric oxide: A synchronizing chemical messenger. *Experientia* 51(6): 545-550.
- [7] **Ansyco und a., e. s.** (1985). Chemiluminescent Nitrogen oxides Analyser AC 30M. Poissy.
- [8] **Arancio, O., Kandel, E. R. und Hawkins, R. D.** (1995). Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 376: 74-79.
- [9] **Arnelle, D. R. und Stamler, J. S.** (1995). NO⁺, NO[·] and NO⁻ Donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfid formation. *Arch Biochem Biophys* 318(2): 279-285.

- [10] **Auterhoff, H., Knabe, J. und Höltje, H.-D.** (1994). Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- [11] **Baik, Y. H., French, J. F., Schwartz, A. und Rapoport, R. M.** (1994). Dihydropyridine Ca^{2+} channel agonists and antagonists potentiate ultraviolet light-induced relaxation through cyclic GMP formation in porcine coronary artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 23(5): 785-791.
- [12] **Barbato, F. und Cappello, B. Grumetto, L. Morrica, P.** (1993). Analysis of calcium channel blocking dihydropyridines by high performance liquid chromatography. *Il Farmaco* 48 (3): 417-426.
- [13] **Barnes, P. J.** (1995). Nitric oxide and airway disease. *Ann Med* 27(3): 389-393.
- [14] **Bauer, J. A. und Fung, H.-L.** (1993). Photochemical generation of nitric oxide from nitro-containing compounds: possible relation to vascular photorelaxation phenomena. *Life Sci* 54: PL 1-4.
- [15] **Beck, T.** (1995). Stickstoffmonoxid- Ein gasförmiger Neurotransmitter. *Dtsch Apoth Ztg* 135(26): 15-22.
- [16] **Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H. und Crow, J. P.** (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite, Academic Press.
- [17] **Berkels, R., Klaus, W., Boller, M. und Roesen, R.** (1994). The calcium modulator nifedipine exerts its antiaggregatory property viaa nitric oxide mediated process. *Thromb Haemostasis* 72(2): 309-312.
- [18] **Biel, B., Younes, M. und Brasch, H.** (1993). Cardiotoxic effects of nitrofurantoin and teriary butylhydroperoxide in vitro:are oxygen radicals involved? *Pharmacol Toxicol* 72: 50-55.

- [19] **Billiar, T. R.** (1995). Nitric Oxide: novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 221(4): 339-349.
- [20] **Billiar, T. R., Saavedra, J. E., Williams, D. L. und Keefer, L. K.** (1995). Toward design of a liver-specific nitric oxide (NO) donor. Biology of nitric oxide, Amelia Island, Florida, Endothelium: 13
- [21] **Bina, S., Hart, J. L. und Muldoon, S. M.** (1995). Comparative effects of exogenous nitrovasodilators on cGMP levels in different canine blood vessels. *Life Sci* 56(2): PL 33-38.
- [22] **Bironaite, D. A., Cenas, N. K. und Kulys, J. J.** (1991). The rotenone-insensitive reduction of quinones and nitrocompounds by mitochondrial NADH:ubichinone reductase. *Biochim Biophys Acta* 1060: 203-209.
- [23] **Bohn, H., Brendel, J., Martorana, P. A. und Schönafinger, K.** (1995). Cardiovascular actions of the furoxan CAS 1609, a novel nitric oxide donor. *Br J Pharmacol* 114: 1605-1612.
- [24] **Bohn, H. und Schönafinger, K.** (1989). Oxygen and oxydation promote the release of nitric oxide from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 14 (Suppl 11): S6-S12.
- [25] **Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J. und Cohen, R. A.** (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368(6474): 850-853.
- [26] **Bond, J. A., Medinsky, M. A. und Dutcher, J. S.** (1984). Metabolism of 1-(14 C) nitropyrene in isolated perfused rat livers. *Toxicol Appl Pharmacol* 75: 531-538.

- [27] **Boyland, E. und Speyer, B. E.** (1970). Enzyme-catalysed reactions between some 2-substituted 5-nitrofurane derivatives and glutathione. *Biochem J* 119: 463-472.
- [28] **Braun, M., Grosser, T. und Schrör, K.** (1995). Bioactivation of nitroglycerin in vascular smooth muscle cells is different from that in non-vascular tissue. *Eur J Pharmacol* 276: 239-245.
- [29] **Braunschweiger, P. G., Wang, P. G., Cantauria, G., Cameron, D., Price, H., Teresia, S. und Sharp, L.** (1998). Glucose conjugated S-nitroso-N-acetylpenicillamine (GLC-SNAP-2) is a novel NO-donor with enhanced cytotoxicity in human tumor cells in vitro. *Biochemistry and molecular biology of nitric oxide*, University of California, Los Angeles, Academic Press, Arch Biochem Biophys, Part B: 105
- [30] **Brown, G. C.** (1995). Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem* 232(1): 188-191.
- [31] **Buddecke, E.** (1989). *Grundriß der Biochemie*. Berlin, New York, deGruyter.
- [32] **Burger, A. und Wachter, H.** (1992). *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*. Berlin-New York, Walter De Gruyter.
- [33] **Busse, R. und Fleming, I.** (1995). Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med* 27(3): 331-340.
- [34] **Butler, A. R., Flitney, F. W. und Williams, D. L. H.** (1995). NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 16: 18-22.
- [35] **Butler, A. R. und Williams, D. L. H.** (1993). The physiological role of nitric oxide. *Chem Soc Rev*: 233-241.

- [36] **Butler, J. und Hoey, B. M.** (1993). The one-electron reduction potential of several substrates can be related to their reduction rates by cytochrome P450 reductase. *Biochim Biophys Acta* 1161: 73-78.
- [37] **Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. und Williams, G.** (1987). A protocol and guide for the in vitro rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mutation Res* 189: 113-121.
- [38] **Calvino, R., Fruttero, R., Ghigo, D., Bosia, A., Pescarmona, G. P. und Gasco, A.** (1992). 4-Methyl-3-(arylsulfonyl)furoxans: a new class of potent inhibitors of platelet aggregation. *J Med Chem* 35: 3296-3300.
- [39] **Calvino, R., Mortarini, V., Gasco, A., Sanfilippo, A. und Ricciardi, M. L.** (1980). Antimicrobial properties of some furazan and furoxan derivatives. *Eur Med Chem* 15(5): 485-487.
- [40] **Campos, K. L., Giovanelli, J. und Kaufman, S.** (1995). 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(4): 1721-1728.
- [41] **Chapman, D. E., Michener, S. R. und Powis, G.** (1992). Metabolism of 2,6-dinitro(3-³H)toluene by human and rat liver microsomal and cytosolic fractions. *Xenobiotica* 22(No 8): 1015-1028.
- [42] **Chapman, D. E., Michener, S. R. und Powis, G.** (1993). In vitro metabolism of (3H)2,6-dinitrotoluene by human and rat liver. *Toxicol in Vitro* 7(3): 213-220.
- [43] **Chinellato, A. und Ragazzi, E.** (1995). Receptor-mediated pathways of endothelium activity in experimental atherosclerosis. *Pharmacol Res* 31(3/4): 163-168.

- [44] **Chorgade, M. S., Dezaro, D. A., Hill, D. R., Lee, E. C. und Pariza, R. J.** (1994). Metalloporphyrins as chemical mimics of cytochrome P-450 systems. *Bioorg Med Chem Lett* 4(24): 2867-2870.
- [45] **Civelli, M., Caruso, P., Giossi, M., Bergamaschi, M., Razzetti, R., Bongrani, S. und Gasco, A.** (1994). CHF 2206, a new potent vasodilating and antiaggregating drug as potential nitric oxide donor. *Eur J Pharmacol* 255: 17-24.
- [46] **Clement, B., Schnörwangen, E., Kämpchen, T., Mordvintcev, P. und Mülsch, A.** (1994). Synthesis of $^{15}\text{N}^{\omega}$ -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* 327: 793-798.
- [47] **Clement, B., Schultze-Mosgau, M.-H. und Wohlers, H.** (1993). Cytochrome P450 dependent N-hydroxylation of a guanidine (Debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the N-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. *Biochem Pharmacol* 46(12): 2249-2267.
- [48] **Cole, S., Stratford, I. J. und Adams, G. E.** (1989). Manipulation of radiobiological hypoxia in a human melanoma xenograft to exploit the bioreductive cytotoxicity of RSU-1069. *Int J Radiat Biol* 56 No. 5: 587-591.
- [49] **Cole, S., Stratford, I. J., Adams, G. E., Fielden, E. M. und Jenkins, T. C.** (1990). Dual-function 2-nitroimidazoles as hypoxic cell radiosensitizers and bioreductive cytotoxins: in vivo evaluation in KHT murine sarcomas. *Radiat Res* 124: S 38- S43.
- [50] **Cooper, C. E. und Brown, G. C.** (1995). The interactions between nitric oxide and brain nerve terminals as studied by electron paramagnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun* 212(2): 404-412.

