

**Aus dem Institut der Physiologie  
Abteilung für Herz- und Kreislaufphysiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Schrader**

---

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN  
ZUR IDENTITÄT DES  
ENDOTHELIUM-DERIVED RELAXING FACTOR  
(EDRF)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Marc te Poel

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt  
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Deussen  
Korreferent: Prof. Dr. Kelm

# INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>A</u></b>	<b><u>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</u></b> .....	1
<b>A.1</b>	<b>Der "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF). Historischer Überblick</b>	2
A.1.1	Erstbeschreibung des EDRF .....	2
A.1.2	Die Suche nach der chemischen Identität des EDRF. ....	2
A.1.2.1	<i>Untersuchungen von 1980 bis 1986</i> .....	3
A.1.2.2	<i>Stickstoffmonoxid als biologischer Mediator. NO-Synthase</i> .....	3
A.1.3	Die Kontroverse über die chemische Identität des EDRF .....	6
A.1.3.1	<i>Übereinstimmungen mit Hydroxylaminen</i> .....	7
A.1.3.2	<i>Übereinstimmungen mit S-Nitrosothiolen und S-nitrosylierten Proteinen</i> .....	8
A.1.3.3	<i>Übereinstimmungen mit dem Dinitrosyl-Eisen(II)-L-Cystein Komplex</i> .....	10
A.1.1.4	<i>Anmerkungen zur Nitroxyl-Theorie</i> .....	11
<b>A.2</b>	<b>Mechanismus der endothelabhängigen Gefässdilatation durch den EDRF</b>	13
<b>A.3</b>	<b>Problemstellung</b> .....	16
<b><u>B</u></b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b> .....	18
<b>B.1</b>	<b>Zubereitung der Testlösungen</b> .....	18
B.1.1	Wässrige NO-Lösungen .....	18
B.1.2	Hydroxylamin-Lösungen .....	19
B.1.3	S-Nitrosothiol-Lösungen .....	20
B.1.3.1	<i>Synthese der S-Nitrosothiole von Cystein, Cysteamin, N-Acetyl-DL-Cystein, L-Homocystein und Glutathion.</i> .....	20
B.1.3.2	<i>Synthese des N-Acetyl-DL-penicillaminthionitrits</i> .....	21
B.1.3.3	<i>Synthese des S-nitrosylierten humanen Serumalbumin</i> .....	22
B.1.4	Dinitrosyl-Eisen(II)-L-Cystein Komplex (DNIC)-Lösungen .....	23
B.1.5	Herstellung und Gehaltsbestimmung der Oxyhämoglobin-(HbO <sub>2</sub> )-Lösung .....	23
B.1.6	Sonstige Zubereitungen .....	24

<b>B.2</b>	<b>Endothelzellkultur und Füllung der Zellsäule</b> .....	24
B.2.1	Gewinnung des Zellkulturmaterials .....	24
B.2.2	Ansetzen der Zellkultur .....	25
B.2.3	Beladen der Zellsäule mit Endothelzellen .....	27
<b>B.3</b>	<b>Die Superfusions-Bioassay-Kaskade</b> .....	28
B.3.1	Krebs-Henseleit Pufferlösung .....	29
B.3.2	Entnahme und Präparation der Kaninchenaorten .....	29
B.3.3	Aufbau der Superfusions-Kaskade .....	31
B.3.4	Methodische Vorarbeiten .....	33
B.3.5	Ablauf eines typischen Bioassay-Experimentes .....	34
<i>B.3.5.1</i>	<i>Vorbereitungen, Kalibrierung</i> .....	34
<i>B.3.5.2</i>	<i>Experimente ohne Endothelzellsäule</i> .....	35
<i>B.3.5.3</i>	<i>Experimente mit Endothelzellsäule</i> .....	35
<i>B.3.5.4</i>	<i>Experimente mit Koinfusionen</i> .....	36
<b>B.4</b>	<b>Auswertung der Experimente</b> .....	36
B.4.1	Halbwertzeiten .....	36
B.4.2	Relaxationsdauer .....	37
B.4.3	Vasorelaxierende Potenz .....	38
B.4.4	Änderung der kinetischen Charakteristika durch Koinfusionen .....	38
B.4.5	Statistik .....	38
<b><u>C</u></b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	39
<b>C.1</b>	<b>Experimente ohne Koinfusionen. Vorselektion der EDRF-Kandidaten.</b> ....	39
C.1.1	Basal und nach Bradykininstimulation freigesetzter EDRF .....	39
C.1.2	Stickstoffmonoxid .....	41
C.1.3	S-Nitrosothiole, Vergleich S-Nitroso-L- und D-Cystein .....	42
C.1.4	S-Nitrosyliertes humanes Serumalbumin .....	44
C.1.5	Hydroxylamin .....	46
C.1.6	Dinitrosyl-Eisen-Cystein Komplex .....	46
<b>C.2</b>	<b>Vergleich der kinetischen Charakteristika.</b> .....	48

<b>C.3</b>	<b>Beeinflussung der kinetischen Charakteristika durch Koinfusionen</b> . . . . .	52
C.3.1	Oxygeniertes Hämoglobin . . . . .	52
C.3.2	Ascorbinsäure, Pyrogallol, Quecksilberacetat, SOD und EDTA . . . . .	55
C.3.3	Niedermolekulare Thiole und Humanalbumin . . . . .	57
C.3.3.1	<i>L- bzw. D-Cystein</i> . . . . .	58
C.3.3.2	<i>L-Homocystein, Glutathion und Humanalbumin</i> . . . . .	61
<b><u>D</u></b>	<b><u>DISKUSSION</u></b> . . . . .	64
<b>D.1</b>	<b>Experimente ohne Koinfusionen</b> . . . . .	65
D.1.1	Vasorelaxierende Potenz . . . . .	65
D.1.2	Halbwertzeiten . . . . .	66
D.1.3	Relaxationsdauer . . . . .	68
<b>D.2</b>	<b>Experimente mit Koinfusionen</b> . . . . .	69
<b><u>E</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b> . . . . .	76
<b><u>F</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b> . . . . .	77
	<b><u>DANKSAGUNGEN</u></b> . . . . .	102

## A

### EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stellen - nach dem Rückgang der Infektionskrankheiten in der sog. dritten Welt - weltweit z.Zt. die wichtigste Todesursache dar <sup>40</sup>. Trotz jahrzehntelanger Grundlagenforschung auf diesem Gebiet sind bis heute weder alle physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge geklärt, noch einheitliche therapeutische Strategien zu den verschiedenen Krankheitsbildern gefunden worden. Insbesondere die der Regulation des arteriellen und venösen Gefäßtonus zugrunde liegenden physiologischen Mechanismen und deren pharmakologische Beeinflussung stehen seit Jahrzehnten im Mittelpunkt des wissenschaftlichen und klinischen Interesses. Pharmakologischerseits exemplarisch genannt werden sollen die seit über 150 Jahren erforschten und empirisch eingesetzten Vasodilatoren aus der Gruppe der sog. "Organischen Nitrate". Der älteste Vertreter, das Nitroglycerin (korrekt Glyzeroltrinitrat) wurde erstmalig 1846 durch den Turiner Chemiker Ascanio Sobero synthetisiert <sup>175</sup> und ist seitdem Standardmedikation insbesondere zur Behandlung der Angina pectoris. Tatsächlich ist es aber erst vor wenigen Jahren gelungen, die involvierten metabolischen Prozesse und Wirkungsmechanismen dieser wichtigen Substanzgruppe aufzudecken. Ein entscheidender Beitrag resultierte aus der 1980 erstmalig beschriebenen Beobachtung, daß dem intakten Endothel eine wesentliche Rolle für die Regulation sowohl des arteriellen als auch des venösen Gefäßtonus zukommt <sup>61</sup>. Eine Vielzahl von wissenschaftlichen Diskussionen und neuen Forschungsprojekten befaßten sich daher in den letzten Jahren mit der Funktion des Endothels und insbesondere den dort synthetisierten und freigesetzten Substanzen, z.B. dem „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) oder dem Endothelin. Diesen Untersuchungen folgten inzwischen eine immense Anzahl neuer revolutionärer Erkenntnisse bzgl. der Physiologie und Pathophysiologie des Herz- Kreislaufsystems. Aber auch andere Gebiete, z.B. die neurophysiologische Forschung <sup>174</sup>, profitierten von den Entdeckungen <sup>1,26,31,72,86,142,143,145,158,167,176</sup>. Im Zusammenhang mit der Erforschung der Wirkungsweise des EDRF konnte schließlich sogar ein völlig neues biologisches Signaltransduktionssystem aufgedeckt werden, der sogenannte L-Arginin: Stickstoffmonoxid-Stoffwechselweg <sup>129</sup>. Trotz der beeindruckenden Fortschritte konnte bislang über einige wesentliche physiologische Zusammenhänge, insbesondere über die Identität des EDRF, keine Einigung erzielt werden. Soweit es die seit 1980 umstrittene Identität des EDRF betrifft, wird die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zu deren Klärung liefern.

Durch die neuen Erkenntnisse insgesamt dürfen für die Zukunft Optimierungen und Neuerungen der medikamentösen Therapie einiger Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems <sup>115</sup>, beispielsweise der essentiellen arteriellen Hypertonie <sup>30,150,157,182,187</sup>, der koronaren Herzerkrankung (KHK) <sup>73,75b</sup>, der Atherosklerose <sup>20,63,102</sup> aber auch im Bereich der Thromboseprophylaxe zu erwarten sein <sup>21,132,197</sup>. Es gelang bereits deren Ätiologie und Pathogenese teilweise aufzudecken, mit weiteren Erkenntnissen darf gerechnet werden.

Zunächst soll im Folgenden ein historischer Überblick bzgl. der Entdeckung, Untersuchungen zur Identifizierung und anhaltenden Diskussion über die Identität des EDRF gegeben werden.

## A.1                    Der „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF). Historischer Überblick

### A.1.1                Erstbeschreibung des EDRF

Im Rahmen von wissenschaftlichen Untersuchungen über die physiologische Regulation des Gefäßtonus durch vasoaktive Substanzen berichteten Furchgott und Zawadzki im Jahre 1980 über entscheidende Beobachtungen<sup>61</sup>: Es gelang ihnen, einen bis dato nicht zu klärenden Widerspruch bei den vasoaktiven Wirkungen des Azetylcholins (ACh) in *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten aufzuklären. Es war bekannt, daß der vasokonstringierend wirkende Neurotransmitter Noradrenalin seine Wirkung direkt über spezielle Rezeptoren an den glatten Muskelzellen der Gefäße entfaltet. Ähnliche Rezeptoren wurden an gleicher Stelle auch für das ACh vermutet. ACh führt *in vivo* zu einer deutlichen Gefäßdilatation, *in vitro*-Experimente mit isolierten Gefäßpräparationen zeigten dagegen keine durchgehende Relaxation der exponierten Gefäßstreifen bzw. -ringe<sup>61</sup>. Furchgott und Zawadzki gelang es nun nachzuweisen, daß die unterschiedliche Sorgfalt bei der Präparationen der Gefäßstreifen bzw. -ringe hierfür verantwortlich war. Das Reiben der Intimaoberfläche (Endothel) gegen fremde Oberflächen während der Präparation führte zu einer Zerstörung der Endothelzellschicht und nachfolgend zum Verlust der Relaxationsfähigkeit nach ACh-Stimulation. Bei vorsichtiger Präparation der Gefäße unter Schonung des Endothels waren in allen Fällen eine aus den *in vivo*-Experimenten bekannte Vasorelaxation durch ACh zu beobachten. Die Autoren wiesen nach, daß ACh über muscarinerge Rezeptoren an den Endothelzellen die Freisetzung einer oder mehrerer labiler humoraler Faktoren aus dem Endothel stimuliert, welche dann die Relaxation der glatten Media-Gefäßmuskulatur bewirkt. Eine Identifizierung dieser Substanz gelang zunächst nicht, die unbekannte Substanz erhielt den deskriptiven Namen „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF; deutsch: aus dem Endothel stammender Entspannungsfaktor)<sup>57</sup>. Verständlicherweise waren diese Beobachtungen von großem Interesse, da man bis dato diesbezüglich keine derartig komplexe Syntheseleistungen des Endothels vermutete. Fernerhin handelte es sich bei diesem Faktor um einen der potentesten bis dahin bekannten Vasodilatoren. Es folgten zahlreiche Experimente und Hypothesen verschiedenster Untersuchergruppen mit dem Ziel, die Identität des EDRF aufzudecken.

### A.1.2                Die Suche nach der chemischen Identität des EDRF

In den darauf folgenden Jahren konnten mit Hilfe unterschiedlicher pharmakologischer Methoden, insbesondere Bioassays mit Aortenringen und -streifen unterschiedlicher Tierspezies als EDRF-Donor bzw. Detektor (Kaninchen, Rind etc.), neue Erkenntnisse über die chemischen und biologischen Eigenschaften des EDRF gewonnen und einige Theorien über dessen chemische Natur widerlegt werden.

### A.1.2.1 *Untersuchungen von 1980 bis 1986*

Endothelial freigesetzte Prostaglandine<sup>61,131,139</sup> sowie Metabolite des Arachidonsäure / Lipoxigenaseweges<sup>28,51,64,69,173</sup> und des Zytochrom P-450 Enzymsystems<sup>116,152</sup> konnten als EDRF-Kandidaten relativ schnell ausgeschlossen werden. Parallel wurden neben ACh zahlreiche andere Stimulatoren der EDRF-Freisetzung, z.T. rezeptorvermittelt, beschrieben. Einige wichtige sind Histamin, Serotonin, Adeninnukleotide (ADP, ATP), Thrombin, das Calciumionophore A23187 sowie das bei späteren Experimenten häufig eingesetzte Bradykinin<sup>58,69</sup>. Neben einer permanenten geringfügigen basalen Freisetzung des EDRF aus den Endothelzellen<sup>59,71,119</sup>, wurde nachgewiesen, daß sich eine EDRF-Ausschüttung insbesondere über hohe arterielle Scherkräfte<sup>164</sup> (Fluß → Schubspannung) sowie durch Gewebhypoxie<sup>23,34</sup> induzieren läßt (Abb. 1, S. 14). Durch die Verwendung von Endothelzellkulturen war man bald nicht mehr alleine auf isolierte Gefäßpräparate (Donorgefäße) als EDRF-Quelle angewiesen. Die nun zur Verfügung stehenden EDRF-Konzentrationen übertrafen diejenigen aus Gefäßpräparaten<sup>8,29,33</sup>.

Trotz dieser Fortschritte gelang die Identifizierung weiterhin nicht. Wesentlich bedingt war dies durch die kurze Halbwertszeit des EDRF von wenigen Sekunden. Dennoch wurden zumindest entscheidende charakteristische biologische und chemische Eigenschaften dieses Faktors aufgedeckt. So zeigte sich, daß der EDRF, je nach Methodik, eine nur wenige Sekunden betragende biologische Halbwertszeit *in vitro* besitzt (zwischen ca. 3 - 50 s)<sup>6,29,69,82,130,165</sup> und seine Wirkungen durch Oxyhämoglobin, Methylen-Blau<sup>42,58,121</sup>, Albumin<sup>52</sup>, Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Eisenionen (Fe<sup>2+</sup>)<sup>71,165</sup> sowie durch Hyperoxygenierung<sup>165</sup> der verwendeten oxygenierten physiologischen Pufferlösungen abgeschwächt wird. Insbesondere die abschwächenden Wirkungen des Oxyhämoglobins und der Superoxid-Anionen wurden für weitere Studien bevorzugt genutzt.

### A.1.2.2 *Stickstoffmonoxid als biologischer Mediator. NO-Synthase.*

Ein wichtiger Schritt gelang Ignarro et al. und Förstermann et al. Im Jahre 1986 durch den Nachweis, daß aus Donorgefäßen freigesetzter EDRF die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) über die Aktivierung der glattmuskulären löslichen Guanylatcyclase stimuliert. Über diesen wichtigen sekundären Botenstoff für Neurotransmitter und Hormone wird nachfolgend die Relaxierung der Gefäßmuskulatur vermittelt<sup>50,90</sup>. Die Beobachtung ließ sich kurz darauf auch für aus Endothelzellkulturen freigesetzten EDRF bestätigen<sup>133</sup>. Dies war deshalb von großer Bedeutung, da seit vielen Jahren parallel durchgeführte Untersuchungen zum Mechanismus der Gefäßerweiterung durch organische Nitrovasodilatoren<sup>144</sup> (Nitroglycerin u.a. organischen Nitrate) zeigen konnten, daß der gemeinsame aktive Metabolit Stickstoffmonoxid (NO) die vasorelaxierende Wirkung vermittelt und dies ebenfalls über eine Aktivierung der glattmuskulären löslichen Guanylatcyclase ge-

schieht <sup>46,100,126,135,136,156</sup>. Furchgott stellte etwa zur selben Zeit die Hypothese auf, daß der EDRF möglicherweise identisch mit dem Stickstoffmonoxid (NO) sei <sup>55,57</sup>. Unabhängig voneinander demonstrierten Furchgott und Ignarro 1987 deutliche Übereinstimmungen des EDRF und Stickstoffmonoxids bzgl. des relaxierenden Verhaltens an isolierten Gefäßpräparaten <sup>87,107</sup>. Unter anderem wurde dabei, wie in der vorliegenden Arbeit, eine Superfusions-Bioassay-Kaskade verwendet.

Diese Erkenntnis war äußerst unerwartet, da NO bei Atmosphärendruck gasförmig sowie als freies Radikal äußerst reaktionsfreudig und hochtoxisch ist. In wäßriger Lösung ist NO äußerst instabil und oxidiert schnell zu Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Ferner handelt es sich um eine anorganische Verbindung, verglichen mit dem komplexen Aufbau anderer "Botenstoffe" in ähnlichen entscheidenden physiologischen Funktionen des Organismus daher also um eine geradezu schlichte Substanz.

Tatsächlich gelang es schließlich Palmer et al. 1987 die EDRF / NO-Hypothese durch weitere Experimente zu stärken: Aus Schweineendothelzellkulturen mittels Bradykininstimulation freigesetztes EDRF wurde in seinen vasorelaxierenden Eigenschaften auf einer Bioassay-Kaskade direkt mit NO-Lösungen verglichen. Gleichzeitig erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode eine NO-Gehaltsbestimmung des Effluates. Die Endothelzellen setzten NO frei und es war in seiner biologischen Aktivität und Stabilität nicht vom EDRF zu unterscheiden <sup>82,149</sup>. Die durch beide Substrate ausgelösten biologischen Effekte konnten ebenfalls durch Beimengung von o.g. EDRF-Inhibitoren (u.a. Oxyhämoglobin) zu den verwendeten Pufferlösungen in vergleichbarem Ausmaß abgeschwächt werden <sup>132</sup>.

Nachfolgend konnte eine NO-Freisetzung aus den Endothelzellen verschiedener Tierspezies und einer Reihe unterschiedlicher Gefäßpräparate demonstriert werden. Neben Pulmonalarterien und -venen von Schweinen <sup>87</sup> und den zuvor genannten Kaninchenarterien gelang der Nachweis u.a. auch an isolierten perfundierten Kaninchen-<sup>2</sup> und Schweineherzen <sup>104</sup> sowie in Schweineendothelzellkulturen <sup>103</sup>. Etwa zur gleichen Zeit war neben der vasodilatatorischen eine weitere Eigenschaft des EDRF aufgedeckt worden. Sowohl EDRF als auch NO hatten einen hemmenden Einfluß auf die Thrombozytenaggregation <sup>10,21,62,153,154</sup>. In beiden Fällen führte eine Aktivierung der löslichen Thrombozytenguanylatcyclase über die Erhöhung der cGMP-Spiegel zu einer Aggregationshemmung. Die Guanylatcyclase katalysiert die stöchiometrische Umwandlung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) <sup>44,135</sup>. Ignarro konnte im Jahre 1989 demonstrieren, daß die lösliche Guanylatcyclase letztendlich durch Reaktion des NO mit der Eisen-Hämproteinkomponente des Enzyms zu einem Nitrosyl-(NO-Häm) Addukt reagiert und durch die nachfolgende Änderung der räumlichen Konfiguration aktiviert wird <sup>84</sup>.

Nachdem der prinzipielle Wirkungsmechanismus von NO geklärt war, ergab sich zwangsläufig die Frage nach der biologischen Quelle für NO. Aus anderen wissenschaftlichen Untersuchungen gewonnene Erkenntnisse waren bei der Lösung dieser Frage richtungsweisend. Bis 1981 war die

Meinung vorherrschend, daß Nitrate und Nitrite vom Menschen im wesentlichen mit der Nahrung aufgenommen würden<sup>5,16</sup>. Green et al. konnten 1981 jedoch zeigen, daß eine deutliche Nitratexkretion im Urin selbst unter nitratarmer Diät beim Menschen<sup>67</sup> und bei Ratten<sup>68</sup> zu beobachten ist. Weiterhin wurde bei nachfolgenden Untersuchungen eine deutliche Erhöhung der Nitratexkretion während entzündlicher Erkrankungen und nach bakteriellen Endotoxingaben<sup>195</sup> beobachtet. Schließlich wurde beobachtet, daß Makrophagen als Quelle zur Nitratproduktion dienen können<sup>95,180</sup>. Hibbs et al. beobachteten 1987 in Studien über die Abtötung von Bakterien und Tumorzellen durch Makrophagenkulturen, daß bei Abwesenheit der Aminosäure Arginin im Kulturmedium deren zytotoxische Wirkung verschwand. Sie beschrieben anschließend eine Umsetzung des Substrates Arginin in Citrullin unter stöchiometrischer Entstehung von Nitrit und Nitrat<sup>77,78</sup>. Nachfolgend identifizierten beide Gruppen als Zwischenprodukt bzw. Nitrit- und Nitratquelle Stickstoffmonoxid, welches auch für die zytotoxische Wirkung der Makrophagen verantwortlich war.

Palmer et al. zeigten 1988, daß Endothelzellkulturen, denen L-Arginin 24 h vor den Experimenten aus dem Medium entzogen wurde, nach Stimulation mit Bradykinin eine deutlich geringere Vasorelaxation an Gefäßpräparaten auslösten. Durch L-Arginin-Koinfusionen während der Experimente war der ursprüngliche Effekt wiederherstellbar, D-Arginin zeigte dagegen keine Wirkung<sup>148</sup>. Mit Hilfe der Massenspektrometrie und einer Verwendung von [<sup>15</sup>N]L-Arginin konnten sie ferner zeigen, daß <sup>15</sup>NO durch ein spezifisches Enzym von einem der terminalen Guanidino-Stickstoff-Atome des L-Arginins gebildet wird. Die NO-Synthese aus L-Arginin wurde von verschiedenen Gruppen bestätigt. Das spezifische Enzym wurde NO-Synthase (NOS) benannt (Abb. 1, S. 14)<sup>22,122,129,131,191</sup>.

Über immunhistochemische Färbemethoden und molekularbiologische Verfahren konnten alsbald drei NO-Synthase-Isoenzyme (eNOS, nNOS, iNOS) in speziellen Zellen unterschiedlicher Organe und Körpersysteme lokalisiert werden. Bevorzugte Lokalisationen waren neben den Endothelzellen (eNOS: e = endothelial) insbesondere das zentrale und periphere Nervensystem (nNOS: n = neuronal). Das dritte Isoenzym ließ sich im Rahmen entzündlicher Prozesse in verschiedenen Zellen (u.a. Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Kuppfer-Zellen und Hepatozyten) nachweisen. Dieses Isoenzym wird nach Stimulation des Immunsystems (Zytokine, Endotoxine, Tumornekrosefaktor) sekundär induziert (iNOS: i = inducible)<sup>16,27,146,198</sup>. Während eNOS und nNOS Calcium-abhängig sind, gilt dies für iNOS nicht. Gemeinsam ist allen Isoenzymen, daß sie zur Aktivierung folgende Kofaktoren benötigen: NADPH, Flavin-Mononukleotide, Flavin-Adenin-Dinukleotide und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>)<sup>19</sup>. Es zeigte sich, daß Arginin-Analoga (N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin: L-NMMA; N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin Methyl-ester: L-NAME), die als Antimetabolite fungieren, als Hemmstoffe der NO-Synthase eingesetzt werden konnten. Hiermit gelang es einige wichtige Funktionen und die Bedeutung des Argininmetabolismus (L-Arginin: NO-Stoffwechsel) *in vivo* zu studieren. Auf die differenzierten Eigenschaften dieser Isoenzyme und deren molekulare Struktur kann aus Platzgründen nicht näher eingegangen werden.

Festgehalten werden kann, daß durch die Entdeckung und Erforschung des EDRF ein völlig neuartiger und komplexer physiologischer Regulationsmechanismus, der "L-Arginin: NO-Stoffwechselweg" <sup>129</sup>, aufgedeckt wurde. Das NO erfüllt ferner die Kriterien eines biologischen Mediators wie sie von Dale 1933 definiert wurden <sup>32</sup>. Bzgl. des EDRF lagen einige schlüssige Erkenntnisse vor, daß er mit NO identisch sein könnte. Die Diskussion über die Identität war jedoch, wie nachfolgend ausgeführt, keineswegs beendet <sup>18,159</sup>.

### A.1.3 Die Kontroverse über die chemische Identität des EDRF

Einige Untersucher konnten mit Hilfe verschiedener Methoden scheinbar abweichende Eigenschaften von NO und EDRF herausarbeiten. Angesichts der extremen Instabilität des NO erschien vielen Autoren die Stabilisierung *in vivo* zum Erhalt der biologischen Funktion notwendig. Wesentliche Theorien besagten, daß EDRF entweder eine Vorstufe des aktiven Metaboliten NO sein müsse, er alternativ eine völlig andersartige chemische Natur habe oder daß multiple EDRF's existieren müßten <sup>52,166</sup>. Bzgl. der bereits erwähnten deutlich variierenden Halbwertzeiten (3-50 s) des EDRF's und NO ist anzumerken, daß die beiden Substanzen meist nicht direkt vergleichend untersucht oder die HWZ mit Hilfe unterschiedlicher Methoden ermittelt wurden. Da die Inaktivierung sowohl vom EDRF als auch von NO u.a. stark vom O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Gehalt der Pufferlösungen abhängig ist (Oxidation zu Nitrit und Nitrat), sind abweichende Resultate je nach Ausgangsbedingung zu erwarten <sup>131</sup>. Es hat ferner zahlreiche Versuche gegeben, NO und den EDRF über indirekte chemische Meßmethoden miteinander zu vergleichen. Die Resultate waren jedoch meist aufgrund der Instabilität beider Substanzen und dem u.a. zeitlichen Aufwand für die komplizierten Meßtechniken, sehr unterschiedlich. Praktisch wurde NO meist nicht direkt, sondern nur indirekt über die Abbauprodukte Nitrit und Nitrat bestimmt, welche jedoch selbst nicht bioaktiv sind.

Beachtung bei den Kritikern der "NO-Theorie" fanden Experimente mit Anionen-Austauschsäulen. Von Cocks et al. (1985) sowie Long et al. (1987) wurde berichtet, daß der EDRF derartigen Säulen nicht passieren, d. h. mit den Säulen reagieren würde <sup>29,113</sup>. Long et al. (1987) bestätigten dies für EDRF, konnten aber keine Reaktion bei Verwendung von NO feststellen. Daher wurde geschlossen, daß EDRF und NO nicht identisch sein könnten. Andere Untersucher aber widerlegten später diese Beobachtung und demonstrierten, daß bei Verwendung ausreichend hoher Konzentrationen NO durchaus mit Anionen-Austauschsäulen reagiert <sup>106</sup>. Ähnlich unterschiedlich fielen vergleichende Untersuchungen mit Hilfe der paramagnetischen Resonanz-Spektroskopie aus. Auch hier waren komplizierte, schwer zu interpretierende chemische Reaktionen zur Detektion notwendig. Fehlerquellen waren mannigfaltig gegeben und ein direkter Vergleich der Substanzen nur eingeschränkt möglich <sup>39,160,192</sup>.

Einige Autoren berichteten, EDRF vermöge lediglich die glatte Muskulatur der Gefäße zu relaxieren, NO dagegen auch beispielsweise die glattmuskulären Zellen der Tracheawand und der *Taenia coli*<sup>41,171</sup>. Fraglich blieb aber, ob äquipotente Konzentrationen beider Substanzen verglichen wurden. Tatsächlich konnten verschiedene Experimentatoren später diese Beobachtungen widerlegen<sup>17,60</sup>. Murray et al. (1986) demonstrierten die vermeintliche Stabilisierung des EDRF im sauren Milieu und führten eine chromatografische Charakterisierung durch<sup>138</sup>. Anscheinend handelte es sich dabei aber artifiziell um  $\text{NO}_2^-$ , welches dieselbe chromatografische Mobilität aufweist<sup>131</sup>. Ähnliches gilt für die Beobachtung von Angus und Cocks (1989), daß der EDRF durch sofortige Kühlung auf 0° C nach Freisetzung aus Endothelzellkulturen zu stabilisieren sei. Sie vermuteten, wie andere Autoren ebenfalls, EDRF sei eine stabilere Vorstufe des sehr instabilen NO<sup>7</sup>. Die bislang geschilderten Argumente gegen die Identifizierung des EDRF als NO waren zusammenfassend nicht derart stichhaltig, daß NO als EDRF-Kandidat ausgeschlossen werden konnte. Entweder ließen sich Experimente nicht ausreichend reproduzieren oder es waren unüberschaubare und schwer kontrollierbare chemische Reaktionen involviert sowie artifizielle physiologische Bedingungen zugrunde gelegt worden. Dennoch präsentierten mehrere Experimentatoren in der Folgezeit neue Resultate und entwickelten verschiedene mit den bislang etablierten Erkenntnissen zu vereinbarende plausible Theorien über den EDRF. Die Identität des EDRF blieb daher weiter unklar.

#### *A..1.3.1 Übereinstimmungen mit Hydroxylaminen*

Im Jahr 1989 zeigten Thomas und Ramwell die gefäßrelaxierenden Wirkungen einiger Hydroxylamine (eigentliches Hydroxylamin:  $\text{NH}_2\text{OH}$ ; substituierte Hydroxylamine:  $\text{R-NHOH}$ ) und deren Oxime ( $\text{R=NOH}$ ). Mit Hilfe eines Bioassays (Rattenaortenringe im Organbad) demonstrierten sie ein dem EDRF ähnliches und vom Endothel unabhängiges vasorelaxierendes Verhalten<sup>185</sup>. Nach Zugabe von Metylen-Blau, einem Hemmstoff der löslichen Guanylatcyclase, zur Pufferlösung war eine deutliche Abnahme der induzierten Relaxation zu beobachten. Hämoglobin hatte einen ebenfalls inhibierenden Effekt. Eine Aktivierung der Guanylatcyclase durch Hydroxylamin war bereits zuvor beschrieben worden<sup>35,100,196</sup>, gleiches gilt für die Inhibierung der Thrombozytenaggregation<sup>92</sup>. Alles, wie bereits oben aufgeführt, vom EDRF her bekannte Effekte. Hydroxylamine ( $\text{R-NHOH}$ ) und ihre korrespondierenden Oxime ( $\text{R=NOH}$ ; Additionsreaktion mit Aldehyden oder Ketonen<sup>79</sup>) können nichtenzymatisch (z.B. per Autoxidation) oder enzymatisch (z.B. Zytochrom-Oxidase, Superoxide, Katalase) zu  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$  konvertieren<sup>3,44,196</sup>. Interessanterweise hatten jedoch einerseits die Oxime gegenüber den Hydroxylaminen deutlich geringere biologische Wirkungen, andererseits standen die gemessenen Nitritkonzentrationen nach chem. Konversion der einzelnen Substanzen (Jod / Eisessig) in keinem erkennbaren Zusammenhang zu der jeweiligen vasorelaxierenden Potenz. Die Gefäßdilataion erfolgt daher anscheinend unabhängig vom Grad der Stickoxid-Bildung.

Dieselben Autoren konnten zusätzlich zeigen, daß N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), ein als spezifischer Inhibitor der EDRF-Synthese beschriebener Arginin-Antimetabolit (siehe Kap. A.1.2.2), auch antagonisierende Effekte auf chemisch nicht vom L-Arginin direkt abstammende Vasodilatoren hatte <sup>183,184</sup>. Es wurde vermutet, daß der Vorläufer des EDRF eine vom L-Arginin unterscheidbare, lediglich Arginin enthaltende Komponente sein könnte. Möglich wäre z.B. das bereits im NO-Metabolismus u.a. bei aktivierten Makrophagen nachgewiesene N<sup>G</sup>-Hydroxy-L-Arginin <sup>118,179</sup>. Nachfolgende Experimente konnten ein potentes relaxierendes Verhalten unterschiedlicher glattmuskulärer Gewebepreparate durch N<sup>G</sup>-Hydroxy-L-Arginin und Hydroxylamin demonstrieren <sup>65,200</sup>. Die Autoren postulierten daher, daß der EDRF ein Hydroxylamin sein müsse. Das NO wäre demnach ein Zerfallsprodukt des Hydroxylamins und fälschlicherweise als der eigentliche EDRF bezeichnet worden <sup>185</sup>.

#### A.1.3.2 *Übereinstimmungen mit S-Nitrosothiolen und S-nitrosylierten Proteinen.*

Myers et al. präsentierten 1989 Untersuchungsergebnisse über einen erneuten Vergleich des authentischen NO mit dem EDRF in einem Bioassay-System (Herzkranzarterienringe vom Schwein in einem Organbad) und einer nachgeschalteten NO-Detektion mittels Chemilumineszenz <sup>139</sup>. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß der basal und nach Stimulation (Bradykinin oder Calciumionophor A23187) aus Rinderendothelzellkulturen freigesetzte EDRF nicht mit NO identisch sein könne. Die gemessenen freigesetzten NO-Konzentrationen waren unter den gegebenen Konditionen nicht ausreichend, um die gleichzeitig registrierte Stärke der Vasorelaxation zu erklären. Dies führte zu der Annahme, daß der EDRF ein NO-Precursor mit wesentlich potenterem Verhalten sein müsse. Vorstellbar sei eine intrazelluläre Synthese des NO und anschließende Reaktion mit anderen Zellkomponenten zum EDRF. Letzterer würde dann von den Endothelzellen freigesetzt und in der darunterliegenden glatten Gefäßmuskulatur teilweise zu NO remetabolisiert. Für eine derartige reversible EDRF-Synthese und NO-Bindung kämen insbesondere Substanzen mit freien Sulfhydryl-Gruppen (R-SH) in Frage <sup>83</sup>. Nach Untersuchungen von Ignarro et al. (1981) benötigen die dem EDRF vergleichbar über eine Freisetzung von NO in der glatten Gefäßmuskulatur wirkenden organischen Nitrate zur Wirkungsvermittlung ebenfalls freie intrazelluläre Sulfhydryl-Gruppen und zwar von niedermolekularen Thiolen <sup>91</sup>. Zur Aktivierung des Zielenzym Guanylatcyclase durch org. Nitrate ist nämlich die Anwesenheit des Thiols Cystein zwingend notwendig <sup>89</sup>. Thiole wiederum können unter physiologischen Bedingungen mit NO zu stabileren S-Nitrosothiolen (R-SNO) reagieren <sup>147</sup>. Diese aktivieren gleichfalls die lösliche Guanylatcyclase, hemmen die Thrombozytenaggregation und sind potente Vasodilatoren. Einige Autoren vermuteten daher, daß S-Nitrosothiole, bevorzugt das S-Nitrosocystein, die eigentlichen aktiven Metabolite bei der Verstoffwechslung von Organischen Nitraten sein müßten <sup>43,46,89,91,114</sup>. Möglich wäre daher eine Reaktion des über die NO-Synthase aus L-Arginin im Endothel freigesetzten

NO mit intrazellulären Thiolen zu den teilweise stabileren *S*-Nitrosothiolen<sup>162</sup>. Diese würden dann freigesetzt und über die zuvor bereits demonstrierte Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase die Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur induzieren<sup>196</sup>. Der EDRF wäre somit mit einem *S*-Nitrosothiol identisch. Thiole finden sich physiologisch in relativ hohen Konzentrationen in menschlichen Geweben (0,1 - 5 mM)<sup>98</sup> und wären daher in ausreichendem Maße als Substrat für die *S*-Nitrosothiolsynthese verfügbar. Myers et al. (1990) führten nachfolgend eine Studie durch, in der das *S*-Nitrosocystein mit EDRF und authentischem NO in seiner biologischen Wirkung verglichen wurde (Herzkranzarterienring-Bioassay, Rinderendothelzellkulturen und gekoppelte Chemilumineszenz)<sup>140</sup>. Authentisches NO, EDRF und *S*-Nitrosocystein wiesen bei der angewendeten Methodik nach Applikation äquipotenter Konzentrationen eine vergleichbare relative Halbwertszeit von ca. 30 s auf und konnten durch Hämoglobin in ihren Wirkungen gehemmt werden. *S*-Nitrosocystein zeigte allerdings eine um den Faktor 80 höhere vasorelaxierende Potenz gegenüber NO. Ebenfalls potenter waren andere *S*-Nitrosothiole wie das *S*-Nitrosoglutathion. Diese besaßen allerdings mit ca. 2 min eine deutlich höhere Halbwertszeit. Nach Angaben der Autoren waren die mit Hilfe der Chemilumineszenz-Technik gemessenen NO-Konzentrationen des basal und nach Stimulation freigesetzten EDRF vergleichbar den nach *S*-Nitrosocystein-Applikationen gemessenen NO-Konzentrationen. Dagegen würden die mit dem EDRF freigesetzten NO-Konzentrationen, als authentische NO-Lösung appliziert, als Vermittler der Vasodilatation nicht ausreichen. Insbesondere das *S*-Nitrosocystein, alternativ eine Kombination mehrerer *S*-Nitrosothiole oder anderer nitrosylierter Substanzen, wären demnach eher mit dem EDRF identisch als NO<sup>124,140</sup>. Weitere Studien über *S*-Nitrosothiole konnten dem EDRF vergleichbare Effekte *in vitro* und *in vivo* auch auf die Thrombozytenfunktion (Aggregationshemmung) durch Aktivierung der Guanylatcyclase demonstrieren<sup>112,155</sup>. Schließlich beschrieben Rubanyi et al. (1990) ein übereinstimmendes Verhalten von *S*-Nitrosocystein und EDRF bei EPR- Analysen (electron paramagnetic resonance spectroscopy), NO dagegen verhielt sich abweichend vom EDRF<sup>160,161,163</sup>.

Wie die verschiedenen *S*-Nitrosothiole ihre Wirkungen vermitteln ist z.Zt. im einzelnen noch nicht geklärt. Die publizierten Untersuchungsergebnisse zum Wirkmechanismus widersprechen sich bislang. Resultate am Beispiel des *S*-Nitrosocysteins in wäßrigen Pufferlösungen dokumentieren den spontanen Zerfall zu Cystin und NO unter physiologischen Bedingungen (37° C, pH 7,4) mit einer *in vitro* Halbwertszeit von 15 s. Entsprechendes gilt für andere *S*-Nitrosothiole, wobei die Geschwindigkeit des Zerfalls mit den ermittelten biologischen Halbwertszeiten korreliert<sup>12</sup>. Dagegen demonstrieren Kowaluk und Fung mit Hilfe chemischer und pharmakologischer Methoden, daß die spontane Freisetzung des NO alleine aber nicht für die Vasorelaxation verantwortlich sein könne. Vielmehr müsse die Denitrosierung zusätzlich durch externe Zellmembranen katalysiert werden<sup>108</sup>. Von Lewis et al. (1992) wurde schließlich sogar die Existenz stereospezifischer *S*-Nitrosothiolrezeptoren postuliert. An narkotisierten Ratten verglichen sie den Einfluß intracerebroventrikulärer Injektionen des L- und D- Isomers des *S*-Nitrosocysteins auf die Herz-

Kreislauf-Regulation. Das L-Isomer soll demnach erheblich potenter gewesen sein, obwohl beide Isomere in gleicher Weise spontan NO freisetzen <sup>111</sup>.

Stamler et al. (1992) untersuchten weitere physiologische Sulfhydryl-Gruppen-Donatoren. Die quantitativ größte Fraktion reduzierter Thiole im Plasma findet sich in Form der unterschiedlichen Proteine (insbes. Albumin) <sup>98</sup>. Erfahrungen mit der Synthese von S-nitrosylierten Proteinen durch NO-Exposition bestanden zuvor nicht. Die Autoren konnten S-nitrosylierte Proteine (Rinderserumalbumin, tissue-type plasminogen activator (t-TPA) und Cathepsin B) auf drei verschiedenen Wegen herstellen: 1. durch säurekatalysierte S-Nitrosylierung der Proteine mit NaNO<sub>2</sub>, 2. Durchperlen einer auf pH 7,4 gepufferten, deoxygenierten Proteinlösung mit authentischem NO-Gas und 3. durch Inkubation der Proteine mit zur EDRF-Freisetzung stimulierten Rinderaortenendothelzellen <sup>178</sup>. Unabhängig von der Syntheseart waren die Produkte allesamt potente Vasodilatoren. Die induzierte Vasorelaxation erfolgte allerdings, im Vergleich zu niedermolekularen Thiolen, EDRF und NO, verzögert und war deutlich länger anhaltend (Detektor-Bioassay: Kaninchenaortenringe im Organbad). Die biologische Halbwertszeit lag bei über 40 min (Plasma). Hochmolekulare Thiole stimulieren die Guanylatcyclase, ihre Effekte lassen sich durch Methylen-Blau und andere Inhibitoren der Guanylatcyclase hemmen. S-nitrosylierte Proteine haben ebenfalls einen antiaggregatorischen Effekt auf Thrombozyten <sup>172</sup>.

