

## 3 Pharmakologisch-biochemischer Teil

### 3.1 Bestimmung der Thrombozytenaggregation *in vitro* (Born-Test)

#### 3.1.1 Allgemeines

Das folgende Testmodell stellt einen *in vitro* Test dar, der die Fähigkeit der Testsubstanzen untersuchen soll, die Thrombozytenaggregation zu hemmen. Es gibt eine Vielzahl von endogenen und exogenen Stoffen, die die Thrombozytenaggregation auslösen können (z.B. ADP, Thrombin, Serotonin, Plättchen Aktivierender Faktor (PAF) und Kollagen).

Die Substanzen dieser Arbeit wurden alle unter Zusatz von Kollagen als Thrombozytenaggregationsauslöser vermessen. Hiermit sollte das körpereigene System der Hämostase simuliert werden, in dem bei einer Schädigung des Gefäßendothels Thrombozyten an die Kollagenfasern adhären und über thrombozytäre Glykoproteine mit den subendothelialen Strukturen interagieren. An der Thrombozytenoberfläche werden verschiedene Botenstoffe (z.B. ADP und Serotonin) freigesetzt und der GP IIb/IIIa-Komplex aktiviert. Dieser kann mit Fibrinogen als Brückenprotein zur Thrombozytenaggregation führen. Über die weitere Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade kommt es schließlich zur Bildung von Fibrinpolymeren, die zusammen mit Erythrozyten die Blutgerinsel ausbilden [96]. Diese Blutgerinselbildung wird durch eine proportionale Transmissionssteigerung angezeigt und so bei verschiedenen Konzentrationen gemessen. Die  $IC_{50}$  wurde graphisch ermittelt. Methode siehe Seite 125, Kapitel 6.1

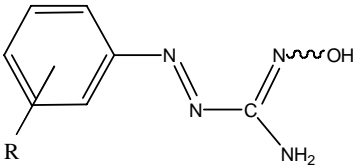
### 3.1.2 Ergebnisse des Born-Tests

#### 3.1.2.1 Arylazoamidoxime

Die untersuchten Arylazoamidoxime zeigen gute bis schwache antiaggregatorische Effekte (Tab. 9). Die Verbindungen **4**, **5** und **10** hemmen die Thrombozytenaggregation in dieser Stoffklasse am stärksten. Eine Struktur-Wirkungs-Beziehung läßt sich schwer ableiten, da die Substitution der besten drei Verbindungen zum Teil in para-(**4** und **5**) und zum Teil in ortho-Stellung (**10**) zu finden ist. Auch kann keine bessere Wirkung durch die Art des Substituenten abgeleitet werden, da die Verbindung **4** einen Chlorsubstituenten und die Verbindungen **5** und **10** einen Fluorsubstituenten tragen.

Die uneinheitlichen Ergebnisse unterstreicht auch die Tatsache, daß die Verbindungen **4** und **12**, deren Chlor- und Trifluormethyl-Substituenten isoster zueinander sind, sich in ihren  $IC_{50}$ -Werten um fast eine Zehnerpotenz unterscheiden.

Tab. 9: Arylazoamidoxime im Born-Test

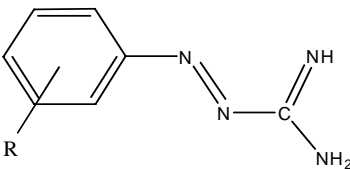
		<b>Arylazoamidoxime: Hemmung der Thrombozytenaggregation im Born-Test</b>
Stoff Nr.	R	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]
<b>4<sup>a</sup></b>	4-Chlor-	37
<b>5<sup>a</sup></b>	4-Fluor-	25
<b>7</b>	3-Chlor-	160
<b>8</b>	2-Chlor-	210
<b>9</b>	3-Fluor-	170
<b>10</b>	2-Fluor-	30
<b>12</b>	4-Trifluormethyl-	230
<b>21</b>	4-Phenyl-	210
<b>22</b>	2,6-Dichlor-	150

a. synthetisiert und getestet von *Bade* [68]

### 3.1.2.2 Arylazoamidine

Die antiaggregatorischen Effekte der Arylazoamidine sind als gut einzustufen (Tab. 10). Mit einer  $IC_{50}$  von 3  $\mu\text{mol/L}$  erreicht Verbindung **17** die stärkste Hemmung der Thrombozytenaggregation aller Verbindungen dieser Arbeit. Die Klasse der Arylazoamidine läßt eine Abhängigkeit der aggregationshemmenden Wirkung von einem kleinen Substituenten in para-Stellung vermuten, jedoch ist die Anzahl der Verbindungen zu gering, um diese Aussage eindeutig zu belegen.

Tab. 10: Arylazoamidine im Born-Test

		<b>Arylazoamidine: Hemmung der Thrombozytenaggregation im Born-Test</b>
Stoff Nr.	R	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]
<b>14</b>	4-Chlor-	14
<b>15</b>	3-Chlor-	30
<b>17</b>	4-Fluor-	3

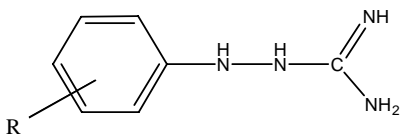
### 3.1.2.3 1-Amidino-2-arylhydrazine

Die vermessenen 1-Amidino-2-arylhydrazine zeigen in Tabelle 11  $IC_{50}$ -Werte von über 300  $\mu\text{mol/L}$  und werden damit laut Tabelle 34 auf Seite 126 als wirkungslos eingestuft. Die Azogruppe scheint elementar für die thrombozytenaggregatorische Wirkung dieser Stoffklasse zu sein, da schon eine Reduktion zur Hydrazinogruppe den Verlust der aggregationshemmenden Wirkung zur Folge hat.

### 3.1.2.4 N-Hydroxyguanidine

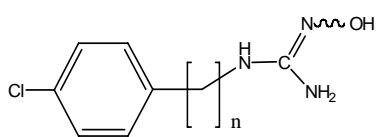
4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin (**1**) und 4-Chlorbenzyl-*N*-hydroxyguanidin (**3**) zeigen mäßige antiaggregatorische Effekte (Tab. 12). Mit  $IC_{50}$ -Werten von 21 und 26  $\mu\text{mol/L}$  zeigen sie zudem recht ähnliche Werte, die den Eindruck erwecken, der Abstand zwischen Aromat und Hydroxy-

Tab. 11: 1-Amidino-2-arylhydrazine im Born-Test

		<b><u>1-Amidino-2-arylhydrazine:</u></b> <b>Hemmung der</b> <b>Thrombozytenaggregation im</b> <b>Born-Test</b>
Stoff Nr.	R	IC <sub>50</sub> [μmol/L]
<b>14a</b>	4-Chlor-	>300
<b>15a</b>	3-Chlor	>300
<b>17a</b>	4-Fluor-	>300

guanidin-Struktur wäre nicht wirkungsrelevant. Allerdings könnte diese Vermutung nur durch die Testung von Verbindungen mit weiterer Kettenverlängerung (n= 2, 3, 4) bestätigt werden.