- [51] **Cotton, F. A. und Wilkinson, G.** (1988). The chemistry of the main group elements. New York, Wiley.
- [52] **Curran, R. D., Billiar, T. R., Stuehr, D. J., Hofman, K. und Simmons, R. I.** (1989). Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 170: 1769-1774.
- [53] **Das, S. und Kumar, K. N.** (1995). Nitric oxide: its identity and role in blood pressure control. *Life Sci* 57(17): 1547-1556.
- [54] **De Belder, A. J., Mac Allister, R., Radomski, M. W., Moncada, S. und Vallance, P. J.** (1994). Effects of S-Nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res* 28: 691-694.
- [55] **De Voss, J. J. und De Montellano, P. R. O.** (1995). Computer-assisted, structure-based prediction of substrates for cytochrom P450_{cam}. *J Am Chem Soc* 117: 4185-4186.
- [56] **Decker, K. F. und Obolenskaya, M. Y.** (1995). Cytokines, nitric oxide synthesis and liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 10: S12-S17.
- [57] **Décourt, J.-L., Roy, B., Fontecave, M., Muller, J.-C., Williams, P. H. und Loyaux, D.** (1995). Decomposition of FK 409, a new vasodilator: identification of nitric oxide as a metabolite. *Bioorg Med Chem Lett* 5(9): 973-978.
- [58] **Delaforge, M., Piffeteau, A., Boucher, J.-L. und Viger, A.** (1995). Nitric oxide formation during the cytochrome P-450-dependent reductive metabolism of 18-nitro-oxyandrostenedione. *J Pharmacol Exp Ther* 274(2): 634-640.

- [59] **DeMaster, E. G., Quast, B. J., Redfern, B. und Nagasawa, H. T.** (1995). Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry* 34(36): 11494-11499.
- [60] **DeMaster, E. G., Rajj, L., Archer, S. L. und Weier, E. K.** (1989). Hydroxylamine is a vasorelaxant and a possible intermediate in the oxidative conversion of L-arginine to nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 163(1): 527-533.
- [61] **Dhein, S., Zhao, Y., S., S., Salameh, A. und Klaus, W.** (1995). Actions of 1,4-dihydropyridines in isolated mesenteric vascular beds. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26: 784-791.
- [62] **Dierks, E. A. und Burtyn, J. N.** (1996). Nitric oxide (NO \cdot), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase. *Biochem Pharmacol* 51: 1593-1600.
- [63] **Dietz, G.** (1998). PETN führt nicht zu Nitrattoleranz. *Pharm Ztg* 143(8): 46.
- [64] **Drieu la Rochelle, C. D., Laine, P., Grosset, A. und O'Connor, S. E.** (1995). Coronary and systemic hemodynamic effects of the putative nitric oxide donor, FK 409, in comparison with nitroglycerin in conscious and anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 26: 555-563.
- [65] **Duchstein, H.-J.** (1990). Charakterisierung von aktiven Sauerstoffspezies in ausgewählten Modellreaktionen.-Beiträge zu Mechanismen biologisch relevanter Oxygenierungsprozesse. FU-Berlin. Berlin.
- [66] **Duchstein, H.-J. und Riederer, S.** (1995). Cytochrom P-450: Enzymsystem zur NO-Freisetzung. *PZ* 31: 25-29.

- [67] **Duchstein, H.-J. und Riederer, S.** (1995). Light dependent relaxation of vascular smooth muscles. Experimental proof for the participation of nitric oxide under various activation conditions. *Biology of Nitric Oxide, Amelia Island, Endothelium*: 73
- [68] **Duchstein, H.-J. und Riederer, S.** (1995). Vorstellungen zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus NO-Pharmaka - Modellreaktionen in Gegenwart von Licht und Übergangsmetallkomplexen. *Arch Pharm* 328: 317-324.
- [69] **Duchstein, H.-J., Riederer, S. und Erbach, C.** (1999). Aktive Stickstoffspezies - Ein neues Forschungsgebiet für die Pharmazeutische Chemie. *Pharmazie in unserer Zeit* 28(4): 197-207.
- [70] **Duchstein, H.-J., Riederer, S. und Schellenberger, C.** (1995). Release of nitric oxide (NO) from SIN-1 (3-morpholinosydnonimine) in the presence of model compounds for cytochrome P-450. *Biology of Nitric Oxide, Amelia Island, Endothelium*: 67
- [71] **Duncan, C., Dougall, H., Johnston, P., Green, S., Brogan, R., Leifert, C., Smith, L., Golden, M. und Benjamin, N.** (1995). Chemical generation of nitric oxide in the mouth from enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nature Med* 1(6): 546-551.
- [72] **Edwards, J. O. und Plumb, R. C.** (1994). The chemistry of peroxonitrites. *Progress in inorganic chemistry*. K. D. Karlin. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons. 41: 599-637.
- [73] **Ewing, J. F. und Janero, D. R.** (1998). Specific S-nitrosothiol (thionitrite) quantification as solution nitrite after vanadium(III) reduction and ozone-chemiluminescent detection. *Free Rad Biol Med* 25(4/5): 621-628.

- [74] **Falbe, J. und Regitz, M.** (1995). CD Römpp Chemie Lexikon. Stuttgart. Georg Thieme Verlag.
- [75] **Feelisch, M.** (1988). 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*.
- [76] **Feelisch, M.** (1991). 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.
- [77] **Feelisch, M., Kubitzek, D. und Werringloer, J.** (1996). The oxyhemoglobin assay. Methods in nitric oxide research. M. Feelisch and J. S. Stamler, John Wiley & Sons Ltd. 3: 455-478.
- [78] **Feelisch, M. und Noack, E.** (1987). Nitric oxide (NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin or non-heme iron. *Eur J Pharmacol* 142: 465-469.
- [79] **Feelisch, M. und Noack, E. A.** (1987). Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* 139: 19-25.
- [80] **Feelisch, M., Ostrowski, J. und E., N.** (1989). On the Mechanism of NO Release from Sydnominines. *J Cardiovasc Pharmacol* 14 (Suppl.11): S13-S22.
- [81] **Feelisch, M., Schönafinger, K. und Noack, E.** (1992). Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. *Biochem Pharmacol* 44 No.6: 1149-1157.

- [82] **Feelisch, M. und Stamler, J.** (1996). Donors of nitrogen oxides. Methods in nitric oxide research. M. Feelisch and J. Stamler, John Wiley & Sons Ltd.: 71-115.
- [83] **Feelisch, M., tePoel, M., Zamora, R., Deussen, A. und Moncada, S.** (1994). Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature* 368: 62-65.
- [84] **Feroli, R., Fazzini, A., Folco, G. C., Fruttero, R., Calvino, R., Gasco, A., Bongrani, S. und Civelli, M.** (1993). NO-mimetic furoxans: arylsulfonylfuroxans and related compounds. *Pharmacol Res* 28 No. 3: 202-214.
- [85] **Feroli, R., Folco, G. C., Ferretti, C., Gasco, A. M., Medena, C., Fruttero, R., Civelli, M. und Gacso, A.** (1995). A new class of furoxan derivatives as NO donors: mechanism of action and biological activity. *Br J Pharmacol* 114: 816-820.
- [86] **Förstermann, U. und Ishii, K.** (1996). Measurement of cyclic GMP as an indicator of nitric oxide production. Methods in nitric oxide research. M. Feelisch and J. S. Stamler. West Sussex, John Wiley & Sons Ltd.: 555-566.
- [87] **Foubert, L., Fleming, B., Latimer, R., Jonas, M., Oduro, A., Borland, C. und Higenbottam, T.** (1992). Safety guidelines for use of nitric oxide. *Lancet* 339: 1615-1616.
- [88] **Fozard, J. R.** (1995). The 5-hydroxytryptamine-nitric oxide connection: The key link in the initiation of migraine? *Arch Int Pharmacodyn Ther* 329(1): 111-119.
- [89] **Freedman, J. E., Frei, B., Welch, G. N. und Loscalzo, J.** (1995). Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. *J Clin Invest* 96: 394-400.
- [90] **Fruttero, R., Boschi, D., DiStilo, A. und Gasco, A.** (1995). The furoxan system as a useful tool for balancing "hybrids" with mixed α_1 -antagonist and NO-like vasodilator activities. *J Med Chem* 38: 4944-4949.