Die Autoren diskutieren die Möglichkeit, daß nach EDRF-Freisetzung S-nitrosylierte Proteine im Plasma (insbes. Albumin) entstehen, die die Wirkungen des EDRF auf die Thrombozytenaggregation und die vom Freisetzungsort entfernten Gefäßwandabschnitte aufrecht erhalten <sup>96,101,177</sup>. Zuvor war von Kelm und Schrader (1990) für authentisches NO *in vivo* eine nur 0,1 s betragende Halbwertszeit ermittelt worden. Ursächlich hierfür ist anscheinend die bereits mehrfach erwähnte, zur Abschwächung führende Interaktion mit oxygeniertem Hämoglobin <sup>105</sup>. Unklar bleibt allerdings, in welcher Form nicht membranpermeable S-nitrosylierte Proteine die intrazelluläre Guanylatcyclase zu beeinflussen vermögen. Möglich wäre eine Signalübertragung durch Reaktion des NO mit membranständigen Thiolgruppen an der Oberfläche der glatten Gefäßmuskulatur oder ein NO-Transfer in das Zellinnere in Form einer S-Nitrosothiol- bzw. S-Nitrosothiol-Thiol-Austauschreaktion <sup>178</sup>. Schließlich könnte es sich, nach Ansicht der Autoren, bei der intrazellulären S-Nitrosylierung von Proteinen um einen der Phosphorylierung ähnlichen Signalübertragungsmechanismus handeln <sup>177,178</sup>.

#### A.1.3.3 *Übereinstimmungen mit dem Dinitrosyl-Eisen(II)-L-Cystein Komplex (DNIC)*

Aus der Überlegung, daß die nun favorisierten S-Nitrosothiole, insbesondere das ähnlich instabile S-Nitroso-L-Cystein, wahrscheinlich ebenfalls im Zellmilieu schnell inaktiviert würde und daher einer außergewöhnlich komplizierten Speicherung z.B. in "sauren Vakuolen", d.h. in Zellkompartimenten mit niedrigen pH-Wert, bedürfe <sup>85</sup>, stellte Vanin (1991) die Hypothese auf, daß der EDRF ein Nitrosyl-Eisen Komplex mit Thiol-Liganden ist (Fe(NO)<sub>2</sub>(RS)<sub>2</sub>). Nach intrazellulärer NO-Synthese

würde dieses direkt von freiem Eisen und Thiolen gebunden. Der resultierende Komplex wäre demnach der eigentliche EDRF. Derartige Komplexe sind seit langem in verschiedenen Zellen und Geweben bekannt<sup>190</sup>, z.B. im Metabolismus aktivierter Makrophagen<sup>109</sup>. Sie geben, wie der EDRF, ein Elektronenspin-Resonanz-Signal (sog. 2.03 Komplexe)<sup>160,190,192</sup>, sind im intrazellulären Milieu stabil und können mit niedermolekularen Thiolen als Liganden (Cystein, reduziertes Glutathion) *in vivo* nachweisbar interzellulär transferiert werden. Über die Oxidation der Thiolgruppe kann eine erneute NO-Freisetzung erfolgen. Über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase vermitteln sie, wie der EDRF, die Vasodilatation isolierter Gefäßpräparationen und inhibieren die Thrombozytenaggregation<sup>134</sup>. Wurden solche Verbindungen narkotisierten Hunden *in vivo* injiziert, trat eine initiale schnelle arterielle Hypotension ein. Die Blutdrucksenkung blieb über mehrere Stunden bestehen<sup>190</sup>.

Später wurde die Synthese von stabilen Dinitrosyl-Eisen(II)-Komplexen (DNIC) mit Protein-Thiol-Liganden als "stabiler intrazellulärer NO-Speicher", anhand von mit NO-Gas und DNIC vorbehandelten isolierten Kaninchenarterien (A. femoralis), *in vitro* demonstriert. Die Protein-Thiole führten zu einer deutlichen Stabilisierung dieser Komplexe. Durch Addition freier niedermolekularer Thiole zum Bioassay-Puffer (N-Acetyl-L-Cystein) erfolgte eine teilweise Rückverwandlung in Komplexe mit niedermolekularen Thiol-Liganden, welche im Perfusat nachgewiesen werden konnten und vasorelaxierende Eigenschaften aufwiesen<sup>134</sup>.

Ein direkter Vergleich von DNIC mit authentischen NO-Lösungen und des mittels ACh-Stimulation aus Donorgefäßen freigesetzten EDRF anhand der Relaxation von Rattenaortenringen im Organbad zeigte, daß die konzentrationsabhängige Vasodilatation durch Oxyhämoglobin abschwächbar und mit der des EDRF vergleichbar war. Insbesondere ähnelten sich die Dauer und der Verlauf der Relaxation. NO dagegen hatte einen andersartigen Verlauf und der Basaltonus der Gefäße wurde nach Abklingen der Relaxation deutlich schneller erreicht<sup>194</sup>. Die Autoren schlußfolgerten, daß der EDRF ein Nitrosyl-Eisen(II)-Komplex mit Thiol-Liganden sein müsse.

#### A.1.1.4 Anmerkungen zur Nitroxyl-Theorie

Zeitgleich zur Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit erschien von Fukuto et al. und anderen Untersuchern eine neue Theorie über die Identität des EDRF. Studien zur möglichen Entstehung vasoaktiver Metabolite im Rahmen der endothelialen NO-Synthese aus L-Arginin, führten zu der Beobachtung, daß neben NO auch Nitroxyl (NO<sup>-</sup> / HNO) synthetisiert wird<sup>54,137</sup>. Dieses führte in Bioassay-Experimenten zu einer über die Guanylatcyclase vermittelten, dem NO und EDRF vergleichbaren Vasodilatation von Kaninchenarterien und intrapulmonalen Rinderarterien<sup>53</sup>.

Nach Ansicht der Autoren ließen sich, wenn der EDRF mit dem Nitroxyl identisch wäre, einige Inkonsistenzen im Vergleich NO und EDRF erklären. Wie bereits im Kapitel A.1.3 erwähnt, soll nach

Long et al. NO nicht mit Anionen-Austauschsäulen reagieren. Für den EDRF hingegen war eine Reaktion beschrieben worden <sup>29,113</sup>. Authentisches NO wird an Deoxyhämoglobin gebunden, das entsprechende Addukt konnte per EPR (electron paramagnetic resonance) Spektroskopie nachgewiesen werden. Ein NO-Häm Addukt wurde beim EDRF nicht beobachtet <sup>160,192</sup>. Aufgrund der chemischen Eigenschaften des Nitroxyls, würde es sowohl bei Versuchen mit Anionen-Austauschsäulen (pKa 4,7) als auch beim Verhalten unter Deoxyhämoglobinexposition und anschließender EPR Spektroskopie wie EDRF reagieren <sup>53</sup>. Daher könne das Nitroxyl teilweise, oder komplett für die biologische Funktion des EDRF verantwortlich sein.

Deutlich wird somit, daß trotz aller Fortschritte um die Erforschung der endothelabhängigen Vasodilatation, die Identität des EDRF letztlich unklar geblieben ist. Neben NO sind weitere Kandidaten für die Identität des EDRF bislang weder zuverlässig bestätigt noch sicher ausgeschlossen worden. Namentlich trifft dies für Hydroxylamin, die *S*-Nitrosothiole (besonders *S*-Nitroso-L-Cystein), *S*-nitrosylierte Proteine und dem DNIC zu.

Nachfolgend wird eine zusammenfassende Darstellung der bislang bekannten Fakten über die Vasodilatation durch den EDRF und die endothelabhängige Gefäßtonusregulation präsentiert.

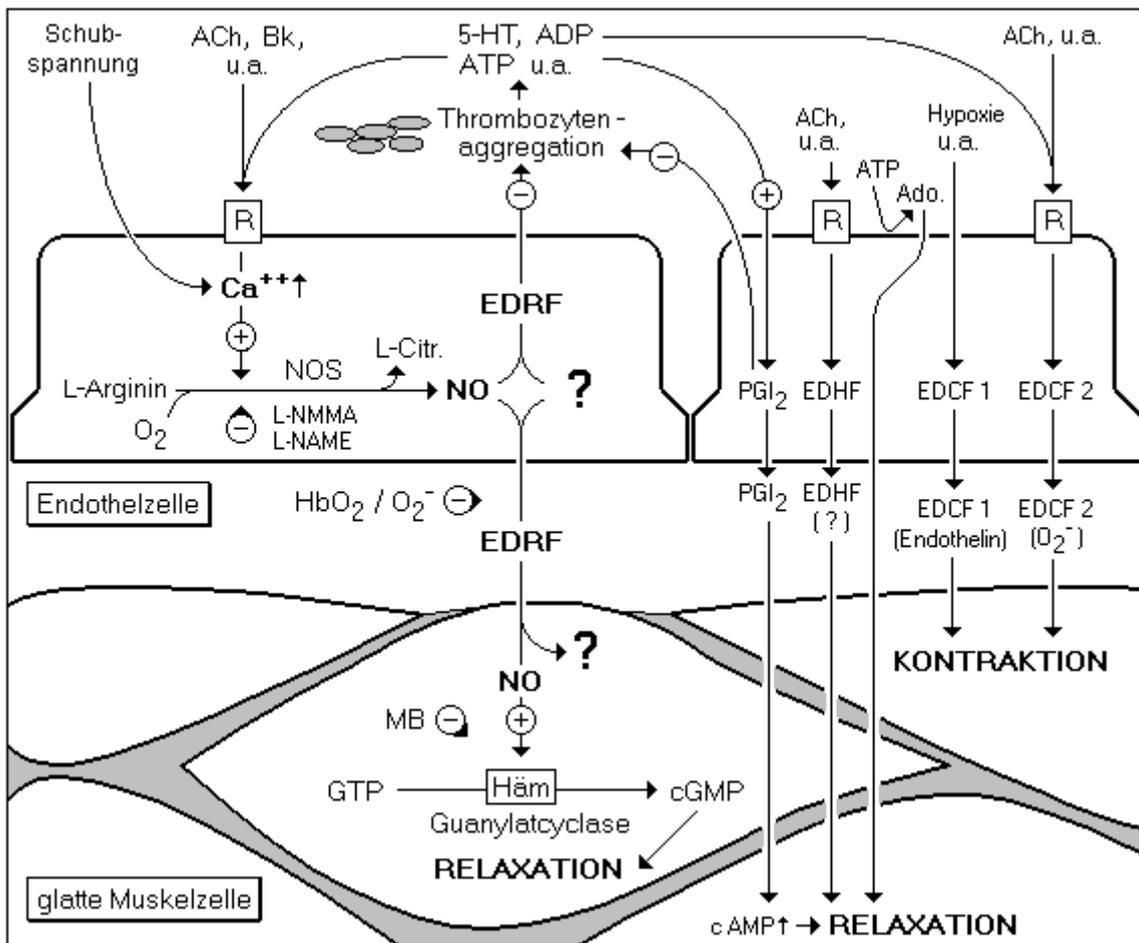
## A.2 Mechanismus der endothelabhängigen Gefäßdilatation durch den EDRF

Die im folgenden dargestellten Zusammenhänge ergeben sich zum großen Teil aus bereits zitierten Untersuchungen aus den vorhergehenden Kapiteln. Es werden daher lediglich noch nicht erwähnte Fakten mit entsprechenden Literaturhinweisen versehen. Abbildung 1 (S. 14) stellt das komplexe Zusammenspiel verschiedener endothelialer Prozesse, welche letztlich den resultierenden Tonus der Gefäße bestimmen, vereinfacht dar. Die Darstellung erhebt der Übersichtlichkeit halber keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Es sind die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit notwendigen und einige wesentliche zusätzliche Prozesse wiedergegeben. In der Abbildung 1 aufgeführte Fakten und Abkürzungen sind in **Fettschrift** hervorgehoben.

Die Wand der Blutgefäße besteht aus drei Schichten, der (Tunica) Intima, Media und Externa (Adventitia). Die Intima stellt die Begrenzung zum Gefäßlumen dar und besteht aus einer einfachen Lage von spindelförmigen, flachen, in Flußrichtung orientierte **Endothelzellen**. Im subendothelialen Raum findet sich ebenso ausgerichtetes Bindegewebe. Arterien sind zur Media hin durch die Membrana elastica interna abgegrenzt. Die Media besteht aus zirkulär verlaufenden **glatten Muskelzellen**, elastischen Fasernetzen, Kollagenfasern und Proteoglykanen. Die Adventitia weist erneut längsgerichtete Bindegewebsstrukturen auf, Arterien besitzen z.T. eine Membrana elastica externa zur Media hin, Venen zusätzlich glatte Muskulatur in der Adventitia. Je nach Lokalisation unterscheidet sich der Aufbau der einzelnen Gefäßschichten hinsichtlich ihrer Dicke, Bestandteile, Zellkontakte u.ä. <sup>110</sup>.

Die endothelständige NO-Synthase (eNOS) metabolisiert basal **L-Arginin** zu **NO** und L-Citrullin (**L-Citr.**). Durch Stimulation kann eine Aktivitätssteigerung induziert werden. Bislang bekannte Stimuli sind auf das Endothel einwirkende **Schubspannungen** (Flußerhöhungen) und verschiedene über spezielle Zelloberflächen-Rezeptoren (**R**) wirkende Stoffe (**ACh**: Azetylcholin; Vasopressin) oder lokal freigesetzte Mediatoren (**Bk**: Bradykinin; Thrombin; Substanz P; Histamin; **ADP**: Adenosindiphosphat (z.B. durch **Thrombozytenaggregation**); **5-HT**: Serotonin; **ATP**: Adenosintriphosphat). Gemeinsam ist ihnen, daß sie die NOS über eine Erhöhung der intrazellulären freien Calcium (**Ca<sup>++</sup>**)-Konzentration aktivieren (+) (Einstrom; endoplasmatisches Retikulum). L-Argininanaloge vermögen die NOS zu inhibieren (-) (z.B. **L-NMMA**, **L-NAME**). Gegenwärtig wird diskutiert, ob das NO intrazellulär mit weiteren cytosolischen Komponenten zum eigentlichen **EDRF** reagiert und anschließend gespeichert bzw. freigesetzt wird (Carrier?, aktiver Prozeß?), oder nach Diffusion durch die Zellmembran sowohl in das Gefäßlumen als auch zur nach abluminal gelegenen Media seine Wirkungen direkt vermittelt. Fragezeichen (?) in Abbildung 1 kennzeichnen einerseits die möglichen cytosolischen Komponenten wie Thiole (→ S-Nitrosothiole), Eisen-Thiol-Komplexe (→ DNIC) und bestimmte Proteine (→ S-nitrosylierte Proteine), andererseits alternative Synthesemöglichkeiten wie Nitroxyl (NO<sup>-</sup>) oder Hydroxylamine. Die bekanntesten Hemmstoffe (-) des EDRF sind Oxyhämoglobin (**HbO<sub>2</sub>**) und Superoxid-Anionen (**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**).

EDRF passiert den subendothelialen Raum und gelangt in die darunter befindlichen glatten **Muskelzellen** (Diffusion ? / Carrier ? / S-Nitroso-L-Cystein: rezeptorvermittelt ?). Sicher scheint, daß freies NO (= EDRF ?, oder nach Abspaltung der o.g. Komponenten des EDRF [→ ?]) in der Muskulatur nach Anbindung an die **Häm**-Komponente sodann die lösliche **Guanylatcyclase** aktiviert. Dies wiederum resultiert in einer erhöhten Konzentration cyclischen Guanosinmonophosphats (**cGMP**; **GTP**: Guanosintriphosphat; Hemmstoff (-): **MB**: Methylen-Blau). Über nachfolgend induzierte Phosphorylierungsschritte, die Mechanismen sind im einzelnen noch nicht bekannt, kommt es infolge Reduktion der freien Ca-Konzentration schließlich zur **Relaxation** des Gefäßes<sup>20,56,57,125,189b</sup>.



**Abb. 1:** Darstellung einiger wesentlicher endothelabhängiger Prozesse zur Regulation des Gefäßmuskeltonus. Erläuterungen und Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen (per Fettschrift hervorgehoben).

EDRF gelangt außerdem in das Gefäßlumen und übt hier Effekte hauptsächlich auf **Thrombozyten** aus (Hemmung der **Aggregation** und Adhäsion; neg. Feedback). Da die Halbwertszeit des NO im Blut (isoliertes Herz) *in vivo* lediglich ca. 0,1 s beträgt (Abschwächung durch  $\text{HbO}_2$ )<sup>105</sup>, wären die Effekte, falls EDRF identisch mit dem NO wäre, lokal auf den Ort der Freisetzung beschränkt. Andernfalls

müßte eine Stabilisierung angenommen werden (Proteine, Thiole  $\rightarrow$  S-Nitrosylierung)<sup>96</sup>. Im Falle der Identität des EDRF mit stabilen S-Nitrosothiolen oder S-nitrosylierten Proteinen könnte dieser auch in nachgeschalteten Gefäßsegmenten seine Wirkung entfalten.

Wichtig ist die Erkenntnis, daß die Bedeutung einzelner Stimulanzen (Mediatoren) für die Tonusregulation von Gefäßen unterschiedlicher Lokalisation oder verschiedener Tierspezies stark variieren kann. Auch sind unterschiedliche Effekte je nach Grad einer Vorschädigungen des Endothels zu beobachten<sup>19,20,52,131</sup>. Die Situation wird dadurch besonders komplex, daß Endothelzellen sowohl relaxierende als auch konstringierende Faktoren synthetisieren.

Weitere, vom Endothel freigesetzte vasorelaxierende Faktoren sind das durch die Cyclooxygenase aus Arachidonsäure synthetisierte Prostacyclin (**PGI<sub>2</sub>**;  $\rightarrow$  Erhöhung der Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphats [**cAMP**] in der Muskelzelle  $\rightarrow$  **Relaxation**) und der bislang noch unzulänglich charakterisierte "endothelium-derived hyperpolarizing factor" (**EDHF**). Die Prostacyclinsynthese wird durch ähnliche Stimuli aktiviert wie die des EDRF (**Schubspannung**, Thrombin, **Bk**; **Thrombozytenaggregation**:  $\rightarrow$  **ADP**, **5-HT** u.a.), Prostacyclin wirkt auf Thrombozyten ebenfalls aggregationshemmend. Über eine Erhöhung des cAMP in der Muskelzelle wirkt auch Adenosin vasorelaxierend<sup>36,169</sup>.

Erwähnt werden sollen noch einzelne vom Endothel gebildete und freigesetzte vasokonstringierende Faktoren (endothelium-derived contracting factor: **EDCF 1+2**). Diese haben eine wichtige Bedeutung für die Balance der Tonusregulation und sind bei pathologischen Gefäßprozessen involviert (z.B. Atherogenese). In Abb. 1 sind außerdem das Polypeptid **Endothelin-1 (EDCF 1, Stimulation** u.a. durch **Hypoxie**) und Superoxid-Anionen (**EDCF 2: O<sub>2</sub><sup>-</sup>  $\rightarrow$  EDRF-Inaktivierung**) dargestellt. Weitere, nicht dargestellte, sind das Thromboxan A<sub>2</sub>, Leukotriene und das Prostaglandin H<sub>2</sub><sup>20,125</sup>. Natürlich wirken zusätzlich noch andere Hormone (z.B. Angiotensin II) und Mediatoren teilweise direkt auf die glatte Muskulatur ein (z.B. Adrenalin, Noradrenalin) und sind hierüber an der Tonusregulierung beteiligt, auf die Erläuterung im Einzelnen muß aber verzichtet werden<sup>74</sup>.

Aus den zahlreichen durch *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen gewonnene Ergebnissen sollen folgende nochmals hervorgehoben werden: 1. Dem EDRF kommt anscheinend eine wesentliche Rolle in der Regulation des Gefäßmuskeltonus zu. 2. Ein entscheidender Stimulus zur Aktivierung der NO-Synthase ist die auf das Endothel einwirkende Schubspannung. 3. Eine Reihe wichtiger Stimuli werden von aggregierten Thrombozyten freigesetzt.

### A.3            Problemstellung

Verbunden mit der Entdeckung und Erforschung des EDRF sind in den letzten Jahren wesentliche Erkenntnisse über die Herz-Kreislaufregulation und andere Regulationsmechanismen verschiedener Organsysteme gewonnen worden. Trotz aller Bemühungen konnte jedoch bislang die Identität des EDRF nicht eindeutig geklärt werden. Zur Zeit werden das Hydroxylamin, einige *S*-Nitrosothiole (insbes. das *S*-Nitroso-L-Cystein), *S*-nitrosylierte Proteine, der Dinitrosyl-Eisen(II)-L-Cystein Komplex und das Stickstoffmonoxid als potentielle Kandidaten diskutiert und experimentelle Belege für die einzelnen Theorien vorgelegt. Bei den Experimente fanden meist unterschiedliche Methoden, insbesondere Bioassays, Verwendung. Bislang wurden die genannten Vasodilatoren hinsichtlich ihrer pharmakologischen Profile aber noch nicht mit Hilfe einer einheitlichen Methode direkt verglichen. Die Interpretation der bislang zur Verfügung stehenden Daten und Vergleiche der charakteristischen pharmakologischen Profile der einzelnen Substanzen untereinander sind demnach bislang nur beschränkt möglich. Sichere Aussagen zur Identität des EDRF sind daher ebenso zur Zeit nicht möglich.

- 1)     Es erscheint deshalb zum gegenwärtigen Zeitpunkt wichtig, den EDRF und alle genannten potentiellen EDRF-Kandidaten hinsichtlich ihrer kinetischen Charakteristika (vasorelaxierende Potenz, Halbwertszeit und Verlauf bzw. Dauer der Vasorelaxation) systematisch mit Hilfe einer einheitlichen und etablierten Methode zu untersuchen.
  
- 2)     Die Methodik soll für die Untersuchung instabiler vasoaktiver Substanzen im besonderen Maße geeignet sein, ferner physiologischen Bedingungen möglichst nahekommen. Zusätzlich sollte zumindest der EDRF mit Hilfe dieser Methodik bereits untersucht worden sein, um die zu erwartenden Resultate mit bereits publizierten Daten zum EDRF vergleichen zu können.
  
- 3)     Der direkte quantitative Vergleich der kinetischen Charakteristika aller potentiellen Kandidaten mit denen des EDRF sollte den Kern des Untersuchungsansatzes darstellen. Signifikante quantitative Differenzen würden eine Identität der betreffenden Substanz / -en mit dem EDRF unwahrscheinlich werden lassen.
  
- 4)     Zusätzlich sollen die Effekte einiger bekannten Inhibitoren des EDRF auf die einzelnen Substanzen untersucht werden. Substanzen, welche ein vom EDRF signifikant unterschiedliches Verhalten aufweisen, könnten so ebenfalls klar vom eigentlichen biologischen Faktor differenziert werden.

5) Falls nach Vergleich der Aktivitätsprofile und der Wirkung der EDRF-Inhibitoren nach wie vor keine eindeutige Aussage zur Identität möglich sein sollte, sollten andersartige Lösungen gefunden werden, welche die Charakteristika des EDRF von denen der verbliebenen Kandidaten zu unterscheiden erlauben. Idealerweise sollte nur ein Kandidat stets mit dem EDRF vergleichbare Veränderungen des pharmakologischen Profils aufweisen. Dieser wäre dann sehr wahrscheinlich mit dem EDRF identisch.

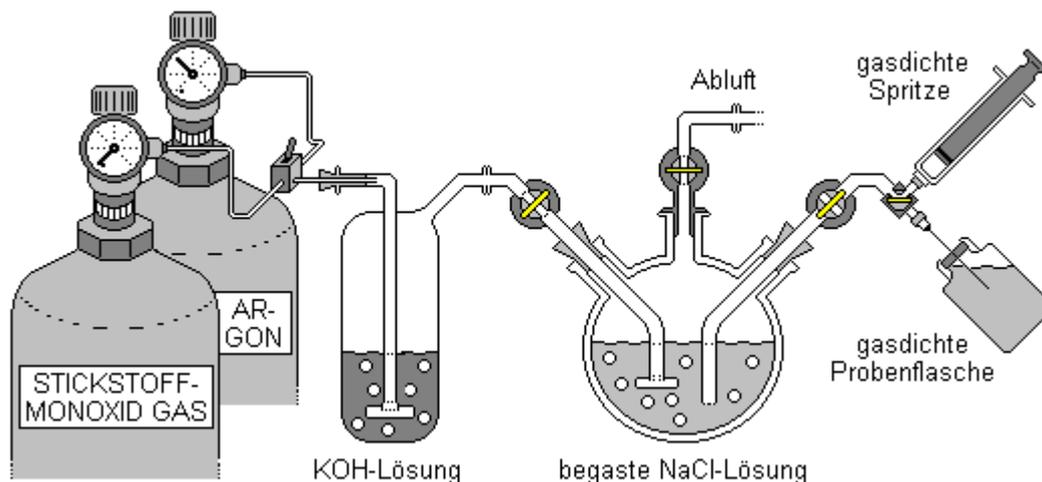
6) Für den Fall, daß bei den untersuchten Konditionen keiner der Kandidaten stets identisch mit dem EDRF reagieren würde, müßten die vorgenannten Theorien über die Identität des EDRF alle als nicht zutreffend bezeichnet werden. Falls trotz aller Bemühungen mehrere Kandidaten stets identisch mit dem EDRF reagieren würden, wäre die Möglichkeit der Existenz multipler EDRF's mit einem solchen Ansatz nicht zu widerlegen.

## **B**                    **MATERIAL UND METHODEN**

### **B.1**                    **Zubereitung der Testlösungen**

#### **B.1.1**                    **Wässrige NO-Lösungen**

Stickstoffmonoxid ist ein farbloses, toxisches Gas, welches insbesondere bei Verbrennungsprozessen entsteht und u.a. im Tabakrauch und Autoabgasen enthalten ist. Es besitzt eine geringe Wasserlöslichkeit von 1,8 mM (25°C, 1 Atmosphäre Luftdruck) und hat ein starkes Bestreben, mit Sauerstoff zu braunem Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) zu reagieren. In wässrigen oxygenierten Lösungen reagiert es schnell zu Nitrit und Nitrat<sup>15,44,45</sup>. Zur Herstellung der authentischen NO-Lösung mußte daher auf strikte Sauerstofffreiheit der Glasapparatur, der Lösungsmittel und aller zur weiteren Verdünnung der NO-Stammlösung verwendeten Behälter geachtet werden. Die Herstellung der authentischen NO-Lösung erfolgte nach einer von Feelisch beschriebenen Prozedur<sup>45</sup>.



**Abb. 2:** Vereinfachte schematische Darstellung der für die Herstellung der wässrigen NO-Lösung verwendeten Apparatur. Erläuterung im Text.

Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %) wurde im Ultraschallbad für mindestens 20 min. entgast, in einen Dreihalskolben (100 ml) gefüllt und mit reinem Argon durchperlt (Abb. 2). Zur Entfernung von Sauerstoffspuren aus dem Argongas (Linde, Unterschleißheim), wurde dieses zuerst mit alkalischer Pyrogallollösung gewaschen und anschließend durch die gesamte Apparatur geleitet. Nach mindestens 60 minütiger Begasung erfolgte die Umstellung des Gasstroms von Argongas auf Stickstoffmonoxidgas (Reinheit >99%; Linde, Unterschleißheim). Zur Eliminierung höherer Stickoxide war eine Gaswaschflasche mit 10 %iger KOH-Lösung vorgeschaltet. Nach mindestens

25 min. langsamem Durchperlen der NaCl-Lösung war diese NO-gesättigt. Zur Verdünnung der Stammlösung und weiteren Verwendung der im Bioassay benötigten niedriger konzentrierten Lösungen, wurden auf gleiche Weise entgaste physiologische NaCl-Lösungen und Glasbehälter, ferner gasdichte Spritzen und Stahlkanülen verwendet.

Unter strikter Einhaltung dieser Vorschriften war die NO-Konzentration in der Gaswaschflasche nach eigenen Beobachtungen bis zu 28 Tage stabil, ebenfalls konnte während des Experiments eine gleichbleibende Konzentration der für den Bioassay verdünnten NO-Lösungen sichergestellt werden. Einzelne bereits verdünnte wäßrige NO-Lösungen zeigten sogar nach 7 Tagen noch ausreichende Aktivität in Bioassay-Experimenten. Trotz dieser Beobachtungen wurden die Stammlösung sowie die Verdünnungen zur Sicherstellung der höchstmöglichen Qualität an jedem Versuchstag frisch zubereitet.

Authentisches Stickstoffmonoxid reagiert in sauerstoffhaltigen wäßrigen Medien schnell fast ausschließlich zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), die ebenfalls entstehenden Mengen an Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) sind vernachlässigbar gering<sup>45</sup>. Die Konzentration der NO-haltigen Lösung konnte somit, in Anlehnung an ein von Feilisch beschriebenes Verfahren, nach Injektion definierter Volumina in einen sauerstoffhaltigen Phosphatpuffer mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), als Nitrit bestimmt werden<sup>44</sup>. Die erreichten Sättigungskonzentrationen für NO lagen reproduzierbar im Bereich von  $1,75 \pm 0,08$  mM und in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Werten<sup>9,44,80</sup>.

### B.1.2 Hydroxylamin-Lösungen

Stellvertretend für die Gruppe der Hydroxylamine (R-NHOH) und Oxime (R=NOH) wurde das als Aktivator der glattmuskulären löslichen Guanylatcyclase bekannte Hydroxylamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) ausgewählt. Es ist eine anorganische Verbindung, die das Hydroxyderivat des Ammoniaks darstellt. Da nur die Salzform längere Zeit stabil ist, kam das Hydrochlorid zum Einsatz (Hydroxylammoniumchlorid, Sigma, München). In wäßrigen Lösungen zersetzt sich die Substanz bei Wärmeeinwirkung zu Ammoniak und Stickstoff<sup>79</sup>. Hydroxylamine (R-NHOH) und ihre korrespondierenden Oxime (R=NOH) können aber auch nichtenzymatisch (z.B. per Autoxidation) oder enzymatisch (z.B. Zytochrom-Oxidase, Superoxide, Katalase) zu NO,  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$  umgewandelt werden. Superoxid-Anionen sowie Katalase sind im verwendeten Bioassay-System prinzipiell verfügbar (oxygenierte Pufferlösung bzw. Gefäßpräparate)<sup>3,44,196</sup>, eine Konversion zu NO erscheint somit möglich. Die eingesetzten Lösungen des kristallinen Hydroxylammoniumchlorids wurden stets frisch mit 2-3°C kalter physiologischer 0,9%iger Kochsalzlösung angefertigt und im Dunkeln unter ständiger Eiswasserkühlung aufbewahrt. Die Anfertigung der weiteren Verdünnungen sind dem Kapitel B.1.3.1 zu entnehmen.

### B.1.3 S-Nitrosothiol-Lösungen

#### *B.1.3.1 Synthese der S-Nitrosothiole von Cystein, Cysteamin, N-Acetyl-DL-Cystein, L-Homocystein und Glutathion*

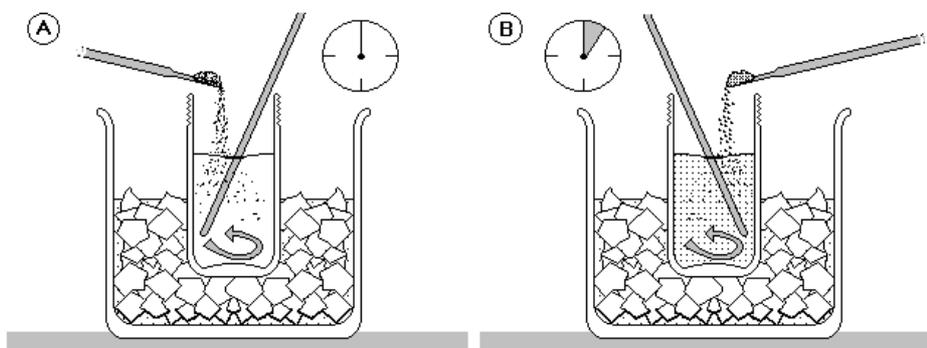
Neben den bereits erwähnten gefäßdilatierenden und thrombozytenaggregationshemmenden Effekten der S-Nitrosothiole (R-SNO) (Kap. A.1.3.2), ist bekannt, daß sie eine wichtige Rolle im Umrötungsprozeß des Fleisches spielen<sup>4,127</sup>, mutagene Eigenschaften<sup>25</sup> sowie antibakterielle Effekte besitzen<sup>93,99</sup>. Aufgrund der labilen S-NO-Gruppierung handelt es sich um sehr reaktionsfreudige Moleküle.

Die Herstellung der Verbindungen erfolgte über eine säurekatalysierte S-Nitrosierung der entsprechenden Thiole (R-SH) durch Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Hierbei fanden modifizierte Arbeitsvorschriften von Mirna und Hoffmann<sup>127</sup>, Cantoni et al.<sup>24</sup> und Hart<sup>75 a</sup> Anwendung:



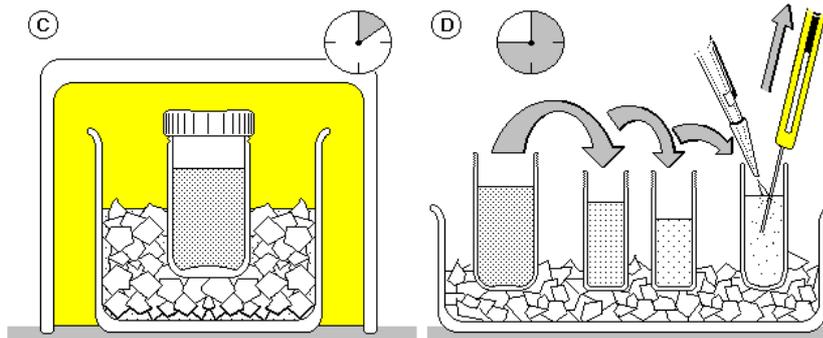
S-Nitrosothiole sind äußerst temperatur-, licht- und sauerstoffempfindliche instabile Substanzen. In wäßriger Lösung beträgt ihre Halbwertszeit, abhängig von der Thiolkomponente, lediglich max. 1 bis 300 min.<sup>45,89,91</sup>. Es war daher notwendig, die Stabilität der wäßrigen Stammlösungen durch Verwendung eines stark sauren und sauerstofffreien Lösungsmittels (Verschiebung des Gleichgewichts nach rechts (s.o.)) zu gewährleisten. Zusätzlich wurden sämtliche Lösungen im Dunkeln unter Eiswasserkühlung zubereitet und gelagert. Die Darstellung dieser Nitrosothiole wurde aufgrund ihrer Instabilität erst etwa 60 min. vor jedem Experiment vorgenommen.

0,1 mMol des betreffenden Thiols in kristalliner Form (Sigma, München), wurden in 5 ml 2-3° C kaltem 1 mM Citratpuffer, der zuvor 20 min. mit Argon begast und mit Salzsäure auf einen pH 2,0 eingestellt worden war, vollständig gelöst (Abb. 3 A).



**Abb. 3 A / B: Herstellung von S-Nitrosothiollösungen über die säurekatalysierte S-Nitrosierung der entsprechenden Thiole.** A: Das Thiol in kristalliner Form wird in eiswassergekühltem Citratpuffer pH 2 bis zur Lösung eingerührt. B: Anschließend erfolgt die Zugabe von äquimolaren Mengen NaNO<sub>2</sub>.

Äquimolare Mengen festen Natriumnitrits ( $\text{NaNO}_2$ , Merck, Darmstadt) wurden hinzugegeben und unter weiterer Kühlung bis zur Lösung gerührt (Abb. 3 B). Die Produktentstehung durch die säurekatalysierte *S*-Nitrosierung der Thiolkomponente konnte an der leichten rot-bräunlichen Verfärbung optisch verfolgt werden. Alle weiteren Verdünnungen dieser 20 mM Nitrosothiol-Stammlösungen erfolgten ebenfalls im obigen Citratpuffer. Während der Bioassay-Experimente mußten die Lösungen unter ständiger Eiswasserkühlung und vor Lichteinstrahlung geschützt aufbewahrt werden (Abb. 3 C).



**Abb. 3 C / D: Herstellung von *S*-Nitrosothiollösungen über die säurekatalysierte *S*-Nitrosierung der entsprechenden Thiole. C:** Aufbewahrung der *S*-Nitrosothiollösungen im Dunkeln und unter ständiger Eiswasserkühlung, **D:** Anfertigung der zur Applikation benötigten Endverdünnungen.

Die applizierten Endverdünnungen wurden Sekunden vor der Verwendung in kalter physiologischer NaCl-Lösung angesetzt (Pipettierung) und sofort mittels Hamilton-Spritzen (Volumina 5 - 50  $\mu\text{l}$ ) in das Superfusat injiziert (Abb. 3 D). Zur Berechnung der Konzentrationen über den Aortenstreifen war das Verhältnis von Injektionsvolumen pro Minute zu Perfusatfluß (5 ml/min) zu berücksichtigen. Alle *S*-Nitrosothiole wurden durch Aufnahme ihrer UV/VIS-Spektren und mit Hilfe der HPLC identifiziert<sup>13,44,91</sup>. Der Reinheitsgrad betrug etwa 98 %, lediglich sehr geringe Mengen an Nitrit und ein über mehreren Stunden zunehmender Disulfidanteil konnte detektiert werden.

Bei Lagerung im Dunkeln und ununterbrochener Kühlung bei 2-3° C zeigten die Lösungen des *S*-nitrosylierten N-Acetyl-DL-cysteins, L-Homocysteins und Glutathions auch noch nach mehreren Tagen auf der Bioassay-Kaskade volle vasodilatatorische Aktivität. Dagegen waren deutliche Aktivitätsverluste für *S*-nitrosyliertes Cystein und Cysteamin bereits nach etwa 24 Stunden zu beobachten. Verwendung fanden jedoch ausschließlich täglich frisch bereitete Lösungen.

#### B.1.3.2 *Synthese des N-Acetyl-DL-penicillaminthionitrits*

N-Acetyl-DL-penicillaminthionitrit (SNAP) konnte aufgrund seiner außergewöhnlichen Stabilität als einziges *S*-Nitrosothiol in kristalliner Form synthetisiert werden. Hierzu wurde die Darstellung nach Field et al. angewendet<sup>48</sup>.

1,9 g (10 mMol) N-Acetyl-DL-penicillamin, in einem 250 ml Dreihalskolben in 50 ml Methanol / 1 N-HCl (1:1) suspendiert, wurde mit 2,5 ml konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt und bis zur fast vollständigen Lösung gerührt. Eine wäßrige Lösung von 1,38 g (20 mMol) NaNO<sub>2</sub> wurde bei einer Temperatur von 25° C (Kühlung) innerhalb von 20 min. unter starkem Rühren hinzugegeben. Nach weiteren 15 min. Rühren konnte das nun grüne kristalline Produkt abfiltriert, dreimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet werden. Mittels Dünnschichtchromatographie (Serviceleistung der Schwarz Pharma AG, Monheim) konnte die Reinheit des so erhaltenen SNAP objektiviert werden (keine nitrit- bzw. nitrat- und SH-haltigen Verunreinigungen). Es war im festen Zustand selbst nach Aufbewahrung bei Raumtemperatur über mehrere Monate stabil.

Die Anfertigung der benötigten wäßrigen Lösungen des kristallinen SNAP fand wie folgt statt: 0,1 mMol der Festsubstanz wurden durch Hinzutropfen von 1 ml absoluten Alkohols unter Wärmeeinwirkung (Heizplatte, 40° C) gelöst und anschließend zur Stabilisierung mit 4 ml 2-3° C kaltem 1 mM Citratpuffer pH 1,5 versetzt. Weitere Verdünnungen dieser 20 mM Stammlösung wurden mit 1 mM Citratpuffer pH 2,0 durchgeführt und im Dunkeln unter Kühlung bei 2° C aufbewahrt. Obwohl diese Lösungen ca. 7 Tage stabil waren, fanden für die Experimente nur tagesfrische Präparationen Anwendung. Weitere Verdünnungen wurden wie im Kapitel B.1.3.1 beschrieben durchgeführt.

### *B.1.3.3        Synthese des S-nitrosylierten humanen Serumalbumins*

Albumine machen 52-62% der Gesamteiweiße des Blutplasmas aus. Sie kommen ferner im Liquor cerebrospinalis und im Muskelgewebe vor. Wichtige Aufgaben der Albumine im menschlichen Körper sind u.a. die Homöostase des Plasmavolumens über die Regelung des onkotischen Drucks und der Transport von Salzen, Wasser, Farbstoffen (Bilirubin, Urobilin) sowie freien Fettsäuren.

Die exemplarische Darstellung des S-nitrosylierten humanen Serumalbumins (h-ASNO) erfolgte, wie von Stamler et al. beschrieben, ebenfalls durch eine säurekatalysierte S-Nitrosierung von kristallinem Humanalbumin (fettsäurefrei, Sigma, München) mittels Nitrit<sup>178</sup>. Es kann als hochmolekulares Nitrosothiol bezeichnet werden. Sowohl die Synthese der Stammlösung als auch die Anfertigung und Applikation der Verdünnungen entsprach den Prozeduren des Kapitels B.1.3.1. Sämtliche S-nitrosylierten Albuminlösungen wurden stets an jedem Versuchstag frisch zubereitet. Zur Qualitätskontrolle erfolgte die Identifizierung durch Aufnahme des typischen UV/VIS-Spektrums (Absorptionsmaxima bei 320-360 nm und ca. 550 nm; Shimadzu UV-3000)<sup>178</sup>.