Tab. 12: *N*-Hydroxyguanidine im Born-Test

		<b><u>N-Hydroxyguanidine:</u></b> <b>Hemmung der</b> <b>Thrombozytenaggregation im</b> <b>Born-Test</b>
Stoff Nr.	n	IC <sub>50</sub> [μmol/L]
<b>1</b>	0	21
<b>3</b>	1	26

### 3.1.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem *in vitro*-Born-Test

- Die *in vitro* Testung auf Hemmung der Thrombozytenaggregation zeigt laut Abbildung 34 auf Seite 126 gute bis mäßige Hemmeigenschaften der Arylazoamide, *N*-Hydroxyguanidine und einiger Arylazoamidoxime.
- Herauszuheben ist das Arylazoamidin **17** mit einer  $IC_{50}$  von 3  $\mu\text{mol/L}$ . Es zeigt die niedrigste halbmaximale Hemmkonzentration aller getesteten Verbindungen dieser Arbeit.
- Auch die beiden anderen Arylazoamide **14** und **15**, die *N*-Hydroxyguanidine **1** und **3** und einige Arylazoamidoxime (**4**, **5** und **10**) erreichen mit 14  $\mu\text{mol/L}$  bis 37  $\mu\text{mol/L}$  laut Tabelle 34 auf Seite 126 gute Hemmeigenschaften.
- Die am besten wirkenden Substanzen **14** und **17** sind nicht hydroxylierte Verbindungen. Interessanterweise zeigen die ebenfalls nicht hydroxylierten 1-Amidino-2-arylhydrazine keine thrombozytenaggregatorische Wirkung (Tab. 11), so daß die Azogruppe für den antiaggregatorischen Effekt essentiell erscheint.
- Das am besten wirkende Arylazoamidin **17** und das beste Arylazomethanamidoxim **4** besitzen jeweils eine 4-Fluor-Substitution. Diese scheint für die Wirkung im Born-Test von Vorteil zu sein.



## **3.2 Bestimmung der Thrombusbildung *in vivo* (Laser-Thrombose-Modell)**

### **3.2.1 Allgemeines**

Da bei *in vitro*-Testmodellen die physiologischen Verhältnisse des lebenden Organismus nur ungenügend berücksichtigt werden können, benötigt man zur umfassenderen Untersuchung einer antithrombotischen Wirkung *in vivo*-Testmodelle. Physiologische Faktoren wie Resorption, Bioverfügbarkeit, Metabolismus und Toxizität haben einen sehr großen Einfluß auf die Eignung einer Substanz als Arzneistoff. Im speziellen Fall der gerinnungsphysiologischen Untersuchungen sind zudem viele weitere, z.T. physikalische Mechanismen von entscheidender Bedeutung. Hierzu zählen die Fließeigenschaften des Blutes, die gerinnungsregulierende Funktion des intakten Gefäßendothels, Scherkräfte innerhalb der Gefäße, Gefäßdurchmesser, sowie der Blutdruck. Es wird daher im Arbeitskreis Prof. Rehse ein Laser-Thrombose-Modell eingesetzt Abbildung 51 auf Seite 127.

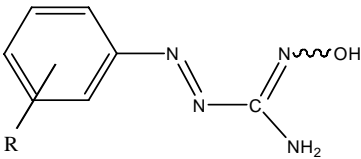
Die Mesenterialgefäße männlicher Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150-180g werden freigelegt und mit einem Argon-Laser beschossen. Die Gefäßläsionen führen zur Freilegung subendothelialer Kollagenfasern und zur Sekretion aggregationsauslösender Substanzen. Die dadurch induzierte Thrombozytenaktivierung hat eine Adhäsion von Plättchen am verletzten Gewebe und die Freisetzung weiterer Agonisten zur Folge. Es bildet sich ein hauptsächlich aus Thrombozyten aufgebauter „weißer Thrombus“, dessen Bildungsprozess sich durch ein Mikroskop verfolgen läßt. Methode siehe Seite 127, Kapitel 6.2.

## 3.2.2 Ergebnisse des *in vivo*-Laser-Thrombose-Tests

### 3.2.2.1 Arylazoamidoxime

Die Hemmung der Thrombusbildung *in vivo* durch die Gruppe der Arylazoamidoxime wird angeführt von Verbindung **4**, die eine 13%ige Hemmung in den Venolen und eine 22%ige Hemmung in den Arteriolen hervorruft (Born-Test:  $IC_{50} = 37\mu M$ ). Verbindung **10** bestätigt mit einer Thrombushemmung von 7% in den Venolen und 10% in den Arteriolen seinen guten *in vitro* Wert im Born-Test von  $IC_{50} = 30\mu M$  (Tabelle 9 auf Seite 44). Verbindung **9** und **22** liefern sowohl in den Venolen als auch in den Arteriolen signifikante Thrombusbildungshemmungen. Alle weiteren Arylazoamidoxime zeigen entweder nur in den Arteriolen (**7**, **12**, **21**) oder gar keine (**5** und **7**) signifikante Thrombushemmung. Verbindung **5** hatte im Born-Test gut abgeschnitten ( $IC_{50} = 25\mu M$ ), liefert jedoch im Laser-Thrombose-Modell keine signifikante Thrombusbildungshemmung.