- [91] **Fu, P. P.** (1990). Metabolism of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Rev* 22 (2&3): 209-268.
- [92] **Fu, P. P., Chou, M. W. und Beland, F. A.** (1991). Effects of nitro substitution on the in vitro metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Polycyclic aromatic hydrocarbon- Carcinogenesis. 2: 37-65.
- [93] **Fukuto, J. M.** (1995). Chemistry of nitric oxide: Biologically relevant aspects. Advances in Pharmacology/ Nitric oxide-Biochemistry, molecular biology, and therapeutic implications. L. Ignarro and F. Murad, Academic Press Inc. 34: 1-15.
- [94] **Fukuto, J. M., Chiang, K., Hsieh, R., Wong, P. und Chaudhuri, G.** (1992). The pharmacological activity of nitroxyl: a potent vasodilator with activity similar to nitric oxide and/or endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 263(2): 546-551.
- [95] **Fukuyama, S., Kita, Y., Hirasawa, Y., Auma, T., Sato, A., Morokoshi, N., Koda, S., Yasuda, T., Oka, S. und Sakurai, H.** (1995). A new nitric oxide (NO) releaser: spontaneous NO release from FK 409. *Free Rad Res* 23(5): 443-452.
- [96] **Furchgott, R. F.** (1995). A research trail over half a century. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 1-27.
- [97] **Furchgott, R. F.** (1996). The discovery of the endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *J Am Med Assoc* 276(14): 1186-1188.
- [98] **Furchgott, R. F. und Zawadski, J. V.** (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.

- [99] **Gadano, A. C., Sogni, P. Y., S., Cailmail, S., Moreau, R., Nepveux, P., Couturier, D. und Lebec, D.** (1999). Endothelial calcium-calmodulin dependent nitric oxide synthase in the in vitro vascular hyporeactivity of portal hypertensive rats. *J Hepatol* 26(3): 678-686.
- [100] **Gaillard, T., Mülsch, A., Busse, R., Klein, H. und Decker, K.** (1991). Regulation of nitric oxide production by stimulated rat Kupffer cells. *Pathobiology* 59: 280-283.
- [101] **Garthwaite, J. und Boulton, C. L.** (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57: 683-706.
- [102] **Gasco, A. M., Stilo, A. D., Fruttero, R., Sorba, G. und Gasco, A.** (1993). Synthesis and structure of a trimer of the furoxan system with high vasodilator and platelet antiaggregatory activity. *Liebigs Ann Chem*: 441-444.
- [103] **Gasco, A. M., Stilo, A. D., Sorba, G., Gasco, A., Ferioli, R., Folco, G., Civelli, M. und Caruso, P.** (1993). 1,1-Dinitroethyl substituted furoxans: a new class of vasodilators and inhibitors of platelet aggregation. *Eur J Med Chem* 28: 433-438.
- [104] **Ghigo, D., Heller, R., Calvino, R., Alessio, P., Fruttero, R., Gasco, A., Bosia, A. und Pescarmona, G.** (1992). Characterization of a new compound, S35b, as a guanylate cyclase activator in human platelets. *Biochem Pharmacol* 43(6): 1281-1288.
- [105] **Ghislaine, A. J., Narayanan, K., Griffith, O. W. und Kilbourn, R. G.** (1995). Characterization of the effects of two new arginine/citrulline analogues on constitutive and inducible nitric oxide synthases in rat aorta. *Br J Pharmacol* 115: 491-497.

- [106] **Ghosh, P. B. und Everitt, B. J.** (1974). Furazanobenzofuroxan, furazanobenzothiadiazole, and their N-oxides. A new class of vasodilator drugs. *J Med Chem* 17 No. 2: 203-206.
- [107] **Gibaldi, M.** (1993). What is nitric oxide and why are so many people studying it. *J Clin Pharmacol* 33(6): 488-496.
- [108] **Glover, J. H.** (1975). Chemiluminescence in gas analysis and flame-emission spectrometry. *Analyst* 100: 449.
- [109] **Goldstein, S. und Czapski, G.** (1995). 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.
- [110] **Goldstein, S. und Czapski, G.** (1996). Mechanism of the nitrosation of thiols and amines by oxygenated ·NO solutions: the nature of the nitrosating intermediates. *J Am Chem Soc* 118: 3419-3425.
- [111] **Golenhofen, K., Finger, K., Förster, B., Mandrek, K. und Noack, T.** (1994). A novel effect of some dihydropyridines: relaxation of smooth muscle by light-induced release of NO₂ or NO. ? : R 66, 263
- [112] **Gordge, M. P., Meyer, D. J., Hothersall, J., Neild, G. H., Payne, N. N. und Noronha-Dutra, A.** (1995). Copper chelation-induced reduction of the biological activity of S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol* 114: 1083-1089.
- [113] **Gordh, T., Karlsten, R. und Kristensen, J.** (1995). Intervention with spinal NMDA, adenosine, and NO systems for pain modulation. *Ann Med* 27: 229-234.
- [114] **Gorren, A. C. F., Schrammel, A., Schmidt, K. und Mayer, B.** (1996). Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 330(2): 219-228.

- [115] **Grigat, H. und Stein, M.** (1996). Nitrofurane. *Dtsch Apoth Ztg* 136(6): 28-37.
- [116] **Gryglewski, R. J.** (1995). Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol Toxicol* 77: 1-9.
- [117] **Gryglewski, R. J.** (1995). Interactions between endothelial secretagogues. *Ann Med* 27(3): 421-427.
- [118] **Hanson, S. R., Hutsell, T. C., Keefer, L. K., Mooradian, D. L. und Smith, D. J.** (1995). Nitric oxide donors: a continuing opportunity in drug design. *Advances in Pharmacology / Nitric oxide- Biochemistry, molecular biology and therapeutic implications*. L. Ignarro and F. Murad, Academic Press Inc. 34: 383-398.
- [119] **Harada, Y., Ikeda, M., Murasato, Y., Nakamura, T., Araki, M., Nanri, H. und Hayashida, Y.** (1998). Direct measurement with two types of nitric oxide selective electrodes. *Biochemistry and molecular biology of nitric oxide*, University of California, Los Angeles, Academic Press, Arch Biochem Biophys, Part B: 99
- [120] **Harrison, D. G. und Bates, J. N.** (1993). The nitrovasodilators-New ideas about old drugs. *Circulation* 87(5): 1461-1467.
- [121] **Hassan, S. M., Ibrahim, F. A., El-Din, M. S. und Hefnawy, M. M.** (1990). A stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for the determination of some pharmaceutically important nitrocompounds. *Chromatographia* 30(3-4): 176-180.
- [122] **Hecker, M., Vorhoff, W., Bara, A. T., Mordvintcev, P. I. und Busse, R.** (1995). Characterization of furoxans as a new class of tolerance-resistant nitrovasodilators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 351: 426-432.