#### B.1.4 Dinitrosyl-Eisen(II)-L-Cystein Komplex (DNIC)-Lösungen

Proben des DNIC wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Anatoly Vanin, Institut für angewandte Physiologie der Universität Freiburg, für diese Experimente zur Verfügung gestellt. Die Synthese ist der Arbeit von Vedernikov et al. zu entnehmen<sup>194</sup>. Die instabile Lösung mußte bei -80° C (flüssiger Stickstoff) und im Dunkeln gelagert werden. Eine kleine Menge der gefrorenen Stammlösung (3,6 mM) wurde jeweils unmittelbar vor der Applikation entnommen und gewogen, in einer entsprechend der geplanten Endkonzentration bemessenen eisgekühlten 0,9 % NaCl-Lösung gelöst und sofort appliziert (max. 15 µl, gasdichte Hamilton-Spritze). Berücksichtigt werden mußte, daß 1 mol DNIC 2 mol NO enthalten, die applizierten Konzentrationen DNIC also die doppelten Konzentrationen aktiver Komponenten enthielten. Die Angaben im Ergebnisteil berücksichtigen dies und sind zur besserer Vergleichbarkeit als Konzentrationen der Dinitrosyl-Gruppen zu verstehen.

#### B.1.5 Herstellung und Gehaltsbestimmung der Oxyhämoglobin-(HbO<sub>2</sub>)-Lösungen

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist oxygeniertes Hämoglobin ein in bislang publizierten Experimenten häufig eingesetzter Inhibitor der EDRF- und NO-Wirkungen (Vergl. Kap. A.1.2). Es reagiert mit NO und deaktiviert es unter Bildung von Methämoglobin<sup>66</sup>. Die Oxyhämoglobinlösung wurde in Anlehnung an zuvor beschriebene Methoden zubereitet<sup>37,38</sup>.

Rinderhämoglobin (doppelt kristallisiert, Sigma, München) in einer Konzentration von 1,2 mM (bezogen auf Häm) wurde in neutralem Aqua bidest. gelöst und 3 min. mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Linde) begast. Die anschließende Zugabe von Na-Dithionit (ca. 5-facher molarer Überschuß, Merck, Darmstadt) führte zu einer vollständigen Reduktion des Hämoglobins in den zweiwertigen Zustand und nachfolgend zu einer schnellen Sauerstoffanlagerung. Nach weiterer 15 minütiger Begasung mit Carbogen, erfolgte die gelchromatographische Reinigung und Auftrennung des Oxyhämoglobins. Mehrere Pasteurpipetten (5 mm x 7 cm) wurden hierfür mit einer Aufschwemmung von Sephadex G 25 (medium, Pharmacia Fine Chemicals) in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,40, gefüllt und mit der gleichen Pufferlösung mehrmals eluiert. Auf das Gel wurden sodann jeweils 500 µl der Oxyhämoglobinlösung aufgetragen und mit 50 mM Phosphatpuffer eluiert. Nach einer Trennstrecke von etwa 3 cm waren mehrere Banden zu erkennen, eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße. Aufgefangen wurde nur der Mittellauf der dunkelrot gefärbten Bande (Oxyhämoglobin) und dieser abschließend erneut 15 min. mit Carbogen begast.

Nach Verifizierung der Identität durch Kontrollaufnahme des Spektrums im Bereich von 300 bis 500 nm, erfolgte die Gehaltsbestimmung ebenfalls photometrisch unter Ausnutzung des Absorptionsmaximums von HbO<sub>2</sub> bei 415 nm ( $\epsilon_{415}$  nm 131000 bei pH 7)<sup>44,188</sup>. Dabei mußte auf die Neutralität des verwendeten Wassers geachtet werden um pH-abhängige Verschiebungen des

Spektrums zu vermeiden. Der Gehalt der Oxyhämoglobinlösung wurde auf eine Konzentration von 0,750 mM (bezogen auf Häm) eingestellt. Portionierte Volumina der Stammlösung wurden tiefgekühlt verwahrt und vor den entsprechenden Koinfusionsexperimenten aufgetaut, sodann die benötigten Verdünnungen unmittelbar vor dem Einsatz in mit Carbogen begaster physiologischer Kochsalzlösung angefertigt.

#### B.1.6            Sonstige Zubereitungen

Die Lösungen folgender Substanzen wurden durch vollständige Lösung der entsprechenden Festsubstanzen oder tiefgefrorenen Stammlösungen in physiologischer Kochsalzlösung stets frisch am Versuchstag angefertigt. Die weiteren Verdünnungen erfolgten ebenfalls in 0,9% NaCl-Lösung und fanden sofort Verwendung. Die gewünschten Effekte im Bioassay sind in den Klammern hinzugefügt: Phenylephrin (kristallin, Sigma; → Vasokonstriktion), Thromboxan-Analogen U-46,619 (tiefgefrorene Lösung, Upjohn; → Vasokonstriktion), Bradykinin (tiefgefrorene  $10^{-4}$  M-Lösung, Schwarz Pharma AG; → Stimulator der EDRF-Freisetzung), Superoxid Dismutase (aus Rindererythrozyten, lyophilisiertes Pulver, Sigma; → Inhibitor der Superoxid-Synthese), verschiedene Thiol-Koinfusionen (Thiolkomponenten: kristallin, Sigma; → Veränderung der kinetischen Charakteristika der untersuchten Substanzen), Ethylendinitrilotetraessigsäure (= EDTA; kristallin, Merck; → Komplexbildner), Quecksilber-(II)-acetat (kristallin, Sigma; → selektiver Abbau von S-Nitrosothiolen), L-Ascorbinsäure (kristallin, Sigma; → Antioxidationsmittel) und Pyrogallol (= 1,2,3-Trihydroxybenzene; kristallin, Sigma; → Reduktionsmittel).

### B.2            Endothelzellkultur und Füllung der Zellsäule

#### B.2.1            Gewinnung des Zellkulturmaterials

Als EDRF-Donator für die Bioassay-Experimente auf der Superfusions-Kaskade wurden in eine Zellsäule gepackte, mit Endothelzellen bewachsene Microträger eingesetzt<sup>70,71,107</sup>. Dieses bewährte Verfahren garantierte, abhängig von der Qualität der Endothelzellkulturen und der sorgfältigen Versuchsvorbereitungen, eine gute Reproduzierbarkeit sowohl der basalen als auch der durch Bradykinin stimulierten EDRF-Freisetzung.

Die Gewinnung der Endothelzellen erfolgte von frischen Schweineaorten, welche vom Schlachthof Düsseldorf bezogen wurden. In Gentamycin- und Azlocillin-haltigem PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, GIBCO BRL, Eggenstein) wurden diese bis zur Aufarbeitung, maximal eineinhalb Stunden nach Gewinnung, aufbewahrt. Nach Entfernung des Adventitiagewebes und Spülen mit PBS

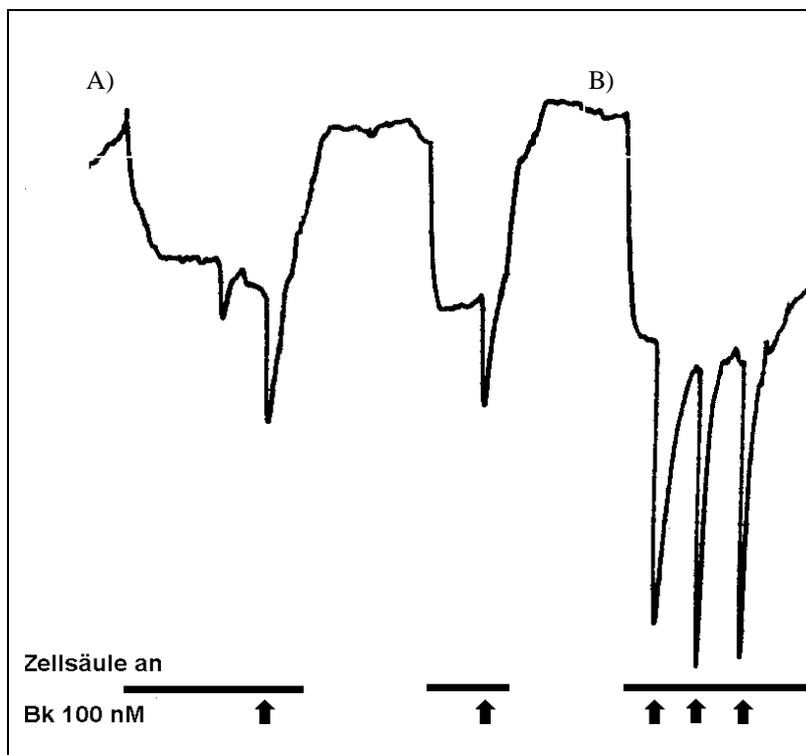
wurden die Aorten der Länge nach aufgeschnitten, auf Kork gespannt und ausgiebig mit steriler Kochsalzlösung gespült. Die Ablösung der Endothelzellen erfolgte entweder enzymatisch durch Dispase-Lösung (Boehringer Mannheim) oder durch vorsichtiges Abschaben mit einem Skalpell. Direkt anschließend wurden diese in sterilem Nährmedium suspendiert (nach Earle und Hank modifiziertes M 199 (Boehringer Mannheim), zusätzlich 18 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM HEPES und 0,2 % Rinderserumalbumin (Serva, Taufkirchen))<sup>44,103</sup>.

## B.2.2 Ansetzen der Zellkultur

Die isolierten Endothelzellen wurden bei Raumtemperatur für 6-8 min. mit 950 U/min zentrifugiert, das Zellsediment in 5-10 ml frischem Medium resuspendiert und auf sterile Petrischalen ausgesät. Das Kulturmedium enthielt gegenüber dem bei der Isolierung verwendeten Medium innerhalb der ersten Woche noch folgende Zusätze: 20 % fötales Kälberserum (GIBCO BRL, Eggenstein), 250 µg/ml Penicillin-Streptomycin (Boehringer Mannheim), 50 µg/ml Gentamicin (Boehringer M.) und 12,5 µg/ml Amphotericin B (Boehringer M.), danach nur noch 20 % Serum, 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin und 5 µg/ml Amphotericin B. Die Zellsuspension wurde bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte inkubiert. In der ersten Woche wurde das Medium zur Entfernung von Verunreinigungen und avitalen Zellen täglich, anschließend nur noch zweitägig gewechselt. Nach jeweils durchschnittlich 4-5 Tagen war das Passagieren der Zellkulturen wegen erreichter Konfluenz notwendig. Hierzu wurde zweimal mit PBS, welches zusätzlich 0,2 M EDTA enthielt, gespült und anschließend zur Ablösung der Zellen vom Plattenboden 15 min. mit 0,05%iger Trypsinlösung (Sigma) inkubiert. Das weitere Prozedere entsprach dem der ersten Zellaussaat. Je nach Qualität und Quantität (Bestimmung der Zellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer) der so gewonnenen Endothelzellen wurden diese nach 1-3 Passagen auf kugelförmige Microträger (Biosilon, Fa. Nunc, Wiesbaden) aufgebracht. 50-70 Mio. Zellen pro Gramm trockenes Trägermaterial (davon 2-3 g/Rührgefäß) wurden hierzu in sterilisierte, silikonisierte Pendelrührgefäße (Fa. Techne, Vertrieb Thermolux, Wertheim) pipettiert. In den ersten 24 Stunden (Anheftungsphase) waren diese mit 70-100 ml M199-Medium (incl. 30 mM HEPES und 20% Serumanteil) gefüllt, danach wurde die Füllmenge um weitere 70-100 ml Medium (ohne Serum) erhöht<sup>44,103</sup>. Der Rührerbetrieb erfolgte kontinuierlich mit 35 Umdrehungen/min). An jedem zweiten Tag wurde das Medium gewechselt und das Wachstum der Endothelzellen durch Phasenkontrastmikroskopie kontrolliert. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte darüber hinaus im Rahmen von Routinekontrollen, welche durch Mitarbeiter der Fa. Schwarz Pharma AG, Monheim, regelmäßig durchgeführt wurden, durch Elektronen-Rasterelektronenmikroskopie und immunologischer Fluoreszenzfärbung des Faktor-VIII-assoziierten Antigens ("von Willebrand Faktor", spezifischer Endothelzellmarker) mit kombinierter Kernfärbung<sup>11,81,170</sup>. Die Reinheit war bei allen zu Messungen verwendeten Kulturen >95 %. Abweichend von dieser Arbeitsvorschrift wurden bei den methodischen

Vorarbeiten auch einige Endothelzellkulturen direkt in mit Medium und kugelförmigen Microträgern gefüllten Rührgefäßen angezchtet. Hierbei unterblieb die in Kap. B.2.1 beschriebene enzymatische Ablösung der Endothelzellschicht mittels Dispase (Zellen wurden durch Abschaben von der Gefäßinnenwand gewonnen), die Ablösung der Zellen bei der Passage durch Trypsin (s.o.) entfiel ebenfalls. Untersucht werden sollte, ob es, wie von Sung et al. beschrieben, durch die enzymatische Vorbehandlung der Endothelzellen zu einer Andauung der Bradykinin-Rezeptoren kommt<sup>181</sup>. Zeigen würde sich dieses im Bioassay durch eine verminderte EDRF-Ausschüttung und entsprechend verringerter Dilatation der Gefäße nach Stimulierung der Endothelzellen durch Bradykinin.

Tatsächlich konnte bei direkt vergleichenden Experimenten, mit aus derselben Präparation stammenden gepoolten Endothelzellen unterschiedlicher Kultivierung, eine bis zu 4fach höhere vasodilatorische Aktivität der so angezchteten Zellen beobachtet werden (Abb. 4). Dieses Verfahren war allerdings mit einem erheblichen zeitlichen und organisatorischen Mehraufwand verbunden. Einerseits mußten deutlich mehr Schweineaorten zur Zellgewinnung präpariert werden (Wegfall der Zellzahlpotenzierung durch die Passage), andererseits wurden die Kulturen durch Verunreinigungen häufiger unbrauchbar (Wegfall der Waschung bei der Passage). In der Regel wurde daher mit enzymatisch vorbehandelten Zellkulturen gearbeitet.

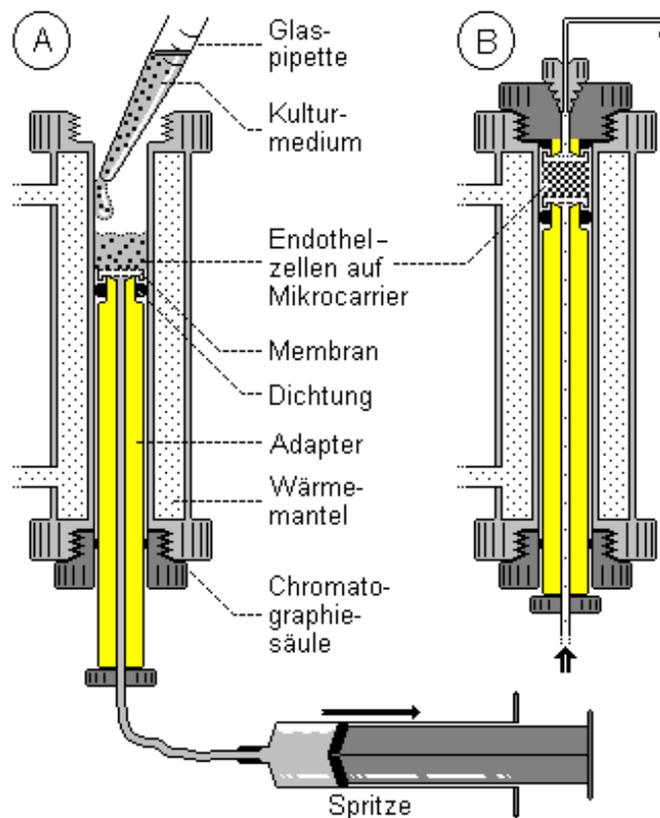


**Abb. 4:** Auswirkung der enzymatischen Endothelzellablösung auf die Bradykinin-stimulierte Freisetzung des EDRF. Aus derselben Präparation stammende gepoolte Endothelzellen wurden:

**A)** enzymatisch mit Dispase und Trypsin abgelöst,

**B)** lediglich von der Unterflächc abgcschabt. Letztere zeigten eine bis zu 4fach höhere vasodilatorische Aktivität. Registrierung des ersten Gefäßes

Nach Erreichen der Konfluenz (2-3 Tage nach Beimpfung) wurden die zelltragenden Microträger in die Zellsäule überführt. Verwendung fand eine modifizierte temperierte Chromatographiesäule (C 16/20 mit Adapter AC 16, Pharmacia, Freiburg), bei der anstelle des Schlauchverbinders am Endstück ein 3 cm kurzer abgewinkelter Kapillar-Polyethylen-Schlauch (Innendurchmesser 1 mm) zur Minimierung der Transitzeit des Effluates eingepaßt worden war<sup>70,71</sup>. Die auf 37° C vortemperierte Säule wurde geöffnet in eine Halterung eingespannt, mit der unter B.3.1 beschriebenen Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt und anschließend die Microträger vorsichtig einpipettiert (Abb. 5 A). Nach dem Verschluß der Säule durch Aufschauben des Endstücks (hierbei durften keine Luftblasen in der Säule gefangen werden) und dem Packen des Trägermaterials (Vorschieben des Adapters; Abb. 5 B), wurde diese direkt an die vorbereitete Superfusions-Bioassay-Kaskade angeschlossen.



**Abb. 5 A / B: Beladen der Endothelzellsäule.** Verwendung fand eine modifizierte temperierte Chromatographiesäule. **A:** Beladen der Zellsäule durch Einpipettieren der bewachsenen Microträger. **B:** Aufsetzen des Endstücks, Packen der Microträger durch vorsichtiges Vorschieben des Adapters. Nach mind. 15 min. Vorperfusion mit der Pufferlösung konnte die Säule für die Experimente eingesetzt werden.

Die Säule wurde anschließend für mindestens 15 min. konstant mit 5 ml/min der auf 37°C erwärmten Krebs-Henseleit-Lösung von unten nach oben vorperfundiert bevor das Effluat nun über die Detektorgefäße geleitet werden konnte. Hierdurch wurde zum einen das in der Säule verbliebene Medium ausgespült, zum anderen konnten sich die Endothelzellen an die veränderten Umgebungsbedingungen adaptieren. Vorversuche haben gezeigt, daß nach dieser Zeit die basale Freisetzung von EDRF für mehrere Stunden konstant bleibt (Daten nicht gezeigt).

Ein Milliliter gepacktes Säulenvolumen enthielt durchschnittlich 0,96 g Trägermaterial bei einer initialen Bewuchsdichte von  $5-7 \times 10^6$  Zellen pro g. Im Rahmen der Vorarbeiten wurden Superfusions-Bioassay-Experimente mit 0,5-5 ml gepackten Säulenvolumen durchgeführt, wobei sich ein optimales Säulenvolumen von 1,5-2,5 ml herausstellte (gemessen an der Stärke der Vasodilatation nach Stimulation).

### **B.3            Die Superfusions-Bioassay-Kaskade**

Die von J.R. Vane 1964 erstmalig beschriebene Superfusions-Bioassay-Kaskade wurde in modifizierter Form in der pharmakologischen Abteilung der Fa. Schwarz Pharma AG installiert und während der Vorversuche den besonderen Bedürfnissen angepaßt<sup>189 a</sup>. Sie fand bereits mehrfach bei entscheidenden Experimenten im Rahmen der EDRF-Forschung Verwendung<sup>70,71,82,106,107,149</sup> und stellt ein zwar aufwendiges, aber hochempfindliches Modell zur Erfassung und Beschreibung instabiler vasoaktiver Substanzen dar.

Bei Experimenten mit der Endothelzellsäule stellt diese quasi das physiologische Endothel dar, nachgeschaltete endothelfreie arterielle Gefäßstreifen die abluminal gelegene Mediamuskulatur. Der EDRF wird von den Endothelzellen freigesetzt und erreicht nach einer bestimmten Transitzeit über die Applikationsrinne der Bioassay-Kaskade die glatte Muskulatur. In den Experimenten wurden drei hintereinander geschaltete Detektorgefäße mit je einem deendothelialisierten Kaninchenarterienstreifen zur detaillierten Erfassung der pharmakokinetischen Charakteristika des EDRF und der untersuchten EDRF-Kandidaten verwendet.

Zwischen den einzelnen Detektorgefäßen bestand eine Transitzeit von 3 s. Durch Koinfusion pharmakologisch aktiver Lösungen in die Applikationsrinne über dem ersten Gefäß ließen sich die Charakteristika der vasoaktiven Substanzen manipulieren und nachfolgend detailliertere Unterschiede herausarbeiten (Kap. B.3.3, Abb. 7, Seite 32).

### B.3.1            Krebs-Henseleit Pufferlösung

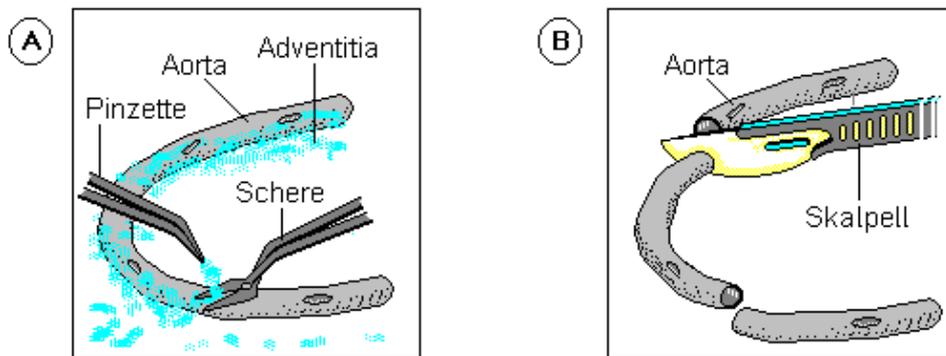
Sowohl während der Präparation als auch während der Bioassay-Experimente wurde zur Perfusion der Kaninchenaorten eine modifizierte Krebs-Henseleit Pufferlösung folgender Zusammensetzung eingesetzt (Mengen bezogen auf 1 Liter Aqua bidest.): 126,8 mmol NaCl, 5,9 mmol KCl, 1,2 mmol MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrat, 1,2 mmol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Monohydrat, 2,5 mmol CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat, 5 mmol Glucose, 30 mmol NaHCO<sub>3</sub>. Der Zusatz von 10 µM Indometacin verhinderte Interferenzen durch Metabolite des Prostaglandinstoffwechsels (z.B. Prostacyclin; Hemmung der Cyclooxygenase), ohne jedoch die EDRF-Freisetzung aus Endothelzellen zu beeinflussen<sup>61,70</sup>. Die Pufferlösung wurde an jedem Versuchstag frisch zubereitet, in ein Vorratsgefäß gefüllt und vor der Verwendung mindestens 30 min. bei Raumtemperatur über eine Fritte mit Carbogen (5 % CO<sub>2</sub> / 95 % O<sub>2</sub>) begast. Der pH-Wert wurde engmaschig kontrolliert und, falls nötig, mit 2 N NaOH auf pH 7,4 korrigiert. Während der Bioassay-Experimente fand eine permanente Begasung der Lösung statt, wodurch eine nahezu konstante Sauerstoffsättigung (pO<sub>2</sub> ca. 600 mmHg) erreicht wurde. Da sowohl die EDRF-Freisetzung als auch die NO-Oxidation sauerstoffabhängig sind, war eine konstante Sauerstoffsättigung für die Reproduzierbarkeit der Messungen unabdingbar<sup>23,34</sup>.

### B.3.2            Entnahme und Präparation der Kaninchenaorten

Als Detektor für die applizierten vasoaktiven Substanzen und des EDRF dienten drei ausreichend lange und kräftige endothelfreie Gefäßstreifen. Die meisten Erfahrungen lagen bei Verwendung von Kaninchenaorten vor. Sinnesphysiologisch niedriger entwickelte Tiere (siehe § 9 der seit dem 1. Januar 1987 geltenden Fassung des Tierschutzgesetzes) waren für diese Methodik nicht geeignet.

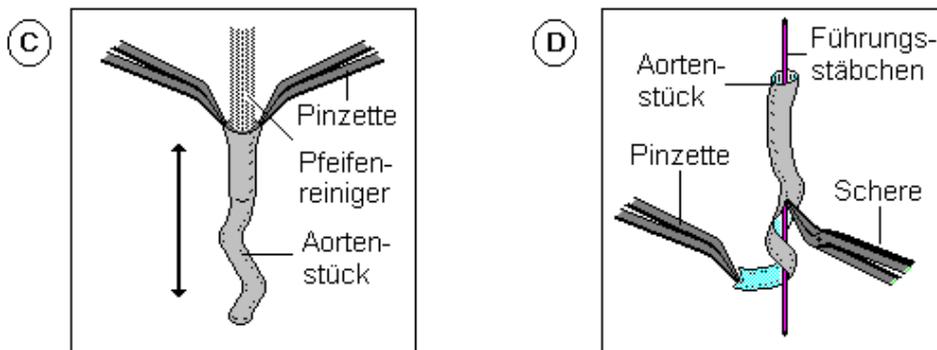
Verwendung fanden von Charles River Deutschland gezüchtete männliche weiße Neuseeland Kaninchen, welche im Alter von wenigen Wochen geliefert und bis zur Entnahme der Aorten entsprechend den Gesetzesvorlagen gehalten wurden.

Die zwischen 2 und 2,8 kg schweren Tiere wurden durch entsprechende Dosen Thiopental in tiefe Vollnarkose versetzt und anschließend das Abdomen und der Thorax eröffnet. Die Aorta konnte nun sorgfältig in situ präpariert werden. Nach Entnahme des Herzens folgte ein Durchspülen der Aorta nach distal mit der begasten Pufferlösung zur Entfernung von Blutrückständen. Die Gefäßabgänge wurden durchtrennt und die Aorta vom distalen Bogen bis zum infrarenalen Anteil in toto entnommen und sofort in eine Schale mit begaster Krebslösung eingebracht. Dort erfolgte die weitere Feinpräparation. Verbliebene Blutreste wurden ausgespült, anschließend die Adventitiarreste gefäßschonend entfernt (Abb. 6 A), sodann sämtliche Gefäßabgänge ausgeschnitten und schließlich mit einem Skalpell drei gleich lange Gefäßsegmente zugeschnitten (Abb. 6 B).



**Abb. 6 A / B: Feinpräparation der Aortenstreifen. A:** Entfernung von Blut- und Adventitiaresten nach der Entnahme. **B:** Teilung in drei gleich lange Gefäßsegmente

Die sorgfältig Entfernung der Endothelzellschicht erfolgte mit Hilfe handelsüblicher Pfeifenreiniger. Durch mehrmaliges vorsichtiges Durchbürsten der Gefäßlumina ließ sich das Endothel sicher entfernen (Abb. 6 C). In Vorexperimenten konnte bei derart behandelten Gefäßen nach direkter Stimulation durch Bradykinin keine Vasorelaxierung mehr detektiert werden. Die komplette Entfernung mußte sichergestellt sein, da ansonsten zum einen die Detektorgefäße selber nach Stimulation EDRF freigesetzt hätten, zum anderen eine Inaktivierung der applizierten vasorelaxierenden Substanzen im Endothel nicht auszuschließen gewesen wäre. Beides hätte eine Interpretation der Resultate unmöglich gemacht.



**Abb. 6 C / D: Feinpräparation der Aortenstreifen. C:** Entfernung der Endothelzellschicht durch Durchbürsten der Gefäßsegmente. **D:** Anfertigung der Aortenstreifen durch spiralförmige Schnittführung.

Die Aortenstücke wurden schließlich durch eine spiralförmige Schnittführung in Streifen gleicher Breite geschnitten (ca. 5 mm). Um den Ringmuskelcharakter der glatten Mediamuskulatur weitgehend zu erhalten, durfte die Steigung der Spirale nicht zu steil ausfallen (Abb. 6 D). Zuletzt wurden jeweils ca. 10 cm lange Nylonhaltefäden an den Gefäßenden angebracht<sup>70,71,82,90,130</sup>.

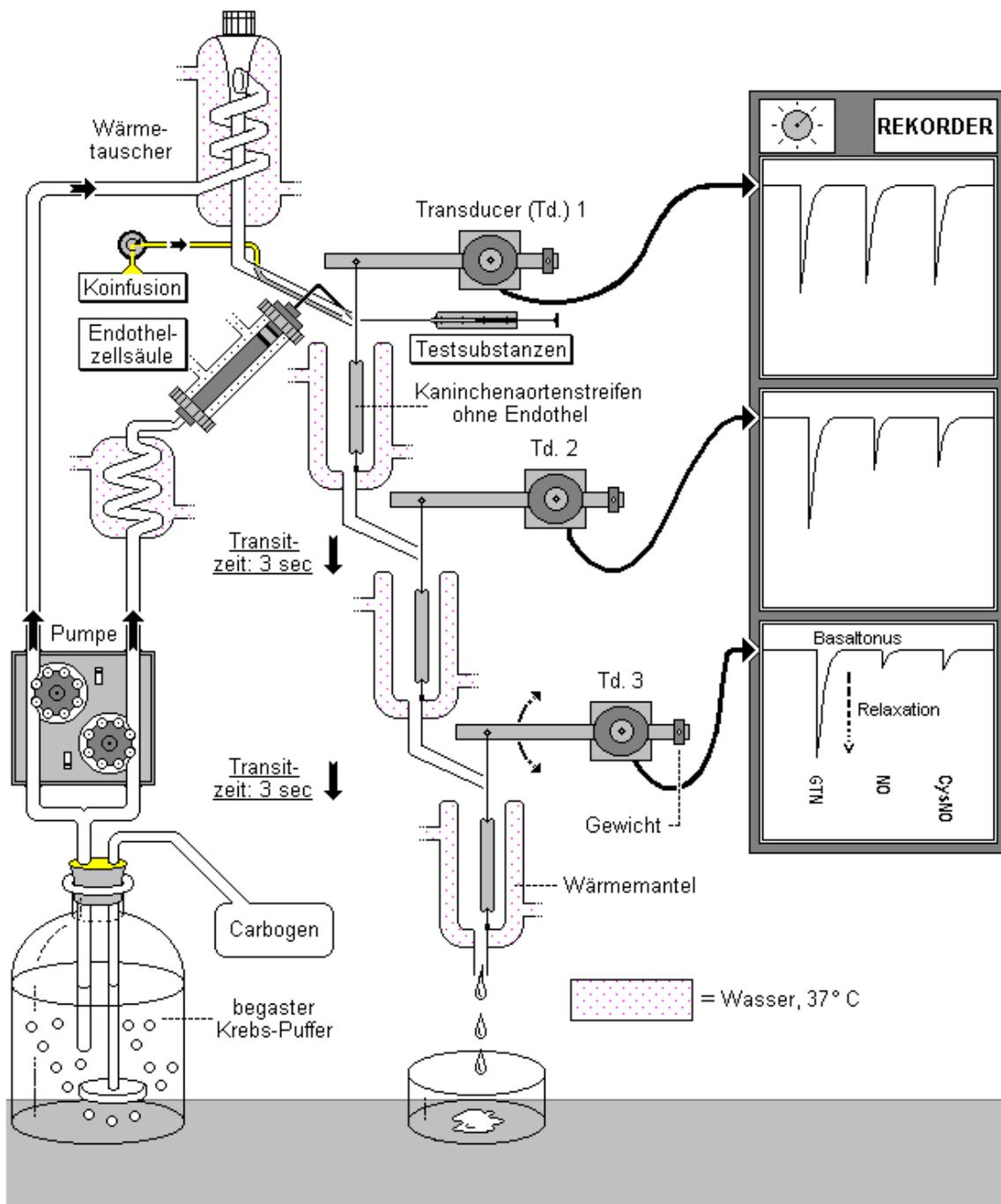
### B.3.3            Aufbau der Superfusions-Kaskade

Die drei wie oben präparierten endothelfreien Aortenstreifen wurden senkrecht in drei untereinander versetzt angebrachte zylinderförmige Glaswärmemäntel eingehängt. Die unteren Befestigungsfäden der Aortensegmente wurden hierzu am Auslaß der Wärmemäntel fixiert, die oberen mittels Fadenanschlußklemmen in die jeweils waagrecht darüber angebrachten Hebelkraftaufnehmer eingehängt (Lever Transducer B Typ 368, HSE, March-Hugstetten). Die Temperatur im Inneren der Mäntel (Innendurchmesser 4 cm) betrug bei permanent kontrollierter Beheizung durch ein Wasserbad konstant 37°C (Abb. 7, S. 32). Zum Spannen der Gefäße wurde nun eine Vorlast von 2 g an die Transducerhebel angebracht. Die Wirkungen vasoaktiver Substanzen auf die einzelnen Gefäßpräparate ließen sich nun als Längenänderung der Aortensegmente messen, die durch die Lageänderung der Transducerhebelarme erzeugten Signale wurden von einem Drei-Kanal-Schreiber aufgezeichnet (WATANABE Linearorder mark VII Typ 3101 mit Bridge Coupler Typ 570, HSE). Zur Perfusion der Gefäße und als Transportmedium für die eingebrachten Testlösungen und Koinfusionen diente die unter Punkt B.3.1 beschriebene Krebs-Henseleit-Lösung. Hierzu wurden konstant 5 ml/min der Carbogen-begasteten Lösung aus einem Vorratsgefäß durch einen beheizten Wärmetauscher gepumpt (pulsationsarme Schlauchpumpe, Minipuls 2, ABIMED, Langenfeld) und anschließend über das oben hängende erste, von dort zum zweiten und schließlich zum dritten Aortenstreifen geleitet (Superfusion, Abb. 7). Die Temperatur des Puffers betrug konstant 37° C, eine Kontrolle der Superfusatflußmenge erfolgte mehrfach während der Experimente. Die Transitzeiten der Lösung vom Abtropfen des jeweils oben angebrachten Gefäßes bis zum Erreichen des darunter befindlichen, konnte durch entsprechend lange Polyethylen-Rinnen, welche an den Auslaßöffnungen der Wärmemäntel angebracht waren, variiert werden.

Um die Wirkungen der instabilen Testsubstanzen (z.B. NO, EDRF, S-Nitrosocystein) optimal zu erfassen, wurde die Transitzeit zwischen den Gefäßen auf jeweils 3 s eingestellt (Bestimmung durch die nacheinander einsetzende Vasorelaxation nach Applikation von 50 mM Glyzeroltrinitrat (GTN) sowie durch Pufferfärbung mit Methylblau in den Vorexperimenten). In eine Rinne am Auslaß des über dem obersten Gefäß angebrachten Wärmetauschers, konnten die zu testenden Substanzen in die Pufferlösung eingebracht werden (Abb. 7). Da in diese Rinne ebenfalls das zur Eichung der Gefäße bestimmte GTN sowie die Koinfusionen eingeleitet wurden, wird diese im Folgenden mit "Applikationsrinne" bezeichnet.

Je nach Experiment und Substanz erfolgten die Applikationen entweder durch gasdichte Hamilton-Spritzen manuell (5-50 µl in 1 min) oder im Falle der Koinfusions- und einzelner Dauerinfusionsexperimente über Infusionspumpen automatisch (Precidor Typ 5003, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Von dort betrug die Transitzeit bis zum obersten, ersten Aortenstreifen 1 s. In dieser Konfiguration konnte also das vasorelaxierende Verhalten des EDRF und der EDRF-Kandidaten mit Hilfe der Detektorgefäße für 1, 4 und 7 s nach Einbringung in die Pufferlösung

registriert werden. Über die unterschiedlichen Längenänderungen (Tonusänderung) der einzelnen Aortenstreifen, also dem Aktivitätsverlust der Substanzen während der Gefäßpassage, ließen sich die Halbwertzeiten ermitteln. Über Registrierung der Zeiten bis zum erneuten Erreichen des Ruhetonus nach Relaxation wurde die Relaxationsdauer bestimmt. Genauere Erläuterungen zur Auswertung finden sich im Kapitel B.4 (S. 36).



**Abb. 7: Schematische Darstellung der Superfusions-Bioassay-Kaskade.** Erläuterungen sind dem Text Kap. B.3.3 zu entnehmen.

Abweichend vom obigen Aufbau mußte für die Erfassung der kinetischen Charakteristika des EDRF verfahren werden. Hierzu wurde die im Kap. B.2.3 beschriebene, mit einem Wärmemantel versehene Endothelzellsäule (37° C) vor das erste Gefäß geschaltet. Mit Hilfe einer zusätzlichen pulsationsarmen Schlauchpumpe (Vermeidung einer übermäßigen, durch Schubspannung induzierten EDRF-Freisetzung; Minipuls 2, ABIMED, Langenfeld) wurde die Säule zuvor mit 5 ml/min auf 37° C erwärmter Pufferlösung getrennt perfundiert und das Effluat sodann in die Applikationsrinne über dem ersten Gefäß geleitet (Abb. 7). Durch die Perfusion der Säule bei nahezu senkrechter Stellung von unten nach oben konnte einer Gasblasenansammlung im Säulenlumen und damit der Zerstörung der Endothelzellen sowie vorzeitigen Inaktivierung des EDRF vorgebeugt werden.

Durch die getrennten Pufferleitungen war es möglich, die Zellsäule während eines Experimentes durch Einbringen in bzw. Entfernen aus dem Superfusatstrom beliebig oft "ein-" bzw. "auszuschalten" und hierüber die durch die basale Freisetzung des EDRF bedingte Vasorelaxation zu messen. Die jeweiligen Pufferlösungen mußten vor dem Umschalten der Pufferleitungen auf absolut gleiche Temperatur eingestellt sein (+/- 1 %), da schon geringste Temperaturdifferenzen eine Tonusänderung der Detektorgefäße verursachten (Tonusabnahme bei Erwärmung).

Sämtliche pufferleitenden Schläuche (Tygon) waren geringen Innendurchmessers (3 mm, kürzere Transitzeit), sauerstoffundurchlässig (konstanter pO<sub>2</sub>) und lipophob (Verhinderung der Diffusion von lipophilem GTN in das Schlauchmaterial). Bei allen Experimenten wurde auf gleiche Raumtemperatur geachtet, die Superfusions-Kaskade vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt (Vasorelaxation durch UV-Strahlung; Daten nicht gezeigt) und erschütterungsfrei gearbeitet (artifizielle Tonusänderungen).

#### B.3.4            Methodische Vorarbeiten

Der Schwerpunkt der methodischen Vorarbeiten lag auf folgenden zwei Punkten. Zum einen mußte die neu installierte Apparatur den Erfordernissen entsprechend dahingehend optimiert werden, daß aussagekräftige und gut reproduzierbare Resultate erzielbar waren (u.a. Handhabung). Zum anderen waren zahlreiche Vorexperimente mit den zumeist erstmalig auf einer Superfusions-Kaskade eingesetzten Testsubstanzen notwendig. Deren spezifisches Verhalten, kinetische Charakteristika sowie geeignete Konzentrationsbereiche mußten ermittelt werden.

Die Bioassay-Superfusions-Kaskade wurde für diese Experimente erstmalig in der pharmakologischen Abteilung der Schwarz Pharma AG, Monheim, eingesetzt. Die Bestandteile waren teils von kommerziellen Anbietern, teils Maßanfertigungen. Der Aufbau erfolgte in Anlehnung an Literaturangaben<sup>71,82,106,107,149,189 a</sup>.

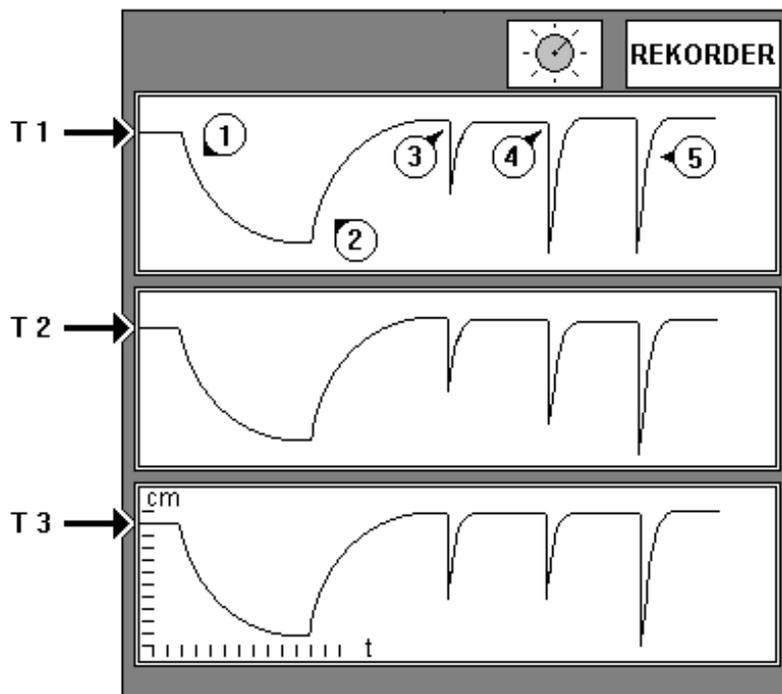
Im Verlaufe der Vorexperimente wurden zahlreiche Änderungen an der Apparatur vorgenommen. So konnte die Bedienbarkeit verbessert und eine Minimierung von Artefakte erzielt werden (z.B. Zellsäulenaufhängung). Es mußte die notwendige Konstanz der Ausgangsparameter wie Temperatur

und Flußmenge des Puffers, Temperatur der Wärmemäntel, Transitzeit zwischen den Gefäßen u.ä. optimiert werden. Eine Erkenntnis aus den umfangreichen Vorexperimenten mit Einsatz der Zellsäule soll exemplarisch kurz erwähnt werden: Der basal freigesetzte EDRF ließ sich nur unter erheblichem Aufwand nahezu artefaktfrei detektieren. Die bereits zuvor erwähnte Forderung, daß die Puffertemperatur des Zellsäuleneffluates mit +/- 1% Toleranz mit derjenigen des über die Applikationsrinne geleiteten Puffers übereinstimmen mußte, konnte über zwei getrennt beheizbare, parallel geschaltete Wasserbäder und Wärmetauscher erfüllt werden. Die Temperaturabgleichung erfolgte durch geeichte, von der Schwarz Pharma AG angefertigte Temperatursonden in den jeweiligen Pufferflüssen. Um ein störungsfreies Umschalten von Superfusat zu Säuleneffluat ohne Unterbrechung der Aortenstreifenbenetzung zu ermöglichen, mußten zusätzliche Pufferleitungen angebracht werden. Auf die Beschreibung weiterer Änderungen muß aus Platzgründen verzichtet werden.