Tab. 13: Arylazoamidoxime im Laser-Thrombose-Modell

		<b>Arylazoamidoxime: Hemmung der Thrombusbildung</b>			
		<b>Venolen</b>		<b>Arteriolen</b>	
<b>Stoff Nr.</b>	<b>R</b>	<b>% ± S<sub>x</sub></b>	<b>α</b>	<b>% ± S<sub>x</sub></b>	<b>α</b>
<b>4<sup>a</sup></b>	4-Chlor-	13 ± 3	0,01	22 ± 2	0,02
<b>5<sup>a</sup></b>	4-Fluor-	0 ± 1	n.s.	0 ± 2	n.s.
<b>7</b>	3-Chlor-	3 ± 1	n.s.	3 ± 2	n.s.
<b>8</b>	2-Chlor-	2 ± 1	n.s.	7 ± 1	0,01
<b>9</b>	3-Fuor-	4 ± 1	0,02	9 ± 2	0,02
<b>10</b>	2-Fluor-	7 ± 1	0,002	10 ± 2	0,002
<b>12</b>	4-Trifluormethyl-	3 ± 1	n.s.	6 ± 1	0,05
<b>21</b>	4-Phenyl-	2 ± 1	n.s.	9 ± 2	0,01
<b>22</b>	2,6-Dichlor-	4 ± 1	0,05	7 ± 2	0,01



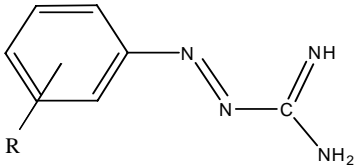
a. synthetisiert und getestet von *Bade* [68]

### 3.2.2.2 Arylazoamidine

Die guten Ergebnisse der Arylazoamidine im *in vitro*-Test ließen sich nicht vollständig auf den *in vivo*-Test übertragen. Zwar erreicht Substanz **14** mit einer venulären Hemmung von 7% und einer arteriellen Hemmung von 8% klar signifikante Thrombusbildungshemmungen, bleibt aber hinter den Erwartungen zurück. Da die  $IC_{50}$  von Verbindung **14** im Born-Test mit 14  $\mu\text{mol/L}$  klar unter der  $IC_{50}$  der hydroxylierten Verbindung **4** lag (37  $\mu\text{mol/L}$ ), wurde auch in diesem Test ein besseres Abschneiden erwartet. Doch die guten Ergebnisse des Arylazoamidoxims **4** (13% venös, 22% arteriell) konnten nicht erreicht werden.

Verbindung **17** hatte im Born-Test die stärkste Thrombozytenaggregationshemmung dieser Arbeit erreicht (3  $\mu\text{mol/L}$ ), kann aber im Laser-Thrombose-Modell keine signifikante Hemmung zeigen. Auch Verbindung **15** liegt mit nur einer arteriellen Hemmung von 4% weit hinter seinem Ergebnis im Born-Test (30  $\mu\text{mol/L}$ ) zurück. Bei diesen Ergebnissen zeigt sich eindrucksvoll, daß eine *in vivo-in vitro*-Korrelation in diesem Fall schwierig ist.

Tab. 14: Arylazoamidine im Laser-Thrombose-Modell

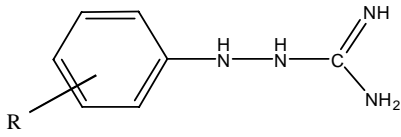
		<b>Arylazoamidine: Hemmung der Thrombusbildung</b>			
		<b>Venolen</b>		<b>Arteriolen</b>	
<b>Stoff Nr.</b>	<b>R</b>	<b>% <math>\pm S_x</math></b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>% <math>\pm S_x</math></b>	<b><math>\alpha</math></b>
<b>14</b>	4-Chlor-	7 $\pm$ 1	0,01	8 $\pm$ 1	0,01
<b>15</b>	3-Chlor-	0 $\pm$ 2	n.s.	4 $\pm$ 1	0,1
<b>17</b>	4-Fluor-	0 $\pm$ 1	n.s.	4 $\pm$ 2	n.s.

### 3.2.2.3 1-Amidino-2-arylhydrazine

Die drei 1-Amidino-2-arylhydrazine zeigen eine Hemmung der Thrombusbildung im beschriebenen Laser-Thrombose-Modell. Wie schon bei den Testungen der Arylazoamidoxime und der Arylazoamidine hemmt die 4-Chlor-Verbindung, im Fall der 1-Amidino-2-arylhydrazine **14a**, die Thrombusbildung am stärksten. Es werden signifikante Hemmungen von 4% in den Venolen und 7% in den Arteriolen gemessen. Die Verbindungen **15a** und **17a** hemmen nur die Thrombusbildung in den Arteriolen mit 7% bzw. 6% signifikant.

Auffallend ist, daß keine Verbindung dieser Substanzklasse im *in vitro*-Born-Test eine Wirkung gezeigt hatte. Es wäre möglich, daß die 1-Amidino-2-arylhydrazine nur durch die Biotransformation im lebenden Organismus in ihre Wirkform überführt werden können. Vorstellbar wäre eine Oxidation zu den Arylazoamidinen.

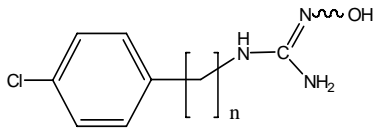
Tab. 15: 1-Amidino-2-arylhydrazine im Laser-Thrombose-Modell

		<b>1-Amidino-2-arylhydrazine: Hemmung der Thrombusbildung</b>			
		<b>Venolen</b>		<b>Arteriolen</b>	
<b>Stoff Nr.</b>	<b>R</b>	<b>% ± S<sub>x</sub></b>	<b>α</b>	<b>% ± S<sub>x</sub></b>	<b>α</b>
<b>14a</b>	4-Chlor-	4 ± 1	0,05	7 ± 1	0,01
<b>15a</b>	3-Chlor-	3 ± 1	n.s.	7 ± 2	0,05
<b>17a</b>	4-Fluor-	2 ± 1	n.s.	6 ± 2	0,05

### 3.2.2.4 N-Hydroxyguanidine

Die N-Hydroxyguanidine zeigen eine mäßige Fähigkeit der Thrombusbildungshemmung. Verbindung **3** zeigt sich mit 3% venös und 8% arteriell gegenüber Verbindung **1** überlegen, die nur mit 4% in den Arteriolen die Thrombusbildung hemmen kann. Beide Verbindungen hatten im Born-Test besser als Verbindung **4** abgeschnitten, können aber dessen gute Hemmwerte im Laser-Thrombose-Modell (vgl. Tabelle 9 auf Seite 44) nicht erreichen.