- [123] **Heller, R., Münscher-Paulig, F. und Till, U.** (1998). The influence of antioxidants on nitric oxide synthesis in human endothelial cells. *Biochemistry and molecular biology of nitric oxide*, University of California, Los Angeles, Academic Press, Arch Biochem Biophys, Part B: 96
- [124] **Herpel, M.** (1997). Aktivierte Azodioxide als NO-Donatoren. FU-Berlin. Berlin. Dissertation.
- [125] **Hobbs, A. J., Fukuto, J. M. und Ignarro, L. J.** (1994). Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci* 91: 10992-10996.
- [126] **Hobbs, A. J., Tucker, J. F. und Gibso, A.** (1991). Differentiation by hydrochloride of relaxations induced by exogenous and endogenous nitrates in non-vascular smooth muscle: role of superoxide anions. *Br J Pharmacol* 104: 645-650.
- [127] **Hobbs, A. J., Wolzt, M., MacAllister, R. J., Feelisch, M., Vallance, P. und Moncada, S.** (1998). Biochemical and pharmacological characterisation of S-nitrosohaemoglobin. *Biochemistry and molecular biology of nitric oxide*, University of California, Los Angeles, Academic Press, Arch Biochem Biophys, Part B: 139
- [128] **Howard, P. C., Mc Manus, M. E. und Koop, D. R.** (1994). The role of cytochrome P 450 2C3 in rabbit liver microsomal metabolism of 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene. *J Biochem Toxicology* 9 No. 2: 71-78.
- [129] **Hrabie, J. A., Klose, J. R., Wink, D. und Keefer, L. K.** (1993). New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J Org Chem* 58: 1472-1476.
- [130] **Hübner, M.** (1995). NMDA-Rezeptorantagonisten. Charite Berlin. Berlin. persönl. Mitteilung.

- [131] **Hughes, M. N. und Nicklin, H. G.** (1968). The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J Chem Soc A*: 450-452.
- [132] **Hughes, M. N. und Nicklin, H. G.** (1970). The chemistry of peroxonitrites. Part II. Copper(II)-catalysed reaction between hydroxylamine and peroxonitrite in alkali. *J Chem Soc A*: 925-928.
- [133] **Hughes, M. N. und Nicklin, H. G.** (1971). Autoxidation of hydroxylamine in alkaline solution. *J Chem Soc A*: 164-168.
- [134] **Hunder, G., Schmid, A. und Mayring, L.** (1987). Investigation on the metabolic degradation of the side chain of furazolidone. *Arch Toxicol* 61: 161-163.
- [135] **Hunt, R. und Reid, S. T.** (1972). Photochemical transformations. Part VI. The photorearrangement of 2-nitrofurane and 2-nitropyrrol. *J Chem Soc*: 2527-2528.
- [136] **Hurshman, A. R. und Marletta, M. A.** (1995). Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity. *Biochemistry* 34: 5627-5634.
- [137] **Hwang, K. J., Jo, I., Shin, Y. A., Yoo, S. und Lee, J. H.** (1995). Furoxans as potential nitric oxide generator: Mechanistic speculation on the electron impacted fragmentation. *Tetrahedron Lett* 36(19): 3337-3340.
- [138] **Ignarro, L. J., Adams, J. B., Horwitz, P. M. und Wood, K. S.** (1986). Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J Biol Chem* 261(11): 4997-5002.
- [139] **Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. und Chaudhuri, G.** (1987). Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 84: 9265-9268.

- [140] **Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. und Wood, K. S.** (1987). Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) released from artery and vein appears to be nitric oxide (NO) or a closely related radical species. *Fed Proc* 46(3): 644.
- [141] **Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. und Wood, K. S.** (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61: 866-79.
- [142] **Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E. und Byrns, R. E.** (1993). Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci* 90(17): 8103-8107.
- [143] **Ishii, K., Gorski, L. D., Förstermann, U. und Murad, F.** (1989). Endothelium-derived relaxing factor (EDRF): the endogenous activator of soluble guanylate cyclase in various types of cells. *J Appl Cardiol* 4: 505-512.
- [144] **Itoh, T., Nagata, K., Okada, M. und Ohsawa, A.** (1995). The aromatization of Hantzsch dihydropyridines with nitric oxide. *Tetrahedron Lett* 36(13): 2269-2272.
- [145] **Iversen, H. H., Gustafsson, L. E., Leone, A. M. und Wiklund, N. P.** (1994). Smooth muscle relaxing effects of NO, nitrosothiols and a nerve-induced relaxing factor released in guinea-pig colon. *Br J Pharmacol* 113.
- [146] **Jaenicke, L.** (1994). Stickstoffmonoxid (NO) wird zellulär durch eine Häm-Eisen-katalysierte Radikalreaktion gebildet. *Chem Unserer Zeit* 28(No 5): 239.
- [147] **Jakobsen, P., Lederballe Pedersen, O. und Mikkelsen, E.** (1979). Gaschromatic determination of nifedipine and one of its metabolites using electron capture detection. *J Chromatogr* 162: 81-87.

- [148] **Jefcoate, C. R.** (1978). Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P450 by optical-difference spectroscopy. *Methods in Enzymology*. 52: 258-279.
- [149] **Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J. und Stamler, J. S.** (1996). S-Nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380: 221-226.
- [150] **Johnson, G. J., Dunlop, P. C., Leis, L. A. und From, H. L.** (1988). Dihydropyridine agonist BAY-K 8644 inhibits platelet activation by competitive antagonism of thromboxane A₂-prostaglandin H₂ receptor. *Circ Res* 62 (2): 494-505.
- [151] **Jousserandot, A., Boucher, J.-L., Dessaux, C., Delaforge, M. und Mansuy, D.** (1995). Formation of nitrogen oxides including NO from oxidative cleavage of C=N(OH) bonds: A general cytochrome P450-dependent reaction. *Bioorg Med Chem Lett* 5(5): 423-426.
- [152] **Kahn, R. A., Weinberger, J., Brannan, T., Prikhojan, A. und Reich, D. L.** (1995). Nitric oxide modulates dopamine release during global temporary cerebral ischemia. *Anesth Analg* 80: 1116-1121.
- [153] **Keefer, L. K.** (1998). Nitric oxide releasing compounds: from basic research to promising drugs. *Chem Tech* 1998(8): 30-35.
- [154] **Keefer, L. K., Nims, R. W., Davies, K. M. und Wink, D. A.** (1996). "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods in Enzymology*, Academic Press. 268: 281-293.
- [155] **Keilin, D. und Nicholls, P.** (1958). *Biochim Biophys Acta* 29: 302-307.

- [156] **Kelm, M., Feelisch, M. und Spahr, R.** (1988). Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothel cells. *Biochem Biophys Res Commun* 154(1): 236-244.
- [157] **Kerwin, J. F., Lancaster, J. R. und Feldman, P. L.** (1995). Nitric oxide: A new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 38(22): 4343-4362.
- [158] **Khan, M. T. und Furchgott, R. F.** (1987). Additional evidence that endothelium-derived factor is nitric oxide. Amsterdam, Elsevier.
- [159] **Kharitonov, V. G., Sundquist, A. R. und Sharma, V. S.** (1994). Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *J Biol Chem* 269(No 8): 5881-5883.
- [160] **Kharitonov, V. G., Sundquist, A. R. und Sharma, V. S.** (1995). Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J Biol Chem* 270(47): 28158-28164.
- [161] **Kim, Y. M., Bergonia, H. und Lancaster, J. R.** (1995). Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 374(2): 228-232.
- [162] **Kim, Y.-M., Bergonia, H. A., Müller, C., Pitt, B. R., Watkins, W. D. und Lancaster, J. R.** (1995). Nitric oxide and intracellular heme. *Advances in Pharmacology / Nitric Oxide- Biochemistry, molecular biology and therapeutic implications.* L. Ignarro and F. Murad, Academic Press Inc. 34: 277-291.
- [163] **Kita, Y., Fukuyama, S. und Hirasawa, Y.** (1995). Close correlation between nitric oxide (NO) formation from NO releasers and the biological activities of these agents in rats. *Jpn J Pharmacol* 69: 69-74.
- [164] **Kita, Y., Hirasawa, Y., Maeda, K., Nishio, M. und Yoshida, K.** (1994). Spontaneous nitric oxide release accounts for the potent pharmaceutical actions of FK 409. *Eur J Pharmacol* 257: 123-130.