### B.3.5            Ablauf eines typischen Bioassay-Experimentes

#### *B.3.5.1*            *Vorbereitungen, Kalibrierung*

Folgende Prozeduren wurden an jedem Versuchstag durchgeführt. Nach Erwärmung der Apparatur auf 37° C und der Eichung des Verstärkers und der Registriereinheiten, erfolgte die Entnahme der Kaninchenaorta. Nach Überführung in den mindestens 30 min. Carbogen-begasteten frischen Krebs-Henseleit-Puffer schloß sich die Feinpräparation an. Die Superfusion wurde angeschaltet und sodann die Aortenstreifen in die Transducer-Meßarme eingehängt. Die Arretierung der auf 2g Vorlast eingestellten Transducerarme konnte nun gelöst werden, die Adaptation (Vordehnung) der Aortenstreifen begann (Abb. 8). Nach 30 -60 min war diese abgeschlossen. Durch Koinfusion von U 46,619 (50 nM) oder Phenylephrin (100-300 nM) erfolgte nun die submaximale Vorkontraktion der Gefäßstreifen. Dabei wurde zunächst die Sensibilität der Gefäße auf Phenylephrin getestet. Es ist bekannt, daß Gefäßstreifen individuell unterschiedlich auf die Gabe von Phenylephrin reagieren. Die Reaktion reichte von einer sehr starken Kontraktion bis zum Ausbleiben einer Reaktion, es wurde daher die optimale Dosis zur Koinfusion bei jedem Experiment neu titriert. Bei fehlender Reaktion fand der Vasokonstriktor U 46,619 Verwendung. Bis zum Erreichen des erneuten Ruhetonus nach ca. 30 min wurden die vorgesehenen Testlösungen vorbereitet. Als nächstes erfolgte die Kalibrierung der Meßsysteme (Transducer, Verstärker, Mehrkanalschreiber) und die wichtige Abgleichung der Gefäßempfindlichkeiten. Wiederholt wurde der stabile Nitrovasodilator Glyceroltrinitrat <sup>45</sup> in die Pufferlösung injiziert (GTN; 50 nM in 1 min; Schwarz Pharma AG, Monheim) und jeweils die Amplitudenstärke der Schreibereinheiten derart verändert, daß schließlich die Relaxation der Gefäßsegmente zu einem etwa gleich großen absoluten Registriausschlag führten (Abb. 8) <sup>71</sup>.



**Abb. 8: Adaptation, Vor-  
kontraktion und Eichung  
der Gefäße (T 1-3).**

Aufzeichnung des Gefäß-  
segmenttonus als Funktion  
der Zeit (Schreiberregist-  
rierung).

**1:** Vordehnung der Gefäße  
unter 2g Vorlast.

**2:** Koinfusion von U46,619  
bzw. Phenylephrin, die Ge-  
fäße kontrahierten submaxi-  
mal.

**3+4:** Eichen der Gefäß-  
empfindlichkeit durch wie-  
derholte GTN-Applikation  
und Variierung der Ampli-  
tuden.

**5:** Schließlich gleiche Am-  
plituden der Tonusänderung  
an allen Gefäßen nach GTN-  
Gabe.

### B.3.5.2 Experimente ohne Endothelzellsäule

Die Aufnahme von Konzentrationswirkungskurven der EDRF-Kandidaten sowie direkte Vergleiche untereinander wurde ohne Endothelzellsäule durchgeführt. Nach zügiger Bereitung der gewünschten Verdünnungen, wurden die vorbereiteten Testlösungen nacheinander in die Applikationsrinne über dem ersten Gefäß injiziert (Hamilton-Spritzen, 5-50  $\mu$ l). Zwischen den einzelnen Applikationen lagen meist 15 min., in denen die Gefäße ihren Ruhetonus wiedererlangen konnten. In regelmäßigen Abständen erfolgten Applikationen von GTN zur Überprüfung der Gefäßempfindlichkeit. Ausreichend reproduzierbare Tonusamplituden der Aortensegmente wurden bis zu einer Gesamtversuchsdauer von 12 Stunden beobachtet.

### B.3.5.3 Experimente mit Endothelzellsäule

Für Untersuchungen des EDRF wurde die vorbereitete und perfundierte Endothelzellsäule mit dem Auslaß in die Applikationsrinne geschwenkt und, ohne die Gefäßbenetzung zu unterbrechen, gleichzeitig die Superfusion über den Wärmetauscher der Kaskade abgeschaltet (Abb. 7, S. 32). Auf den exakten Abgleich der Puffertemperaturen (37° C) und Flußraten (5 ml/min) wurde bereits hingewiesen. Die gesamte Pufferlösung erreichte nun erst nach Passage der Zellsäule die Gefäße. Je

nach Beladung der Säule konnte so direkt eine stärkere Relaxation der Streifen durch den basal freigesetzten EDRF beobachtet werden. Die Applikation der Testsubstanzen erfolgte, wie zuvor beschrieben, weiterhin in die Applikationsrinne. Über Bradykininjektionen in den Einstrom der Zellsäule erfolgte die Stimulation der Endothelzellen zur EDRF-Freisetzung (1 min Infusion durch Perfusor, 10-100 nM). Frisch beladene Zellsäulen konnten ca. 4 h eingesetzt werden bis die Stimulierbarkeit der Zellen deutlich nachließ.

#### *B.3.5.4 Experimente mit Koinfusionen*

Die verschiedenen Koinfusionen (z.B. HbO<sub>2</sub>) zur Manipulation der kinetischen Charakteristika (Halbwertszeit, Relaxationsdauer, vasorelaxierende Potenz) erfolgte über in die Applikationsrinne eingebrachte kleinlumige Infusionsschläuche. Über Infusomaten konnten konstante Volumina der Pufferlösung beigemischt werden (max. 50 µl/min.), durch die Verdünnung des Puffers waren keine Änderung des Ruhetonus detektierbar. Bei allen Koinfusionsexperimenten wurden zuerst die Testsubstanzen alleine (also ohne Koinfusion) appliziert um repräsentative Kontrollreaktionen zu erhalten. Danach wurde die Koinfusion gestartet und die Applikationen der Testsubstanzen wiederholt. Die Änderungen der kinetischen Charakteristika konnten somit direkt erfaßt werden.

### **B.4 Auswertung der Experimente**

#### **B.4.1 Halbwertszeiten**

Die Vermessung der registrierten Amplituden auf dem Schreiberprotokoll erfolgte mit Hilfe einer Schieblehre. Unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen der einzelnen Substanzen, wurde die am ersten Gefäß erhaltene Amplitude gleich 100% gesetzt und die zugehörigen Ausschläge der nachgeschalteten Gefäße hierzu in Relation gesetzt. Dabei waren die durch die GTN-Eichung erhaltenen Amplituden zu Beginn jedes Experiments zu berücksichtigen. Da immer geringfügige Unterschiede in der Gefäßempfindlichkeit der einzelnen Gefäßsegmente bestanden, die Amplituden der GTN-Eichung also trotz Angleichung der Amplitudenverstärkung nie exakt übereinstimmten, wurden die entsprechenden Differenzen rechnerisch berücksichtigt.

Die biologische Halbwertszeit (HWZ) der eingesetzten Substanzen beschreibt deren zeitabhängigen Aktivitätsverlust (Inaktivierung, Zerfall) bedingt durch verschiedene einwirkende Faktoren. Das erste Gefäß detektiert die maximale Aktivität (N) zum Zeitpunkt 0 s (N<sub>0</sub>), das zweite und dritte Gefäß die Restaktivität zum Zeitpunkt t = 3 s bzw. 6 s (N<sub>t</sub>). Angaben von Palmer et al. zufolge entspricht der Zerfall von NO in wäßrigen Pufferlösungen einer Reaktion erster Ordnung<sup>149</sup>. Bei einem berechneten

Sauerstoffpartialdruck von ca. 600 mm Hg (ca. 0,2 mM O<sub>2</sub>) liegt ein enormer Sauerstoffüberschuß vor, es kann daher von einer Reaktion pseudoerster Ordnung ausgegangen werden. Gleiches darf für die anderen instabilen Kandidaten und den EDRF unterstellt werden, entweder da sie als wirksame Komponente NO freisetzen oder weil deren Kinetik in bisherigen Experimenten der des EDRF und NO ähnelte. In die Berechnung floß der erste und dritte Meßpunkt ein (N<sub>0</sub> u. N<sub>6</sub>; zwei Transitzeiten = 6 s Zeitdifferenz), hierdurch konnte eine gute Konkordanz der Daten erreicht werden.

Die in Abb. 9 wiedergegebenen Gleichungen (2) und (3) werden zur Berechnung von natürlichen Inaktivierungs- bzw. Zerfallsprozessen pseudoerster Ordnung benutzt<sup>76,141</sup>. Durch Auflösen nach λ (λ = Zerfallskonstante der untersuchten Substanz, unbekannt) und anschließender Gleichsetzung ergibt sich Gleichung (1). Die Halbwertzeiten konnten hierüber berechnet werden.

$\textcircled{1} \quad T_{1/2} = \frac{-t}{\ln(N_t / N_0) \cdot \ln 2}$	$\textcircled{2} \quad N_t = N_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$	$\textcircled{3} \quad T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$
---	--	---

**Abb. 9: Berechnung der Halbwertzeiten.** Gleichung (2): Berechnung der Aktivität (N) zum Zeitpunkt (t) bei einem Zerfall pseudoerster Ordnung; Gleichung (3): Berechnung der Halbwertzeit (T<sub>1/2</sub>) bei bekannter Zerfallskonstante λ. Da λ unbekannt ist, ferner von den eingesetzten Konzentrationen abhängig ist, müssen Gleichung (2) u. (3) nach λ aufgelöst und gleichgesetzt werden. Gleichung (1) resultiert. Hierüber kann nun die HWZ berechnet werden. N<sub>0</sub> = Aktivität zum Zeitpunkt 0 s (= 1. Meßwert / 1. Gefäß = 100%), N<sub>t</sub> = Aktivität zum Zeitpunkt t (3. Meßwert / 3. Gefäß, wurde gemessen), t = Zeit (hier 6 s = zwei Transitzeiten).

#### B.4.2            Relaxationsdauer

Erstmalig wurde die Dauer der durch die vasoaktiven Substanzen und den EDRF induzierten Gefäßrelaxierung systematisch erfaßt und berechnet (Wirkungsdauer). Die Relaxationsdauer umfaßt sämtliche mit der Relaxierung und erneuten Wiederherstellung des Ausgangstonus verbundenen chemischen u. biochemischen Prozesse in den glattmuskulären Zellen summarisch (z.B. vollständige Aktivierung und Deaktivierung der Guanylatcyclase und Proteinkinasen). Bestimmt wurde die Zeitdifferenz zwischen dem Beginn der Relaxierung nach Applikation der entsprechenden Lösung bis zum Abklingen von 90 % des Maximalausschlags. Da der Ruhetonus einer ständigen geringen physiologischen Schwankung unterlag (spontane Variabilität des Gefäßtonus), war als Endpunkt das Erreichen des vor der Applikation bestandenen Ruhetonus (= Abklingen von 100 % des Maximalausschlags) nicht geeignet. Nach Applikation einer Testsubstanz wurden die jeweiligen Zeitdifferenzen der drei Gefäße ermittelt, der entsprechende Mittelwert floß in die Auswertung ein.

#### B.4.3 Vasorelaxierende Potenz

Die vasorelaxierende Potenz der Testsubstanzen wurde im direkten Vergleich untereinander ermittelt. Konzentrationen, welche zum Erreichen nahezu gleich starker Relaxationen des ersten Gefäßes notwendigen waren, wurden in Relation zueinander gesetzt. Die vasorelaxierende Potenz des NO wurde dabei gleich 1 gesetzt. Bei DNIC wurde die Konzentration der Dinitrosyl-Komponente berücksichtigt.

#### B.4.4 Änderung der kinetischen Charakteristika durch Koinfusionen

Die Halbwertzeiten und Relaxationsdauer der Substanzen während der Koinfusion reaktiver Lösungen wurden wie folgt berechnet:

Zur Ermittlung veränderter relaxierender Aktivitäten, wurden die durch den EDRF und die Testsubstanzen während der Koinfusion induzierten Tonusveränderungen an den drei Gefäßen in Relation zu den jeweiligen zuvor ermittelten Kontrollwerten ohne Koinfusion gesetzt. Die Änderungen wurde in Prozent berechnet. Die Konzentrationen der koinfundierten Substanzen, die zu einer 50 %igen Abnahme der Ausgangsantwort führten ( $IC_{50}$ ), wurde graphisch ermittelt.

#### B.4.5 Statistik

Bei den im nachfolgenden Text sowie in den Tabellen angeführten Daten handelte es sich, soweit nicht anders angegeben, um Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler vom Mittelwert (SD) aus n individuellen Versuchen, durchgeführt an verschiedenen Tagen. Sofern Vergleiche der Mittelwerte von Halbwertzeit und Relaxationsdauer verschiedener vasoaktiver Substanzen nach Mehrfachapplikationen über die Kaskade durchgeführt wurden, erfolgte eine Überprüfung der Daten auf Signifikanz mittels ANOVA-Test. Berechnete p-Werte von  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

Gleiches galt für Vergleiche der Mittelwerte von Halbwertzeit und Relaxationsdauer nach Mehrfachapplikation der gleichen vasoaktiven Substanz über die Kaskade ohne und mit Koinfusion reaktiver Lösungen. Änderungen der kinetischen Charakteristika wurden mit Hilfe des ANOVA-Tests auf Signifikanz überprüft, p-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

## C

## ERGEBNISSE

### C.1 Experimente ohne Koinfusionen. Vorselektion der EDRF-Kandidaten

Hydroxylamin, DNIC, nitrosyliertes Humanalbumin und die meisten *S*-Nitrosothiole waren zuvor noch nicht auf einer Superfusions-Bioassay-Kaskade mit Gefäßstreifen eingesetzt worden. Somit konnten keine Vorergebnisse über deren vasorelaxierendes Verhalten unter Einsatz dieser Methodik zur Orientierung herangezogen werden; es mußten zuerst geeignete Konzentrationsbereiche, u.a. über das Erstellen von Konzentrationswirkungskurven, ermittelt werden. Nachdem von allen Kandidaten und dem EDRF genügend Daten erhoben waren, wurde über deren ermittelte Halbwertzeiten und Relaxationsdauer eine Vorselektion hinsichtlich der möglichen Identität mit dem EDRF durchgeführt.

#### C.1.1 Basal und nach Bradykininstimulation freigesetzter EDRF

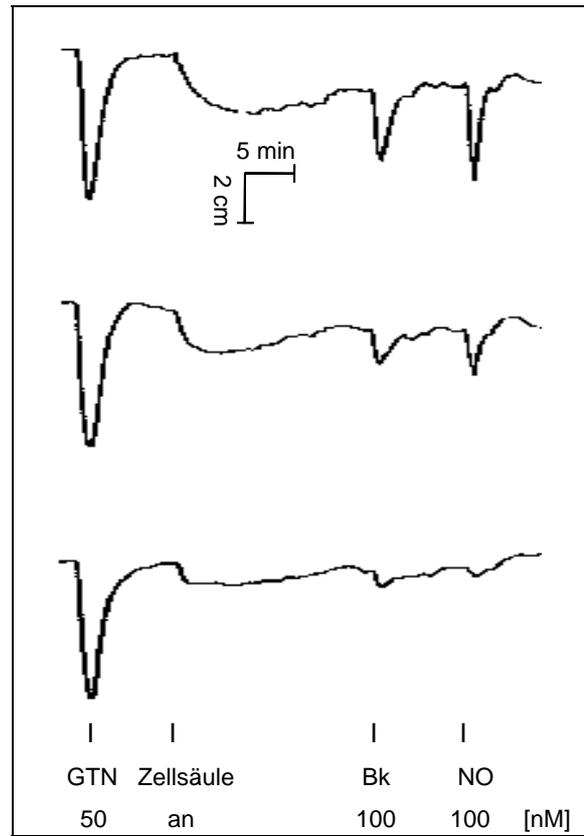
Der Auslaß der vorbereiteten perfundierten Endothelzellsäule wurde in die Applikationsrinne eingebracht, die direkte Superfusion wurde gleichzeitig abgestellt. Die gesamten 5 ml / min Pufferlösung erreichten nun erst nach Perfusion der Säule das erste Gefäß. Es wurden Säulenfüllungen zwischen 0,5 - 5 ml Endothelzellträger ausgemessen. Durch den basal freigesetzten EDRF konnte nach wenigen Sekunden eine unterschiedliche Relaxation der Gefäße beobachtet werden und hierüber die Halbwertzeit, welche von der Säulenfüllung abhängig war, berechnet werden. Optimale Antworten wurden bei Säulenvolumina zwischen 1,5 und 2,5 ml beobachtet. Nachfolgend angegebene Konzentrationen (in M = Molar = Mol pro Liter Lösungsmittel) beziehen sich auf die Endkonzentration der applizierten Substanzen über den Gefäßen (Anhang o.t. = over tissue (engl.): über dem Gewebe). Hierbei waren die von den in den Perfusatfluß von 5 ml / min injizierte bzw. koinfundierte Volumina abhängigen Verdünnungsfaktoren berücksichtigt.

Nachdem die Gefäße ihren neuen Tonus erreicht hatten, fand die Stimulation der Endothelzellen durch einminütige Bradykinininfusionen mit Konzentrationen von 10, 30 und 100 nM o.t. statt. In dem für die Experimente eingestellten Verstärkungsbereich wurden optimale Antworten bei 100 nM o.t. Bradykinin erreicht, höhere Konzentrationen zeigten, mit Untersuchungen von Gryglewski et al. übereinstimmend, keine weitere Zunahme der EDRF-Ausschüttung<sup>70</sup>. Aus den erhaltenen Vasorelaxationen erfolgte die Berechnung der Halbwertzeiten und Relaxationsdauer. Nach erneutem Umschalten der Superfusatwege erreichten die Aortenstreifen wieder ihren ursprünglichen Tonus. Dieser Befund war innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von ca. zwei Stunden reproduzierbar, danach traten deutliche Amplitudenabnahmen auf. Abbildung 10 zeigt den Effekt des basal ausgeschütteten EDRF und des nach Stimulation der Endothelzellen durch 100 nM t.c.

Bradykinin ausgeschütteten EDRF in einer Originalregistrierung. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die GTN-Eichung, wie bei allen nachfolgenden Originalregistrierungen, mit abgebildet.

Zusätzlich ist die vasorelaxierende Wirkung von 100 nM o.t. NO abgebildet. Tabelle 1 faßt die Halbwertzeiten und die Relaxationsdauer des basal und nach Stimulation ausgeschütteten EDRF zusammen, Abbildungen 17 u. 18 (S. 48 / 49) stellen die Abhängigkeit der HWZ bzw. Relaxationsdauer von der Konzentration grafisch dar.

**Abb. 10:** Vasorelaxation durch basal (Zellsäule an; 2,5 ml Endothelzell-trägermaterial) und nach Bradykinin-Stimulation (Bk; 100 nM t.c.) ausgeschütteten EDRF. Direkter Vergleich zu der durch Applikation von 100 nM o.t. NO induzierten Vasorelaxation. Originalregistrierung.



**Tab. 1: Halbwertzeit des basal ausgeschütteten EDRF, Halbwertzeit und Relaxationsdauer des nach Stimulation freigesetzten EDRF.** Die Halbwertzeit (HWZ) des basalen EDRF ist für verschiedene Säulenvolumina angegeben (ml Endothelzellträgermaterial). Die Relaxationsdauer (RD) kann aufgrund der permanenten basalen EDRF-Ausschüttung nicht angegeben werden (---). Die HWZ und Relaxationsdauer des nach Stimulation freigesetzten EDRF ist in Abhängigkeit der infundierten Bradykinin-Konzentration aufgeführt (Verdünnungsfaktor berücksichtigt).  $\pm$  = Standardfehler, n = Anzahl der Experimente.

Vol. [ml]	HWZ [s]	n	RD [s]	n
1	3,34 $\pm$ 0,93	10	---	---
1,5	3,77 $\pm$ 1,26	4	---	---
2,5	4,00 $\pm$ 1,29	8	---	---

EDRF basal

Konz [nM]	HWZ [s]	n	RD [s]	n
10	2,10 $\pm$ 0,74	3	100 $\pm$ 13,2	3
30	2,44 $\pm$ 0,85	3	130 $\pm$ 28,2	3
100	3,13 $\pm$ 0,91	41	161 $\pm$ 48,5	3

EDRF nach Bradykininstimulation

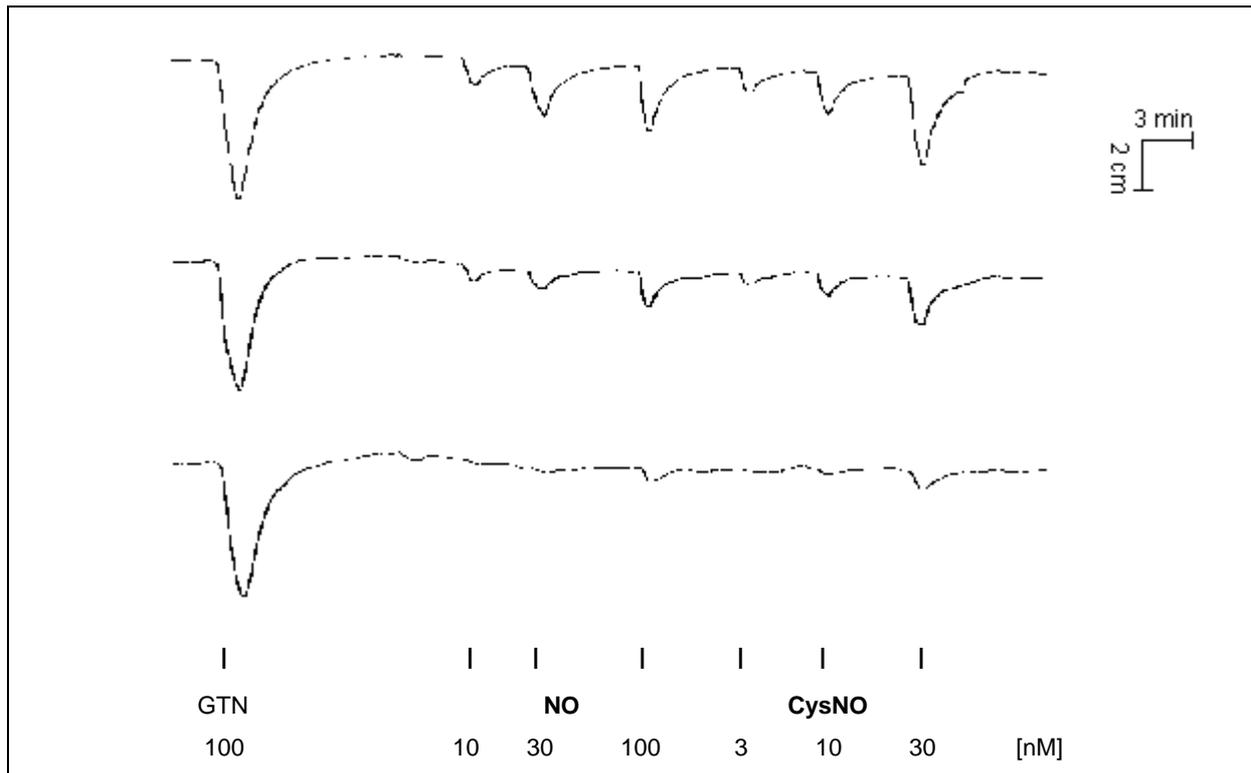
Maximale Antworten wurden bei Endothelzellvolumina von 2,5 ml Trägermaterial erzielt. Hierbei betrug die Halbwertzeit des basal ausgeschütteten EDRF  $4,00 \pm 1,29$  s. Nach maximaler Stimulation der Endothelzellen durch 100 nM Bradykinin lag die Halbwertzeit des EDRF bei  $3,13 \pm 0,91$  s, die Relaxationsdauer bei  $161 \pm 48,5$  s.

### C.1.2            Stickstoffmonoxid

Alle Endverdünnungen der einzelnen EDRF-Kandidaten wurden als einminütige Kurzinfusionen (1 min-KI) mittels gasdichter Hamilton-Spritzen in die Applikationsrinne injiziert. Bei allen Substanzen setzte die Relaxation, ausreichend hohe Konzentrationen vorausgesetzt, ca. 45 s nach Beginn der Injektion ein. Um ein erneutes Erreichen des ursprünglichen Ruhetonus zu gewährleisten, lagen zwischen den einzelnen Applikationen stets mindestens 15 Minuten. Die injizierten Volumina lagen zwischen 5 und 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Applikation der verschiedenen Lösungsmittel alleine hatte keine Änderung des Basaltonus zur Folge. Die eingesetzten Konzentrationen der NO-Lösungen betragen 3, 10, 30, 300 und 1000 nM o.t. Unterhalb 1 nM o.t. war kein relaxierender Effekt detektierbar, eine sicher reproduzierbare Vasorelaxation fand sich erst ab 3 nM o.t. Berücksichtigt werden muß hierbei, daß die isolierten Gefäße eine gewisse zeitliche Variabilität des Ruhetonus aufwiesen, die aufgezeichneten Ruhelinien also entsprechend oszillierten. Oberhalb einer Konzentrationen von 300 nM o.t. überschritt die Relaxation meist den für diese Experimente eingestellten Meßbereich. Abb. 11 zeigt eine repräsentative Originalregistrierung für NO im Bereich 10 bis 100 nM o.t.. Die aus allen Einzelapplikationen ermittelten Halbwertzeiten sowie die Relaxationsdauer waren abhängig von der Konzentration. Tabelle 2 gibt hierzu einen Überblick, Abb. 17 bzw. 18 (S. 48 / 49) stellen diese schließlich grafisch dar. Bei den später vorgestellten Koinfusions-Experimenten wurden meist NO-Konzentrationen von 100 nM o.t. eingesetzt, die HWZ lag hier bei  $4,02 \pm 1,39$  s, die Relaxationsdauer bei  $173 \pm 45,1$  s.

**Tab. 2: Halbwertzeit und Relaxationsdauer des Stickstoffmonoxids (NO).** HWZ = Halbwertzeit, RD = Relaxationsdauer,  $\pm$  = Standardfehler, n = Anzahl der Experimente.

Konz. [nM] o.t.	HWZ [s]	n	RD [s]	n
3	$2,26 \pm 1,04$	3	$110 \pm 10,0$	3
10	$2,54 \pm 0,37$	5	$94 \pm 17,4$	5
30	$2,68 \pm 0,87$	15	$129 \pm 22,6$	14
100	$4,02 \pm 1,39$	69	$173 \pm 45,1$	60
300	$5,20 \pm 0,83$	5	$168 \pm 9,80$	5
1000	$6,36 \pm 0,90$	3	$240 \pm 19,2$	3



**Abb. 11:** Konzentrationsabhängige Vasorelaxation durch Stickstoffmonoxid (NO; Konzentrationen 10 – 100 nM o.t.) im direkten Vergleich zur konzentrationsabhängigen Vasorelaxation durch *S*-Nitroso-L-Cystein (CysNO; Konzentrationen 3 – 30 nM o.t.). Originalregistrierung, n=3.

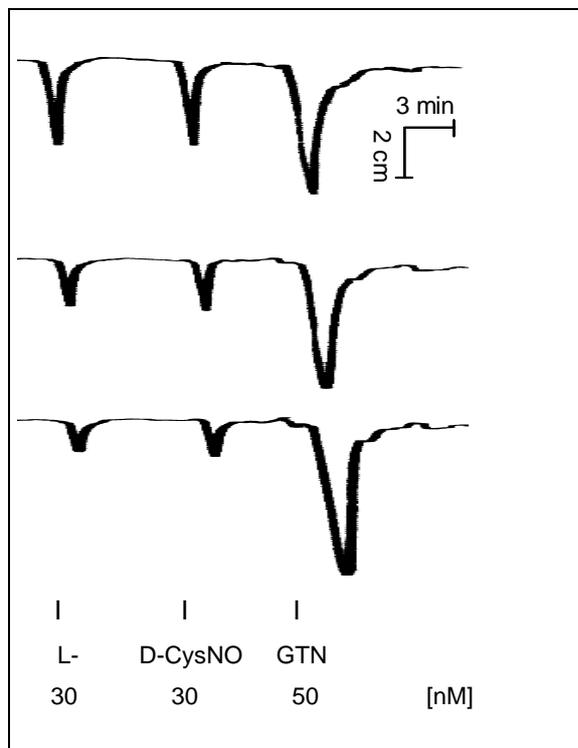
### C.1.3 *S*-Nitrosothiole, Vergleich *S*-Nitroso-L- und D-Cystein

*S*-Nitrosothiole sind zuvor noch nicht mit der verwendeten Methodik untersucht worden. Die Durchführung der Experimente mit den verschiedenen *S*-Nitrosothiolen erfolgte entsprechend denen des Stickstoffmonoxids. Im Unterschied zu NO waren alle untersuchten Nitrosothiole allerdings 3- bis 10-fach potenter, unabhängig von ihren Halbwertzeiten, also ihrer Stabilität, und Relaxationsdauer. Eine reproduzierbare Vasorelaxation war schon bei Konzentrationen von 1 nM o.t. detektierbar, der Meßbereich wurde meist bei Konzentrationen über 300 nM o.t. überschritten. *S*-Nitrosocystein und *S*-Nitrosocysteamin erwiesen sich von den untersuchten *S*-Nitrosothiolen als besonders instabil mit konzentrationsabhängigen Halbwertzeiten zwischen 2,8 s und 5,5 s für ersteres bzw. zwischen 4 s und 12,8 s für letzteres. Abbildung 11 zeigt eine repräsentative Originalregistrierung für *S*-Nitroso-L-Cystein im direkten Vergleich zu NO. Tabelle 3 faßt die Daten aus allen Bioassay-Experimenten für die Halbwertzeiten und Relaxationsdauer zusammen, Abb. 17 (S. 48) bzw. 18 (S. 49) stellen die Abhängigkeit der HWZ bzw. Relaxationsdauer von der Konzentration grafisch dar. Bei den nachfolgenden Experimenten fanden meist Lösungen mit einer Konzentration von 30 nM o.t. Verwendung, die HWZ lag hier bei  $4,16 \pm 1,14$  s (*S*-Nitroso-L-Cystein) bzw.  $5,4 \pm 1,43$  s (*S*-Nitrosocysteamin), die Relaxationsdauer bei  $174 \pm 35,5$  s bzw.  $192 \pm 39,0$  s.

**Tab. 3: Halbwertzeiten und Relaxationsdauer der besonders instabilen S-Nitrosothiole des L-Cysteins und Cysteamins.**  $\pm$  = Standardfehler, n = Anzahl der Experimente, c = Konzentration.

c [nM]	S-Nitroso-L-Cystein				S-Nitrosocysteamin			
	HWZ [s]	n	RD [s]	N	HWZ [s]	n	RD [s]	N
1	2,76 $\pm$ 0,79	6	110 $\pm$ 15,5	5	3,96 $\pm$ 0,76	3	87 $\pm$ 23,7	3
3	2,96 $\pm$ 0,55	10	158 $\pm$ 31,7	9	3,64 $\pm$ 0,88	5	134 $\pm$ 15,2	4
10	3,64 $\pm$ 1,45	30	149 $\pm$ 32,3	31	5,56 $\pm$ 1,72	8	129 $\pm$ 10,5	10
30	4,16 $\pm$ 1,14	32	174 $\pm$ 35,5	33	5,40 $\pm$ 1,43	12	192 $\pm$ 39,0	13
100	4,53 $\pm$ 1,19	5	237 $\pm$ 12,5	3	8,21 $\pm$ 1,43	3	228 $\pm$ 45,5	4
300	5,48 $\pm$ 1,70	3	320 $\pm$ 40,0	3	12,8 $\pm$ 3,64	3	345 $\pm$ 75,0	3

Direkt miteinander verglichen wurden die D- und L-Isomere des S-Nitrosocysteins. Es zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied in der vasorelaxierenden Potenz noch hinsichtlich der Halbwertzeit und Relaxationsdauer. Sie waren in ihren biologischen Effekten nicht voneinander unterscheidbar (Abb. 12, Abb. 19, S. 49). Tabelle 4 faßt die kinetischen Charakteristika beider Isomere bei Konzentrationen von 30 nM o.t. exemplarisch zusammen.



**Tab. 4: Vergleich der Halbwertzeiten und Relaxationsdauer des L- und D- S-Nitrosocysteins (CysNO).** Werte für 30 nM o.t., andere Konzentrationen lieferten gleichartige Ergebnisse.  $\pm$  = Standardfehler, n = Anzahl der Experimente.

	HWZ [s]	n	RD [s]	n
L-CysNO	4,16 $\pm$ 1,14	32	174 $\pm$ 35,5	33
D-CysNO	4,23 $\pm$ 1,52	8	171 $\pm$ 37,5	8

**Abb. 12: Direkter Vergleich der L- und D-Isomere des S-Nitrosocysteins (CysNO).** Originalregistrierung für 30 nM o.t. Qualitativ gleichartige Ergebnisse wurden bei anderen Konzentrationen erhalten. n = 8.

Im Gegensatz zu den bereits Genannten verhielten sich die übrigen untersuchten S-Nitrosothiole von Glutathion, Homocystein, N-Acetyl-DL-cystein sowie N-Acetyl-DL-penicillaminthionitrit.

Unabhängig von der eingesetzten Konzentration war kein Verlust der vasorelaxierenden Potenz bei der Passage über die Gefäßkaskade detektierbar. Demzufolge war es nicht möglich, für diese Substanzen eine diskrete Halbwertszeit anzugeben. Sie wurden als stabil eingestuft und ihre HWZ mit  $\gg 12$  s (doppelte Transitzeit vom 1. bis zum 3. Gefäß) angegeben. Zu berücksichtigen war allerdings, daß lediglich die ersten sieben Sekunden nach Applikation der Substanzen auf der Bioassay-Kaskade erfaßt wurden (Transitzeit der Applikationsrinne + Transitzeit vom 1. bis zum 3. Gefäß) und darüber hinaus keine weiteren Aussagen getroffen werden konnten.

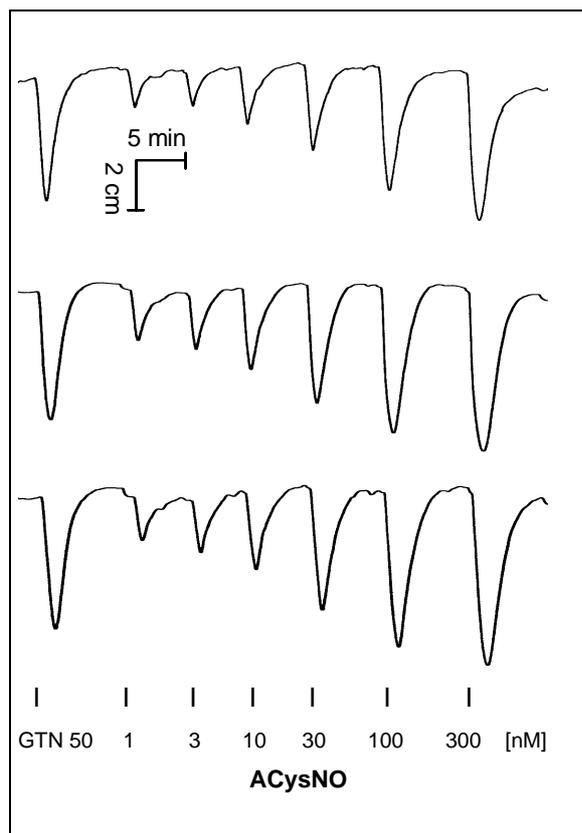
Die vasorelaxierende Potenz aller *S*-Nitrosothiole war nahezu identisch, also unabhängig von ihrer Stabilität (Vergl. Abb. 19, S. 49). Die Relaxationsdauer der stabilen Nitrosothiole war wie die der instabilen, des NO und auch des EDRF von der Konzentration abhängig (Abb. 18, S. 49). Abbildung 13 zeigt stellvertretend für alle stabilen Nitrosothiole eine Originalregistrierung des *S*-Nitroso-N-Acetyl-DL-cysteins. Tabelle 5 faßt die Halbwertszeiten und Relaxationsdauer zweier stabiler *S*-Nitrosothiole zusammen, *S*-Nitrosoglutathion steht dabei auch stellvertretend für *S*-Nitrosohomocystein und *S*-Nitroso-N-Acetyl-DL-cystein. N-Acetyl-DL-penicillaminthionitrit (SNAP) wird zusätzlich aufgeführt, da es, abweichend von den übrigen, eine oberhalb Konzentrationen von 100 nM o.t. signifikant kürzere Relaxationsdauer aufwies (174 s respektive 298 s).

**Tab. 5: Halbwertszeiten und Relaxationsdauer der stabilen *S*-Nitrosothiole des Glutathion und N-Acetyl-DL-penicillaminthionitrit (SNAP).**  $\pm$  = Standardfehler, n = Anzahl der Experimente.

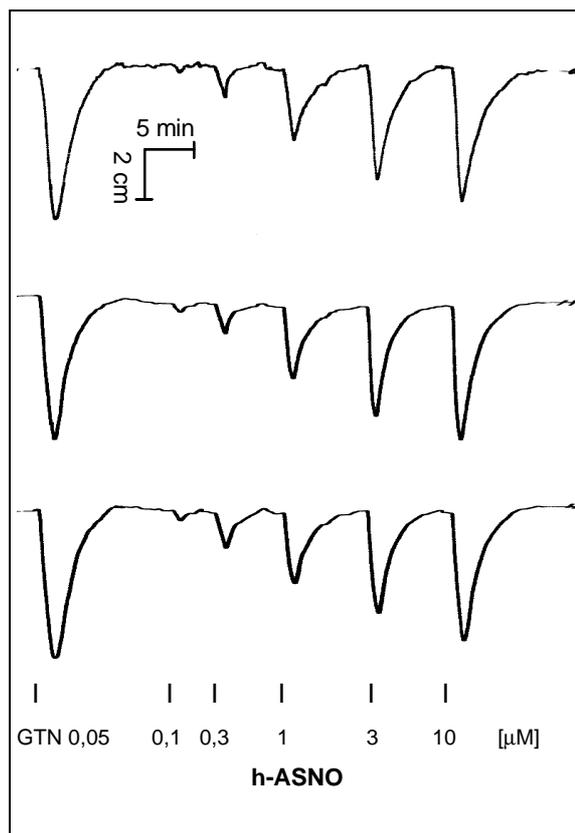
Konz. [nM] o.t.	<i>S</i> -Nitrosoglutathion				SNAP			
	HWZ [s]	n	RD [s]	n	HWZ [s]	n	RD [s]	n
1	$\gg 12$	3	$180 \pm 20,0$	3	---	0	---	0
3	$\gg 12$	4	$160 \pm 32,7$	3	---	0	---	0
10	$\gg 12$	7	$159 \pm 29,9$	7	$\gg 12$	6	$139 \pm 26,9$	6
30	$\gg 12$	14	$241 \pm 67,7$	12	$\gg 12$	3	$141 \pm 33,0$	3
100	$\gg 12$	3	$298 \pm 62,5$	3	$\gg 12$	3	$174 \pm 41,0$	3
300	$\gg 12$	3	$392 \pm 88,2$	3	$\gg 12$	3	$191 \pm 53,4$	3

#### C.1.4 *S*-Nitrosyliertes humanes Serumalbumin

Die kinetischen Charakteristika des *S*-nitrosylierten humanen Serumalbumins (h-ASNO) wurden entsprechend den zuvor beschriebenen Abläufen erhoben. H-ASNO war 10- bis 30-fach weniger potent als NO, somit reproduzierbar vasorelaxierend erst ab Konzentrationen von 100 nM o.t.. Abbildung 14 zeigt eine repräsentative Originalregistrierung. Aus allen Einzelapplikationen wurden die Halbwertszeiten und Relaxationsdauer bestimmt.



**Abb. 13:** Konzentrationsabhängige Vaso-relaxation durch *S*-Nitroso-*N*-Acetyl-DL-cystein (ACysNO). Stellvertretend für alle stabilen *S*-Nitrosothiole. Konzentrationen 1-300 nM o.t.. Originalregistrierung, n=3.