Tab. 16: N-Hydroxyguanidine im Laser-Thrombose-Modell

		<b><u>N-Hydroxyguanidine:</u> Hemmung der Thrombusbildung</b>			
		<b>Venolen</b>		<b>Arteriolen</b>	
<b>Stoff Nr.</b>	<b>n</b>	<b>% ± S<sub>x</sub></b>	<b>α</b>	<b>% ± S<sub>x</sub></b>	<b>α</b>
<b>1</b>	0	0 ± 1	n.s.	4 ± 1	0,1
<b>3</b>	1	3 ± 1	0,1	8 ± 3	0,05

### 3.2.2.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der *in vivo*-Thrombushemmung

Die im Laser-Thrombose-Modell untersuchten Verbindungen zeigen nur mäßige antithrombotische Effekte. Selbst die am stärksten hemmende Verbindung **4**<sup>1</sup> kommt mit einer venösen Hemmung von 13% und einer arteriellen Hemmung von 22% nicht an die Hemmwerte der Referenzsubstanz **ASS** heran. Die Referenzsubstanz erreicht unter den gleichen Bedingungen eine 20%ige Hemmung in den Venolen und eine 48%ige Hemmung in den Arteriolen [75]. Die zweite Referenzsubstanz **Molsidomin** zeigt bei einer Konzentration von nur 10 mg/kg eine 21%ige Hemmung. Verbindung **10** aus der Reihe der Arylazoamidoxime zeigt mit 7% venös und 10% arteriell die nächstbesten Ergebnisse (Tabelle 13 auf Seite 50). Gefolgt wird sie von Verbindung **14** aus der Reihe der Arylazoamidine, die eine Hemmung in den Venolen von 7% und eine Hemmung in den Arteriolen von 10% zeigt (Tabelle 14 auf Seite 51). Von den getesteten 1-Amidino-2-arylhydrazinen zeigt Verbindung **14a** mit 4% venös und 7% arteriell die stärkste Hemmung der Thrombusbildung. Verbindung **3** aus der Gruppe der *N*-Hydroxyguanidine hemmt die Thrombusbildung mit 3% in den Venolen und mit 8% in den Arteriolen besser als Verbindung **1** (Tabelle 16 auf Seite 53) und zeigt damit ein umgekehrtes Bild wie im *in vitro*-Born-Test (Tabelle 12 auf Seite 46).

Aus den Ergebnissen lassen sich nur bedingt Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten. Aufgrund der jeweils stärksten Hemmwirkung in allen Substanzklassen ist eine 4-Chlor-Substitution als positiv zu beurteilen. Die Arylazoamidoxime liefern hier die besten Ergebnisse. Allerdings sind die Stoffe **1** und **3** aus der Klasse der *N*-Hydroxyguanidine den nicht hydroxylierten Verbindungen (Arylazoamidine und der Arylhydrazinoamine) nicht überlegen, so daß eine *N*-Hydroxylierung nicht als Wirkungsvoraussetzung gesehen werden kann.

Auffallend ist die teilweise deutliche Differenz der Hemmung der Thrombusbildung in Venolen und Arteriolen. Die prozentuale Thrombusbildungshemmung ist bei allen hier getesteten Verbindungen in den Arteriolen ausgeprägter als in den Venolen. Ein wichtiger Grund dafür liegt in der höheren Fließgeschwindigkeit in den Arteriolen. Aufgrund dieser können in den Arteriolen kleinere induzierte Thromben schlechter zu größeren „heranwachsen“.

---

1. synthetisiert und getestet von Bade [68]

Durch die vorliegenden Ergebnisse wird belegt, daß der *in vitro*-Born-Test und das *in vivo*-Laser-Thrombose-Modell oft keine übereinstimmenden Ergebnisse liefern. Einige Verbindungen zeigen im Born-Test gute halbmaximale Hemmkonzentrationen, doch im Laser-Thrombose-Modell zeigen sie keine oder nur eine geringe Thrombusbildungshemmung (z.B. Verbindung **17**). Andere Stoffe hemmen die Thrombusbildung *in vivo* signifikant, können aber im *in vitro*-Born-Test keine Wirksamkeit aufweisen. (z.B. Verbindung **14a**). Diese unterschiedlichen Ergebnisse werden höchstwahrscheinlich durch die unterschiedlichen physiologischen Parameter während des Versuchs ausgelöst. Durch die Applikation von Suspensionen im Tiermodell können nur Vermutungen über die Resorption angestellt werden. Auch der first pass-Effekt und die gesamte Biotransformation der verabreichten Stoffe ist nicht bekannt. Weiterhin sorgen Verteilung und eventuelle Plasma-Eiweißbindung für weitere unbekannte Größen.

Der *in vitro*-Born-Test liefert Ergebnisse, die eher Aufschluß auf das Verhalten der Substanz bei definierten Versuchsbedingungen liefern und dabei viele Vorgänge im Gesamtorganismus ausblenden.

Das *in vivo*-Laser-Thrombose-Modell zeigt die Vorgänge vom Moment der Applikation bis zur Eliminierung der Versuchssubstanz aus dem Körper des Versuchstiers Ratte. Dabei können eventuell wirksame Substanzen an den oben beschriebenen physiologischen Parametern wie Resorption und Metabolismus scheitern. Dafür kann eine eventuelle Biotransformation zur Wirkform nur durch *in vivo*-Tests entdeckt werden. Es werden somit auch Wirkungen erfaßt, die aufgrund anderer Wirkmechanismen entstehen.

Es bleibt festzuhalten, daß beide Tests ihre Berechtigung haben und im Zusammenspiel ein differenzierteres Bild der Versuchssubstanzen liefern können.

## 3.3 Beeinflussung des Blutdrucks

### 3.3.1 Allgemeines

Die synthetisierten Verbindungen zeigen zum Teil thrombozytenaggregationshemmende Effekte, die eventuell durch eine NO-Freisetzung ausgelöst werden. Da auch der Blutdruck durch NO mitreguliert wird (Abbildung 2 auf Seite 4) und um ein klareres Bild des Wirkungsspektrums und der Wirkmechanismen zu erhalten, wurden alle Verbindungen auf ihren Eigenschaft, den Blutdruck zu beeinflussen, in einem Blutdruckmodell getestet.

Hierzu wurden als Versuchstiere spontan hypertensiven Ratten verwendet. Den Ratten wurden die Testsubstanzen als Suspension oral verabreicht. Somit konnten gleichzeitig Aussagen über die Resorption der Testverbindungen gemacht werden. Die Blutdruckveränderung wurde nach festgelegten Zeiten gemessen. Methode siehe Seite 130, Kapitel 6.3.