- [165] **Kita, Y., Ohkubo, K., Hirasawa, Y., Katayama, Y., Ohno, M., Nishino, S., Kato, M. und Yoshida, K.** (1995). Fr144420, a novel, slow, nitric oxide-releasing agent. *Eur J Pharmacol* 275: 125-130.
- [166] **Klahr, S. und Morrissey, J.** (1995). Renal disease: the two faces of nitric oxide. *Lab Invest* 72(1): 1-3.
- [167] **Knüttel, K., Meese, C. O., Bökens, H., Spahr, R., Friehe, H., Rees, D., Follenfant, M. J., Whittle, B. J. R. und Feelisch, M.** (1995). Biochemical and pharmacological characterization of the novel NO-donor, SP/W-5186. Biology of nitric oxide, Amelia Island, Florida, Endothelium, Harwood academic publishers: S 68
- [168] **Koesling, D.** (1995). Struktur und Regulation der löslichen Guanylat-Cyclase. Freie Universität Berlin. Berlin. Habilitationsschrift.
- [169] **Koivisto, A. und Nedergaard, J.** (1995). Modulation of calcium-activated non-selective cation channel activity by nitric oxide in rat brown adipose tissue. *J Physiol* 486(1): 59-65.
- [170] **Kojda, G.** (1998). Hämodynamische Wirkungen organischer Nitrate. *Med Monatsschr Pharm* 21(1): 9-18.
- [171] **Kojda, G., Patzner, M., Hacker, A. und Noack, E.** (1996). Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate: a novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. *Mol Pharmacol* 53: 547-554.
- [172] **Kostka, P.** (1995). Free radicals (nitric oxide). *Anal Chem* 67(12): 411 R -416 R.
- [173] **Kröncke, K.-D., Fehsel, K. und Kolb-Bachofen, V.** (1995). Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376: 327-343.

- [174] **Kuo, P. C. und Abe, K. Y.** (1996). Nitric oxid -associated regulation of hepatocyte glutathione synthesis is a guanlyl cylcase-independent event. *Surgery* 120(2): 309-314.
- [175] **Kuo, P.-C. und Schroeder, R. A.** (1995). The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann. Surg.* 221: 220-235.
- [176] **Kurz, M. A., Boyer, T. D., Whalen , R., Peterson, T. E. und Harrison, D. G.** (1993). Role of glutathion S-tranferases and relationship between $\text{NO}\cdot$ and NO_2^- formation. *Biochem J* 292: 545-550.
- [177] **Kurz, M. A., Boyer, T. D., Whalen, R., Peterson, T. E. und Harrison, D. G.** (1993). Nitroglycerin metabolism in vascular tissue: role of glutathione S-transferases and relationship between $\text{NO}\cdot$ and NO_2^- formation. *Nature* 292: 545-550.
- [178] **Lefebvre, R. A.** (1995). Nitric oxide in the peripheral nervous system. *Ann Med* 27(3): 379-388.
- [179] **Lindqvist, K.** (1998). The 1998 nobel prize in physiology or medicine. Stockholm, Nobel-Komitee, Karolinska-Institut.
- [180] **Lönnqvist, P. A., Jonsson, B., Winberg, P. und Frostell, C. G.** (1995). Inhaled nitric oxide in infants with developing or established chronic lung disease. *Acta Paediatr* 84: 1188-1192.
- [181] **Loscalzo, J.** (1995). Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med* 333(4): 251-253.
- [182] **Loskove, J. A. und Frishman, W. H.** (1995). Nitric oxide donors in the treatment of cardiovascular and pulmonary diseases. *Am Heart J* 129(3): 604-613.

- [183] **Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L. und Snyder, S. H.** (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120: 227-237.
- [184] **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- [185] **Lüdtke, E.** (1992). Antithrombotische Thiazol- und Thiadiazol-N-nitrosimine. FU-Berlin. Berlin. Dissertation.
- [186] **Mansuy, D., Boucher, J. L. und Clement, B.** (1995). On the mechanism of nitric oxide formation upon oxidative cleavage of C=N(OH) bonds by NO-synthases and cytochromes P450. *Biochimie* 77(7-8): 661-667.
- [187] **Maragos, C. M., Morley, D., Wink, D. A., Dunams, T. M., Maragos, Saavedra, J. E., Hoffman, A., Bove, A. A., Isaac, L., Hrabie, J. A. und Keefer, L. K.** (1991). Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J Med Chem* 34: 3242-3247.
- [188] **Maragos, C. M., Wang, J. M., Hrabie, J. A., Oppenheim, J. J. und Keefer, L. K.** (1993). Nitric oxide /nucleophile complexes inhibit the in vitro proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxide release. *Cancer Res* 53: 564-568.
- [189] **Marciniec, B. und Rychcik, W.** (1994). Kinetic analysis of nifedipine photodegradation in the solid state. *Pharmazie* 49: 894-897.
- [190] **Marin, J. und Rodriguez-Martinez, M. A.** (1995). Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol* 15(4): 279-307.
- [191] **Marletta, M. A.** (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268(17): 12231-12234.

- [192] **Marletta, M. A.** (1994). Approaches towards selective inhibition of nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37(13): 1899-1905.
- [193] **Maron, D. M. und Ames, B. N.** (1983). Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
- [194] **Mason, R. P. und Holtzman, J. L.** (1975). The mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates. *Biochemistry* 14 , No.8: 1626-1629.
- [195] **Matsunaga, K. und Furchgott, R. F.** (1989). Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 248: 687-693.
- [196] **Mayer, B., Schrammel, A., Klatt, P., Koesling, D. und Schmidt, K.** (1995). Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 270(29): 17355-17360.
- [197] **McAninly, J., Williams, D. L. H., Askew, S. C., Butler, A. R. und Russel, C.** (1993). Metal ion catalysis in nitrosothiol (RSNO) decomposition. *J. Chem. Soc. Chem Commun.:* 1758-9.
- [198] **McDonald, B. J. und Bennet, B. M.** (1993). Biotransformation of glyceroltrinitrate by rat aortic cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* 45: 268-270.
- [199] **Medana, C., Ermondi, G., Fruttero, R., di Stilo, A., Ferretti, C. und Gasco, A.** (1994). Furoxans as nitric oxide donors. 4-phenyl-3-furoxancarbonitrile: thiol-mediated nitric oxide release and biological evaluation. *J Med Chem* 37: 4412-4416.
- [200] **Mehta, J. L.** (1995). Endothelium, coronary vasodilation, and organic nitrates. *Am Heart J* 129(2): 382-391.

- [201] **Mikkelsen, E., Kazda, S. und Nyborg, N. C. B.** (1985). Effects of light and BAY-k 8644, a new 1,4-dihydropyridine, on mechanical responses of rat thoracic aorta. *Acta Pharmacol Toxicol* 56: 126-132.
- [202] **Mikkelsen, E. O. und Nyborg, N. C. B.** (1986). Comparison of the effects of the vasoconstrictive dihydropyridines BAY k 8644 and CGP 28392 on isolated rat aorta: different sensitivities to ultraviolet radiation. *J Cardiovasc Pharmacol* 8(3): 476-482.
- [203] **Milbourne, E. A. und Bygrave, F. L.** (1995). Does nitric oxide play a role in liver function? *Cell. Signalling* 7(4): 313-318.
- [204] **Millar, J.** (1995). The nitric oxide/ ascorbate cycle: how neurones may control their own oxygen supply. *Med Hypotheses* 45: 21-26.
- [205] **Mirvish, S. S.** (1995). Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett* 93(1): 17-48.
- [206] **Misik, V., Mak, I. T. und Weglicki, W. B.** (1992). Formation of superoxide in the reaction of photolytically altered nifedipine- a nitroso compound- with unsaturated membrane lipids. *Chem Biol Interact* 83: 97-105.
- [207] **Mitchell, C. E., Bechtold, W. E. und Belinsky, S. A.** (1993). Metabolism of nitrofluoranthenes by rat lung subcellular fractions. *Carcinogenesis* 14(6): 1161-1166.
- [208] **Miwa, M., Iwata, S. und Miyachi, E.-I.** (1995). Nitric oxide: gap junctional coupling of tracheal smooth muscle excised from rats. *Biogenic Amines* 11(3): 205-212.
- [209] **Moilanen, E. und Vapaatalo, H.** (1995). Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann Med* 27(3): 359-367.