**Abb. 14:** Konzentrationsabhängige Vaso-relaxation durch *S*-nitrosyliertes humanes Serumalbumin (h-ASNO). Konzentrationsbereich 0,1-10 μM o.t.. Originalregistrierung, n=3.

H-ASNO erwies sich bei der Passage der Gefäße als stabil, es konnte keine Abnahme der vasorelaxierenden Aktivität beobachtet werden. Die Relaxationsdauer war, wie aus Tabelle 6 zu entnehmen ist, von der Konzentration abhängig (Abb. 18, S. 49). Die bei den Experimenten im Teil C.2 eingesetzte Konzentration lag bei 1 μM o.t., die HWZ betrug hierunter >> 12 s, die Relaxationsdauer  $327 \pm 62,4$  s.

**Tab. 6:** Halbwertzeiten und Relaxationsdauer des *S*-nitrosylierten humanen Serumalbumin. ± Standardfehler, n = Anzahl der Experimente.

Konz. [μM] o.t	HWZ [s]	n	RD [s]	n
0,1	>> 12	3	$117 \pm 23,0$	2
0,3	>> 12	4	$203 \pm 40,5$	3
1	>> 12	4	$327 \pm 62,4$	3
3	>> 12	3	$367 \pm 94,3$	3
10	>> 12	2	$412 \pm 32,9$	2

### C.1.5 Hydroxylamin

Hydroxylamin erwies sich im Vergleich zu NO als ca. 10-fach weniger potent vasorelaxierend. Ab Konzentrationen von 30 nM o.t. waren reproduzierbare Tonusänderungen zu beobachten (Abb. 15, Originalregistrierung, S. 47). Die Halbwertszeit lag sicher über 12 s (= stabil). Die Relaxationsdauern für die unterschiedlichen Konzentrationen, sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Für die vergleichenden Experimente im Teil C.2 fanden Konzentrationen von 1 µM o.t. Verwendung.

**Tab. 7: Halbwertszeiten und Relaxationsdauer des Hydroxylamins.** ± = Standardfehler, n = Anzahl der Experimente

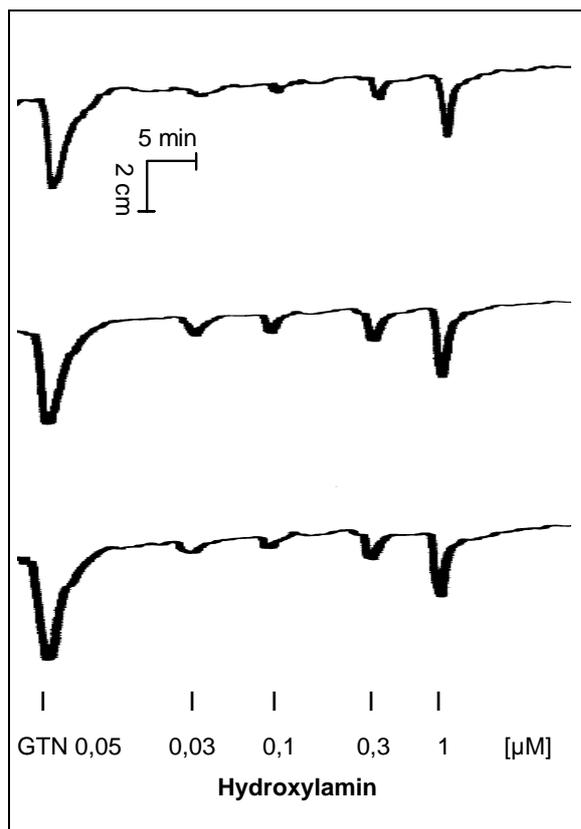
Konz. [µM] o.t.	HWZ [s]	n	RD [s]	n
0,03	>> 12	2	130 ± 11,2	2
0,1	>> 12	2	135 ± 25,0	2
0,3	>> 12	2	129 ± 31,2	2
1	>> 12	6	180 ± 26,9	5
3	>> 12	3	215 ± 23,2	3

### C.1.6 Dinitrosyl-Eisen(II)-Cystein Komplex

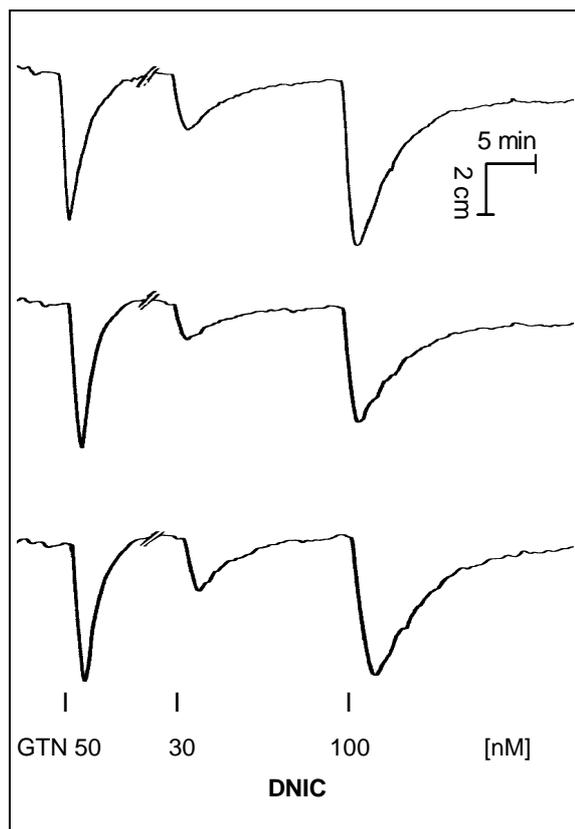
Bei vergleichbarer vasorelaxierender Potenz mit NO (bezogen auf den molaren NO-Anteil), zeigte DNIC keine Abnahme der vasorelaxierenden Aktivität bei der Passage (HWZ >> 12 s, stabil).

Die Relaxationsdauer war zwar ebenfalls konzentrationsabhängig aber bemerkenswert länger als bei allen anderen untersuchten Substanzen (Abb. 18). Teilweise erreichten die Gefäße ihren ursprünglichen Ruhetonus erst nach 30 min wieder, bei höheren Konzentrationen in einzelnen Experimenten auch überhaupt nicht mehr (Tab. 8, Abb. 16). Vergleichswerte auf der Gefäßstreifen-Kaskade sind keine bekannt.

Abbildung 16 zeigt repräsentativ eine Originalregistrierung nach Gaben von 30 nM und 100 nM DNIC o.t.. Für die im Teil C.2 durchgeführten Versuchsreihen wurden 100 nM o.t. DNIC eingesetzt.



**Abb. 15:** Konzentrationsabhängige Vaso-relaxation durch Hydroxylamin. Konzentrationsbereich 0,03 - 1 µM o.t.. Originalregistrierung, n=3.



**Abb. 16:** Konzentrationsabhängige Vaso-relaxation durch DNIC. Konzentrationsbereich 30 u. 100 nM o.t.. Originalregistrierung, n=3.

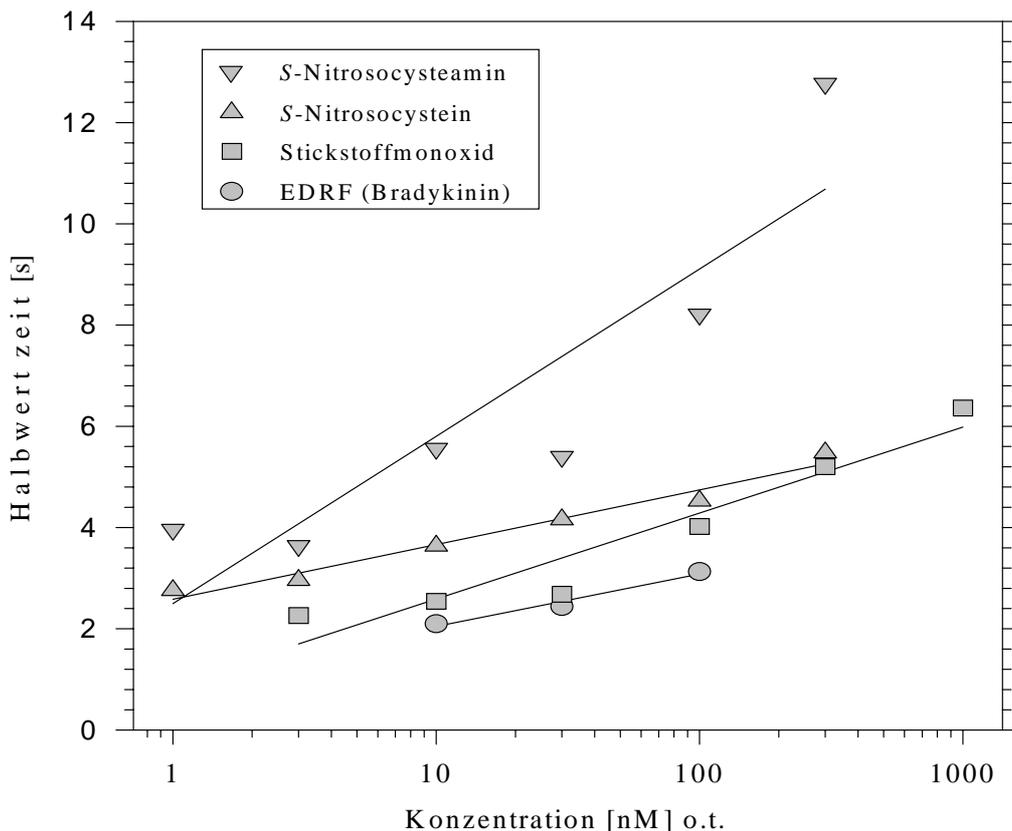
**Tab. 8:** Halbwertzeiten und Relaxationsdauer des Dinitrosyl-Eisen-Cystein Komplex (DNIC). ± = Standardfehler, n = Anzahl der Experimente.

Konz. [nM] o.t.	HWZ [s]	n	RD [s]	n
10	>> 12	3	623 ± 120,3	3
30	>> 12	4	815 ± 132,2	4
100	>> 12	10	1655 ± 407,4	8
300	>> 12	2	2040 ± 226,9	2

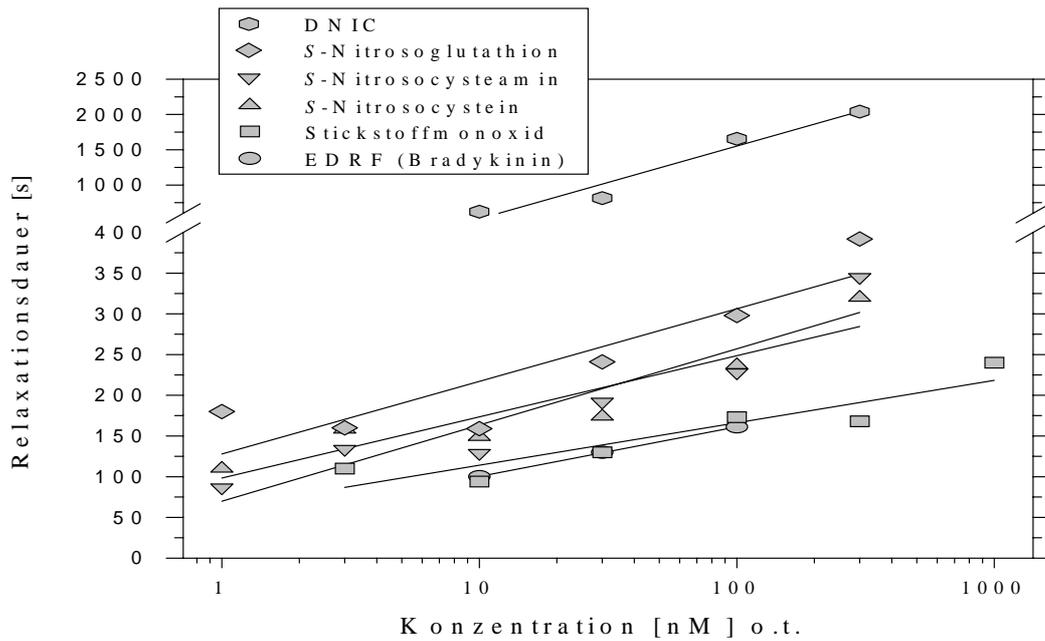
## C.2      Vergleich der kinetischen Charakteristika

Im Folgenden werden die wichtigsten kinetischen Daten der einzelnen untersuchten Substanzen zusammengefaßt und miteinander verglichen. Abbildung 17 stellt die Halbwertzeiten aller instabilen Kandidaten und des EDRF in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration graphisch dar, Abbildung 18 entsprechend für die Relaxationsdauer.

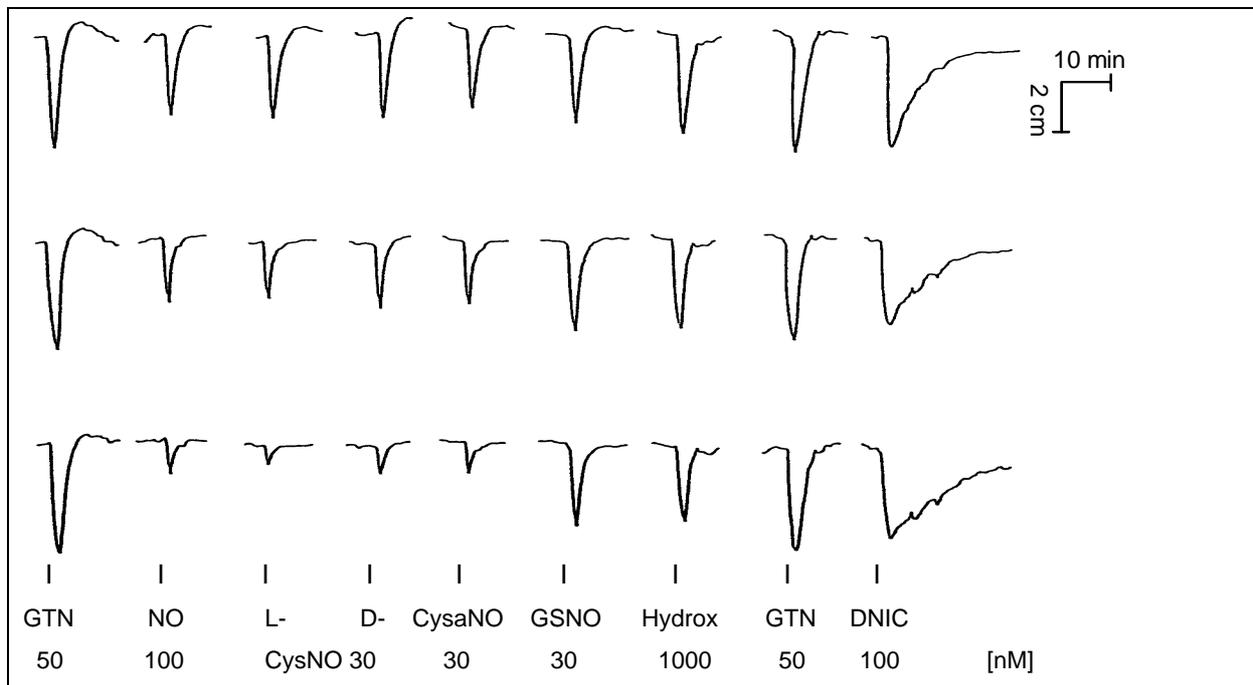
Abbildung 19 zeigt vergleichend die relaxierende Aktivität der wichtigsten EDRF-Kandidaten bei äquipotenten Konzentrationen bezogen auf das erste Gefäß in einer Originalregistrierung. Die relaxierende Aktivität der einzelnen Kandidaten wird hier im direkten Vergleich dargestellt. NO, S-Nitroso-L- u. D-Cystein (CysNO) sowie S-Nitrosocysteamin (CysaNO) wiesen ein nahezu identisches Relaxationsverhalten auf. Alle anderen untersuchten Substanzen zeigten dagegen abweichende Reaktionen. Ihre vasorelaxierende Aktivität auf dem zweiten und dritten Gefäß entsprach derjenigen auf dem ersten Gefäß (stabil). DNIC löste eine extrem lang anhaltende Relaxation aus.



**Abb. 17:** Konzentrationsabhängige Halbwertzeiten aller instabilen EDRF-Kandidaten und des durch Bk-Stimulation aus kultivierten Endothelzellen freigesetzten EDRF. Berechnung der Regressionsgeraden aus den Mittelwerten. Mittelwerte und Standardfehler siehe Tabellen Kap. C.1 (S. 39), halblogarithmische Auftragung.



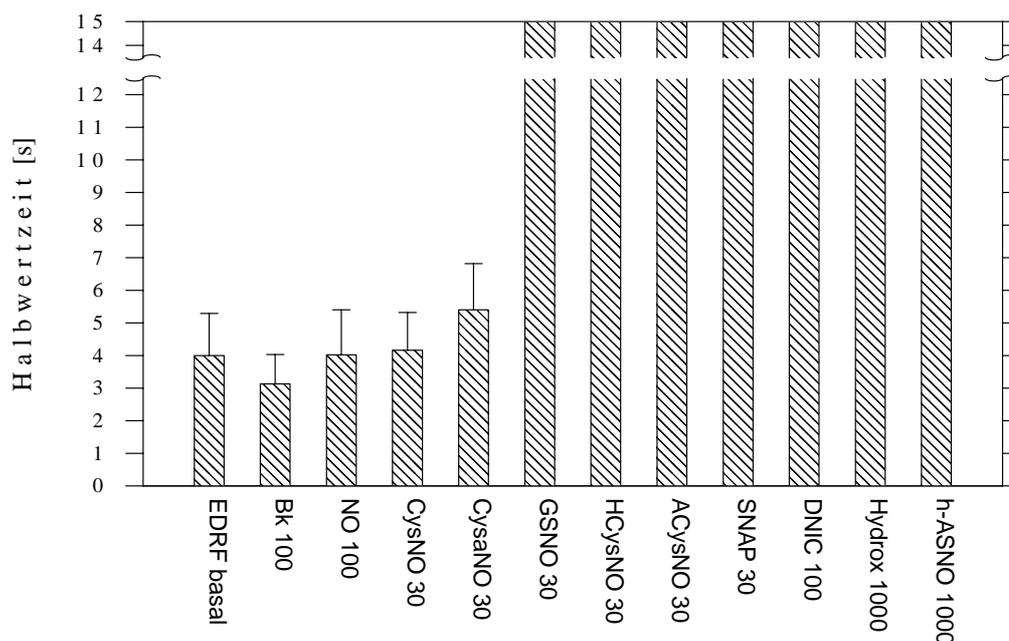
**Abb. 18: Konzentrationenabhängige Relaxationsdauer aller instabilen, zweier stabiler Kandidaten sowie des EDRF selbst.** *S*-Nitrosoglutathion steht stellvertretend für alle stabilen *S*-Nitrosothiole, Hydroxylamin und *S*-nitrosyliertes Serumalbumin. DNIC ist aufgrund seiner hohen Relaxationsdauer mit abgebildet. Berechnung der Regressionsgeraden aus den Mittelwerten. Mittelwerte und Standardfehler siehe Tabellen Kap. C.1 (S. 39), halblogarithmische Auftragung.



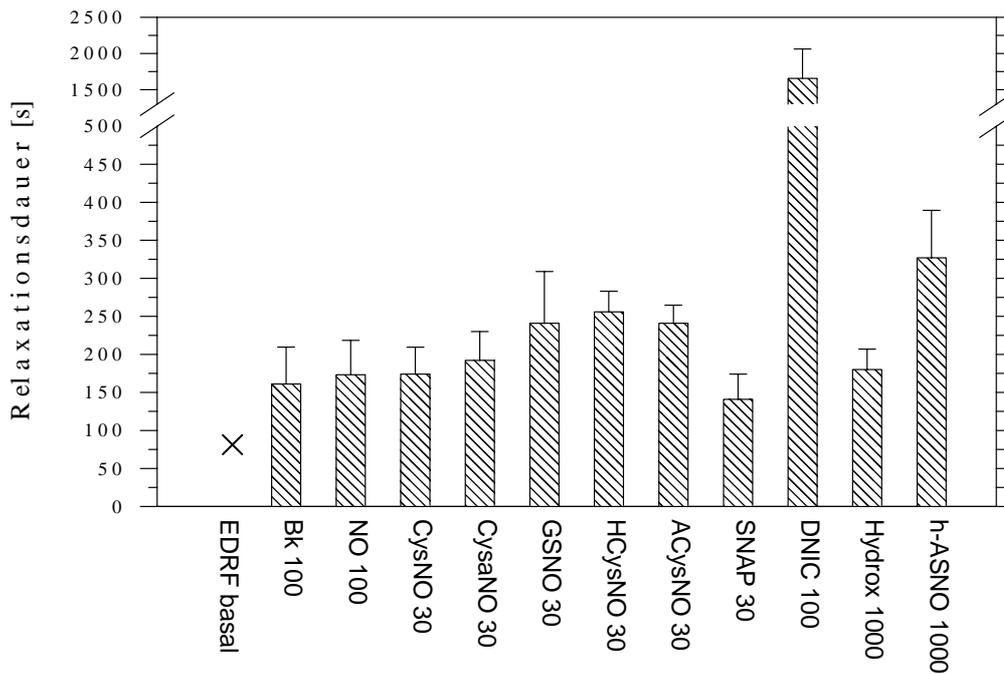
**Abb. 19: Direkter Vergleich einiger EDRF-Kandidaten.** Die applizierten Konzentrationen ergaben nahezu identische Relaxationen auf dem ersten Gefäß. *S*-Nitrosoglutathion ist hier stellvertretend für die stabilen *S*-Nitrosothiole und das *S*-nitrosylierte Serumalbumin abgebildet. NO = Stickstoffmonoxid, CysNO = *S*-Nitrosocystein, CysaNO = *S*-Nitrosocysteamin, GSNO = *S*-Nitrosoglutathion, Hydrox = Hydroxylamin, DNIC = Dinitrosyl-Eisen-Cystein Komplex. Zusammenstellung aus einer Originalregistrierung, n = 3.

Abbildung 20 stellt die Halbwertzeiten aller getesteten Substanzen bei äquipotenten Konzentrationen gegenüber. Für den EDRF wurde die Antwort von mit 2,5 ml Endothelzellträgermaterial beladenen Säulen nach Stimulation durch 100 nM Bradykinin gewählt, diese führte im für die Bioassay-Experimente eingestellten Verstärkungsbereich zu einer maximalen Relaxation der Gefäße. Die Konzentrationen der anderen Substanzen wurden entsprechend ihrer unterschiedlichen Potenz ausgewählt. Es wird deutlich, daß bei den angegebenen Konzentrationen nur Stickstoffmonoxid mit  $4,02 \pm 1,39$  s und die beiden instabilen *S*-Nitrosothiole des Cysteins und Cysteamins mit  $4,16 \pm 1,14$  s bzw.  $5,4 \pm 1,43$  s dem EDRF, mit  $4 \pm 1,29$  s für die Basalfreisetzung bzw.  $3,13 \pm 0,91$  s nach Bradykininstimulation, nahezu identische Halbwertzeiten aufwiesen (keine signifikanten Unterschiede,  $p > 0,05$ ). Alle anderen Substanzen waren stabil und wiesen daher eine signifikant höhere HWZ auf.

Abbildung 21 zeigt eine entsprechende Gegenüberstellung der Relaxationsdauer des EDRF und aller Kandidaten bei äquipotenten Konzentrationen.



**Abb. 20: Halbwertzeiten des EDRF und der untersuchten Kandidaten des EDRF bei äquipotenten Konzentrationen.** Darstellung der Stabilität einzelner Substanzen durch unterbrochene Balken ( $\gg 12$  s). EDRF basal = basal freigesetzter EDRF, Bk = durch Bradykinin freigesetztes EDRF (Beladung der Endothelzellsäulen entsprechend 2,5 ml Microcarrierbeads), NO = Stickstoffmonoxid, CysNO = *S*-Nitrosocystein, CysaNO = *S*-Nitrosocysteamin, GSNO = *S*-Nitrosoglutathion, HCysNO = *S*-Nitrosohomocystein, ACysNO = *S*-Nitroso-N-Acetylcystein, SNAP = N-Acetyl-DL-penicillaminthionitrit, DNIC = Dinitrosyl-Eisen-Cystein Komplex, Hydrox = Hydroxylamin, h-ASNO = *S*-nitrosyliertes humanes Serumalbumin. Konzentrationsangaben in nM. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n (je nach Substanz) = 4 bis 69.



**Abb. 21: Relaxationsdauer des EDRF und der untersuchten Kandidaten des EDRF bei äquipotenten Konzentrationen.** x) basale Freisetzung des EDRF erfolgt permanent, Zeitangabe daher nicht möglich. Abkürzungen siehe Abb. 20. Konzentrationsangaben in nM. Mittelwerte ± Standardfehler. n (je nach Substanz) = 4 – 69.

Die Relaxationsdauer des Stickstoffmonoxids mit  $173 \pm 45,1$  s und der instabilen *S*-Nitrosothiole des Cysteins und Cysteamins unterschieden sich mit  $174 \pm 35,5$  s bzw.  $192 \pm 39$  s nicht signifikant von der des EDRF mit  $161 \pm 48,5$  s. Die stabilen *S*-Nitrosothiole, mit Ausnahme des SNAP, wiesen im Mittel eine längere Relaxationsdauer als der EDRF auf (z.B. *S*-Nitrosoglutathion  $241 \pm 67,7$  s; nicht signifikant). Das SNAP zeigte mit  $141 \pm 33$  s eine signifikant kürzere Relaxationsdauer als die übrigen stabilen *S*-Nitrosothiole, sie war, ebenso wie die des Hydroxylamins, nicht signifikant verschieden von der des EDRF. Das *S*-nitrosylierte humane Serumalbumin (h-ASNO) mit  $327 \pm 62,4$  s und insbesondere DNIC mit  $1655 \pm 407,4$  s wiesen eine signifikant längere Relaxationsdauer als die meisten anderen Kandidaten und insbesondere EDRF / NO auf.

Zusammenfassend läßt sich zu den Ergebnissen der Bioassay-Versuche ohne Substratkoinfusionen festhalten, daß h-ASNO und DNIC sowohl in der Halbwertszeit (stabil) als auch in der Relaxationsdauer signifikant vom EDRF unterscheidbar waren. Keine signifikanten Unterschiede zum EDRF waren nur für NO, *S*-Nitrosocystein und *S*-Nitrosocysteamin objektivierbar. Die übrigen EDRF-Kandidaten zeigten eine signifikant höhere Halbwertszeit (stabil). Daher blieben NO, *S*-Nitrosocystein und *S*-Nitrosocysteamin als einzige potentielle Kandidaten übrig. Zur Klärung der Identität des EDRF war somit eine weitergehende Differenzierung der kinetischen Charakteristika vonnöten.

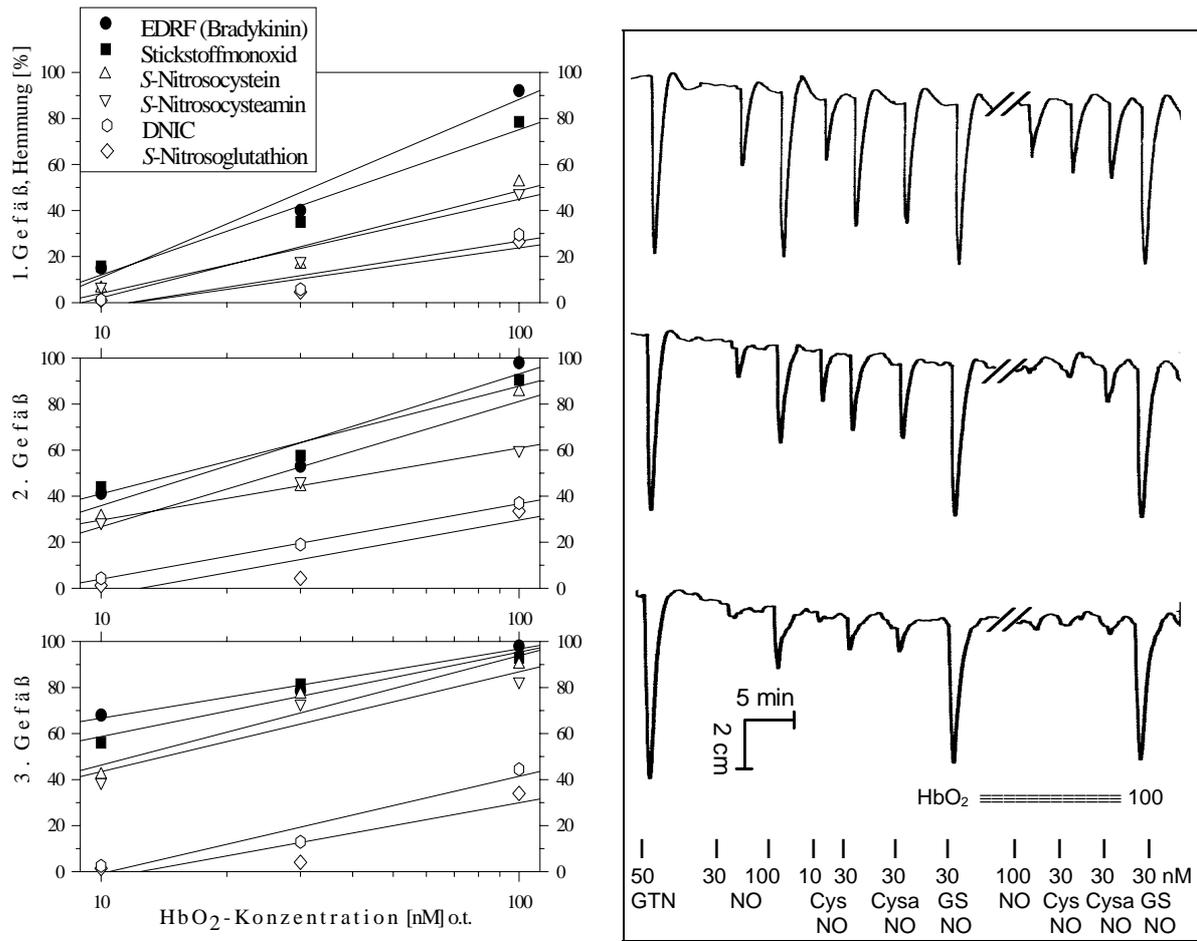
### C.3                    Beeinflussung der kinetischen Charakteristika durch Koinfusionen

Abweichend von den in Teil C.1 beschriebenen Experimenten wurden nun die einzelnen zu testenden Substanzen nicht mehr nur alleine über die Detektorgefäße appliziert, sondern dem Krebs-Puffer zusätzlich verschiedene reaktive Lösungen beigemischt. Dies geschah, wie unter Punkt B.3.5.4 beschrieben, in Form von Dauerinfusionen der betreffenden Lösungen in die Applikationsrinne (Koinfusion). Hierdurch konnte jederzeit die Koinfusion der reaktiven Lösungen wahlweise ein- oder ausgeschaltet werden und somit das vasorelaxierende Verhalten der getesteten Substanzen ohne und mit Koinfusion direkt verglichen werden. Das Ziel war, eine reaktive Lösung zu finden, die die kinetischen Charakteristika der getesteten Substanzen, also deren vasorelaxierenden Eigenschaften, auf typische Weise verändert und hierüber eine weitere Selektion der über eine reine Betrachtung der HWZ und Relaxationsdauer bis dahin nicht vom EDRF unterscheidbaren instabilen EDRF-Kandidaten (NO, *S*-Nitrosocystein, *S*-Nitrosocysteamin) zu ermöglichen. Alle im Folgenden eingesetzten reaktiven Lösungen hatten bei alleiniger Koinfusion über die Detektorgefäße in bis zur 100fachen der für die Experimente verwendeten Konzentration keinen Einfluß auf den Ruhetonus. Es kamen nur stets frisch am Versuchstag angefertigte Lösungen zum Einsatz.

#### C.3.1                    Oxygeniertes Hämoglobin

Die Koinfusion von oxygenierten Hämoglobin (HbO<sub>2</sub>)-Lösungen bot sich an, da aus zuvor publizierten Untersuchungen, unter anderem auch mit der Superfusions-Bioassay-Kaskade, bekannt war, daß oxygeniertes Hämoglobin über eine Oxidierung zu Methämoglobin freies Stickstoffmonoxid zu binden vermag<sup>82,120,130,136,186</sup>.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der HbO<sub>2</sub>-Koinfusionsexperimente zusammengefaßt. Untersucht wurden der EDRF, alle instabilen Kandidaten, DNIC und stellvertretend für die stabilen *S*-Nitrosothiole das *S*-Nitrosoglutathion. HbO<sub>2</sub>-Konzentrationen von 10, 30 und 100 nM o.t. wurden koinfundiert und die Abnahme der vasorelaxierenden Potenz gegenüber den Ausgangswerten registriert. Die Abnahme wurde als Hemmung in % gegenüber der zuvor ohne Koinfusion ermittelten Vasorelaxation (Ausgangswert) für jedes der drei Gefäße berechnet. Abbildung 22 zeigt vergleichend die Hemmung der vasorelaxierenden Aktivität der Kandidaten bei äquipotenten Konzentrationen in Abhängigkeit von der koinfundierten HbO<sub>2</sub>-Konzentration. Abbildung 23 zeigt eine repräsentative Originalregistrierung der instabilen Kandidaten und des *S*-Nitrosoglutathion als Repräsentant der stabilen Kandidaten unter 100 nM HbO<sub>2</sub>-Koinfusion.



**Abb. 22, 23: Hemmung der vasorelaxierenden Aktivität durch Oxyhämoglobin-Koinfusionen.**

**22:** Die prozentuale Hemmung der Aktivität der Substanzen gegenüber den Ausgangswerten sind in Abhängigkeit der koinfundierten HbO<sub>2</sub>-Konzentration für alle drei Gefäße getrennt dargestellt. Appliziert wurden äquipotente Konzentrationen der Testsubstanzen. Füllung der Endothelzellsäulen entsprechend 2,5 ml Microcarrierbeads. NO, DNIC je 100 nM, S-Nitrosothiole je 30 nM o.t.. Aus den Mittelwerten wurden die Regressionsgeraden berechnet. Halblogarithmische Darstellung. **23:** Originalregistrierung. Vergleich NO, S-Nitrosocystein (CysNO), -cysteamin (CysaNO) und -glutathion (GSNO) in Ab- und Anwesenheit von 100 nM HbO<sub>2</sub>.

Aus Abbildung 22 ist gut ersichtlich, daß NO und der EDRF auf allen Gefäßen unter den verschiedenen HbO<sub>2</sub>-Konzentrationen nahezu identisch reagierten. Die Hemmung der Relaxation gegenüber den Ausgangswerten betrug z.B. bei 100 nM o.t. HbO<sub>2</sub> auf dem ersten Gefäß im Mittel 78,5 % für NO und 92 % für EDRF, auf dem zweiten 90,5 % gegenüber 98 % und auf dem dritten Gefäß 92,9 % für NO und 98 % für EDRF. Die durch die HbO<sub>2</sub>-Koinfusion induzierte Hemmung der vasorelaxierenden Aktivität der instabilen S-Nitrosothiole war auf dem ersten Gefäß bei HbO<sub>2</sub>-Konzentrationen über ca. 20 nM o.t. (für S-Nitrosocysteamin auch auf dem zweiten ab ca. 40 nM o.t. HbO<sub>2</sub>) signifikant geringer gegenüber dem EDRF. Auf dem dritten Gefäß konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen diesen beiden Kandidaten und dem EDRF detektiert werden.

Die Hemmung der vasorelaxierenden Aktivität der stabilen *S*-Nitrosothiole (repräsentiert durch *S*-Nitrosoglutathion) und des DNIC war auf allen Gefäßen und bei allen HbO<sub>2</sub>-Konzentrationen untereinander nahezu identisch, allerdings deutlich und signifikant geringer als die des EDRF. Sie betrug z.B. für DNIC bei 100 nM o.t. HbO<sub>2</sub> vom ersten zum dritten Gefäß 29,5 %, 37 % und 44,5 %. *S*-nitrosyliertes humanes Serumalbumin und Hydroxylamin, auf die Darstellung der Werte wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet, zeigten ein ähnliches Verhalten wie die stabilen *S*-Nitrosothiole und der DNIC, wurden also durch die HbO<sub>2</sub>-Koinfusionen signifikant geringer in ihrer vasorelaxierenden Aktivität gehemmt als der EDRF. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Oxyhämoglobin-IC<sub>50</sub>-Werte für die verschiedenen getesteten Substanzen bei äquipotenten Konzentrationen (IC<sub>50</sub>: **50 % inhibitory concentration**; Konzentration der Oxyhämoglobin-Koinfusion, bei der 50 % der ursprünglichen Aktivität einer Testsubstanz gehemmt werden). Dieser Wert repräsentiert die Sensibilität der entsprechenden Substanz bzgl. der hemmenden Wirkung der HbO<sub>2</sub>-Koinfusion.

**Tab. 9: Oxyhämoglobin IC<sub>50</sub>-Werte des EDRF und der untersuchten Substanzen.** Vergleich äquipotenter Konzentrationen (o.t.). Die IC<sub>50</sub>-Werte beziehen sich auf die HbO<sub>2</sub>-Konzentrationen und wurden graphisch über die Regressionsgeraden der Abb. 22 ermittelt. *S*-Nitrosoglutathion (GSNO) repräsentiert die übrigen stabilen *S*-Nitrosothiole (HCysNO, ACysNO, SNAP). Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 20 (S. 50). n = 3-5 pro Substanz.

Substanz [nM]	1.Gefäß, IC <sub>50</sub> [nM]	2.Gefäß, IC <sub>50</sub> [nM]	3.Gefäß, IC <sub>50</sub> [nM]
EDRF (Bk 100)	31,5	15	<10
NO (100)	40	16,5	<10
CysNO (30)	>100	26	12
CysaNO (30)	>100	44,5	14
GSNO (30)	>>100	>>100	>>100
DNIC (100)	>>100	>>100	>>100
Hydrox (1000)	>>100	>>100	>>100
h-ASNO (1000)	>>100	>>100	>>100

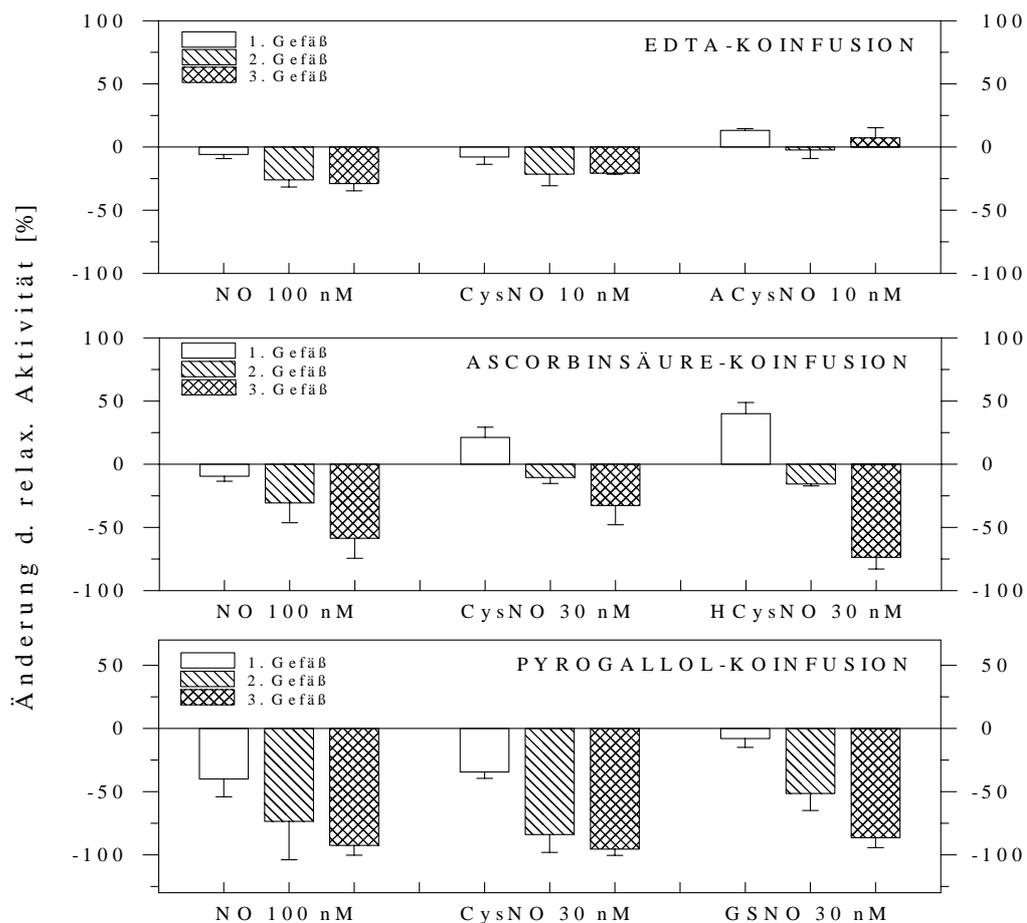
Es kann festgehalten werden, daß sich die stabilen *S*-Nitrosothiole, der DNIC, Hydroxylamin und das *S*-nitrosylierte humane Serumalbumin auch in ihrer Sensibilität gegenüber Oxyhämoglobin deutlich vom EDRF unterschieden (IC<sub>50</sub> >>100 nM gegenüber 31,5 - <10 nM). Die instabilen *S*-Nitrosothiole des Cystein und Cysteamin zeigten auf dem ersten Gefäß eine deutlich geringere (IC<sub>50</sub> >100 nM), auf dem zweiten und dritten Gefäß jedoch eine tendenziell ähnliche Sensibilität. Lediglich Stickstoffmonoxid verhielt sich nahezu identisch (kein signifikanter Unterschied) zu dem EDRF.

