

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.

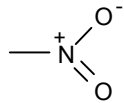
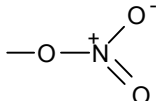
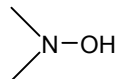
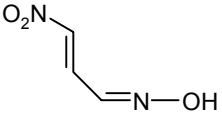
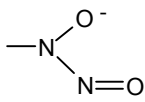
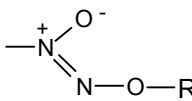
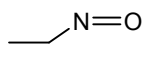
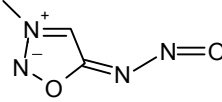
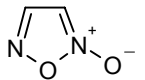
Strukturmerkmal	Strukturformel
Nitro-Verbindung	
Nitrat	
Hydroxylamin	
Hydroxyimin (mit vinyloger NO ₂ -Gruppe)	
NONOat (Diazeniumdiolat)	
alkyliertes NONOat (alkyl. Diazeniumdiolate)	
C-Nitroso-Verbindung	
Nitrososydnonimin	
Furazan-2-oxid (Furoxan)	

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).