### 3.3.2 Ergebnisse des Blutdruckmodells

Der Blutdruck der hypertensiven Testtiere konnte zum Teil deutlich gesenkt werden. Es wurden konzentrationsabhängige und zum Teil langanhaltende Effekte gemessen. Die mitgemessene Herzfrequenz zeigte hingegen keine signifikanten Veränderungen, so daß diese Ergebnisse hier nicht dargestellt werden.

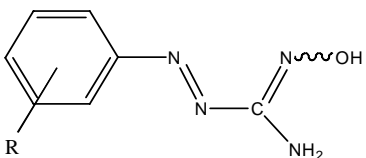
#### 3.3.2.1 Arylazoamidoxime

Die Blutdruckmessung nach Gabe der hergestellten Arylazoamidoxime zeigt in den meisten Fällen eine deutliche Blutdrucksenkung (Tab. 17). Verbindung **4** zeigt bei einer Dosis von 30 mg/kg mit einer 13%igen Hemmung die stärkste Hemmung. Verbindung **9** zeigt bei einer Konzentration von 60 mg/kg 21% Hemmung und liefert damit den höchsten Wert dieser Verbindungsklasse.

Die Verbindungen **7**, **10**, **12**, **21** und **22** zeigen keine oder nur eine geringe Senkung des Blutdrucks.

Bemerkenswert ist, daß eine Chlorsubstitution in 4- und 2-Stellung zu guten Hemmungen führt, die Fluorsubstitution allerdings in 4- und 3-Stellung vorteilhafter zu sein scheint.

**Tab. 17:** Arylazoamidoxime im Blutdruckmodell

		Dosis (mg/kg)	<u>Arylazoamidoxime:</u> Blutdrucksenkung (% ± SD)			
Stoff Nr.	R		2h	4h	6h	24h
4a	4-Chlor-	30	10 ± 3	12 ± 5	13 ± 7	n.s.
		60	14 ± 7	16 ± 10	13 ± 8	5 ± 3
5a	4-Fluor-	30	8 ± 3	5 ± 4	4 ± 2	n.s.
		60	12 ± 2	10 ± 3	10 ± 7	n.s.
7	3-Chlor-	30	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		60	4 ± 3	n.s.	n.s.	n.s.
8	2-Chlor-	60	14 ± 6	13 ± 4	13 ± 5	n.s.
9	3-Fluor-	60	15 ± 14	21 ± 15	21 ± 16	8 ± 7
10	2-Fluor-	60	5 ± 3	n.s.	5 ± 3	n.s.
12	4-Trifluormethyl-	60	6 ± 5	n.s.	n.s.	n.s.
21	4-Phenyl-	60	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
22	2,6-Dichlor-	60	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

a.synthetisiert von Bade [68]

### 3.3.2.2 Arylazoamidine

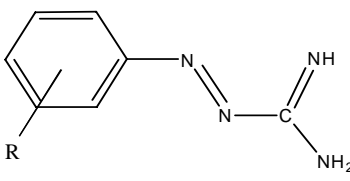
Die Verbindungen in dieser Verbindungsklasse zeigen sehr uneinheitliche Ergebnisse. Wie in Tabelle 18 zu sehen, zeigt Verbindung **14** eine maximale Blutdrucksenkung von 34% bei einer Dosis von 60 mg/kg. Hier konnte die stärkste Blutdrucksenkung aller Stoffe dieser Arbeit gemessen werden. Die Blutdrucksenkung ist deutlich abhängig von der verabreichten Dosis ( z.B. nach 6 h: 10 mg/kg: 8%; 30 mg/ g: 15%; 60 mg/kg: 34%).

Auch die Zeitabhängigkeit der Wirkung ist ausgeprägt. So tritt die Blutdrucksenkung rasch ein (siehe 2h-Werte in Tabelle 18) erreicht nach 6h ihr Maximum und ist dann dosisabhängig noch bis zu 24h nach Applikation zu beobachten.

Verbindung **15** zeigt bei einer Dosis von 30 mg/kg keine signifikante Blutdrucksenkung. Dieses Ergebnis ist überraschend, weil lediglich die Chlorsubstitution von 4-(**14**) auf 3-Position verändert wurde. Die gleiche Beobachtung wird bei den analogen Amidoximen **4** und **7** gemacht (siehe Tabelle 17 auf Seite 57).

Die maximale Blutdrucksenkung von Verbindung **17** beträgt 11% bei 30 mg/kg und zeigt damit vergleichbare Werte wie das analoge Amidoxim **5** (Tab. 17). Die Blutdrucksenkung von Verbindung **17** bei 30mg/kg ist damit schwächer als die der stärksten Verbindung **14**. Es wurden keine Messungen von Verbindung **17** bei einer höheren Konzentration vorgenommen, da befürchtet wurde, daß Tiere verenden könnten, wie es bei 60mg/ kg von Verbindung **14** geschehen war.

Tab. 18: Arylazoamidine im Blutdruckmodell

		Dosis (mg/kg)	Arylazoamidine: Blutdrucksenkung (% ± SD)			
Stoff Nr.	R		2h	4h	6h	24h
<b>14</b>	4-Chlor-	10	8 ± 4	7 ± 3	7 ± 4	n.s.
		30	13 ± 7	15 ± 10	15 ± 5	4 ± 3
		60	19 ± 4	30 ± 17	34 ± 11	24 ± 6
<b>15</b>	3-Chlor-	30	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>17</b>	4-Fluor-	10	5 ± 1	n.s.	4 ± 3	n.s.
		30	11 ± 5	8 ± 5	5 ± 3	n.s.

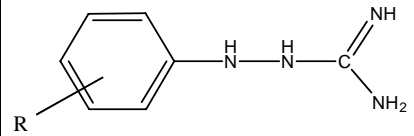


### 3.3.2.3 1-Amidino-2-arylhydrazine

Auch die Verbindungsklasse der 1-Amidino-2-arylhydrazine zeigt deutliche Blutdrucksenkungen (Tab. 19). Herausragend wirkt Verbindung **14a**. Sie zeigt bei 30 mg/kg eine 17%ige Blutdrucksenkung. Dieser Wert liegt sogar höher als die Blutdrucksenkung des analogen Azoamidis **14** (15% bei 30mg/kg). Es wurden auch hier keine höheren Dosen verabreicht, da befürchtet wurde, daß Tiere zu Grunde gehen könnten.