Durch Koinfusionen weiterer reaktiver Lösungen sollten zusätzliche Unterschiede zwischen dem vasorelaxierenden Verhalten des NO und den instabilen *S*-Nitrosothiolen aufgedeckt werden. Hierzu wurden u.a. eine Lösungen des Superoxid-Ionen produzierenden Reduktionsmittels Pyrogallol, das selektiv Nitrosothiol-abbauende Quecksilberacetat, das Antioxidationsmittel Ascorbinsäure (Vit. C) <sup>71,90</sup> sowie der Komplexbildner (EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure) eingesetzt. Daß Superoxid-Anionen den EDRF zu inaktivieren vermögen, wurde bereits an anderer Stelle angeführt (Teil A.1.2.1 u. A.2) <sup>71,82,131,165,193</sup>. Durch die Koinfusion von Pyrogallol war über eine vermehrte Superoxid-Ionen-Bildung eine partielle Inaktivierung des EDRF und NO sowie eine Verminderung der HWZ zu erwarten, das Verhalten der anderen Kandidaten sollte hierzu verglichen werden <sup>88,131</sup>. Quecksilberacetat sollte dagegen, analog der Saville-Reaktion <sup>168</sup>, zu einem selektiven Abbau von *S*-Nitrosothiolen führen, ohne die gefäßrelaxierende Wirkung von NO bzw. EDRF selbst zu beeinflussen. Ascorbinsäure sollte als Antioxidans und Sauerstoffradikalfänger Superoxid-Ionen inaktivieren und somit einen protektiven Einfluß auf die EDRF- und *S*-Nitrosothiolaktivität entfalten. Ferner erfolgten Koinfusionen mit Superoxid-Dismutase-Lösungen (SOD, syn. Orgotein), einem Kupfer und Zink enthaltenden Enzym, welches physiologisch im Metabolismus anfallende Superoxid-Ionen zu inaktivieren vermag. EDTA schließlich ist in der Lage als Komplexbildner freie Schwermetallionen in Lösungen zu binden. Schwermetallionen, insbesondere Eisen <sup>2+</sup> und Kupfer <sup>2+</sup>-Ionen können ihrerseits Superoxid-Anionen generieren sowie die Stabilität verschiedener labiler Substanzen vermindern <sup>71,165</sup>.

Die Konzentrationen der koinfundierten Pyrogallol- und Quecksilberacetatlösungen lagen zwischen 1 µM und 1 mM o.t., die des EDTA zwischen 1 und 100 µM o.t.. Die Aktivitäten der verwendeten SOD-Koinfusionen wurden zwischen 10 und 100 U/l o.t. (units pro Liter) gewählt. Zusammenfassend betrachtet, konnten in dieser Versuchsreihe jedoch keine entscheidenden und sicher reproduzierbaren Unterschiede zwischen dem NO und den instabilen *S*-Nitrosothiolen herausgearbeitet werden. Entweder zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen Effekte (SOD, Ascorbinsäure), oder es waren nur Teilergebnisse reproduzierbar. Ursache für letzteres waren zum einen die Toxizität einzelner Lösungen und die dadurch bedingten starken Tonusschwankungen (Pyrogallol) bzw. Tonusverluste (Quecksilberacetat) der Detektorgefäße. Zum anderen führten gleichartig durchgeführte Experimente, teilweise sogar isomolare Injektionen derselben Testsubstanz innerhalb weniger Minuten mitunter zu sehr unterschiedlichen Resultaten (EDTA). Meist war es nur innerhalb der ersten 30 bis 45 Minuten nach Beginn der Koinfusion möglich, reproduzierbare Ergebnisse zu gewinnen. Daher wurden die Untersuchungen auf die Applikation von NO, den instabilen *S*-Nitrosothiolen (teilweise nur *S*-Nitrosocystein) und einem stabilen *S*-Nitrosothiol (repräsentativ für alle stabilen Testsubstanzen) beschränkt. Die Teilergebnisse werden im Folgenden kurz dargestellt:

Da **SOD** weder toxische Wirkungen noch komplexe Interaktionen mit den übrigen Substanzen zeigte, konnten alle Kandidaten und der EDRF getestet werden. SOD zeigte jedoch unter den gegebenen Bedingungen keinen signifikanten protektiven Effekt auf NO, EDRF und die instabilen S-Nitrosothiole im Sinne einer Erhöhung der Wirkstärke oder der Halbwertzeiten. Daraus läßt sich schließen, daß Superoxid-Anionen in diesem Modell offenbar eine untergeordnete Rolle für die Potenz und die HWZ dieser Stoffe einnehmen. Die vasorelaxierende Potenz der übrigen Testsubstanzen blieb unter SOD ebenso unverändert. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wird deshalb verzichtet.

Bei den verwertbaren Koinfusionsexperimenten mit Ascorbinsäure, Pyrogallol und EDTA, konnte eine jeweils unterschiedlich starke Hemmung der vasorelaxierenden Aktivität der Testsubstanzen, insbesondere auf dem 2. und 3. Gefäß, detektiert werden. Dies betraf sowohl die instabilen als auch die stabilen Substanzen tendenziell gleichartig. Die  $IC_{50}$ -Werte konnten aufgrund der schlecht reproduzierbaren Ergebnisse nicht zuverlässig ermittelt werden. Abbildung 24 faßt die Wirkungen der Koinfusionen auf die vasorelaxierende Aktivität einiger getesteter Substanzen graphisch zusammen.



**Abb. 24:** Änderung der vasorelaxierenden Aktivität einiger Kandidaten unter EDTA- (1 - 100  $\mu$ M), Ascorbinsäure- und Pyrogallol-Koinfusion (je 1 mM – 1  $\mu$ M) bei äquivalenten Konzentrationen. Angaben in % gegenüber den ohne Koinfusion ermittelten Ausgangswerten für alle drei Gefäße. Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 20 (S. 50). n = 3-4.

**EDTA** zeigte eine etwa gleichartige Wirkung auf NO und *S*-Nitrosocystein. Es induzierte eine Verringerung der relaxierenden Aktivität um 5-8 % auf dem ersten Gefäß, um 20 - 30 % auf dem 2. u. 3. Gefäß. Die stabilen *S*-Nitrosothiole erfuhren eher eine geringe Aktivitätszunahme.

Bezüglich des ersten Gefäßes wirkte **Ascorbinsäure** auf die *S*-Nitrosothiole unterschiedlich zu NO, es war eine Verstärkung der Aktivität um ca. 20 % ( CysNO) bzw. 40 % (CysaNO) zu detektieren. Ebenso zeigte sich eine geringere Hemmung der Aktivität auf dem 2. Gefäß (10 - 15 %) gegenüber NO mit ca. 30 %. Auf dem 3. Gefäß schließlich war bei allen untersuchten Substanzen eine deutliche Abnahme zu verzeichnen ( ca. 55 % für NO bis 75 % für *S*-Nitrosohomocystein).

Unter **Pyrogallol**-Koinfusion waren die Reaktionen nahezu identisch. Es zeigten sich deutliche, vom ersten bis zum dritten Gefäß zunehmende Verluste der relaxierenden Aktivität von ca. 40 %, 75 % und 90 %).

Koinfundiertes **Quecksilberacetat** führte bei wirksamen Konzentrationen zu einem deutlichen und permanent zunehmenden Tonusverlust aller drei Gefäße. Daher reagierten die Gefäße nach einigen Minuten nur noch gering auf die applizierten Testsubstanzen.

Unter Berücksichtigung des eingangs Gesagten wären, um eindeutige Differenzen zwischen den instabilen Kandidaten aufdecken zu wollen, deutlichere und konsistentere Unterschiede in den Reaktionsweisen notwendig gewesen. Auf den Einsatz der Endothelzellsäule wurde wegen der aufwendigen Vorbereitung und den zu erwartenden nicht befriedigend reproduzierbaren Ergebnissen daher verzichtet.

### C.3.3            Niedermolekulare Thiole und Humanalbumin

Entsprechend den vorhergehenden Experimenten wurden in dieser Versuchsreihe Lösungen einiger niedermolekularer Thiole sowie des Humanalbumins in physiologischer Kochsalzlösung koinfundiert. Bei der wie im Teil B.1.3 beschriebenen Synthese der *S*-nitrosylierten Lösungen im Citratpuffer (*S*-Nitrosothiole, *S*-nitrosyliertes Humanalbumin) wurde NaNO<sub>2</sub> als NO-Donator mit den gelösten Thiolen vermischt. Ähnliches sollte nun durch die folgenden Koinfusionsexperimente auf den Gefäßstreifen induziert werden. Als NO-Donatoren fungierten jetzt jedoch alternativ die applizierte authentische NO-Lösung selbst, die während der Passage auf der Kaskade NO freisetzenden NO-haltigen Testsubstanzen (z.B. *S*-Nitrosothiole, DNIC) bzw. das, wie im Kap. A.1.2.2 (S. 3) beschrieben, zumindest parallel zum EDRF nach Bradykininstimulation freigesetzte NO<sup>82,139,149</sup> oder ggf. EDRF selbst.

### C.3.3.1 *L- bzw. D-Cystein*

Die Koinfusion erfolgte in üblicher Weise in die über dem ersten Gefäß angebrachte Applikationsrinne. Die Konzentrationen der Lösungen lagen zwischen 10 nM und 100 µM o.t.. Wie zuvor wurden alle untersuchten Substanzen in äquipotenten Konzentrationen zunächst nacheinander separat appliziert (= Ausgangswerte), anschließend folgte die Applikation unter Koinfusion der reaktiven Lösungen. Die Relaxation der Gefäße wurde detektiert und die Veränderungen gegenüber den Ausgangswerten berechnet. In Abhängigkeit von der Konzentration der koinfundierten Thiole kam es zu erheblichen Veränderungen der Relaxationskinetik und –amplitude für EDRF, NO *S*-Nitrosocystein und –cysteamin.

In Konzentrationen < **100 nM o.t.** hatte Cystein weder einen Einfluß auf die vasorelaxierende Potenz noch auf die Halbwertzeiten oder die Relaxationsdauer. Die Relaxationsmuster blieben identisch zu denen ohne Koinfusion. Dies galt für alle getesteten Substanzen incl. dem EDRF.

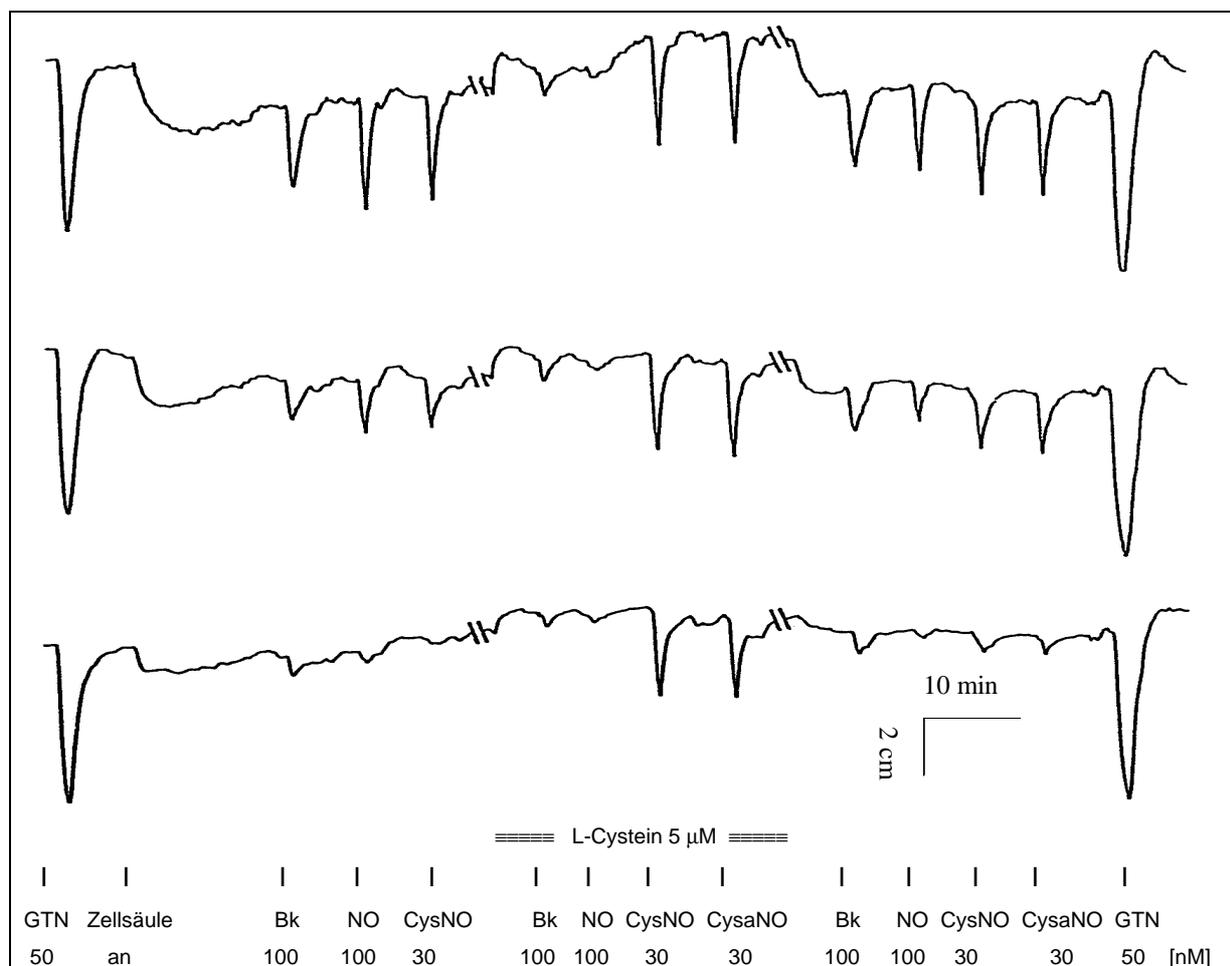
Bei Cystein-Konzentrationen zwischen **100 - 300 nM o.t.** zeigte NO auf dem ersten Gefäß einen leichten nichtsignifikanten Aktivitätsverlust (7,95 %), *S*-Nitrosocystein und -cysteamin im Mittel eine leichte Aktivitätssteigerung (4,25 % bzw. 13,95 %;  $p > 0,05$ ). Auf dem zweiten und insbesondere dritten Gefäß wiesen alle drei Substanzen dagegen einen gleichartigen signifikanten Aktivitätsverlust auf (NO: 29,15 %; CysNO: 28,50 %; CysaNO: 21,5 %). Auf Experimente mit der Endothelzellsäule wurde wegen der tendenziell gleichartigen Reaktionsweise der instabilen Kandidaten in dieser Phase verzichtet.

Oberhalb von **1 µM o.t.** führte Cystein zu völlig konträren Reaktionen bei den instabilen Vasodilatoren: EDRF, sowohl basal als auch durch Bradykinin freigesetzt, und authentisches NO zeigten jetzt einen nahezu vollständigen Verlust der vasorelaxierenden Aktivität. Dies betraf alle drei Gefäße und entsprach einer Hemmung der relaxierenden Aktivität um mehr als 90 % (94,3 % bis 98,8 %). Die Halbwertzeit war somit nicht mehr zuverlässig bestimmbar, jedoch unter 1 s. Dagegen zeigte das *S*-Nitrosocystein (D- u. L-Isomer) und *S*-Nitrosocysteamin eine entgegengesetzt gerichtete Änderung der vasorelaxierenden Aktivität. Auf dem ersten Gefäß war die Relaxation bei größerer Variationsbreite zunächst im Mittel nicht signifikant verändert (CysNO: - 6,16 %; CysaNO: - 20,26 %), auf dem zweiten und dritten Gefäßstreifen war diese jedoch deutlich und signifikant erhöht (CysNO: 96,12 % (2. Gefäß) bzw. 207,17 % (3.); CysaNO: 38,06 % bzw. 121,41 %). Dies führte dazu, daß das Ausmaß der Relaxation aller drei Gefäßstreifen nahezu gleich war. Die Substanzen waren stabilisiert worden, die HWZ lag somit deutlich über 12 s (Tab. 10).

Die auf der Bioassay-Kaskade stabilen EDRF-Kandidaten schließlich erfuhren bei ebenfalls größerer Variationsbreite im Mittel keine signifikante Änderungen. Abbildung 25 zeigt eine repräsentative Originalabbildung eines der Experimente (n=10) unter L-Cystein-Koinfusion von 5 µM.

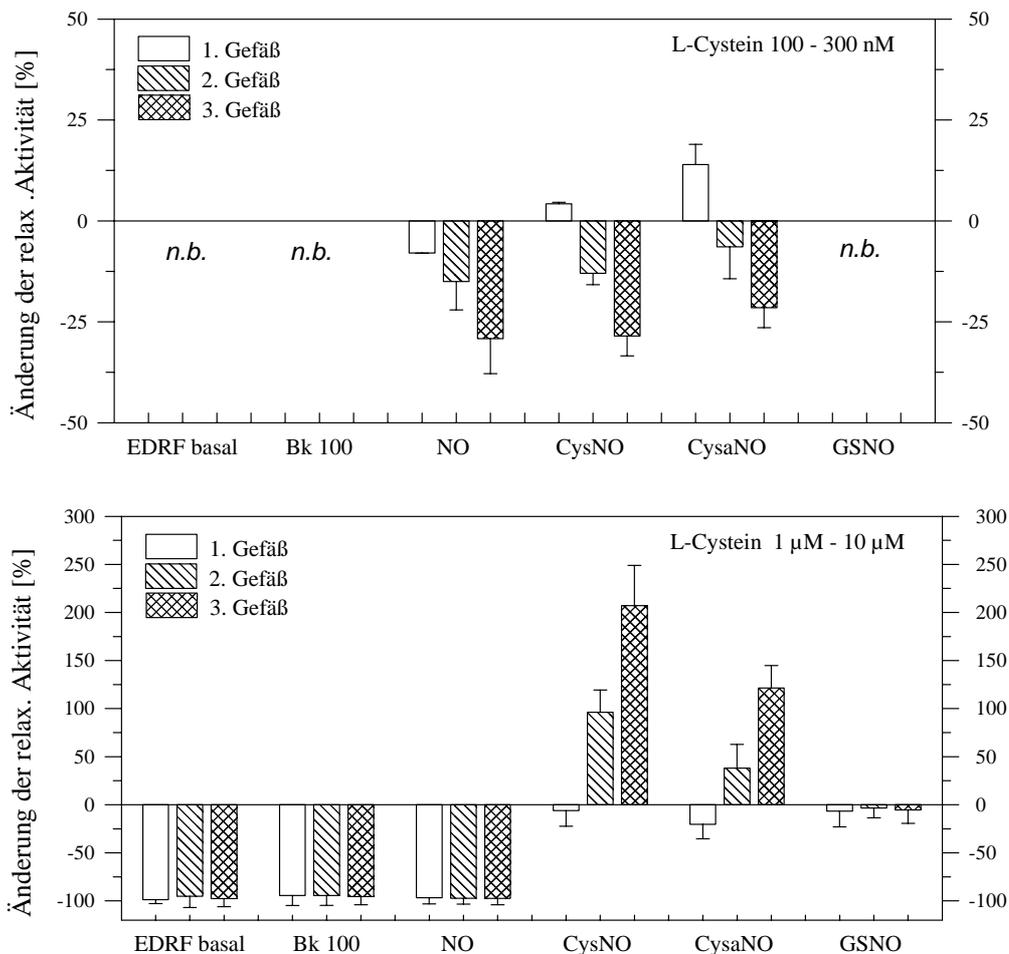
**Tab. 10: Änderung der vasorelaxierenden Aktivität unter L-Cystein-Koinfusion.** Äquipotente Konzentrationen des EDRF, der instabilen und eines stabilen Kandidaten im Vergleich. Änderung gegenüber der ursprünglichen Aktivität am jeweiligen Gefäßstreifen in Prozent (Mittelwerte; “-“ = Hemmung; ± = Standardfehler). GSNO ist repräsentativ für die stabilen Kandidaten aufgeführt. T 1-3 = Gefäßsegmente 1-3, n.b. = nicht bestimmt. EDRF-Werte: Beladung der Endothelzellsäulen entsprechend 1,5 - 2,5 ml Microcarrierbeads. Abkürzungen wie in Legende zu Abb. 20 (S. 50). n = 10.

L-Cystein	100 - 300 nM			1 - 10 µM		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
EDRF basal	n.b.	n.b.	n.b.	-98,8 ± 3,9	-95,2 ± 11,8	-97,6 ± 8,4
EDRF Bk 100	n.b.	n.b.	n.b.	-94,3 ± 10,5	-94,4 ± 10,2	-95,6 ± 8,5
NO 10-100	-8,0 ± 0,1	-15,0 ± 7,1	-29,2 ± 8,7	-96,7 ± 6,4	-97,3 ± 6,0	-97,3 ± 6,7
CysNO 5-30	4,3 ± 0,4	-13,0 ± 2,8	-28,5 ± 5,0	-6,2 ± 16,3	96,1 ± 23,3	207,2 ± 41,8
CysaNO 5-30	14,0 ± 5,0	-6,4 ± 7,9	-21,5 ± 5,0	-20,3 ± 15,1	38,1 ± 24,8	121,4 ± 23,3
GSNO 5-30	n.b.	n.b.	n.b.	-6,6 ± 16,5	-3,4 ± 10,2	-5,5 ± 13,8



**Abb. 25: Änderung der vasorelaxierenden Aktivität einiger EDRF-Kandidaten und des EDRF selbst unter L-Cystein-Koinfusion (5 µM).** Beladung der Endothelzellsäulen entsprechend 2,5 ml Microcarrierbeads. Verglichen wurden, bezogen auf das erste Gefäß, äquipotente Konzentrationen aller instabilen Substanzen und stellvertretend für die stabilen Kandidaten das S-Nitrosoglutathion. Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 20 (S. 50). Repräsentative Originalregistrierung von 10 individuellen Experimenten mit qualitativ gleichen Effekten.

Für die Hemmung des basal freigesetzten EDRF konnten nur Näherungswerte angegeben werden, da diese über die Änderung des Gefäßtonus zu messen war (Anstieg des Tonus nach Beginn der Koinfusion). Der Gefäßtonus unterlag wiederum einer ständigen geringen Schwankung (phasischen Veränderung). Abbildung 26 bietet eine grafische Darstellung der Aktivitätsänderungen.



**Abb. 26:** Änderung der vasorelaxierenden Aktivität einiger EDRF-Kandidaten und des EDRF selbst unter L-Cystein-Koinfusion (100-300 nM u. 1-10 µM). Verglichen wurden, bezogen auf das erste Gefäß, äquivalente Konzentrationen aller getesteten instabilen Substanzen und stellvertretend für alle stabileren Kandidaten das S-Nitrosoglutathion. Darstellung von Mittelwert und Standardfehler (Tab. 10); n.b. = nicht bestimmt. Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 20 (S. 50).

Es ist deutlich erkennbar, daß Stickstoffmonoxid und der EDRF identisch auf die Cystein-Koinfusionen (D- u. L-Isomere) reagierten, S-Nitrosocystein (sowohl das D- als auch das L-Isomer) und -cysteamin sich dagegen völlig konträr verhielten: NO und der EDRF zeigten nahezu keine vasorelaxierende Aktivität mehr bei Cystein-Konzentrationen > 1 µM, die anderen Verbindungen

behielten ihre volle Aktivität während der Gefäßpassage. Somit war ihre Halbwertszeit deutlich auf über 12 s erhöht worden. Die Relaxationszeiten änderten sich hingegen nicht signifikant bzw. konnten für NO und dem EDRF nicht mehr zuverlässig ermittelt werden.

### C.3.3.2 *L-Homocystein, Glutathion und Humanalbumin*

Entsprechend den Koinfusionsexperimenten mit Cystein schlossen sich Experimente mit weiteren Thiolen an. Verwendung fanden Lösungen der niedermolekularen Thiole von L-Homocystein und Glutathion sowie des Humanalbumins. Es sollte orientierend überprüft werden, ob auch diese Einfluß auf die vasorelaxierende Aktivität ausgesuchter Vasodilatoren ausüben. Die hierbei erzielten Resultate werden nachfolgend kurz dargestellt.

Bei Koinfusion von **L-Homocystein** ab Konzentrationen von ca. 3 µM o.t. wurden schwächer ausgeprägte, aber gleichgerichtete Effekte wie unter Cystein detektiert. NO zeigte auf allen drei Gefäßen eine deutlich reduzierte vasorelaxierende Aktivität (bis 63 %), das zum Vergleich applizierte S-Nitrosocystein dagegen eine Zunahme auf dem 2. und 3. Gefäß (bis 58,7 %) (Abb. 27, S. 63)). Tabelle 11 faßt die Daten zusammen.

**Tab. 11: Änderung der vasorelaxierenden Aktivität unter L-Homocystein-Koinfusion (10 µM).** Verglichen wurden äquipotente Konzentrationen des NO und S-Nitrosocysteins als instabile, des S-Nitrosohomocysteins als stabilem Vasodilator. Angaben in Prozent gegenüber den Ausgangswerten bezogen auf das jeweilige Gefäßsegment. ± = Standardfehler, n = 3. Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 20 (S. 50).

Substanz [nM]	1. Gefäß	2. Gefäß	3. Gefäß
NO 100	-44,0 ± 9,9	-62,5 ± 6,4	-57,0 ± 8,5
CysNO 30	-9,3 ± 5,3	21,7 ± 5,2	58,7 ± 12,3
HCysNO 30	6,4 ± 5,0	-6,6 ± 5,0	3,6 ± 7,8

Die Koinfusionsexperimente mit **Glutathion** ab ca. 5 µM o.t. ergaben folgende Resultate: Alle untersuchten Substanzen wiesen direktional eine Reduktion der relaxierenden Aktivität auf, diese war bei NO aber signifikant stärker als bei den anderen ausgeprägt (Abb. 27, S. 63). Tabelle 12 gibt die Zusammenfassung der Ergebnisse wieder. Interessanterweise zeigte NO einen zunehmenden Aktivitätsverlust bei der Passage über die Gefäßkaskade, die anderen dagegen eine mehr oder minder gleichbleibende Reduktion. Ferner reagierten die stabilen wie instabilen S-Nitrosothiole qualitativ gleichartig.

**Tab. 12: Änderung der vasorelaxierenden Aktivität unter Glutathion-Koinfusion (10 µM).** Verglichen wurden äquipotente Konzentrationen des NO, *S*-Nitrosocysteins und *S*-Nitrosocysteamins als instabile, des *S*-Nitrosoglutathions als stabilem Vasodilator und EDRF-Kandidaten. Angaben in Prozent gegenüber den Ausgangswerten bezogen auf das jeweilige Gefäßsegment. ± = Standardfehler, n = 3. Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 20 (S. 50).

Substanz [nM]	1. Gefäß	2. Gefäß	3. Gefäß
NO 100	-38,7 ± 6,7	-54,3 ± 3,5	-63,7 ± 15,0
CysNO 30	-19,0 ± 1,4	-19,7 ± 9,9	-12,0 ± 5,7
CysaNO 30	-21,5 ± 2,8	-26,1 ± 8,9	-32,5 ± 6,4
GSNO 30	-11,5 ± 0,7	-10,2 ± 6,8	-26,5 ± 4,9

Koinfusionen mit **Humanalbumin-Lösungen** ab ca. 1 µM o.t. ergaben den Cystein-Koinfusionsexperimenten ähnliche Resultate. Die relaxierende Wirkung von NO erfuhr einen deutlichen Verlust (bis 75,5 %), die Wirkung der instabilen *S*-Nitrosothiole dagegen einen erheblichen Anstieg bei der Passage der Gefäßkaskade (bis 152,3 % für CysNO) (Abb. 27, S. 63). Tabelle 13 faßt die Daten zusammen:

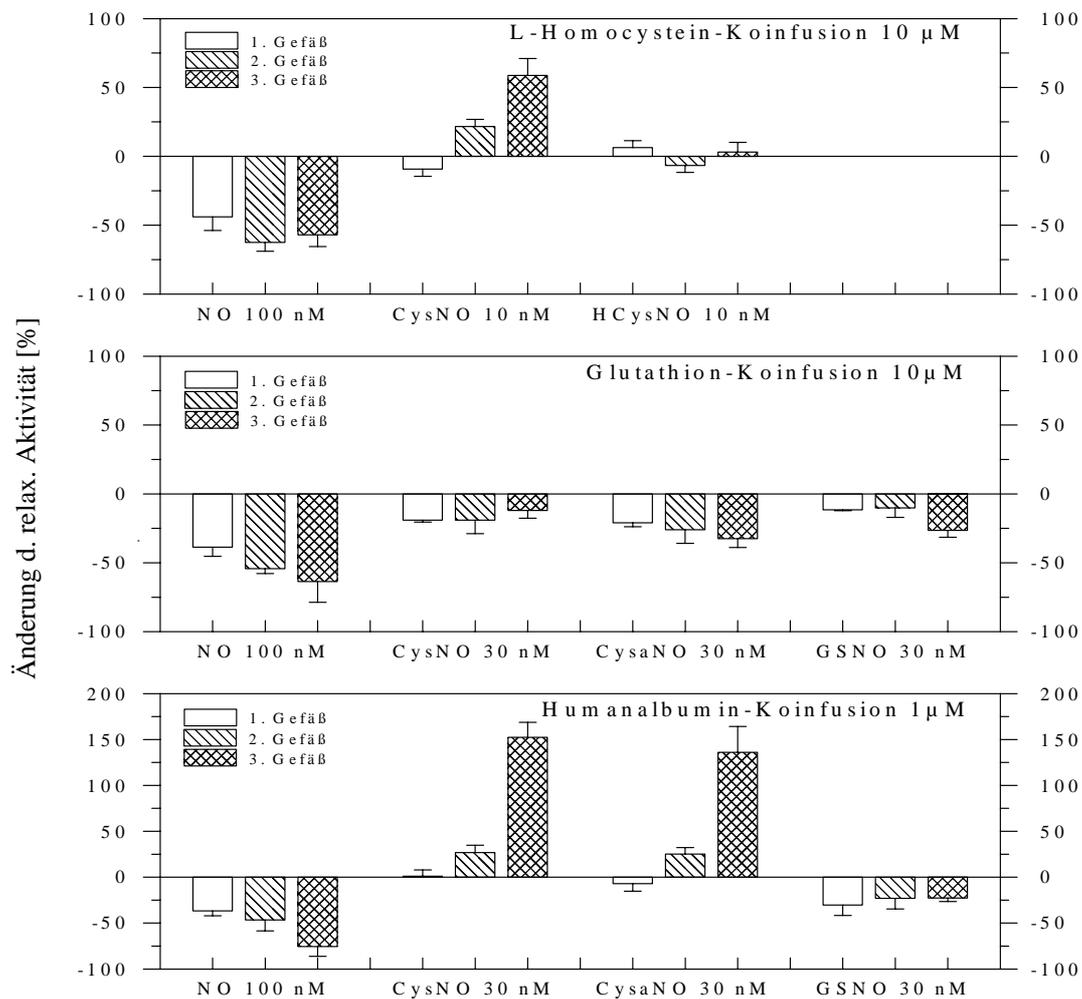
**Tab. 13: Änderung der vasorelaxierenden Aktivität unter Humanalbumin-Koinfusion (1 µM).** Verglichen wurden äquipotente Konzentrationen des NO, *S*-Nitrosocysteins und *S*-Nitrosocysteamins als instabile, des *S*-Nitrosoglutathions als stabilen Vasodilator und EDRF-Kandidat. Angaben in Prozent gegenüber den Ausgangswerten bezogen auf das jeweilige Gefäßsegment. ± = Standardfehler, n = 3. Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 20 (S. 50).

Substanz [nM]	1. Gefäß	2. Gefäß	3. Gefäß
NO 100	-36,7 ± 5,2	-45,7 ± 11,8	-75,5 ± 10,6
CysNO 30	1,1 ± 6,9	26,9 ± 8,0	152,3 ± 16,4
CysaNO 30	-7,0 ± 8,2	25,2 ± 7,1	136,0 ± 28,3
GSNO 30	-30,3 ± 11,4	-23,0 ± 11,5	-22,7 ± 3,8

Zusammenfassend läßt sich zu den Ergebnissen der Bioassay-Versuche mit HbO<sub>2</sub>- und Thiol- / Humanalbumin-Koinfusionen festhalten:

- 1) Alle untersuchten stabilen EDRF-Kandidaten verhielten sich bzgl. der Änderung ihrer vasorelaxierenden Aktivität signifikant anders als EDRF und alle untersuchten instabilen EDRF-Kandidaten (NO, *S*-Nitrosocystein u. -cysteamin),

- 2) *S*-Nitrosocystein u. -cysteamin wiesen unter  $\text{HbO}_2$ -Koinfusion auf dem ersten Gefäß einen signifikant höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert auf als EDRF und NO,
- 3) Während der Koinfusion von Cystein-Lösungen  $> 1 \mu\text{M}$  o.t. verloren der EDRF und authentisches NO auf allen Gefäßsegmenten mehr als 90 % der vasorelaxierenden Aktivität. Dagegen blieb die vasorelaxierende Aktivität des *S*-Nitrosocysteins u. -cysteamins auf dem ersten Gefäßsegment unverändert, auf den nachfolgenden Segmenten erfuhr diese aber eine deutliche Aktivitätszunahme.



**Abb. 27:** Änderung der vasorelaxierenden Aktivität einiger EDRF-Kandidaten unter Homocystein, Glutathion und Humanalbumin-Koinfusion. Angaben der Änderungen in % gegenüber den ohne Koinfusion erhobenen Ausgangswerten bezogen auf das jeweilige Gefäßsegment. Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 20 (S. 50).  $n = 3$ .

## D

## DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden die wichtigsten zur Zeit diskutierten Theorien über die Identität des EDRF mit Hilfe eines biologischen Detektorsystems, eines sog. Bioassays überprüft. Die vasorelaxierende Aktivität des basal und nach Bradykininstimulation freigesetzten EDRF, des Stickstoffmonoxids, einiger S-nitrosylierter Thiole (Cystein, Cysteamin, Glutathion, Homocystein, N-Acetyl-DL-penicillaminthionitrit und N-Acetyl-DL-Cystein), des S-nitrosylierten Humanalbumins, des Dinitrosyl-Eisen(II)-Cystein Komplexes und des Hydroxylamins wurden unter Verwendung einer einheitlichen Methodik erstmals direkt unter identischen Ausgangsbedingungen miteinander verglichen. Da der EDRF ein extrem instabiler Vasodilatator ist (von verschiedenen Autoren war übereinstimmend eine nur Sekunden betragende *in vitro* Halbwertszeit von 30-50 s ermittelt worden <sup>6,29,69,82,130,165</sup>) sollte ein für die Untersuchung besonders kurzlebiger Vasodilatoren geeigneter Bioassay eingesetzt werden. Die Methode sollte ferner physiologischen Bedingungen möglichst nahe kommen. Eine modifizierte und den speziellen Bedürfnissen angepaßte, von Vane (1964) erstmalig beschriebene Superfusions-Kaskade <sup>189a</sup>, bestehend aus drei endothelfreien Kaninchenaortenstreifen als Detektorgefäßen, erwies sich hierbei als eine im besonderen Maße geeignete Methode. Mit Hilfe dieser Methode gelang es, selbst diskrete Unterschiede im vasorelaxierenden Verhalten der unterschiedlichen Vasodilatoren herauszuarbeiten.

Die Herstellung sämtlicher untersuchten vasoaktiven Substanzen erfolgte ausschließlich nach etablierten Syntheseverfahren. Hierbei war für den Vergleich der biologischen Aktivitäten des NO und des EDRF eine qualitativ möglichst hochwertige "NO-Quelle" notwendig. Prinzipiell bestehen verschiedene Möglichkeiten eine endogene Stickstoffmonoxid-Freisetzung in biologischen Systemen nachzuahmen, z.B. durch "Nitrovasodilatoren" oder durch eine wäßrige Lösung authentischen NO selbst. Gemeinsam ist den Ersteren, daß sie enzymatisch und nichtenzymatisch NO freisetzen und hierüber als NO-Donatoren fungieren können. Zu dieser Gruppe zählen u.a. die sog. Organischen Nitrate, also Ester der Salpeter- oder der salpetrigen Säure mit ein- oder mehrwertigen Alkoholen, Organische Nitrite, S-Nitrosothiole, Sydnominine, Furoxane, anorganisches Nitrit sowie Nitroprussid-Natrium <sup>45</sup>. Jede dieser Substanzklassen besitzt unterschiedliche biochemische Eigenschaften, wodurch je nach geplantem Experiment zwar die Auswahl des geeigneten NO-Donators möglich wird, aber trotzdem Probleme in der Interpretation der Ergebnisse verbleiben: Zum einen kann eine konstante NO-Generierung nicht sichergestellt werden, zum anderen könnte es zu Interaktionen einzelner Metabolite und Intermediärprodukte mit dem biologischen System kommen. Die registrierte Vasorelaxation nach Applikation des entsprechenden Vasodilators könnte daher unter Umständen nicht ausschließlich auf eine Freisetzung des NO zurückgeführt werden. Nur die Verwendung einer wäßrigen Lösung authentischen Stickstoffmonoxids selbst ließ daher in den vorgestellten Experimenten eine zuverlässige Interpretation der biologischen Reaktionen zu.

Die Gewinnung und Kultivierung der Endothelzellen sowie der Umgang mit der Endothelzellsäule und deren Stimulation zur Freisetzung des EDRF erfolgte ebenfalls nach etablierten Vorschriften. Maximale EDRF-Antworten waren bei Endothelzellvolumina entsprechend 1,5 - 2,5 ml Microcarrierbeads erzielt. Größere Volumina führten zu keiner weiteren Zunahme der EDRF-Antwort. Zu bedenken ist hierbei, daß größere Säulenvolumina zwar zu einer quantitativ höheren Freisetzung des EDRF führen dürften, sich gleichzeitig aber auch die Säulentransitzeit deutlich verlängert, so daß ein Großteil des von den am Säulenanfang gelegenen Endothelzellen freigesetzten EDRF's aufgrund der extremen Instabilität bereits vor Erreichen des ersten Detektorgefäßes vollständig abgebaut wird. Die registrierte EDRF-Antwort kann daher bei zunehmender Säulenlänge nur einem Optimum entgegenstreben, welches bei der verwendeten Säulengeometrie und Perfusionsrate bei genannten 1,5 - 2,5 ml Gesamtvolumen lag. Bei einer initialen Bewuchsdichte der Microcarrier von  $5 - 7 \times 10^6$  Zellen / ml berechnete sich die Gesamtendothelzellzahl dabei auf  $0,75 - 1,75 \times 10^7$  Zellen / Säule. Diese Zahl stimmte mit Beobachtungen von Gryglewski et al. überein. Die Autoren beschrieben bei Verwendung einer ähnlichen Methodik optimale EDRF-Antworten bei  $1-2 \times 10^7$  Endothelzellen / Säule<sup>70</sup>.

## **D.1            Experimente ohne Koinfusionen**

In der ersten Versuchsreihe wurden die kinetischen Charakteristika (vasorelaxierende Potenz, Halbwertszeit, Relaxationsdauer) des EDRF und der untersuchten EDRF-Kandidaten bestimmt und miteinander verglichen. Sämtliche getesteten Substanzen erwiesen sich dabei als potente Vasodilatoren.

### **D.1.1            Vasorelaxierende Potenz**

In allen Fällen konnten Relaxationen der Gefäßstreifen bereits nach Applikation nanomolarer Konzentrationen registriert werden. Die S-Nitrosothiole waren dabei durchweg 3-10 fach potenter als NO. Das S-nitrosylierte Humanalbumin und Hydroxylamin zeigte dagegen eine um den Faktor 10 geringere Aktivität gegenüber NO. DNIC erwies sich als äquipotent (Berechnung der Wirkkomponente (NO) auf molarer Basis). Zum Vergleich beschrieben Myers et al. bei Verwendung eines anders konzipierten Bioassay eine um den Faktor 80 höhere Potenz des S-Nitrosocysteins respektive NO<sup>140</sup>. In der Literatur ließen sich ansonsten keine mit vergleichbaren Methoden erhobenen Vergleichswerte finden. Eine mögliche Ursache für die beobachtete höhere vasodilatatorische Potenz der S-Nitrosothiole gegenüber NO könnte der Umstand sein, daß die in die Applikationsrinne eingebrachte authentische NO-Lösung vor Erreichen des ersten Gefäßes sofort mit

dem in der Pufferlösung verfügbaren Sauerstoff und dem Luftsauerstoff reagierte und demnach in höherem Maße inaktiviert wurde. Nach Applikation in die pH-neutrale Pufferlösung beginnen dagegen die *S*-Nitrosothiole erst nach einer kurzen Reaktionszeit das aktive NO freizusetzen. Entsprechend höhere NO-Konzentrationen konnten daher das erste Detektorgefäß erreichen. Auf die Möglichkeit, daß *S*-Nitrosothiole nicht nur über eine Freisetzung von NO vasorelaxierend wirken, sondern evtl. direkt auf die glattmuskulären Zellen stimulierende Effekte vermitteln, wird nachfolgend noch eingegangen.