- [210] **Moncada, S.** (1994). Nitric oxide. *J Hypertension* 12(Suppl. 10): S 35- S 39.
- [211] **Moncada, S. und Higgs, E. A.** (1995). Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 9: 1319-1330.
- [212] **Moreno, S. N. J. und Docampo, R.** (1985). Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. *Environ Health Perspect* 64: 199-208.
- [213] **Moreno, S. N. J., Mason, R. P. und Docampo, R.** (1984). Distinct reduction of nitrofurans and metronidazol to free radical metabolites by *Tritrichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *J Biol Chem* 259(13): 8252-8259.
- [214] **Morgenstern, R., Lundquist, G., Andersson, G., Lennart, B. und Depierre, J. W.** (1984). The distribution of microsomal glutathione transferase among different organelles, different organs, and different organisms. *Biochem Pharmacol* 33: 3609-3614.
- [215] **Morley, D., Maragos, C. M., Zhang, X.-Y., Boignon, M., Wink, D. A. und Keefer, L. K.** (1993). Mechanism of vascular relaxation induced by the nitric oxide (NO)/nucleophile complexes, a new class of NO-based vasodiliators. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: 670-676.
- [216] **Moro, M. A., Darley-Usmar, V. M., Goodwin, D. A., Read, N. G., Zamora-Pino, R., Feelisch, M., Radomski, M. und Moncada, S.** (1994). Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci* 91: 6702-6706.
- [217] **Murad, F., Mittal, C. K., Arnold, W. P., Katsuki, S. und Kimura, H.** (1978). Guanylate cyclase: activation by azide, nitrocompounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cycl Nucl Res* 9: 145-158.

- [218] **Murphy, M. E. und Sies, H.** (1991). Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10860-10864.
- [219] **Myers, P. R., Minor, R. L., Guerra, R., Bates, G. N. und Harrison, D. G.** (1990). Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345: 161-163.
- [220] **Nanji, A. A., Greenberg, S. S., Tahan, S. R., Fogt, F., Loscalzo, J., Sadrzadeh, S. M. H., Xie, J. und Stamler, J. S.** (1995). Nitric oxide production in experimental alcoholic liver disease in the rat: Role of protection from injury. *Gastroenterology* 109: 899-907.
- [221] **Nava, E., Noll, G. und Lüscher, T. F.** (1995). Nitric oxide in cardiovascular diseases. *Ann Med* 27: 343-351.
- [222] **Nüssler, A. K.** (1996). Stickstoffmonoxid/Nitric Oxide: ein biologischer Tausend-sassa. *Pharm Ztg* 141(2): 11-20.
- [223] **Nüssler, A. K. und Billiar, T. R.** (1991). Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukocyte Biol* 54: 171-178.
- [224] **Ohkuma, S., Katsura, M., Guo, J. L., Hasegawa, T. und Kuriyama, K.** (1995). Involvement of peroxynitrite in N-methyl-D-aspartate- and sodium nitroprusside-induced release of acetylcholine from mouse cerebral cortical neurons. *Mol Brain Res* 31(1-2): 185-193.
- [225] **Okochi, E., Namai, E., Ito, K. und Mochizuki, M.** (1995). Activation of N-nitrosodialkylamines to mutagens by a metalloporphyrin/oxidant model system for cytochrom P450. *Biol Pharm Bull* 18(1): 49-52.

- [226] **Olesen, J., Thomsen, L. L. und Iversen, H.** (1994). Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trends Pharmacol Sci* 15: 149-153.
- [227] **Ogilvie, P., Schilling, K., Billingsley, M. L. und Schmidt, H. H. H. W.** (1995). Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. *FASEB J* 9: 799-806.
- [228] **Omura, T. und Sato, R.** (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 239: 2370-2378.
- [229] **Osawa, Y., Davila, J. C., Nakatsuka, M., Meyer, C. A. und Darbyshire, J. F.** (1995). Inhibition of P450 cytochromes by reactive intermediates. *Drug Metab Rev* 27(1&2): 61-72.
- [230] **Paakkari, I. und Lindsberg, P.** (1995). Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med* 27(3): 369-377.
- [231] **Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. und Moncada, S.** (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- [232] **Paul, H. E., Ellis, V. R., Kopko, F. und Bender, R. C.** (1960). Metabolic degradation of the nitrofurans. *J Med Pharm Chem* 2, No. 5: 563-584.
- [233] **Pearse, R. W. B. und Gaydon, A. G.,** Eds. (1974). The identification of molecular spectra. London.
- [234] **Perutz, M. F.** (1996). Taking the pressure off. *Nature* 380: 205-206.
- [235] **Pfaffendorf, M.** (1996). Das Endothel als sekretorisches Organ. *Med Monatsschr Pharm* 19(2): 42-53.

- [236] **Pryor, W. A., Church, D. F., Govindan, C. K. und Crank, G.** (1982). Oxidation of thiols by nitric oxide and nitrogen dioxide: Synthetic utility and toxicological implications. *J. Org. Chem.* 47: 156-159.
- [237] **Radomski, M. W.** (1995). Nitric oxide: Biological mediator, modulator and effector. *Ann Med* 27(3): 321-329.
- [238] **Rand, M. J. und Li, C. G.** (1995). Discrimination by the NO-trapping agent, carboxy-PTIO, between NO and the nitergic transmitter but not between NO and EDRF. *Br J Pharmacol* 116(2): 1906-1910.
- [239] **Rao, D. N. R., Harman, L., Motten, A., Schreiber, J. und Mason, R. P.** (1987). Generation of radical anions of nitrofurantoin, misonidazole and metronidazole by ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 255, No. 2: 419-427.
- [240] **Rao, D. N. R., Jordan, S. und Mason, R. P.** (1988). Generation of nitro radical anions of some 5-nitrofurans, and 2- and 5-nitroimidazoles by rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 37: 2907-2913.
- [241] **Rao, D. N. R. und Mason, R. P.** (1987). Generation of nitro radical anions of some nitrofurans, 2- and 5-nitroimidazoles by norepinephrine, dopamine and serotonin. *J Biol Chem* 262, No. 24: 11731-11736.
- [242] **Rickert, D. E.** (1987). Metabolism of nitroaromatic compounds. *Drug Metabol Rev* 18(1): 23-53.
- [243] **Riederer, S.** (1998). Beiträge zum Mechanismus der Bioaktivierung von NO-Donatoren durch nicht-enzymatische Modellreaktionen. *Dissertation, Freie Universität Berlin.*
- [244] **Riederer, U.** (1999). Dissertation, in Vorbereitung. Hamburg.

- [245] **Robak, J. und Duniec, Z.** (1986). Membrane activity, antioxidant, antiaggregatory and antihemolytic properties of four calcium channel blockers. *Pharmacol Res Commun* 18 No.12: 1107-1117.
- [246] **Rodeberg, D. A., Chaet, M. S., Bass, R. C., Arkovitz, M. S. und Garcia, V. F.** (1995). Nitric oxide: an overview. *Am J Surg* 170: 292-303.
- [247] **Rodrigues, A. D.** (1994). Use of in vitro human metabolism studies in drug development. *Biochem Pharmacol* 48(12): 2147-2156.
- [248] **Rogg, H., Criscione, L., Truog, A. und Meier, M.** (1985). In vitro comparative studies of the calcium-entry activators YC-170, CGP 28392 and BAY k8644. *J Cardiovasc Pharmacol* 7(Suppl. 6): S 31- S37.
- [249] **Roth, H. J. und Fenner, H.** (1998). Pharmazeutische Chemie III - Arzneistoffe. Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag.
- [250] **Saavedra, J. E., Southan, G. J., Davies, K. M., Lundell, A., Markou, C., Hanson, S. R., Adrie, C., Hurford, W. E., Zapol, W. M. und Keefer, L. K.** (1996). Localizing antithrombotic and vasodilatory activity with a novel, ultrafast nitric oxide donor. *J Med Chem* 39: 4361-4365.
- [251] **Sanders, K. M. und Ward, S. M.** (1992). Nitric oxide as a mediator of nonadren-ergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 262: G379-392.
- [252] **Saran, M. und Bors, W.** (1994). Signalling by $O_2^{\cdot-}$ and NO: how far can either radical, or any specific reaction product, transmit a message under in vivo conditions? *Chem Biol Interact* 90: 35-45.