Verbindung **17a** zeigt ähnliche Blutdrucksenkungen wie das analoge Azoamidin **17** (Tab. 18). Überraschend ist der mit bis zu 10% deutlich senkende Effekt von Verbindung **15a**, denn sowohl das analoge Amidoxim **7** als auch das analoge Azoamidin **15** hatten fast keine signifikante Blutdrucksenkung erzeugen können.

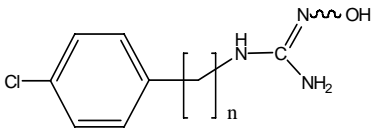
Tab. 19: 1-Amidino-2-arylhydrazine im Blutdruckmodell

		Dosis (mg/kg)	<b><u>1-Amidino-2-arylhydrazine:</u></b> Blutdrucksenkung (% ± SD)			
Stoff Nr.	R		2h	4h	6h	24h
<b>14a</b>	4-Chlor-	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		30	17 ± 4	15 ± 4	13 ± 4	n.s.
<b>15a</b>	3-Chlor-	30	7 ± 6	10 ± 6	7 ± 5	n.s.
<b>17a</b>	4-Fluor-	30	9 ± 5	n.s.	6 ± 4	n.s.

### 3.3.2.4 *N*-Hydroxyguanidine

Die blutdrucksenkenden Eigenschaften der *N*-Hydroxyguanidine sind etwa vergleichbar mit denen der Arylazoamidoxime (Tab. 17). Verbindung **3** zeigt eine 18%ige Senkung bei einer Dosis von 60 mg/kg. Verbindung **1** zeigt mit 8% etwa halb so viel (Tab. 20).

**Tab. 20:** *N*-Hydroxyguanidine im Blutdruckmodell

		Dosis		<b><u>Hydroxyguanidine:</u></b> <b>Blutdrucksenkung</b> (% ± SD)			
Stoff Nr.	n	(mg/ Kg)	2h	4h	6h	24h	
<b>1</b>	0	60	8 ± 2	8 ± 2	6 ± 4	n.s.	
<b>3</b>	1	60	16 ± 6	18 ± 3	14 ± 5	9 ± 3	

### 3.3.2.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse des Blutdruckmodells

Die Ergebnisse zeigen zum Teil deutliche Blutdrucksenkungen im beschriebenen Modell. Vor allem Arylazoamidine und 1-Amidino-2-arylhydrazine zeigen klar signifikante Blutdrucksenkungen, die im Fall von Verbindung **14** auch länger als 24 Stunden anhalten.

Es konnte das Arylazoamidoxim **9** gefunden werden, welches mit 21% (bei 60 mg/kg) Blutdrucksenkung einen stärkeren Effekt als die am stärksten wirkende Verbindung **4** (16% bei 60 mg/kg) von *Bade* [68] hat.

Die beiden Verbindungsklassen, in denen keine Hydroxyl-Gruppe enthalten ist (Arylazoamidine und 1-Amidino-2-arylhydrazine) senken den Blutdruck im allgemeinen stärker als die Klassen, die Hydroxyl-Gruppen enthalten (Arylazoamidoxime und *N*-Hydroxyguanidine). Da bisher noch keine Sauerstofffreien NO-Donatoren bekannt sind, ist der Mechanismus über eine NO-Freisetzung eher unwahrscheinlich.

Auf Grund von Strukturähnlichkeiten der Arylazoamidine und 1-Amidino-2-arylhydrazine mit dem Arzneistoff Guanfacin wäre ein analoger Wirkmechanismus zu diskutieren.

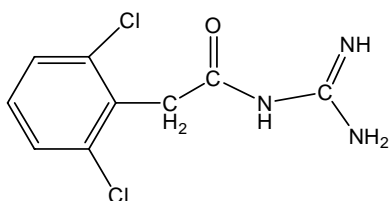


Abb. 30: Struktur des Antihypertensivums Guanfacin

Guanfacin senkt den Blutdruck, indem es zentrale  $\alpha_2$ -Rezeptoren aktiviert und damit die Noradrenalinausschüttung reduziert. Allerdings wird von *Levina* [98] eine chemische Oxidation zu NO und eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase beschrieben.

Die sehr deutliche Abhängigkeit der Wirkung der getesteten Substanzen von der Position des Substituenten am Aromaten deuten auf die Wechselwirkung mit einem spezifischen Rezeptor hin.

Die Ergebnisse des Tests zeigen einen wesentlich stärkeren Effekt einiger getesteter Substanzen im Blutdruckmodell als im Laser-Thrombose-Modell oder im Born-Test. So ist die antiaggregatorische Potenz von Verbindung **14** oder **14a** nur als mäßig bis schwach zu beurteilen (laut

Tabelle 34 auf Seite 126), obwohl sie die stärksten Effekte ihrer Klasse zeigten. Die gemessenen Blutdrucksenkungen allerdings liegen im Bereich der Referenzsubstanz Molsidomin (10mg/kg:  $15\% \pm 3\%$ ; 30mg/kg:  $22\% \pm 6\%$ ).

Im vorliegenden Testmodell ist die gemessene Blutdrucksenkung stark abhängig von der Resorption des Stoffs, da er oral appliziert wird. Ziel dieser Arbeit war es, oral verfügbare Arzneistoffe zu entwickeln, so daß auf eine intravenöse Gabe der Stoffe verzichtet wurde.

Durch die ausschließlich orale Gabe können wichtige Rückschlüsse über die Resorption der getesteten Verbindungen gezogen werden. So kann bei einer signifikanten Blutdrucksenkung 2h nach der oralen Applikation von einer erfolgten Resorption ausgegangen werden. Gleiches gilt ebenfalls für alle Verbindungen, die im Laser-Thrombose-Modell signifikante Thrombozytenaggregationshemmungen hervorrufen. Im Rückschluß kann bei signifikanter Wirkung einer Verbindung in nur einem der beiden Testmodelle davon ausgegangen werden, daß die fehlende Wirkung im anderen Testmodell nicht durch schlechte Resorption bedingt ist.

Bei einem deutlichen Effekt in mindestens einem der beiden Testmodelle nach 2h können auch begrenzte Rückschlüsse auf die Metabolisierung gezogen werden. Entweder findet eine schnelle Metabolisierung zum aktiven Metaboliten statt oder die inaktivierende Metabolisierung geschieht nur langsam.

Die Wasserlöslichkeit der Arylazoamidoxime ist schlechter als die der anderen drei Verbindungsklassen, welches auch als ein Grund für die geringere Wirkung herangezogen werden kann.