#### D.1.2            Halbwertzeiten

Die Halbwertzeiten der unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen instabilen Vasodilatoren zeigte eine positive Korrelation zur applizierten Konzentration. Um eine Vergleichbarkeit der vasorelaxierenden Aktivitäten zu ermöglichen, wurden daher stets Konzentrationen gegenübergestellt, welche auf dem ersten Gefäß zu möglichst gleichstarken Amplituden (Vasorelaxationen) führten und demnach äquipotent waren.

Nur der EDRF (basale und bradykininstimulierte Freisetzung), NO, *S*-Nitrosocystein und *S*-Nitrosocysteamin (in Konzentrationen bis 30 nM o.t.) wiesen dabei eine vergleichbare Halbwertzeit von ca. 2,8 bis 5,5 s auf. Die Halbwertzeiten des basal ausgeschütteten und nach maximaler Bradykininstimulation freigesetzten EDRF aus den Endothelzellen stimmten mit den zuvor publizierten und mit Hilfe einer Superfusions-Bioassay-Kaskade (Kaninchenaortenstreifen) ermittelten EDRF-Halbwertzeiten von 4-7 s<sup>70,71,82,88,130,131</sup> überein. Die Halbwertzeiten für NO waren ebenfalls nahezu identisch mit den in der Literatur bei gleicher Methodik beschriebenen Werten von 3-7 s<sup>82,88,149,131</sup>. Von den untersuchten Nitrosothiolen erwiesen sich nur *S*-Nitrosocystein und *S*-Nitrosocysteamin als besonders instabil. Die konzentrationsabhängigen Halbwertzeiten lagen zwischen 2,8 s und 5,5 s für ersteres bzw. zwischen 4 s und 12,8 s für letzteres. Diese Beobachtung deckt sich mit Experimenten über die Stabilität von *S*-Nitrosothiolen in verschiedenen zubereiteten Pufferlösungen. Dabei erwiesen sich die auf der Bioassay-Kaskade instabilen *S*-Nitrosothiole, abhängig von pH, Temperatur und O<sub>2</sub>-Konzentration, als ebenfalls besonders instabil. Unter physiologischen Bedingungen zerfiel z.B. das *S*-Nitrosocystein spontan zu NO und Cystin mit einer HWZ von 15 s<sup>44,91,108,45</sup>. An Literaturangaben über die Halbwertzeiten von *S*-Nitrosothiolen auf einer Gefäßstreifen-Kaskade war nur eine Arbeit von Iversen et al. zu finden. Die nach den hier vollständig vorgestellten Untersuchungen<sup>47</sup> publizierte Arbeit gibt für *S*-Nitrosocystein eine vergleichbar HWZ von ca. 2 s an<sup>94</sup>.

Im Gegensatz zum EDRF, NO, *S*-Nitrosocystein bzw. -cysteamin zeigten alle übrigen untersuchten Vasodilatoren keinen Aktivitätsverlust während der Passage über die Gefäßkaskade. Deren

Halbwertszeiten lagen demnach deutlich über 12 s und somit signifikant über der des EDRF. Das vasorelaxierende Verhalten der *S*-Nitrosothiole des Homocysteins und *N*-Acetyl-DL-Cysteins wurde zuvor noch nie mit einer Superfusions-Kaskade untersucht. Gleiches gilt für das *S*-nitrosylierte Humanalbumin und den Dinitrosyl-Eisen(II)-Cystein Komplex. Mit einer Bioassay-Kaskade gewonnene Vergleichswerte sind also keine bekannt. Nur *S*-Nitrosoglutathion, SNAP und Hydroxylamin waren bei der bereits oben angesprochenen Arbeit von Iversen et al. mituntersucht worden. Die Autoren bestätigten deren gegenüber dem *S*-Nitrosocystein deutlich höhere HWZ<sup>94</sup>. In den bereits erwähnten Untersuchungen über die Stabilität von *S*-Nitrosothiolen in Pufferlösungen wurden die zuletzt genannten *S*-Nitrosothiole unter physiologischen Bedingungen ebenfalls als deutlich stabiler als *S*-Nitrosocystein u. -cysteamin beschrieben<sup>44,45,91,108</sup>. Übereinstimmend wurden *S*-Nitroso-*N*-Acetylcystein und SNAP im Vergleich als relativ stabile *S*-Nitrosothiole beschrieben<sup>113,114</sup>.

Bzgl. des *S*-nitrosylierten Humanalbumins beobachteten Stamler et al. in Phosphatpufferlösung eine Halbwertszeit von ca. 24 h, bei Experimenten mit isolierten Gefäßstreifen in Organbädern eine von ca. 40 min<sup>96,101,172,177,178</sup>. Angaben über die Halbwertszeit des DNIC waren u.a. für Experimente in Tyrode-Lösung zu finden. Hierbei schwankte die HWZ in Abhängigkeit von O<sub>2</sub>-Partialdruck, Temperatur und pH zwischen 30 s und 2 min<sup>134</sup>.

Die ermittelten Halbwertszeiten der verwendeten Vasodilatoren werden *in vitro* von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Hierin ist ein Grund für teilweise abweichende Angaben über die Halbwertszeiten in der erwähnten Literatur im Vergleich zu den Resultaten dieser Arbeit zu sehen. Je nach Methodik bestanden unterschiedliche Ausgangsbedingungen. Einige Einflußfaktoren sollen daher im Folgenden diskutiert werden. Während der Bioassay-Experimente war die Pufferlösung stets auf pH 7,4 und 37° C eingestellt. Welche Auswirkung nichtphysiologische Bedingungen, insbesondere die Änderungen der Temperatur und des pH-Wertes, auf die Stabilität von *S*-Nitrosothiolen haben können, wurde durch Untersuchungen von Feilisch demonstriert. Höhere Temperaturen hatten bei allen untersuchten *S*-Nitrosothiolen durchweg eine höhere Zerfallsgeschwindigkeit zur Folge, dagegen war der Einfluß der Protonenkonzentration (pH) auf deren Stabilität unterschiedlich. Jede Substanz wies ein eigenes pH-Optimum auf. So war *S*-Nitrosohomocystein in Phosphatpufferlösung bei 20° C und pH 7,7 z.B. instabiler als *S*-Nitrosocystein u. -cysteamin<sup>44</sup>. Noch unübersichtlicher wird die Situation wenn in dem Versuchsaufbau, wie bei der in dieser Arbeit verwendeten Methodik, Proteine und / oder Thiole, also Sulfhydryl-(R-SH)-Gruppen-haltige Verbindungen präsent sind. Durch eine schnelle NO-Gruppenübertagung (Transnitrierung) von einem *S*-Nitrosothiol auf die Mercapto-Gruppe eines anderen freien Thiols können neue instabilere *S*-Nitrosothiole entstehen<sup>44</sup>.

Transnitrosierungsreaktionen mit Mercapto-Gruppen von Proteinen können wiederum zu irreversiblen Modifikationen von aktiven Thiolgruppen i.S. der Entstehung gemischter Disulfide mit nachfolgendem Aktivitätsverlust führen<sup>45,151</sup>. Ebenso könnte eine Stabilisierung kurzlebiger

*S*-Nitrosothiole durch Bildung stabilerer *S*-nitrosylierter Proteine eintreten<sup>177,178</sup>. Die HWZ des EDRF und der übrigen getesteten Substanzen dürfte ebenfalls durch die limitierte Verfügbarkeit von Hemmstoffen der NO-Wirkung (z.B. Superoxid-Ionen) nach Applikation höherer Konzentration der NO-freisetzenden Substanzen beeinflusst werden.

Die genannten Faktoren tragen vermutlich auch alle zu der Beobachtung bei, daß die biologischen Halbwertzeiten der in dieser Arbeit untersuchten instabilen Vasodilatoren mit steigenden Konzentrationen zunahmten. Eine weitere Ursache dürfte in folgendem zu sehen sein: Eine Untersuchung von Feelisch über die Abhängigkeit der Guanylatcyclase-Aktivierung (→ Vasorelaxation der Gefäße) durch unterschiedlich konzentrierte NO- und *S*-Nitrosothiollösungen (Enzymassay) zeigte einen nichtlinearen sondern sigmoiden Verlauf der Konzentrationswirkungskurven. Dabei wurde die höchste Steigung der Enzymaktivierung bei Lösungen in nanomolaren Konzentrationen beobachtet<sup>44</sup>. Bei den hier vorgestellten Experimenten kamen fast ausschließlich Lösungen der Vasodilatoren ebenfalls in nanomolaren Konzentrationen zum Einsatz. Ein nichtlinearer Verlauf der Enzymaktivierung in den Detektorgefäßen nach Applikation unterschiedlicher Konzentrationen der vasorelaxierenden Substanzen darf demnach ebenfalls angenommen werden.

### D.1.3            Relaxationsdauer

Die Relaxationsdauer des nach Bradykininstimulation freigesetzten EDRF (100 nM o.t.) unterschied sich bei äquipotenter Konzentration nicht signifikant von NO, den *S*-Nitrosothiolen des Cystein, Cysteamin, Homocystein und Glutathion, SNAP und dem Hydroxylamin (160 - 240 s). Im Mittel wiesen aber alle untersuchten *S*-Nitrosothiole, mit Ausnahme von SNAP, eine längere Relaxationsdauer bei größerer Variabilität auf. Signifikant höher war die Relaxationsdauer jedoch beim *S*-nitrosylierten Humanalbumin. Eine im Vergleich extrem längere Relaxationsdauer wies DNIC auf. Bei einer Konzentration von 100 nM o.t. DNIC lag diese um den Faktor 10 höher als bei allen anderen untersuchten Substanzen. Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre die Möglichkeit, daß es, ähnlich dem verwandten sog. "Roussin's Black salt", zu einem Übertritt von DNIC in das Aortengewebe kam und dieses daher deutlich langsamer durch die über die Gefäße superfundierte Pufferlösung ausgespült wurde<sup>49</sup>. In der Literatur sind keine Angaben zur Relaxationsdauer des EDRF und der untersuchten *S*-nitrosylierten Thiole, des *S*-nitrosylierten Humanalbumin und des Hydroxylamin zu finden. Eine Arbeitsgruppe um Vanin führte Organbadexperimente zur Untersuchung des vasorelaxierenden Verhalten des DNIC durch. Sie beobachteten eine Relaxationsdauer von 60-90 min nach einmaliger Gabe des DNIC in einer Konzentration von 10 µM<sup>194</sup>.

Bezüglich *S*-Nitrosocystein ist noch zu erwähnen, daß S.J. Lewis et al. 1992 die Existenz spezifischer Rezeptoren für das L-Isomer im Gefäßsystems des Gehirns postulierten. In ihren Untersuchungen beschrieben die Autoren nahezu keine vasorelaxierende Wirkung des D-Isomers im Gegensatz zum L-Isomer<sup>111</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten vergleichenden Experimente über die vasorelaxierenden Aktivität des *S*-Nitroso-L- und D-Cysteins konnten keine unterschiedlichen Effekte auf die Kaninchenaortenstreifen aufzeigen (Kap. C.1.3, S. 42). Somit ist die Existenz derartiger spezifischer Rezeptoren zumindest in dem eingesetzten Gefäßsystem sehr unwahrscheinlich.

Zusammengefaßt zeigten die Experimente im ersten Teil dieser Arbeit, daß die *S*-Nitrosothiole des Glutathions, Homocysteins, N-Acetyl-DL-penicillaminthionitrits und N-Acetylcysteins auf der Superfusions-Bioassay-Kaskade von authentischem EDRF abweichende kinetische Eigenschaften aufweisen. Gleiches gilt für *S*-nitrosyliertes humanes Serumalbumin, Hydroxylamin und DNIC. Von den untersuchten Substanzen verblieben lediglich NO, *S*-Nitrosocystein und *S*-Nitrosocysteamin als mögliche EDRF-Kandidaten.

## **D.2**                    **Experimente mit Koinfusionen**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das vasorelaxierende Verhalten des EDRF und der verbliebenen EDRF-Kandidaten während der Koinfusion verschiedener reaktiver Lösungen eingehender untersucht. Dabei gelang es durch das Koinfundieren von oxygenierten Hämoglobin-Lösungen (HbO<sub>2</sub>) und Lösungen des L- oder D-Cystein Unterschiede im vasorelaxierenden Verhalten von EDRF und NO einerseits und von *S*-Nitrosocystein und -cysteamin andererseits, aufzudecken. Nur EDRF und NO zeigten stets qualitativ und quantitativ gleichartige Änderungen der vasorelaxierenden Aktivität. Während den HbO<sub>2</sub>-Koinfusionen war ein vom ersten zum dritten Gefäß zunehmender, gleichstarker Verlust der vasorelaxierenden Aktivität zu beobachten. Dabei lag der IC<sub>50</sub>-Wert bei äquipotenten Konzentrationen (bzgl. der Amplitude auf dem ersten Gefäß) bei EDRF und NO für das erste Gefäß bei ca. 35 nM HbO<sub>2</sub>.

Im Gegensatz zum EDRF und NO wiesen *S*-Nitrosocystein und -cysteamin, ebenso wie alle untersuchten stabilen Vasodilatoren, auf dem ersten Gefäß mit >100 nM HbO<sub>2</sub> signifikant höhere IC<sub>50</sub>-Werte auf. Bezogen auf das zweite und dritte Gefäß war die Abnahme der relaxierenden Aktivität bei den instabilen Vasodilatoren (*S*-Nitrosocystein und -cysteamin) allerdings nicht mehr signifikant unterschiedlich zu EDRF / NO. HbO<sub>2</sub> vermag über die Oxidierung zu Methämoglobin freies NO zu binden und somit dessen Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur abzuschwächen<sup>82,120,130,136,186</sup>. Daß die im gekühlten Citratpuffer pH 2 stabilisierten *S*-Nitrosothiollösungen im Gegensatz zur authentischen NO-Lösung erst nach Applikation in die 37° C warme Pufferlösung verzögert beginnen NO freizusetzen, wurde bereits erwähnt. Die Reaktion zwischen NO und HbO<sub>2</sub> ist jedoch in weniger

als 100 ms beendet. Die Zeit zur vollständigen Reaktion des entweder direkt applizierten oder erst verzögert freigesetzten NO mit HbO<sub>2</sub> vom gemeinsamen Applikationsort (Applikationsrinne) bis zum Erreichen des ersten Gefäßes (nach 1 s Transitzeit) war demnach in beiden Fällen ausreichend. Hierin kann somit kein Grund für die quantitativ unterschiedlich hemmende Wirkung von HbO<sub>2</sub> auf dem ersten Gefäß liegen. Wahrscheinlicher ist, daß *S*-Nitrosothiole ihre Wirkung nicht nur über eine Freisetzung von NO, sondern evtl. einen weiteren, bislang ungeklärten Wirkungsmechanismus entfalten können<sup>108</sup>. Denkbar wäre eine direkte stimulierende Wirkung oder ein Transport als intakte *S*-Nitrosothiole über die Zellmembran.

Die stabilen Vasodilatoren zeigten durchweg keine signifikante Änderung ihrer vasorelaxierenden Aktivität auf allen drei Detektorgefäßen auch bei Koinfusion höher konzentrierter HbO<sub>2</sub>-Lösungen. Moncada et al. zeigten bereits 1986 mit Hilfe einer ähnlichen Superfusions-Bioassay-Kaskade, daß sowohl EDRF als auch NO auf eine HbO<sub>2</sub>-Beimengung zum Superfusat in gleicher Weise mit einer Abnahme der vasorelaxierenden Aktivität reagieren<sup>130</sup>. Die Abnahme war ebenfalls von der HbO<sub>2</sub>-Konzentration abhängig und auf dem untersten (dritten) Gefäß am deutlichsten ausgeprägt. Die übrigen in dieser Arbeit untersuchten EDRF-Kandidaten wurden noch nie zuvor auf einer Superfusions-Bioassay-Kaskade hinsichtlich ihres vasorelaxierenden Verhaltens bei HbO<sub>2</sub>-Koinfusion untersucht.

Bei Koinfusion von L- oder D-Cystein-Lösungen zur Pufferlösung (in Konzentrationen von 1 µM - 10 µM) fiel das unterschiedliche Verhalten von EDRF (basal und nach Bradykininstimulation) und NO einerseits und von *S*-Nitrosocystein bzw. -cysteamin andererseits, noch deutlicher aus. Die vasorelaxierende Aktivität war bei Ersteren auf allen drei Gefäßstreifen um über 90 % gegenüber der Ausgangsaktivität ohne Koinfusion abgeschwächt. *S*-Nitrosocystein bzw. -cysteamin dagegen zeigten eine deutliche Zunahme der Aktivität auf dem zweiten und dritten Gefäßstreifen bei nahezu unveränderter Aktivität auf dem ersten. Beide zuletzt genannten Substanzen waren somit stabilisiert worden. Da, bezogen auf das erste Gefäß, stets äquipotente Konzentrationen der einzelnen Vasodilatoren miteinander verglichen wurden, kann daher sicher ausgeschlossen werden, daß *S*-Nitrosocystein bzw. -cysteamin mit dem EDRF identisch sind.

Feelisch et al. publizierten Untersuchungen zum Effekt von unterschiedlich konzentrierten L-Cystein-Lösungen auf die durch NO und *S*-Nitrosocystein induzierte Relaxation von Rattenaortenringen im Organbad. Sie bestätigten ein unterschiedliches Verhalten beider Vasodilatoren in Anwesenheit von L-Cystein in Konzentrationen von 1 µM – 100 µM<sup>47</sup>. NO zeigte hierbei eine erheblich geringere vasorelaxierende Aktivität als *S*-Nitrosocystein. Die Resultate stimmen auch mit den Ergebnissen einer Untersuchung von Jia et al. überein. Die Autoren fanden mit Hilfe einer andersartigen Methodik ein ebenfalls abweichendes Verhalten zwischen dem nach Acetylcholinstimulation aus Endothelzellen freigesetzten EDRF / NO bzw. dem *S*-Nitrosocystein<sup>97</sup>.

Überraschenderweise ließen auf der Bioassay-Kaskade stichprobenartig durchgeführte Experimente mit Koinfusion von L-Cystein-Lösungen in Konzentrationen  $> 100 \mu\text{M}$  o.t. ein dem *S*-Nitrosocystein gleichartiges Verhalten von NO erkennen. NO ließ sich unter diesen Bedingungen ebenfalls stabilisieren und führte auf allen drei Gefäßen zu einer gleichstarken Relaxation. Eine wahrscheinliche Erklärung für dieses Phänomen ist, daß es durch die *S*-Nitrosylierungsreaktion von NO mit dem im zunehmenden Überschuß vorhandenen L-Cystein zur Bildung von *S*-Nitrosocystein kommt (vergleichbar der Synthese von *S*-Nitrosocystein aus  $\text{NaNO}_2$  und Cystein; Kap. B.1.3.1, S. 20). Das neugebildete *S*-Nitrosocystein und nicht mehr freies NO dürfte demnach dann für die beobachtete Relaxation der Detektorgefäße verantwortlich gewesen sein. In der oben angesprochenen Untersuchung von Feelisch et al. mit Rattenaortenringen im Organbad wurde gleichartiges beobachtet und diese Vermutung weiter erhärtet <sup>47</sup>.

Welche chemischen und biologischen Reaktionen bei Anwesenheit von Cystein in Konzentrationen von  $1 - 10 \mu\text{M}$  zu einer Abschwächung der vasorelaxierenden Aktivität sowohl des EDRF als auch des NO führen, ist letztlich unklar. Die Möglichkeit, daß NO bzw. der EDRF mit Cystein in Konzentrationen von  $1 - 10 \mu\text{M}$  o.t. bereits zu *S*-Nitrosocystein reagiert (*S*-Nitrosylierung) erscheint unwahrscheinlich <sup>178</sup>. In diesem Fall wäre auf der Bioassay-Kaskade mit einer durch das *S*-Nitrosocystein induzierten zunehmenden Relaxation des untersten dritten Gefäßes zu rechnen gewesen (vergl. Cystein-Konzentrationen  $> 100 \mu\text{M}$ ). Dies wurde aber nicht beobachtet. Dagegen ist als Ursache der NO-Inaktivierung durch Cystein eine gesteigerte Generation von Superoxid-Anionen ( $\text{O}_2^-$ ) durch die vorbeschriebene Autoxidation von Cystein wahrscheinlicher <sup>128</sup>. Untersuchungen von Misra (1974) zu Folge, sind Thiole unter den bei den Experimenten gegebenen Bedingungen nämlich in der Lage, durch Autoxidation Superoxid-Ionen zu generieren. Tatsächlich zeigten Jia et al. bei Experimenten mit Rattenaortenringen im Organbad, daß die Cystein-induzierte Abschwächung der NO-Aktivität durch eine Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) zur Pufferlösung vollständig reversibel war ( $\rightarrow$  Reduktion der  $\text{O}_2^-$ -Generierung) <sup>97</sup>. Ähnliches demonstrierten Iversen et al. bei Untersuchungen über die Wirkungen verschiedener *S*-Nitrosothiole und des NO auf die glatte Gefäß- und Colonmuskulatur <sup>94</sup>.

Dazu passend beschrieben Feelisch et al. in ihren Experimenten mit Rattenaortenringen im Organbad einen dem Effekt von L-Cystein gleichartigen Abschwächung der NO-induzierten Vasodilatation durch Pyrogallol. Pyrogallol vermag, vergleichbar dem Cystein, ebenfalls  $\text{O}_2^-$ -Ionen zu generieren <sup>47,88,130</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Resultate der Pyrogallol-Koinfusionsexperimente bestätigen diese Beobachtung: Auf allen drei Gefäßstreifen kam es nach Pyrogallol-Koinfusion zu einer deutlichen, bis zu ca. 85 %igen Hemmung der vasorelaxierenden Aktivität des NO (Kap. C.3.2). Als Ursache der nahezu vollständigen NO- und EDRF-Inaktivierung durch Cystein kann demnach tatsächlich die gesteigerte Generierung von Superoxid-Anionen ( $\text{O}_2^-$ ) durch eine Autoxidation des Cysteins angenommen werden.

Entgegen den genannten und anderen Publikationen, zeigte SOD in den eigenen stichprobenartig vorgenommenen Experimenten keinen signifikant protektiven Effekt auf NO oder EDRF i.S. einer Erhöhung der Halbwertzeiten<sup>71,82,129,132,139,165</sup>. Auch ließ sich nicht bestätigen, daß die Cystein-induzierte Abschwächung der NO-Aktivität durch eine Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) zur Pufferlösung vollständig reversibel sei. Die vasorelaxierende Potenz der übrigen Testsubstanzen blieb unter SOD ebenso unverändert. Da die begaste Pufferlösung eine wichtige Quelle der Superoxid-Anionen im verwendeten Bioassay darstellt, wäre eine mögliche Erklärungen eine unterschiedliche Zubereitung oder abweichende Methodik bei der Begasung der Pufferlösung.

Die denkbaren für die Stabilisierung des *S*-Nitrosocysteins und -cysteamins verantwortlichen biochemischen Prozesse sollen im Folgenden diskutiert werden. Die mit der Bioassay-Kaskade (ohne Koinfusion) ermittelte kurze Halbwertzeit von *S*-Nitrosocystein (L- u. D-Isomer) bzw. -cysteamin im Vergleich zu den übrigen *S*-Nitrosothiolen, deckt sich mit den bereits erwähnten Beobachtungen u.a. von Kowaluk et al., daß *S*-Nitrosocystein *in vitro* in oxygenierten Krebs-Puffer-Lösungen deutlich schneller und mehr NO freisetzt als andere *S*-Nitrosothiole<sup>12,108</sup>. Dabei scheint aber die spontane Liberation von NO nicht der für die durch *S*-Nitrosothiole *in vitro* ausgelöste Gefäßrelaxation alleinig ursächliche Mechanismus zu sein. Die Autoren fanden, daß die ermittelte spontane Freisetzungsrates von NO bei entsprechenden Kontroll-Bioassay-Experimenten alleine nicht zur Auslösung einer adäquaten Vasorelaxation ausreichte. Anderen Untersuchungen zu Folge liegt der NO-Freisetzung aus *S*-Nitrosothiolen *in vitro* (physiologische Pufferlösungen) als Hauptmechanismus vielmehr ein durch Schwermetallionen katalysierter Zerfall zu Grunde<sup>123</sup>. Bezüglich des *S*-Nitrosocysteins wäre demzufolge die besondere Instabilität bei den Bioassay-Experimenten, also hohe NO-Freisetzungsrates und entsprechend kurze Halbwertzeit, an die Verfügbarkeit von Metall-Ionen gebunden. Die Quelle hierfür dürfte wohl weniger im biologischen Material (Kaninchengefäßstreifen) selbst zu suchen sein (hier liegen Metallionen überwiegend komplexiert vor) als in dem zur Herstellung der Krebs-Puffer-Lösung verwendeten destillierten Wasser<sup>47</sup>.

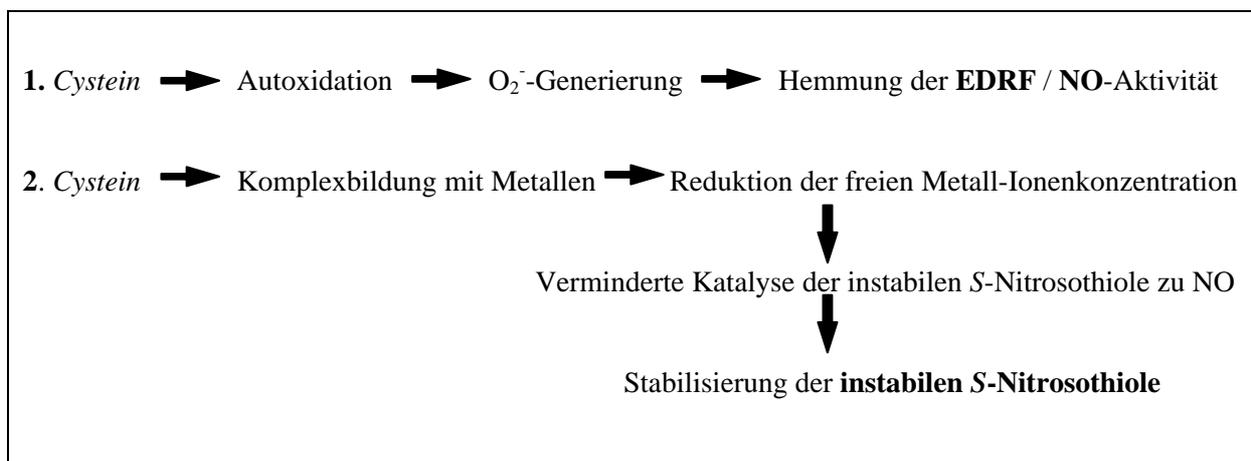
Vor diesem Hintergrund läßt sich nun die Stabilisierung des *S*-Nitrosocysteins durch L- o. D-Cystein zwangfrei erklären. Feelisch et al. fanden in spektroskopischen Studien zum einen, daß die Halbwertzeit des *S*-Nitrosocysteins in Pufferlösungen tatsächlich u.a. von der Metall-Kontamination des verwendeten Wassers abhängig ist<sup>47</sup>. Zum anderen konnte durch Zugabe von L-Cystein eine deutliche Stabilisierung des *S*-Nitrosocysteins bestätigt werden (z.B. Erhöhung der HWZ von 30 µM *S*-Nitrosocystein von 0,31 min auf 36,9 min nach Zugabe von 100 mM L-Cystein). In weiterführenden Experimenten hatten im Puffer gelöstes EGTA und EDTA (beides Substanzen, welche in der Lage sind, mit Metallen Komplexe zu bilden) eine gleichartige Verlängerung der HWZ von *S*-Nitrosocystein zur Folge wie L-Cystein. Die Stabilisierung des *S*-Nitrosocysteins durch Cystein *in vitro* scheint daher durch die chemische Eigenschaft des Cysteins bedingt zu sein, mit Metallen in physiologischen Lösungen Komplexe zu bilden. In der Folge stehen die so gebundenen Metalle zur

Katalyse des *S*-Nitrosothiolzerfalls nicht mehr zur Verfügung. Die NO-Freisetzung aus den instabilen *S*-Nitrosothiolen nimmt daher ab, die HWZ erhöht sich entsprechend. Daß die in der vorliegenden Arbeit stichprobenartig durchgeführten Koinfusionsexperimente mit EDTA keine aussagekräftigen Resultate erbrachten, könnte bei nachträglicher Analyse an zu geringen EDTA-Konzentrationen gelegen haben (Teil C.3.2). Auch wenn bzgl. des ebenfalls relativ instabilen *S*-Nitrosocysteamins keine direkten ähnlichen Untersuchungen bekannt sind, kann davon ausgegangen werden, daß gleichartige chemische Reaktionen für das charakteristische Verhalten auf der Bioassay-Kaskade verantwortlich sind. Festzuhalten bleibt, daß der EDRF keine Stabilisierung durch die Koinfusion von Cystein (1-10 µM) aufwies und es daher sehr unwahrscheinlich ist, daß er einem instabilen *S*-Nitrosothiol entspricht.

Zusammenfassend beruht der konträre Effekt des Cysteins auf EDRF / NO und die instabilen *S*-Nitrosothiole in den Bioassay-Experimenten am ehesten auf folgenden chemischen Reaktionen:

- 1.:** deutliche Hemmung der vasorelaxierenden Aktivität von EDRF / NO durch die Autoxidation des Cysteins unter gleichzeitiger O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Generierung,
- 2.** Stabilisierung der instabilen *S*-Nitrosothiole des Cysteins u. Cysteamins aufgrund reduzierter Katalyse der *S*-Nitrosothiole zu NO durch freie Metall-Ionen. Die verminderte freie Metall-Ionen-Konzentration wiederum beruht auf der Komplexbildung von Cystein mit Metall-Ionen (Abb. 28).

Da tendenziell ähnliche Effekte bei stichprobenartig durchgeführten Experimenten auch bei Koinfusion anderer Thiollösungen gefunden wurden (insbesondere Homocystein und Humanalbumin, weniger Glutathion; Teil C.3.3.2), scheint die freie Sulfhydrylgruppe (-SH) der koinfundierten Thiollösungen die chemischen Reaktionen zu vermitteln.



**Abb. 28:** Wirkungsweise des Cysteins (1- 10 µM) auf EDRF / NO (1) bzw. auf die instabilen *S*-Nitrosothiole (2). Darstellung der möglichen Prozesse, welche zu den konträren Effekten des Cysteins auf die vasorelaxierende Aktivität des EDRF / NO bzw. der instabilen *S*-Nitrosothiole führen.

Bzgl. der von Fukuto et al. (1992) aufgestellten Theorie, daß der EDRF dem in einen anderen Oxidationsstatus konvertierten NO (NO<sup>+</sup>, NO<sup>-</sup>) entspräche<sup>53</sup> (Kap. A.1.1.4, S. 11), soll der Vollständigkeit halber folgendes angemerkt werden: In verschiedenen Bioassay-Experimenten (u.a. Kaskaden-Experimenten) wiesen sowohl NO<sup>+</sup> als auch NO<sup>-</sup> ein vom EDRF abweichendes vasorelaxierendes Verhalten auf. Zum einen lagen die Halbwertszeiten durchweg erheblich über der des EDRF, zum anderen waren relativ hohe Konzentrationen zur Auslösung einer Relaxation der Detektorgefäße notwendig (z.B. 100 µM für NO<sup>-</sup>)<sup>199</sup>. Eine Identität von NO<sup>+</sup> / NO<sup>-</sup> mit dem EDRF erscheint daher unwahrscheinlich.

Tabelle 14 stellt abschließend die Resultate der entscheidenden Versuchsreihen zusammen. Da alle untersuchten Vasodilatoren unter identischen Bedingungen und bezüglich der vasorelaxierenden Potenz auf dem ersten Gefäß in äquipotenten Konzentrationen eingesetzt wurden, liegen nun erstmalig zuverlässig vergleichbare pharmakologische Daten der wichtigsten Kandidaten für die Identität des EDRF vor. Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente konnten Hydroxylamin, die stabilen S-Nitrosothiole, S-nitrosyliertes Albumin und der Dinitrosyl-Eisen(II)-L-Cystein Komplex aufgrund deren deutlich höheren HWZ und der z.T. längeren Relaxationsdauer als EDRF-Kandidaten ausgeschlossen werden. Mit Hilfe der HbO<sub>2</sub>- und insbesondere der Cystein-Koinfusionen ließen sich die instabilen S-Nitrosothiole des L- u. D-Cysteins und Cysteamins ebenfalls als EDRF-Kandidaten ausschließen.

**Tab. 14: Vergleich der pharmakologischen Profile der untersuchten Vasodilatoren.** Die applizierten Konzentrationen führten zu nahezu identischen Relaxationen auf dem ersten Gefäß (äquipotent); Beladung der Zellsäulen zur Freisetzung des EDRF (Stimulation durch Bradykinin (Bk)) entsprechend 2,5 ml Microcarrierbeads. Rel. **Potenz:** Relative vasodilatatorische Potenz im Vergleich zu NO 100 nM (= 1); **HWZ:** Halbwertszeit in s; **RD:** Relaxationsdauer in s; **IC<sub>50</sub> HbO<sub>2</sub>:** HbO<sub>2</sub>-Koinfusion, IC<sub>50</sub>-Wert bezogen auf das erste Gefäß in nM; **Cystein:** HWZ unter Cystein-Koinfusion (1-10 µM); **Abk.:** CysNO = S-Nitrosocystein, CysaNO = S-Nitrosocysteamin, GSNO = S-Nitrosoglutathion (stellvertretend für alle stabilen S-Nitrosothiole), Hydrox = Hydroxylamin, h-ASNO = S-nitrosyliertes humanes Serumalbumin, DNIC = Dinitrosyl-Eisen-Cystein Komplex. - - = keine Angabe; / = nicht mehr bestimmbar.

Substanz	EDRF	NO	CysNO	CysaNO	GSNO	Hydrox	h-ASNO	DNIC
Konz. [nM]	Bk 100	100	30	30	30	1000	1000	100
Potenz	1	1	3-10	3-10	3-10	0,1	0,1	1
HWZ	3,13	4,02	4,16	5,4	>>12	>>12	>>12	>>12
RD	161	173	174	192	241	135	327	1655
IC <sub>50</sub> HbO <sub>2</sub>	31,5	40	>100	>100	>>100	>>100	>>100	>>100
Cystein	/	/	>>12	>>12	>>12	--	--	--

Die Theorie, daß der von Furchgott und Zawadzki beschriebene endothelium-derived relaxing factor mit NO identisch sei, wurde dagegen erhärtet. Dies schließt nicht grundsätzlich die Existenz einer weiteren instabilen unbekanntem Verbindung aus, die unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen eine dem NO vergleichbare biologische Wirkung entfaltet. Die Möglichkeit, daß EDRF ein *S*-Nitrosothiol, Hydroxylamin oder ein DNIC darstellt, konnte jedoch sicher ausgeschlossen werden, da nur EDRF und NO in allen Versuchsreihen auf der Superfusions-Bioassay-Kaskade durchgehend identische pharmakologische Profile aufwiesen.

Seit der Erstbeschreibung des "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF) durch Furchgott und Zawadzki (1980) wurden zahlreiche Untersuchungen zur Identifizierung dieses vom Endothel freigesetzten instabilen Vasodilators durchgeführt. Verschiedene Theorien werden nach wie vor kontrovers diskutiert. Seit der Entdeckung des L-Arginin / NO-Stoffwechselweges und der Beobachtung, daß Stickstoffmonoxid (NO) dem EDRF sehr ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften aufweist, stehen neben NO nun insbesondere solche Substanzen im Blickpunkt, die in der Lage sind unter physiologischen Bedingungen NO freizusetzen. Die Arbeit vergleicht den EDRF (Rinderendothelzellkulturen) und die wichtigsten Kandidaten für dessen Identität (NO, *S*-Nitrosothiole, *S*-nitrosyliertes Humanalbumin, Dinitrosyl-Eisen(II)-L-Cystein Komplex (DNIC) und Hydroxylamin) mit Hilfe einer, für die Untersuchung extrem instabiler Vasodilatoren besonders geeigneten Methode, der Superfusions-Bioassay-Kaskade mit deendothelialisierten Kaninchenaortenstreifen als Detektorgefäßen.

In der ersten Versuchsreihe wurden die pharmakokinetischen Charakteristika (vasodilatatorische Potenz, Halbwertszeit und Relaxationsdauer) des EDRF und der getesteten Kandidaten bestimmt und miteinander verglichen. Nur NO, *S*-Nitrosocystein und *S*-Nitrosocysteamin wiesen hierbei mit dem EDRF vergleichbare pharmakokinetische Eigenschaften auf. Die übrigen untersuchten Vasodilatoren unterschieden sich insbesondere hinsichtlich der beobachteten Halbwertszeiten (stabil) und z.T. auch durch die unterschiedliche Relaxationsdauer (insbesondere DNIC).

In der zweiten Versuchsreihe wurde eine weitere Selektion der verbliebenen Kandidaten durchgeführt. Hierzu wurde deren vasodilatatorische Aktivität durch Koinfusion reaktiver Lösungen beeinflusst. Hierfür besonders geeignet waren oxygenierte Hämoglobin- ( $\text{HbO}_2$ ) und Cystein-Lösungen. EDRF und NO erfuhren unter  $\text{HbO}_2$ -Koinfusion eine signifikant stärkere Hemmung der vasodilatatorischen Aktivität als *S*-Nitrosocystein u. -cysteamin. Unter Cystein-Koinfusion (1-10  $\mu\text{M}$ ) betrug die Hemmung der relaxierenden Aktivität des EDRF und NO über 90 % während *S*-Nitrosocystein und -cysteamin eine vollständige Stabilisierung, d.h. eine Zunahme der Aktivität insbesondere auf dem zweiten und dritten Gefäß zeigten. Weiterführende Untersuchungen dienen der Klärung der hierfür verantwortlichen chemischen Reaktionen.

Die vorgelegten Resultate untermauern daher die Theorie, daß der EDRF mit NO identisch ist. Durch den direkten Vergleich der pharmakokinetischen Eigenschaften und die unterschiedliche Reaktionsweise auf die koinfundierten Substratlösungen, konnten die instabilen *S*-Nitrosothiole des Cysteins und Cysteamins, die stabilen *S*-Nitrosothiole, das *S*-nitrosylierte Albumin, DNIC und Hydroxylamin als mögliche EDRF-Kandidaten nunmehr klar ausgeschlossen werden.