- [253] **Sato, N., Ohtsuka, M., Koibuchi, Y., Sakai, S., Isono, T., Sudo, Y., Ono, T., Mori, J. und Shibiyama, F.** (1990). Cardiovascular profile of FR900409, a newly synthesized vasodilator, in isolated dog vascular preparations and in anesthetized dogs and rats. *Jpn J Pharmacol* 52, Suppl1: 218.
- [254] **Schleifer, K.-J.** (1991). Nitrososydnonimine eine neue Klasse antithrombotischer NO-Wirkstoffe. Freie Universität Berlin. Berlin. Dissertation.
- [255] **Schmidt, H. H. H. W.** (1994). NO, ein endogener Botenstoff und Zellgift. *Med Monatsschr Pharm* 17(6): 168-185.
- [256] **Schmidt, H. H. H. W., M., L. S. und Walter, U.** (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178: 153-175.
- [257] **Schmidt, H. H. H. W. und Walter, U.** (1994). NO at work. *Cell* 78: 919-925.
- [258] **Schmidt, H. H. H. W., Warner, T. D., Ishii, K., Sheng, H. und Murad, F.** (1992). Insulin-secretion from pancreatic B-cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science* 255: 721-723.
- [259] **Schramm, M., Thomas, G., Towart, R. und Franckowiak, G.** (1983). Activation of calcium channels by novel 1,4-dihydropyridines. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 33: 1268-1272.
- [260] **Schramm, M., Thomas, G., Towart, R. und Franckowiak, G.** (1983). Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. *Nature* 303: 535-537.
- [261] **Schramm, M. und Towart, R.** (1985). Modulation of calcium channel function by drugs. *Life Sci* 37(20): 1843-1860.

- [262] **Schröder, H.** (1985). Untersuchungen zur Strukturabhängigkeit der pharmakologischen Wirkungen organischer Nitrate auf subzellulärer Ebene. Düsseldorf. Düsseldorf. Dissertation.
- [263] **Schröder, H.** (1992). Cytochrome P-450 mediates bioactivation of organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 298-302.
- [264] **Schroeder, R. A. und Kuo, P. C.** (1995). Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Anesth Analg* 81(5): 1052-1059.
- [265] **Schultz, G. und Böhme, E.** (1994). Guanylate cyclase. Methods of enzymatic analysis. H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie. 4: 379-389.
- [266] **Schulz, K., Kerber, S. und Kelm, M.** (1998). A new technique for measurement of nitrite in human blood. Biochemistry and molecular biology of nitric oxide, University of California, Los Angeles, Academic Press, Arch Biochem Biophys, Part B: 101
- [267] **Sebolt-Leopold, J. S., Elliott, W. L., Schowalter, H. D. und Leopold, W. R.** (1993). Rationale for selection of PD 144872, the R isomer of RB 6145, for clinical development as a radiosensitizer. *Proc Am Ass Cancer Res* 34: 362.
- [268] **Seglen, P. O.** (1973). Preparation of rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res* 82: 391-398.
- [269] **Seki, J., Nishio, M., Kato, Y., Motoyama, Y. und Yoshida, K.** (1995). FK409 a new nitric oxide donor, suppresses smooth muscle proliferation in the rat model of balloon angioplasty. *Atherosclerosis* 117(1): 97101-97105.

- [270] **Servent, D., Delaforge, M., Ducroq, C., Mansuy, D. und Lenfant, M.** (1989). Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glycerol trinitrate: involvement of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 1210-1216.
- [271] **Shibata, S., Satake, N., Sato, N., Matsuo, M., Koibuchi, Y. und Hester, R. K.** (1991). Characteristics of the vasorelaxing action of (3E)-4-Ethyl-2-hydroximino-5-nitro-3-hexamide FK409, a new vasodilator isolated from microbial sources, in isolated rabbit arteries. *J Cardiovasc Pharm* 17: 508-518.
- [272] **Shiro, Y., Fujii, M., Iizuka, T., Adachi, S.-I., Tsukamoto, K., Nakahara, K. und Shoun, H.** (1995). Spectroscopic and kinetic studies on reaction of cytochrome P450nor with nitric oxide. *J Biol Chem* 270(4): 1617-1623.
- [273] **Sievers** (1995). NOA 280-Analyzer. Sievers Instruments. Boulder.
- [274] **Singh, R. J., Hogg, N., Joseph, J. und Kalyanaraman, B.** (1995). Photosensitized decomposition of S-nitrosothiols and 2-methyl-2-nitrosopropane. Possible use for site-directed nitric oxide production. *FEBS Lett* 360: 47-51.
- [275] **Smith, D. J., Chakravarthy, D., Pulfer, S., Simmons, M. L., Hrabie, J. A., Citro, M. L., Saavedra, J. E., Davies, K. M., Hutsell, T. C., Mooradian, D. L., Hanson, S. R. und Keefer, L. K.** (1996). Nitric oxide-releasing polymers containing the [N(O)NO]⁻ group. *J Med Chem* 39: 1148-1156.
- [276] **Spatz, M., Yasuma, Y., Strasser, A., Kawai, N., Stanimirovic, D. und Mccarron, R.** (1995). Modulation of striatal dopamine release in cerebral ischemia by L-arginine. *Neurochem Res* 20(4): 491-496.
- [277] **Stadler, J., Trockfeld, J., Schmalix, W. A., Brill, T., Siewert, J. R., Greim, H. und Doehmer, J.** (1994). Inhibition of cytochrome P450 1 A by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 91: 3559-3563.

- [278] **Stamler, J. S.** (1994). Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78: 931-936.
- [279] **Stamler, J. S., Singel, D. J. und Loscalzo, J.** (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
- [280] **Stone, J. R. und Marletta, M. A.** (1995). The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. *Biochemistry* 34: 16397-16403.
- [281] **Stowell, J., C.** (1971). tert.-Alkylnitroso Compounds. Synthesis and dimerization equilibria. *J Org Chem* 36(20): 3055-3056.
- [282] **Stroo, W. E. und Schaffer, S. W.** (1989). Furazolidone-enhanced production of free radicals by avian cardiac and hepatic microsomal membranes. *Toxicol Appl Pharmacol* 98: 81-86.
- [283] **Symons, T., Tocher, J. H., Tocher, D. A. und Edwards, D. I.** (1991). Electrochemical studies of nitroheterocyclic compounds of biological interest. VII. Effect of electrode material. *Free Rad Res Comm* 14(No. 1): 33-40.
- [284] **Szabó, C., Thiemermann, C. und Vane, J. R.** (1993). Dihydropyridine antagonists and agonists of calcium channels inhibit the induction of nitric oxide synthase by endotoxin in cultured macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 196(2): 825-830.
- [285] **Tarpey, M. M., Beckmann, J. S., Ischiropoulos, H., Gore, J. Z. und Brock, T. A.** (1995). Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. *FEBS Lett* 364: 314-318.

- [286] **Taylor, D. K., Bytheway, I., Barton, D. H. R., Bayse, C. A. und Hall, M. B.** (1995). Toward the generation of NO in biological systems. Theoretical studies of the N₂O₂ grouping. *J Org Chem* 60: 435-444.
- [287] **Testa, B. und Caldwell, J.** (1995). The metabolism of drugs and other xenobiotics-biochemistry of redox-reactions, Academic Press.
- [288] **Thoma, K. und Kerker, R.** (1992). Photoinstabilität von Arzneimitteln. *Pharm Ind* 54 Nr.5: 465-468.
- [289] **Thomas, G. und Ramwell, P. W.** (1992). Endothelium derived relaxing factor and the vascular role of guanidino compounds. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 584-589.
- [290] **Tikkanen, I. und Fyhrquist, F.** (1995). Nitric oxide in hypertension and renal diseases. *Ann Med* 27(3): 353-357.
- [291] **Tocris** (1996). Nitric oxide research tools. Internet. www.tocris.com/nitrox.htm.
- [292] **Triggle, D. J. und Swamy, V. C.** (1983). Calcium antagonists: some chemical-pharmacological aspects. *Circ Res* 52(2): Suppl. I 17- I 28.
- [293] **Tsai, A.-L.** (1994). How does NO activate heme proteins ? *FEBS Lett* 341: 141-145.
- [294] **Tsikis, D., Böger, R. H., Bode-Böger, S. M., Brunner, G. und Frölich, J. C.** (1995). Formation of S-nitroso compounds from sodium nitroprusside, nitric oxide or nitrite and reduced thiols: analysis by capillary isotachopheresis. *J Chromatogr* 699: 363-369.