Andere physiologische Faktoren, wie Biotransformation, Plasma-Eiweißbindung und Verteilung beeinflussen die Blutdrucksenkung ebenfalls stark, wurden hier allerdings nicht weiter untersucht.

## 3.4 Untersuchungen zur NO Freisetzung

### 3.4.1 Allgemeines

Einige der hergestellten Verbindungen zeigen thrombozytenaggregationshemmende (*in vitro* und *in vivo*) und blutdrucksenkende Wirkungen. Um der Vermutung nachzugehen, die Wirkungen würden durch eine NO-Freisetzung der Verbindungen ausgelöst, wird zunächst die unspezifische NO-Freisetzung durch Cytochrom P450 untersucht.

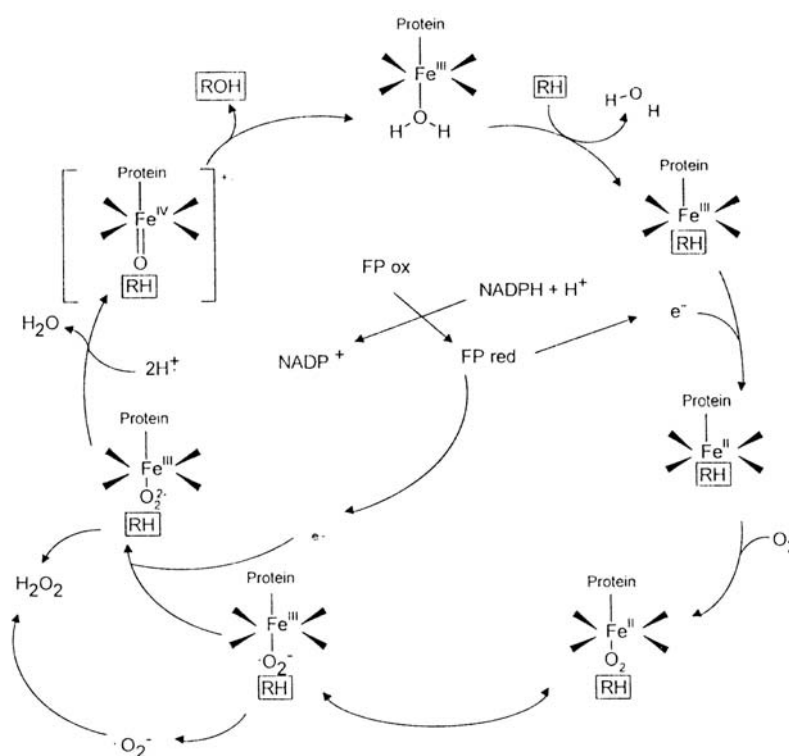


Abb. 31: Übersicht über den katalytischen Zyklus von CYP 450

Der Ablauf der oxidativen Katalyse von Substanzen durch das Cytochrom P450-Enzymsystem ist in Abb. 31 in Anlehnung an Coon [77] schematisch dargestellt.

Sie beginnt mit der Bindung eines Substrates an die hydrophobe Bindungsstelle des Enzyms in der Nähe des aktiven Zentrums. Es kommt dabei zu einem Übergang der hexakoordinierten „low-spin“- in die pentakoordinierte „high-spin“-Form des Fe<sup>(III)</sup>. Damit erhöht sich das Redoxpotential des Komplexes und der erste Reduktionsschritt wird ermöglicht. Dieser geschieht durch eine Elektronenübertragung durch die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase. Desweiteren kommt es

zur Anlagerung von Sauerstoff an das nun zweiwertige Eisen. Der entstandene Komplex kann durch zwei Resonanzstrukturen beschrieben werden. Falls das zweite Reduktionsäquivalent nicht rechtzeitig übertragen wird, kann der Komplex unter Superoxidanionfreisetzung dissoziieren. Auch nach der zweiten Elektronenübertragung kann es zu einer Entkopplung des Zyklus unter Freisetzung von reduziertem Sauerstoff kommen. Sofern es nicht zu einer solchen Entkopplung kommt, wird mit Hilfe von zwei Protonen Wasser abgespalten und das Sauerstoffatom bleibt unter Bildung eines reaktiven Oxokomplexes gebunden. Die genaue Struktur dieser Zwischenstufe ist noch nicht endgültig geklärt. Es sind aber mehrere Resonanzstrukturen denkbar. Sehr gut läßt sich die Elektronenverteilung durch eine Form beschreiben, in der das Eisenatom die Oxidationszahl +IV hat und ein Porphyrin-Radikalkation vorliegt. Anschließend erfolgt die Übertragung des aktiven Sauerstoffatoms auf das Substrat. Abschließend dissoziiert das Produkt und der katalytische Zyklus ist durchlaufen.

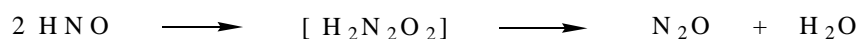
## 3.4.2 Gaschromatographische N<sub>2</sub>O-Bestimmung (Oxidation N<sup>-I</sup> zu N<sup>+I</sup>)

### 3.4.2.1 Allgemeines

Bei den folgenden Testmodellen wurde die oben beschriebene enzymatische Umsetzung mit einem nichtenzymatischen Modell von *Duchstein* [76] nachgeahmt. Es wurde somit versucht, die Oxidierbarkeit der Verbindungen zu testen.

Unter anaeroben Bedingungen können Sauerstoffdonatoren wie Iodosobenzol oder Periodate dem CYP 450 als Sauerstoffquelle dienen [78]. Der katalytische Zyklus des CYP 450 kann durch die Anlagerung des Sauerstoffdonators kurzgeschlossen werden („oxidative shunt“). Außerdem konnte *Volz* [79] zeigen, daß Fe<sup>III</sup>- und Mn<sup>III</sup>-Komplexe synthetischer Porphyrine die Oxygenierung organischer Substrate durch Iodosobenzol katalysieren können.