## F

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Abrams, G.A., Trauner, M., Nathanson, M.H.  
Nitric oxide and liver disease  
Gastroenterologist. **3 (3)**: 220-233 (1995)
  
2. Amezcua, J.L., Dusting, G.J., Palmer, R.M.J., Moncada, S.  
Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator  
Br.J.Pharmacol. **95**: 830-834 (1988)
  
3. Anderson, J.H.  
The metabolism of hydroxylamine to nitrite by *nitrosomonas*  
Biochem.J. **91**: 8-17 (1964)
  
4. Ando, N.  
Some compounds influencing colour formation  
Proc.Int.Symp.Nitrite Meat Prod. (ed.: Krol, B.): 149-160 (1973)
  
5. Änggard, E.E.  
Endogenous and exogenous nitrates  
Acta.Anaesthesiol.Scand. **36** (Suppl. 97):, 7-10 (1992)
  
6. Angus, J.A., Cocks, T.M.  
The half-life of endothelium-derived relaxing factor released from bovine aortic endothelial cells in culture  
J.Physiol. **388**: 71-81 (1987)
  
7. Angus, J.A., Cocks, T.M.  
Endothelium-derived relaxing factor  
Pharmacol.Ther. **41**: 303-351 (1989)
  
8. Angus, J.A., Cocks, T.M., Burkhalter, F., Campbell, J.H., Campbell, G.R.  
Endothelium-dependent relaxing factor (EDRF) from coronary arteries in vivo and from endothelium in cell culture  
J.Mol.Cell.Cardiol. **16 (7)**: R 3 (1984)

9. Armor, J.N.  
Influence of pH and ionic strength upon solubility of NO in aqueous solution  
*J.Chem.Engin.Data* **19 (1)**: 82-84 (1974)
  
10. Azuma, H., Sekizaki,S., Ishikawa, M.  
Inhibition of platelet aggregation by endothelium-derived vascular relaxant factor (EDRF)  
*Jap.J.Pharmacol.* **40 (Suppl.)**: P 120 (1986)
  
11. Balconi, G., Dejana, E.  
Cultivation of endothelial cells. Limitations and perspectives  
*Med.Biol.* **64**: 231-245 (1986)
  
12. Bates, J.N., Aldape, G., Baker, M.T.  
Nitric oxide production by *S*-Nitroso-L-Cysteine  
*FASEB J.* **5(5)**: A1220 (1991)
  
13. Bates, J.N., Myers, P.R., Guerra, R., Baker, M.T., Harrison; D.G.  
Synthesis and detection of *S*-nitroso-L-cysteine  
*FASEB*, **3 (Abstract)**: 5334 (1989)
  
14. Benjamin, N., Cockcroft, J.R., Collier, J.G., et al.  
Local inhibition of angiotensin converting enzyme and vascular responses to angiotensin and bradykinin in the human forearm  
*J.Physiol.* **412**: 543-555 (1989)
  
15. Blanchard, A.A, Mason, C.M., Barnard, R.L.  
Nitric oxide  
*Ed.*: Fernelius, W.C.  
*In*: *Inorg.Synth.* **Vo. II**, Ch. V, 126-128
  
16. Bredt, D.S., Snyder, S.H.  
Nitric Oxide, a Novel Neuronal Messenger  
*Neuron* **Vol 8**: 3-11 (1992)
  
17. Buga, G.M., Gold, M.E., Wood, K.S., Chaudhuri, G., Ignarro, L.J.  
Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle  
*Eur.J.Pharmacol.* **161**: 61-72 (1989)

18. Burke, T.M., Wolin, M.S.  
Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation  
*Am.J.Physiol.* **252**: H721-H732 (1987)
  
19. Busse, R., Flemming, I.  
Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation  
*Ann.Med.* **27**: 331-340 (1995)
  
20. Busse, R., Flemming, I.  
Endothelial dysfunction in atherosclerosis  
*J.Vasc.Res.* **33**: 181-194 (1996)
  
21. Busse, R., Lückhoff, A., Bassenge, E.  
Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **336**: 566-571 (1987)
  
22. Busse, R., Mulsch, A.  
Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin  
*FEBS Lett.* **265**: 133-136 (1990)
  
23. Busse, R., Pohl, U., Kellner, C., Klemm, U.  
Endothelial cells are involved in the vasodilatory response to hypoxia  
*Pflügers Arch.* **397**: 78-80 (1983)
  
24. Cantoni, C., Bianchi, M.A., Beretta, G.  
Stabilità di nitrosoderivati (nitrosotoli, nitrosofenoli e nitrosoemoglobina) a pH alcalino  
*Ind.Aliment.* **14 (7-8)**: 79-81 (1975)
  
25. Carter, M.H., Josephy, P.D.  
Mutagenicity of thionitrites in the ames test - The biological activity of thiol free radicals  
*Biochem.Pharmacol.* **35 (21)**: 3847-3851 (1986)
  
26. Cattell, V., Cook, T.  
The nitric oxide pathway in glomerulonephritis  
*Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **4 (4)**: 359-364 (1995)

27. Cattell, V., Jansen, A.  
Inducible nitric oxide synthase in inflammation  
*Histochem.J.* **27 (10)**: 777-784 (1995)
28. Clark, D.L., Linden, J.  
Modulation of guanylate cyclase by lipoxygenase inhibitors  
*Hypertension* **8**: 947-950 (1986)
29. Cocks, T.M., Angus, J.A., Campbell, J.H., Campbell, G.R.  
Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture  
*J.Cell.Physiol.* **123**: 310-320 (1985)
30. Cohen, R.A.  
The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease  
*Prog.Cardiovasc.Dis.* **38 (2)**: 105-128 (1995)
31. Collin-Osdoby, P., Nickols, G.A., Osdoby, P.  
Bone cell function, regulation and communication: a role for nitric oxide  
*J.Cell.Biochem.* **57 (3)**: 399-408 (1995)
32. Dale, H.H.  
Progress in autopharmacology: a survey of present knowledge of the chemical regulation of certain functions by natural constituents of the tissues  
*Bull.Johns Hopkins Hosp.* **53**: 297-347 (1933)
33. Davies, P.F.  
Microcarrier culture of endothelial vascular cells on solid plastic beads  
*Exp.Cell.Res.* **134**: 367-376 (1981)
34. De Mey, J.G., Vanhoutte, P.M.  
Anoxia and endothelium-dependent reactivity of the canine femoral artery  
*J.Physiol.* **335**: 65-74 (1983)
35. DeRubertis, F.R., Craven, P.A.  
Calcium-independent modulation of cyclic GMP and activation of guanylate cyclase by nitrosamines  
*Science* **193**: 897-899 (1976)

36. Deussen, A., Bading, B., Kelm, M., Schrader, J.  
Formation and salvage of adenosine by macrovascular endothelial cells  
Am.J.Physiol. **264**: H 692-700 (1993)
37. Di Iorio, E.E.  
Preparation of derivatives of ferrous and ferric hemoglobin  
Methods Enzymol. **107**: 57-71 (1984)
38. Doyle, M.P., Hoekstra, J.W.  
Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins  
J.Inorg.Biochem. **14**: 351-358 (1981)
39. Doyle, M.P., Pickering, R.A., DeWeert, T.M., Hoekstra, J.W., Peter, D.  
Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrates  
J.Biol.Chem. **256**: 12393-12398 (1988)
40. Dt.Ärztebl. **94**: C-1707-1709 [Heft 36] (1997)
41. Dusting, G.J., Read, M.A., Stewart, A.G.  
Endothelium-derived relaxing factor released from cultured cells: differentiation from nitric oxide  
Clin.Exp.Pharmacol.Physiol. **15**: 83-92 (1988)
42. Edwards, D.H., Griffith, T.M., Ryley, H.C., Henderson, A.H.  
Haptoglobin-hemoglobin complex in human plasma inhibits endothelium-dependent relaxation:  
evidence that endothelium-derived relaxing factor acts as local autacoid  
Cardiovasc.Res. **20**: 549-556 (1986)
43. Edwards, J.C., Ignarro, L.J., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J.  
Relaxation of Intrapulmonary Artery and Vein by Nitrogen Oxide-Containing Vasodilators and Cyclic  
GMP  
J.Pharmacol.Exp.Ther. **288** (1): 33-42 (1983)
44. Feelisch, M.  
Experimentelle Untersuchungen zum intrazellulären Wirkungsmechanismus der Nitrovasodilatoren  
und der endothelabhängigen Gefäßregulation.  
Beweis für die Bildung von Stickoxid (NO) als gemeinsamen, intermediären Wirkungsvermittler  
Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Univ. Düsseldorf (1988)

45. Feelisch, M.  
The biochemical pathway 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): S25-S33 (1991)
46. Feelisch, M., Noack, E.A.  
Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase  
*Eur.J.Pharmacol.* **139**: 19-30 (1987)
47. Feelisch, M., te Poel, M., Zamora, R., Deussen, A., Moncada, S.  
Understanding the controversy over the identity of EDRF  
*Nature* **368**: 63-65 (1994)
48. Field, L., Dilts, R.V., Ravichandran, R., Lenhert, P.G., Carnahan, G.E.  
An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxyl-1,1-dimethyle-thylthionitrite  
*J.Chem.Soc. (Perkin I)*: 249-250 (1978)
49. Flitney, F.W., Megson, I.L., Flitney, D.E., Butler, A.R.  
Iron sulfur cluster nitrosyls, a novel class of nitric oxide generator: mechanism of vasodilator action on rat tail artery  
*Br.J.Pharmac.*, **107**: 842-848 (1992)
50. Förstermann, U., Mülsch, A., Böhme, E., Busse, R.  
Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries  
*Circ.Res.* **58**: 531-538 (1986)
51. Förstermann, U., Neufang, B.  
The endothelium-dependent vasodilator effect of acetylcholin: characterization of the endothelial relaxing factor with inhibitors of arachidonic acid metabolism  
*Eur.J.Pharmacol.* **103**: 65-70 (1984)
52. Förstermann, U., Trogisch, G., Busse, R.  
Species-dependent differences in the nature of endothelium-derived vascular relaxing factor  
*Eur.J.Pharmacol.* **106**: 639-643 (1984)

53. Fukuto, J.M., Chiang, K., Hszieh, R., Wong, P., Chaudhuri, G.  
The pharmacological activity of nitroxyl: a potent vasodilator with activity similar to nitric oxide and/or endothelium-derived relaxing factor  
*J.Pharmacol.Exp.Ter.* **263 (2):** 546-551 (1992).
54. Fukuto, J.M., Wallace, G.C., Hszieh, R., Chaudhuri, G.  
The chemical oxidation of N-hydroxyguanidine compounds: release of nitric oxide, nitroxyl and possible relationship to the mechanism of biological nitric oxide generation  
*Biochem.Pharmacol.* **43 (3):** 607-613 (1992)
55. Furchgott, R.F.  
Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide  
*In: Mechanisms of Vasodilation, Vol. VI,* Raven Press, New York (1987)
56. Furchgott, R.F.  
Pharmacology of vascular smooth muscle  
*Pharmacol.Rev.* **7:** 183-265 (1984)
57. Furchgott, R.F.  
The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide  
*JAMA* **276 (14):** 1186-1188 (1996)
58. Furchgott, R.F., Cherry, P.D., Zawadzki, J.V., Jothianandan, D.  
Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries  
*J.Cardiovasc.Pharmacol.* **6 (Suppl.):** 336-343 (1984)
59. Furchgott, R.F., Khan, M.T.  
Some properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) released from endothelial cells of rabbit aorta  
*Fed.Proc.* **45 (3):** 425 (1986)

60. Furchgott, R.F., Khan, M.T., Jothianandan, D.  
Comparison of properties of nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor: some cautionary findings  
*In: Endothelium-derived Relaxing Factors*  
*Ed.: G.M. Rubanyi and P.M. Vanhoutte, pp. 8-21, Karger, Basel, Switzerland (1990)*
61. Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V.  
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine  
*Nature* **288**: 373-376 (1980)
62. Furlong, B., Henderson, A.H., Lewis, M.J., Smith, J.A.  
Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation  
*Br.J.Pharmacol.* **90**: 687-682 (1987)
63. Garg, U.C, Hassid, A.  
Nitric oxide (NO) and 8-bromocyclic GMP inhibit the mitogenic effect of both competence and progression factors in cultured rat aortic smooth muscle  
*FASEB J.* **5**: A1608 (1991) (abstr.)
64. Gerzer, R., Brash, A.R., Hardman, J.G.  
Activation of soluble guanylate cyclase by arachidonic acid and 15-lipoxygenase products  
*Biochem.Biophys.Acta* **886**: 383-389 (1986)
65. Gibson, A., Babbedge, R., Brave, S.R., Hart, S.L., Hobbs, A.J., Trucker, J.F. Wallace, P., Moore, P.K.  
An investigation of some S-nitrosothiols, and of hydroxy-arginine, on the mouse anococcygeus  
*Br.J.Pharmacol.* **107**: 715-721 (1992)
66. Gibson, Q.H., Roughton, F.J.W.  
The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin  
*J.Physiol. (Lond.)* **136**: 507-526 (1957)
67. Green, L.C., Ruiz-de-Luzuriaga, K., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R. Tannenbaum, S.R.  
Nitrate biosynthesis in man  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **78**: 7764-7768 (1981)

68. Green, L.C., Tannenbaum, S.R., Goldman, P.  
Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat  
*Science* **212**: 56-58 (1981)
69. Griffith, T.M., Edwards, D.H., Lewis, M.J., Newby, A.C., Henderson, A.H.  
The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor  
*Nature* **308**: 645-647 (1984)
70. Gryglewski, R.J., Moncada, S., Palmer, R.M.J.  
Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells  
*Br.J.Pharmacol.* **87**: 685-694 (1986)
71. Gryglewski, R.J., Palmer, R.M.J., Moncada, S.  
Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor  
*Nature* **320**: 454-456 (1986)
72. Harbrecht, B.G., Billiar, T.R.  
The role of nitric oxide in Kupffer cell-hepatocyte interactions  
*Shock* **3 (2)**: 79-87 (1995)
73. Hare, J.M., Colucci, W.S.  
Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function  
*Prog.Cardiovasc.Dis.* **38 (2)**: 155-166 (1995)
74. Harrison, D.G., Ohara, Y.  
Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: Implications for impaired vasomotion  
*Am.J.Cardiol.* **75**: 75B-81B (1995)
- 75 a. Hart, T.W.  
Some observations concerning the *S*-nitroso and *S*-phenylsulfonyl derivatives of L-cysteine and glutathione  
*Tetrahydr.Lett.* **26 (16)**: 2013-2016 (1985)

- 75 b. Hasebe, N., Shen, Y.-T., Vatner, S.F. et al.  
Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances myocardial stunning in conscious dogs  
*Circulation* **88**: 2862-2871 (1993)
76. *Ed.*: Hering, E., Martin, R., Stohrer, R.  
*In*: Physik für Ingenieure  
VDI Verlag, Düsseldorf, 5. Aufl.: 576-578 (1995)
77. Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z.  
Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite  
*Science* **265**: 473-476 (1987)
78. Hibbs, J.B., Jr., Vavrin, Z., Taintor, R.R.  
L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells  
*J.Immunol.* **138**: 550-565 (1987)
79. Hollemann, A.F., Wiberg, E.  
Lehrbuch der Anorganischen Chemie  
Walter de Gruyter Verlag, Berlin; 91-100. Aufl. (1985)
80. Hori, Y., Koga, O., Suzuki, S.  
NO<sub>x</sub>-intake process by living body. Part 2: Dissolution of nitrogen oxides into water  
*J.Jap.Soc.Air Pollut.* **16 (6)**: 404-409 (1981)
81. Hormia, M., Virtanen, I.  
Endothelium - An organized monolayer of highly specialized cells  
*Med.Biol.* **64**: 247-266 (1986)
82. Hutchinson, P.J.A., Palmer, R.M.J., Moncada, S.  
Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips  
*Eur.J.Pharmacol.* **141**: 445-451 (1987)
83. Ignarro, L.J.  
Endothelium-derived nitric oxide: Pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters  
*Pharm.Res.* **6**: 651-659 (1989)

84. Ignarro, L.J.  
Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: Regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins  
Semin.Hematol. **26 (1)**: 63-76 (1989)
85. Ignarro, L.J.  
Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide  
Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. **30**: 535-560 (1990)
86. Ignarro, L.J.  
Physiology and pathophysiology of nitric oxide  
Kidney.Int.Suppl. **55**: S2-5 (1996)
87. Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S.  
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 (Abstract)**: 644 (1987)
88. Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S., Chaudhuri, G.  
Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation  
J.Pharmacol.Exp.Ther. **244 (1)**: 181-189 (1987)
89. Ignarro, L.J., Gruetter, C.A.  
Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite. Possible involvement of *S*-nitrosothiols.  
Biochem.Biophys.Acta **631**: 221-231 (1980)
90. Ignarro, L.J., Kadowitz, P.J.  
Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: Stimulation by acetylcholin, bradykinin and arachidonic acid  
J.Pharmacol.Exp.Ther. **237 (3)**: 893-900 (1986)

91. Ignarro, L.J., Lippton, H., Edwards, J.C., Baricos, W.H., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., Gruetter, C.A.  
Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of *S*-nitrosothiols and active intermediates  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* **218**: 739-749 (1981)
92. Iizuka, K., Kikugawa, K.  
Platelet aggregation inhibitors. I. Hydroxylamine: a potent inhibitor of platelet aggregation  
*Chem.Pharm.Bull.* **20**: 614-616 (1972)
93. Incze, K., Farkas, J., Mihalyi, V., Zukal, E.  
Antibacterial effect of cysteine-nitrosothiol and possible precursors thereof  
*Appl.Microbiol.* **27 (1)**: 202-205 (1974)
94. Iversen, H.H., Gustafsson, L.E., Leone, A.M., Wiklund, N.P.  
Smooth muscle relaxing effects of NO, nitrosothiols and a nerve-induced relaxing factor released in guinea-pig colon  
*Br.J.Pharmacol.* **113 (4)**: 1088-1092 (1994)
95. Iyengar, R., Stuehr, D.J., Marletta, M.A.  
Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**: 6369-6373 (1987)
96. Jaraki, O., Stamler, J.S., Osborne, J.A., Keaney, J.F., Simon, D.I., Vita, J., Valeri, C.R., Loscalzo, J.  
Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an *S*-nitroso adduct of serum albumin  
*Clin.Res.* **40 (2) (Suppl.)**: 200A (1992)
97. Jia, L., Furchgott, R.F.  
Inhibition by sulfhydryl compounds of vascular relaxation induced by nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **267**: 371-378 (1993)

98. Jocelyn, P.C.  
Biochemistry of the SH group - The occurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulfides  
Academic Press (New York): 94-115 (1972)
99. Kanner, J., Juven, J.  
*S-Nitrosocysteine* as an antioxidant, color-developing and anticlostridial agent in comminuted turkey meat  
J.Food Sci. **45**: 1105-1108 (1980)
100. Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., Murad, F.  
Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine  
J. Cyclic.Nucleotide.Res. **3**: 23-35 (1977)
101. Keaney, J.F., Simon, D.I., Stamler, J.S., Vita, J.A., Loscalzo, J.  
*S-Nitroso-Bovine Serum Albumin: An NO Adduct with Unique Hemodynamic Properties*  
Circulation **84** (4) (Suppl. II): II-672 (1991)
102. Keaney, J.F.Jr., Vita, J.A.  
Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action  
Prog.Cardiovasc.Dis. **38** (2): 129-154 (1995)
103. Kelm, M., Feelisch, M., Spahr, R., Piper, H.-M., Noack, E., Schrader, J.  
Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells  
Biochem.Biophys.Res.Comm. **154**: 236-244 (1988)
104. Kelm, M., Schrader, J.  
Nitric oxide release from the isolated guinea-pig heart  
Eur.J.Pharmacol. **155**: 313-316 (1988)
105. Kelm, M., Schrader, J.  
Control of coronary vascular tone by nitric oxide  
Circ.Res. **66**: 1561-1575 (1990)

106. Khan, M.T., Furchgott, R.F.  
Additional evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide  
*In: Pharmacology*  
*Ed.: M.J. Rand and C. Roper, pp. 341-344, Elsevier, Amsterdam (1987)*
107. Khan, M.T., Furchgott, R.F.  
Similarities of behaviour of nitric oxide (NO) and endothelium-derived relaxing factor in a perfusion cascade bioassay system  
*Fed.Proc., 46 (Abstract): 385 (1987)*
108. Kowaluk, E.A, Fung,H.  
Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for *in vitro* vascular relaxation by *S*-Nitrosothiols  
*J.Pharmacol.Exp.Ther. 255 (3): 1256-1264 (1990)*
109. Lancaster, J.R., Hibbs, J.B.  
EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87: 1223 (1990)*
110. *Ed.: Leonhardt, H.*  
*In: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*  
*Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 7. Aufl.: 194-205 (1985)*
111. Lewis, S.J., Davison, R.L., Bates, J.N., Johnson, A.K., Ohta, H., Talman, W.T.  
Stereoselective actions of *S*-nitrosocysteine suggests the presence of specific *S*-nitrosothiol receptors  
*FASEB J. 6 (N4): A1165 (1992)*
112. Liebermann, E.H., O'Neill, S., Mendelsohn, M.E.  
*S-Nitrosocysteine* inhibition of human platelet secretion is correlated with increases in platelet cGMP levels  
*Circ.Res. 68 (6): 1722-1728 (1991)*
113. Long, G.J., Shikano, K., Berkowitz, B.A.  
Anion exchange resins discriminate between nitric oxide and EDRF  
*Eur.J.Pharmacol. 142: 317-319 (1987)*

114. Loscalzo, J.  
N-acetylcysteine potentiates inhibition of platelet aggregation by nitroglycerin  
*J.Clin.Invest.* **76**: 703-708 (1985)
115. Loscalzo, J, Welch, G.  
Nitric oxide and its role in the Cardiovascular System  
*Prog.Cardiovasc.Dis.* **38 (2)**: 87-104 (1995)
116. MacDonald, P.S., Dubbin, P.N., Dusting, G.J.  
Endothelium-dependent vasodilatation in bovine coronary arteries: calcium dependence and inhibition by proadifen  
*Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **13**: 335-340 (1986)
117. Malinow, R.  
LTD: Desperately seeking resolution  
*Science* **266**: 1195-1196 (1994)
118. Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D., Wishnok, J.S.  
Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate  
*Biochemistry* **27**: 8706-8711 (1988)
119. Martin, W., Furchgott, R.F., Villani, G.M., Jothianandan, D.  
Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxations of rat and rabbit aorta by potentiating the effect of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* **237 (2)**: 539-547 (1986)
120. Martin, W., Smith, J.A., White, D.G.  
The mechanisms by which haemoglobin inhibits the relaxation of rabbit aorta induced by nitrovasodilators, nitric oxide, or bovine retractor penis inhibitory factor  
*Br.J.Pharmacol.* **89**: 563-571 (1986)
121. Martin, W., Viallani, G.M., Jothianandan, D., Furchgott, R.F.  
Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* **232 (3)**: 708-716 (1985)

122. Mayer, B., Schmidt, K., Humbert, R., Bohme, E.  
Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells  $\text{Ca}^{2+}$ -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase  
*Biochem.Biophys.Res.Commun.* **164**: 678-685 (1989)
123. Mc Aninly, J., Williams, D.L.H., Stuart, C.A., Butler, A.R., Russel, C.  
Metal ion catalysis in nitrosothiol (RSNO) decomposition  
*J.Chem.Soc.Chem.Comm.*, **23**: 1758-1759 (1993)
124. McCall, T., Vallence, P.  
Nitric oxide takes centre stage with newly defined roles  
*Trends Pharmacol.Sci.* **13**: 1-6 (1992)
125. Metha, J.  
Endothelium, coronary vasodilation, and organic nitrates  
*Am.Heart.J.* **129**: 382-391 (1995)
126. Miki, W., Kawabe, Y., Kuriyama, K.  
Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide  
*Biochem.Biophys.Res.Commun.* **75**: 851-856 (1977)
127. Mirna, A., Hofmann, K.  
Über den Verbleib von Nitrit in Fleischwaren. I. Umsetzung von Nitrit mit Sulfhydrylverbindungen  
*Fleischwirtsch.* **10**: 1361-1366 (1969)
128. Misra, H.P.  
Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols  
*J.Biol.Chem.*, **249**: 2151-2155 (1974)
129. Moncada, S., Palmer, R.M.J.  
The L-arginine:nitric oxide pathway in the vessel wall  
*In Nitric oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System.*  
*Ed.: S. Moncada and E.A. Higgs, pp. 19-33, Elsevier, Amsterdam (1990)*
130. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Gryglewski, R.J.  
Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **83**: 9164-9168 (1986)

131. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A.  
Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology  
Pharmacol.Rev. **43 (2)**: 109-142 (1991)
132. Moncada, S., Radomski, M.W., Palmer, R.M.J.  
Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function  
Biochem.Pharmacol. **37**: 2495-2501 (1988)
133. Mülsch, A., Böhme, E., Busse, R.  
Stimulation of soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells  
Eur.J.Pharmacol. **135**: 247-250 (1987)
134. Mülsch, A., Mordvintcev, P., Vanin, A.F., Busse, R.  
The potent vasodilating and guanylate cyclase activating dinitrosyl-iron(II) complex is stored in a protein-bound form in vascular tissue and is released by thiols  
FEBS LETT. **294 (3)**: 252-256 (1991)
135. Murad, F.  
Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate  
JAMA **276 (14)**: 1189-1192 (1996)
136. Murad, F., Mittal, C.K., Arnold, W.P., Katsuki, S., Kimura, H.  
Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radicals and inhibition by hemoglobin and myoglobin  
Adv.Cyclic Nucleotide Res. **9**: 145-158 (1978)
137. Murphy, M.E., Sies, H.  
Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA **88**: 10860-10864 (1991)
138. Murray, J.J., Fridovich, I., Makhoul, R.G., Hagen, P.O.  
Stabilization and partial characterization of endothelium-derived relaxing factor from cultured bovine aortic endothelial cells  
Biochem.Biophys.Res.Comm. **141**: 689-696 (1986)

139. Myers, P.R., Guerra, R., Harrison, D.G.  
Release of NO and EDRF from cultured bovine aortic endothelial cells  
*Am.J.Physiol.* **256**: H1030-H1037 (1989)
140. Myers, P.R., Minor, R.L., Guerra, R., Bates, J.N., Harrison, D.G.  
Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide  
*Nature* **345**: 161-163 (1990)
141. *Ed.*: Näser, K.-H.  
*In*: Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure  
VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 15. Aufl.: 373-374 (1980)
142. Nava, E., Palmer, R.E.J., Moncada, S.  
The role of nitric oxide in endotoxic shock: Effects of NG-monomethyl-L-arginine  
*J.Cardiovasc.Pharmacol.* **20**: 5132-5134 (1992)
143. Navar, L.G., Inscho, E.W., Majid, S.A., Imig, J.D., Harrison-Bernhard, L.M., Mitchell, K.D.  
Paracrine regulation of the renal microcirculation  
*Physiol.Rev.* **76 (2)**: 425-536 (1996)
144. Needleman, P.  
Biotransformation of organic nitrates  
*In*: Organic nitrates. Handbook of Experimental Pharmacology  
*Ed.*: Needleman, P., Springer, **40**: 57-95 (1975)
145. Neri, I., Di-Renzo, G.C., Caserta, G., Gallinelli, A., Facchinetti, F.  
Impact of the L-arginine / nitric oxide system in pregnancy  
*Obstet.Gynecol.Surv.* **50 (12)**: 851-858 (1995)
146. Norris, P.J., Charles, I.G., Scorer, C.A. Emson, P.C.  
Studies on the localization and expression of nitric oxide synthase using histochemical techniques  
*Histochem.J.* **27 (10)**: 745-756 (1995)
147. Oae, S., Shinhama, K.  
Organic thionitrites and related substances - A review  
*Org.Prep.Proced.Int.* **15**: 165-198 (1983)

148. Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S.  
Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine  
Nature **333**: 664-666 (1988)
149. Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S.  
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor  
Nature **327**: 524-526 (1987)
150. Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E., et al.  
Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension  
N.Eng.J.Med. **323**: 732-736 (1991)
151. Park, J.W.  
Reactions of S-nitrosoglutathione with sulfhydryl groups in protein  
Biochem.Biophys.Res.Comm. **152**: 916-920 (1988)
152. Pinto, A., Abraham, N.G., Mullane, K.M.  
Cytochrom P-450-dependent monooxygenase activity and endothelial-dependent relaxations induced  
by arachidonic acid  
J.Pharmacol.Exp.Ther. **236**: 445-451 (1986)
153. Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S.  
Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in  
platelets  
Br.J.Pharmacol. **92**: 181-187 (1987)
154. Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S.  
The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium  
Biochem.Biophys.Res.Comm. **148 (3)**: 1482-1489 (1987)
155. Radomski, M.W., Rees, D.D., Dutra, A., Moncada, S.  
S-nitrosoglutathione inhibits platelet activation *in vitro* and *in vivo*  
Br.J.Pharmacol. **107**: 745-749 (1992)

156. Rapoport, R.M., Draznin, M.B., Murad, F.  
Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation  
Nature **306**: 174-176 (1983)
157. Rees, D.D., Palmer, R.M.J, Moncada,S.  
Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA **86**: 3375-3378 (1989)
158. Reid, G.M., Tervit, H.  
Sudden infant death syndrome and superoxide / nitric oxide  
Med.Hypotheses. **45 (4)**: 395-397 (1995)
159. Rosenblum, W.I.  
Hydroxyl radical mediates the endothelium-dependent relaxation produced by bradykinin in mouse cerebral arterioles  
Circ.Res. **61**: 601-603 (1987)
160. Rubanyi, G.M., Greenberg, S.S., Wilcox, D.E.  
Endothelium-derived relaxing factor cannot be identified as free nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy  
*In*: Endothelium-derived Relaxing Factors  
*Ed.*: G.M. Rubanyi and P.M. Vanhoutte, pp. 32-38, Karger, Basel, Switzerland (1990)
161. Rubanyi, G.M., Johns, A., Harrison, D., Wilcox, D.  
S-nitroso-L-cysteine, but not nitric oxide, behaves like EDRF in EPR analysis of nitrosylhaemoglobin  
Arch.Int.Pharmacodyn.Ther. **305**: 298 (1990)
162. Rubanyi, G.M., Johns,A., Harrison, D., Wilcox, D.  
Evidence that endothelium-derived relaxing factor may be identical with an S-nitrosothiol and not with free nitric oxide  
Circulation **80** (Suppl.): Abstr. II-281
163. Rubanyi, G.M., Johns, A., Wilcox, D., Bates, F.N., Harrison, D.,  
Evidence that S-nitrosothiol, but not nitric oxide, may be identical with endothelium-derived relaxing factor  
J.Cardiovasc.Pharmacol. **17** (Suppl. 3): S41-S45 (1991)

164. Rubanyi, G.M., Romero, J.C., Vanhoutte, P.M.  
Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor  
Am.J.Physiol. **250**: H1145-H1149 (1986)
165. Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M.  
Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor  
Am.J.Physiol. **250**: H822-H827 (1986)
166. Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M.  
Nature of endothelium-derived relaxing factor: are there two relaxing mediators?  
Circ.Res. **61** (Suppl. II): II61-II67 (1987)
167. Sanders, P.W.  
L-arginine and arginine analogs in progressive renal failure  
Blood.Purif. **13** (3-4): 219-227 (1995)
168. Saville, B.  
A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols  
Analyst, **83**: 670-672 (1958)
169. Schrader, J., Decking, U.  
Regulation der Koronardurchblutung durch Adenosin  
Z.Kardiol. **85** (Suppl 6): 153-159 (1996)
170. Schwartz, S.M.  
Selection and characterisation of bovine aortic endothelial cells  
In Vitro **14** (12): 966-980 (1978)
171. Shikano, K., Berkowitz, B.A.  
Endothelium-derived relaxing factor is a selective relaxant of vascular smooth muscle  
J.Pharmacol.Exp.Ther. **243**: 55-60 (1987)
172. Simon, D.I., Stamler, J.S., Jaraki, O., Keaney, J.F., Osborne, J.A., Francis, S.A., Ezratty, A.M., Mullins, M.E., Singel, D.J., Loscalzo, J.  
Protein Thiols stabilize nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor to form S-nitrosothiols with potent antiplatelet properties  
Clin.Res. **40** (2) (Suppl.): 171A (1992)

173. Singer, H.A., Peach, M.J.  
Endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. I. Relaxation stimulated by arachidonic acid  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* **226**: 790-795 (1983)
174. Snyder, S.H.  
Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters  
*Science* **257**: 494-496 (1992)
175. Snyder, S.H., Brecht, D.S.  
Stickstoffmonoxid - Regulator biologischer Signale  
*In: Spektrum der Wissenschaft* **7**: 72-80 (1992)
176. Sooranna, S.R., Morris, N.H., Steer, P.J.  
Placental nitric oxide metabolism  
*Reprod.Fertil.Dev.* **7 (6)**: 1525-1531 (1995)
177. Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Jaraki, O., Mullins, M.E., Michel, T., Singel, D.J., Loscalzo, J.  
Endothelium-derived relaxing factor Reacts with Protein Sulfhydryl Groups to Form Stable, Biologically Active S-nitrosothiols  
*Circulation* **84 (4)** (Suppl. II): II-672 (1991)
178. Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J., Loscalzo, J.  
S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**: 444-448 (1992)
179. Stuehr, D.J., Kwon, N.S., Nathan, C.F., Griffith, O.W.  
N<sup>G</sup>-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine  
*J.Biol.Chem.* **266**: 6259-6263 (1991)
180. Stuehr, D.J., Marletta, M.A.  
Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**: 7738-7742 (1985)

181. Sung, C.-P., Arleth, A.J., Shikano, K., Zabko-Potapovich, B., Berkowitz, B.  
Effect of trypsinization in cell culture on bradykinin receptors in vascular endothelial cells  
*Biochem.Pharmacol.* **38 (4)**: 696-699 (1989)
182. Takahashi, M., Yui, Y., Yasumoto, H., et al.  
Lipoproteins are inhibitors of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta  
*Am.J.Physiol.* **258**: H1-H8 (1990)
183. Thomas,G., Hecker, M., Ramwell, P.W.  
Vascular activity of polycations and basic amino acids: L-arginine does not specifically elicit  
endothelium-dependent relaxation  
*Biophys.Res.Comm.* **158 (1)**: 177-180 (1989)
184. Thomas, G., Ramwell, P.W.  
Vasodilatory properties of mono-L-arginine-containing compounds  
*Biochem.Biophys.Res.Comm.* **154**: 332-338 (1988)
185. Thomas, G., Ramwell, P.W.  
Vascular relaxation mediated by Hydroxylamines and Oximes: Their conversion to nitrites and  
mechanism of endothelium dependent vascular relaxation  
*Biochem.Biophys.Res.Comm.* **164 (2)**: 889-893 (1989)
186. Toothill, C.  
The chemistry of the in vivo reaction between hemoglobin and various oxides of nitrogen  
*Br.J.Anaesth.* **39**: 405-412 (1967)
187. Vallance, P., Collier, J., Moncada, S.  
Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arterial tone in man  
*Lancet* **2**: 997-1000 (1989)
188. Van Assendelft, O.W.  
Spectrophotometry of hemoglobin derivatives  
Van Gorcum & Co, Kap. 3: 47-73 (1970)
- 189 a. Vane, J.R.  
The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood  
*Br.J.Pharmacol.Chemother.* **23**: 360-373 (1964)

- 189 b. Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H.  
Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm  
*Circulation* **80 (1)**: 1-9 (1989)
190. Vanin, A.F.  
*Hypothesis*: Endothelium-derived relaxing factor is a nitrosyl iron complex with thiol ligands  
*FEBS LETT.* **289**: 1-3 (1991)
191. Vanin, A.F. Kubrina, L.N., Malenkova, I.V., Mordvintsev  
L-Arginine is an endogenous source of nitric oxide in animal tissue in vivo  
*Biokhimiya* **56 (5)**: 935-939 (1991)
192. Vedernikov, Y.P., Mordvincev, P.E., Malenkova, I.V., Vanin, A.F.  
Endothelium-derived relaxing factor is not identical to nitric oxide  
*In*: Nitric oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System.  
*Ed.*: S. Moncada and E.A. Higgs, pp. 373-377, Elsevier, Amsterdam (1990)
193. Vedernikov, Y.P., Mordvintcev, P.I., Malenkova, I.V., Vanin, A.F.  
Effect of diethyldithiocarbamate on the activity of nitric oxide-releasing vasodilators  
*Eur.J.Pharmacol.* **212**: 125-128 (1992)
194. Vedernikov, Y.P., Mordvintcev, P.I., Malenkova, I.V., Vanin, A.F.  
Similarity between the vasorelaxing activity of dinitrosyl iron cysteine complexes and endothelium-derived relaxing factor  
*Eur.J.Pharmacol.* **211 (3)**: 313-317 (1992)
195. Wagner, D.A., Young, V.R., Tannenbaum, S.R.  
Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of  $^{15}\text{NH}_3$  into nitrate is enhanced by endotoxin treatment  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **80**: 4518-4521 (1983)
196. Waldman, S.A., Murad, F.  
Cyclic GMP synthesis and function  
*Pharmacol.Rev.* **39**: 163-196 (1987)

197. Weyrich, A.S., Ma, X.-L., Lefer, A.M.  
The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat  
*Circulation* **86**: 279-288 (1992)
198. Whittle, B.J.R.  
Nitric oxide in physiology and pathology  
*Histochem.J.* **27 (10)**: 727-737 (1995)
199. Zamora Pino, R., Feelisch, M.  
The pharmacological activity of NO<sup>+</sup> as a possible precursor of EDRF  
*Endothelium*, **1**: S69 (abstr.) (1993)
200. Zembowicz, A., Swierkosz, T.A., Southan, G.J., Hecker, M., Vane, J.R.  
Potentiation of the vasorelaxant activity of nitric oxide by hydroxyguanidine: implications for the nature of endothelium-derived relaxing factor  
*Br.J.Pharmacol* **107**: 1001-1007 (1992)

## DANKSAGUNGEN:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. A. Deussen, Institut für Physiologie, Technische Universität, Dresden, danke ich für die Überlassung des Arbeitsthemas, die hervorragende Betreuung während der Doktorandenzeit und die Herstellung des Kontaktes zu der Schwarz Pharma AG, Monheim. Er ließ mir größtmögliche Freiheit in der Planung und Gestaltung der Arbeit und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn Prof. M. Feelisch, Dept. of Molecular and Cellular Physiology, LSU Health Sciences Center, Shreveport, Louisiana, USA, danke ich für die Ermöglichung der Durchführung der hochinteressanten aber auch teuren Experimente. Er ließ mir alle Freiheiten die Experimente zu gestalten und war jederzeit für Hilfestellungen und zur Diskussion von Resultaten bereit. Er gab mir vom ersten Tag der Untersuchungen an das Gefühl in einem Team zu arbeiten und übertrug die Begeisterung zur wissenschaftlichen Tätigkeit auf mich.

Der Firma Schwarz Pharma AG, Monheim, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Bereitstellung und Analyse zahlreicher Substanzen und die Möglichkeit zu jeder Tages- und Nachtzeit Experimente durchführen zu können.

Den Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie der Schwarz Pharma AG danke ich für die herzliche Zusammenarbeit, die kreative Atmosphäre und die Möglichkeit, jede Idee zur Änderung oder Ergänzung der Superfusions-Kaskade sofort umsetzen zu können.

Meiner Mutter Christine te Poel danke ich für all das, auf was sie verzichtet hat, um ihren Kindern die größtmögliche Entfaltung zu ermöglichen.

Meiner Frau Susanne danke ich für die unendliche Geduld und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit und ich verspreche nur noch in schwerwiegenden Ausnahmefällen den Satz: "Ich muß noch an den Rechner" zu verwenden.

## LEBENS LAUF

Name: te Poel  
Vorname: Marc Christian  
  
Geburtsdatum: 21.07.1967  
Geburtsort: Krefeld  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet mit Frau Susanne te Poel; geb. Onischke  
Kinder: Marius \* 27.10.1995, Elena \* 07.03.1999  
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung:  
1973 - 1977 Städt. Grundschule, Meerbusch-Osterath  
1977 - 1986 Städt. Matere´-Gymnasium, Meerbusch-Büderich  
12.06.1986 Abitur

Hochschulausbildung:  
1986 - 1995 Vorklinisches und klinisches Studium der Human-  
medizin an der Heinrich-Heine-Universität,  
Düsseldorf  
09.11.1995 3. Staatsexamen

Wissenschaftliche Tätigkeit:  
1991 - 1994 Experimentelle Tätigkeit in der Abteilung  
Pharmakologie der Schwarz Pharma AG, Monheim.

Ärztliche Tätigkeit:  
1996 - 1997 Arzt im Praktikum: Krankenhaus Maria-Hilf, Krefeld,  
Chirurgische Klinik, CA PD Dr. med. Krieg

01.07.1997 Approbation als Arzt

seit 1998 Assistenzarzt zur Weiterbildung in der Chirurgie,  
Krankenhaus Maria-Hilf, Krefeld  
Chirurgische Klinik, CA PD Dr. med. Krieg

seit 1999 Notärztliche Tätigkeit, Stadt Krefeld

## Experimentelle Untersuchungen zur Identität des Endothelium-Derived Relaxing Factor

Marc te Poel

Seit der Erstbeschreibung des "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF) durch Furchgott und Zawadzki (1980) wurden zahlreiche Untersuchungen zur Identifizierung dieses vom Endothel freigesetzten instabilen Vasodilators durchgeführt. Verschiedene Theorien werden nach wie vor kontrovers diskutiert. Seit der Entdeckung des L-Arginin / NO-Stoffwechselweges und der Beobachtung, daß Stickstoffmonoxid (NO) dem EDRF sehr ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften aufweist, stehen neben NO nun insbesondere solche Substanzen im Blickpunkt, die in der Lage sind unter physiologischen Bedingungen NO freizusetzen. Die Arbeit vergleicht den EDRF (Rinderendothelzellkulturen) und die wichtigsten Kandidaten für dessen Identität (NO, *S*-Nitrosothiole, *S*-nitrosyliertes Humanalbumin, Dinitrosyl-Eisen(II)-L-Cystein Komplex (DNIC) und Hydroxylamin) mit Hilfe einer, für die Untersuchung extrem instabiler Vasodilatoren besonders geeigneten Methode, der Superfusions-Bioassay-Kaskade mit deendothelialisierten Kaninchenaortenstreifen als Detektorgefäßen.

In der ersten Versuchsreihe wurden die pharmakokinetischen Charakteristika (vasodilatatorische Potenz, Halbwertszeit und Relaxationsdauer) des EDRF und der getesteten Kandidaten bestimmt und miteinander verglichen. Nur NO, *S*-Nitrosocystein und *S*-Nitrosocysteamin wiesen hierbei mit dem EDRF vergleichbare pharmakokinetische Eigenschaften auf. Die übrigen untersuchten Vasodilatoren unterschieden sich insbesondere hinsichtlich der beobachteten Halbwertszeiten (stabil) und z.T. auch durch die unterschiedliche Relaxationsdauer (insbesondere DNIC).

In der zweiten Versuchsreihe wurde eine weitere Selektion der verbliebenen Kandidaten durchgeführt. Hierzu wurde deren vasodilatatorische Aktivität durch Koinfusion reaktiver Lösungen beeinflusst. Hierfür besonders geeignet waren oxygenierte Hämoglobin- ( $\text{HbO}_2$ ) und Cystein-Lösungen. EDRF und NO erfuhren unter  $\text{HbO}_2$ -Koinfusion eine signifikant stärkere Hemmung der vasodilatatorischen Aktivität als *S*-Nitrosocystein u. -cysteamin. Unter Cystein-Koinfusion (1-10  $\mu\text{M}$ ) betrug die Hemmung der relaxierenden Aktivität des EDRF und NO über 90 % während *S*-Nitrosocystein und -cysteamin eine vollständige Stabilisierung, d.h. eine Zunahme der Aktivität insbesondere auf dem zweiten und dritten Gefäß zeigten. Weiterführende Untersuchungen dienen der Klärung der hierfür verantwortlichen chemischen Reaktionen.

Die vorgelegten Resultate untermauern daher die Theorie, daß der EDRF mit NO identisch ist. Durch den direkten Vergleich der pharmakokinetischen Eigenschaften und die unterschiedliche Reaktionsweise auf die koinfundierten Substratlösungen, konnten die instabilen *S*-Nitrosothiole des Cysteins und Cysteamins, die stabilen *S*-Nitrosothiole, das *S*-nitrosylierte Albumin, DNIC und Hydroxylamin als mögliche EDRF-Kandidaten nunmehr klar ausgeschlossen werden.