- [295] **Tsuchiya, K.** (1998). Sensitive quantitation of nitric oxide by EPR spectroscopy. *Biochemistry and molecular biology of nitric oxide*, University of California, Los Angeles, Academic Press, Arch Biochem Biophys, Part B: 102
- [296] **Uppu, R. M., Squadrito, G. L., Cueto, R. und Pryor, W. A.** (1996). Selecting the most appropriate synthesis of peroxynitrite. *Methods in Enzymology*. J. N. Abelson and M. I. Simon. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press. 269: 285-295.
- [297] **Vallance, P., Patton, S., Bhagat, K., McAllister, R., Radomski, M., Moncada, S. und Malinski, T.** (1995). Direct measurements of nitric oxide in human beings. *Lancet* 346: 1543-154.
- [298] **Vanin, A. F.** (1995). On the stability of the dinitrosyl-iron-cysteine complex, a candidate for the endothelium-derived relaxation factor. *Biochemistry (Moscow)* 60(2): 225-230.
- [299] **Vargas, F., Rivas, C. und Machado, R.** (1992). Photodegradation of nifedipine under aerobic conditions: evidence of formation of singlet oxygen and radical intermediate. *J Pharm Sci* 81(4): 399-400.
- [300] **Villamil, S. H. F., Dubin, M., Brusa, M. A., Duran, R. P., Perisinotti, L. J. und Stoppani, A. O. M.** (1990). Generation of radical anions of nifurtimox and related nitrofurans compounds by ascorbate. *Free Rad Res Comm* 10(6): 351-360.
- [301] **Vroomen, L. H. M., Groten, J. P., van Muiswinkel, K., van Velduizen, A. und van Bladeren, P. J.** (1987). Identification of a reactive intermediate of furazolidone formed by swine liver microsomes. *Chem-Biol Interact* 64: 167-179.
- [302] **Vroomen, L. H. M., van Ommen, B. und van Bladeren, P. J.** (1987). Quantitative studies of the metabolism of furazolidone by rat liver microsomes. *Toxicol in Vitro* 1(2): 97-104.

- [303] **Walton, M. I. und Workmann, P.** (1987). Nitroimidazole bio-reductive metabolism. *Biochem Pharmacol* 36(6): 887-896.
- [304] **Wascher, T. C., Bacherneegg, M., Kickenweiz, E., Stark, G., Stark, U., Toblak, H., Graier, W. F. und Krejs, G. J.** (1995). Elevation of D-glucose impairs coronary artery autoregulation after slight reduction of coronary flow. *Eur. J. Clin. Invest.* 25: 590-594.
- [305] **Williams, D. L. H.** (1996). The mechanism of nitric oxide formation from S-nitrosothiols. *Chem Commun*: 1085-1091.
- [306] **Williams, D. L. H.** (1996). S-Nitroso compounds, formation, reactions and biological activity, John Wiley & Sons Ltd.
- [307] **Wink, D. A., Feelisch, M., Fukuto, J., Chistodoulou, D., Jourd'heuil, D., Grisham, M. B., Vodovotz, Y., Cook, J. A., Krishna, M., DeGraff, W. G., Kim, S. M., Gamson, J. und Mitchell, J. B.** (1998). The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch Biochem Biophys* 351(1): 66-74.
- [308] **Wink, D. A., Nims, R. W., Darbyshire, J. F., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G. W., Laval, F., Laval, J., Cook, J. A., Krishna, M. C., DeGraff, W. G. und Mitchell, J. B.** (1994). Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* 7: 519-525.
- [309] **Wink, D. A., Osawa, Y., Darbyshire, J. F., Jones, C. R., Eshenaur, S. C. und Nims, R. W.** (1993). Inhibition of cytochromes P-450 by nitric oxide and nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 300: 115-123.

- [310] **Yagil, G. und Anbar, M.** (1964). The formation of peroxynitrite by oxidation of chloramine, hydroxylamine and nitrohydroxamate. *J Inorg Nucl Chem* 26: 453-460.
- [311] **Yamada, H., Yoneyama, F., Satoh, K. und Taira, N.** (1991). Comparison of the effects of the novel vasodilator FK 409 with those of nitroglycerin in isolated coronary artery of the dog. *Br J Pharmacol* 103: 1713-1718.
- [312] **Yang, C. S., Yoo, J.-S. H., Ishizaki, H. und Hong, J.** (1990). Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab Rev* 22: 147-158.
- [313] **Yang, F., Troncy, E., Francoeur, M., Vinet, B., Vinay, P., Czaika, G. und Blaise, G.** (1997). Effects of reducing agents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence. *Clin Chem* 43(4): 657-662.
- [314] **Youngman, R. J., Osswald, W. F. und Elstner, E. F.** (1982). Mechanisms of oxygen activation by nitrofurantion and relevance to its toxicity. *Biochem Pharmacol* 31(23): 3723-3729.
- [315] **Yuan, S. Y., Bornstein, J. C. und Furness, J. B.** (1995). Pharmacological evidence that nitric oxide may be a retrograde messenger in the enteric nervous system. *Br J Pharmacol* 114: 428-432.
- [316] **Zhang, J. und Snyder, S. H.** (1995). Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 213-233.
- [317] **Zhao, X.-J., Sampath, V. und Caughey, W. S.** (1995). Cytochrome c oxidase catalysis of the reduction of nitric oxide to nitrous oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 212(3): 1054-1060.

- [318] **Zweier, J. L., Wang, P., Samouilov, A. und Kuppusamy, P.** (1995). Enzymatic/non-enzymatic formation of nitric oxide. *Nature Med* 1(11): 1103-1104.
- [319] **Zweier, J. L., Wang, P., Samouilov, A. und Kuppusamy, P.** (1995). Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nature Med* 1(8): 804-809.

Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Themas, die stete Gesprächsbereitschaft und Förderung danke ich Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein sehr herzlich.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises danke ich für die Unterstützung. Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts der Freien Universität Berlin, insbesondere bei Frau Christman-Oesterreich, Herrn Prof. Dr. G. Wurm, Herrn Prof. Dr. K. Rehse, für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. D. Koesling und Herrn Prof. Dr. G. Schulz und ihrem Arbeitskreis am Institut für Pharmakologie der FU Berlin für die großzügige Bereitschaft zur Nutzung der Apparaturen des Guanylylcyclase-Assays, für die Anleitung hierzu insbesondere Herrn J. Malkewitz. Für anregende Diskussionen und ihr Engagement danke ich sehr herzlich Frau Prof. Dr. D. Koesling.

Der gesamten Abteilung NO-Forschung der Firma Schwarz-Pharma möchte ich recht herzlich danken, insbesondere Herrn Dr. M. Feelisch, der mir die Durchführung des Oxyhämoglobin-Assays ermöglichte, ebenso Herrn Dr. R. Spahr und Herrn Dr. K. Knüttel.

Julius und Gerald danke ich für ihre Geduld und Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Christin Erbach, geb. Schellenberger

Geburtsdatum: 10.3.1968

Geburtsort: Hamburg

Eltern: Renate Schellenberger, geb. Mosolfsky
Volker Bernd Schellenberger

Kinder: Julius Erbach

Schulen: 1974-1980 Carl-Orff-Grundschule
1980-1987 Hildegard-Wegscheider-Oberschule

Studium: 1987 Beginn des Chemiestudiums, FU-Berlin
1988-1993 Pharmaziestudium, FU-Berlin

Assistententätigkeit: WS 94/95 Lehrauftrag, FU-Berlin
1995-1996 wissenschaftl. Mitarbeiterin, FU-Berlin
1996 wissenschaftl. Mitarbeiterin, Univ. Hamburg