Die oben beschriebene Modellreaktion oxidiert die Testsubstanzen nicht selektiv zu NO. Es sind mehrere Oxidationsstufen des Stickstoffs denkbar. Hier soll nun der Anteil der Testsubstanz bestimmt werden, deren Stickstoff zu NO<sup>-</sup> oxidiert wird. Nitrosowasserstoff (HNO) ist eine instabile Verbindung, die leicht zur hyposalpnetrigen Säure (H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dimerisiert und in Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) und Wasser zerfällt:



Unter physiologischen Bedingungen liegt HNO (P<sub>k<sub>s</sub></sub>=4,7) überwiegend als Nitroxyl-Anion (NO<sup>-</sup>) vor [87]. Die Dimerisierung zum Hyponitrit (N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>2-</sup>) und die Umsetzung zum Lachgas (N<sub>2</sub>O) erfolgen sehr schnell. Daher kann die aus den Verbindungen freigesetzte HNO-Menge nur indirekt über das gebildete N<sub>2</sub>O bestimmt werden [88] [89]. Methode siehe Seite 132, Kapitel 6.4.1.

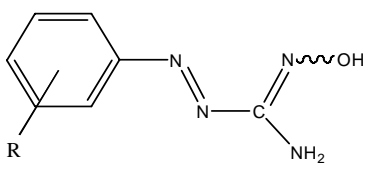
### 3.4.2.2 Ergebnisse der gaschromatographischen N<sub>2</sub>O-Bestimmung

#### 3.4.2.2.1 Arylazoamidoxime

Die Lachgas-Bestimmung der Arylazoamidoxime belegt deutliche Unterschiede in der Freisetzung. Am besten schneiden die Verbindungen **4** und **5** ab. Verbindung **5** erzielt dabei mit einer fast 20%igen Umsetzung (19,3%) bei Methode D die beste Umsetzung der gesamten Testreihe. Verbindung **4** liegt mit einer Umsetzungsrate von 17,9% bei Methode D im gleichen Bereich. Des weiteren zeigen die Verbindungen **12** (8,0%), **21** (2,7%) und **22** (8,5%) deutliche Lachgasmengen. Die anderen Verbindungen zeigen Umsetzungsraten von unter 1% (Abb. 32).

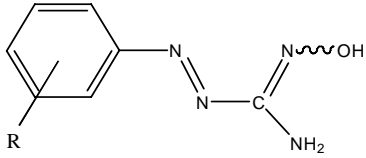
Aufgrund der Ergebnisse läßt sich die Struktur-Wirkungs-Beziehung ableiten, daß eine „symmetrische“ Substitution des Aromaten die Umsetzungsrate erhöht (Verbindungen **4**, **5**, **12** und **21** sind para- und Verbindung **22** ist dimeta-substituiert). Die Verbindungen **7**, **8**, **9**, **10** enthalten eine ortho- oder meta-Substitution. Außerdem scheint ein kleiner Substituent in para-Stellung die Reaktionsfähigkeit im vorgestellten Testmodell zu fördern (vgl. Verbindung **4** und **5**). Die spontane Freisetzung (Methode A) zeigt wie erwartet die niedrigsten Lachgasmengen. Methode B, bei der nur der Sauerstoffdonator zugesetzt wurde, ergab niedrigere Umsetzungsraten als Methode D, bei der sowohl der Sauerstoffdonator als auch der Katalysator zugesetzt wurden.

Tab. 21: Arylazoamidoxime in der gaschromatographischen N<sub>2</sub>O Bestimmung

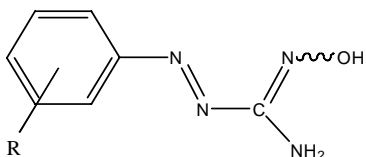
			<b>Arylazoamidoxime in der N<sub>2</sub>O-Bestimmung</b> <b>Methode</b> (Tabelle 35 auf Seite 134)							
Stoff Nr.	R	Inkubationszeit (h)	A	SD	B	SD	C	SD	D	SD
			Umsetzungsrate (%)							
<b>4</b>	4-Chlor-	1	0,05	0,001	5,7	0,20	0,3	0,008	14,9	0,46
		3	0,04	0,003	4,2	0,12	0,1	0,005	16,5	0,32
		6	0,0		4,6	0,30	1,1	0,08	17,4	0,50
		24	<b>0,2</b>	0,003	5,2	0,45	<b>5,1</b>	0,35	16,7	0,54
		48	0,1	0,002	<b>6,6</b>	0,56	2,7	0,04	<b>17,9</b>	0,09



Tab. 21: Arylazoamidoxime in der gaschromatographischen N<sub>2</sub>O Bestimmung

			Arylazoamidoxime in der N <sub>2</sub> O-Bestimmung							
Stoff Nr.	R	Inkubationszeit (h)	Methode (Tabelle 35 auf Seite 134)							
			A	SD	B	SD	C	SD	D	SD
			Umsetzungsrate (%)							
5	4-Fluor-	1	0.04	0.004	4.5	0.09	0.06	0.003	<b>19.3</b>	0.09
		3	0.1	0.004	3.3	0.22	0.1	0.002	15.1	0.41
		6	0.1	0.003	2.5	0.06	0.1	0.009	13.3	0.58
		24	0.1	0.007	<b>10.6</b>	0.28	0.1	0.001	14.4	0.75
		48	<b>0.1</b>	0.007	5.8	0.42	<b>0.3</b>	0.003	14.9	0.71
7	3-Chlor-	1	n.s.		0.3	0.01	n.s.		0.6	0.01
		3	n.s.		0.3	0.02	0.03	0.001	0.6	0.02
		6	n.s.		0.4	0.03	0.03	0.001	0.5	0.03
		24	n.s.		<b>0.4</b>	0.03	<b>0.05</b>	0.002	0.5	0.01
		48	n.s.		0.2	0.01	<b>0.05</b>	0.001	<b>0.8</b>	0.06
8	2-Chlor-	1	n.s.		0.1	0.006	n.s.		<b>0.5</b>	0.02
		3	n.s.		0.1	0.006	0.03	0.001	<b>0.5</b>	0.03
		6	n.s.		0.1	0.005	0.04	0.001	<b>0.5</b>	0.03
		24	n.s.		0.1	0.004	<b>0.1</b>	0.008	0.4	0.02
		48	n.s.		<b>0.1</b>	0.005	0.05	0.001	<b>0.5</b>	0.04
9	3-Fluor-	1	n.s.		0.1	0.003	n.s.		<b>0.3</b>	0.02
		3	n.s.		0.1	0.005	n.s.		<b>0.3</b>	0.005
		6	n.s.		0.1	0.008	0.03	0.001	<b>0.3</b>	0.02
		24	n.s.		0.1	0.009	0.04	0.001	0.2	0.008
		48	<b>0.03</b>	0.001	<b>0.2</b>	0.006	<b>0.1</b>	0.001	<b>0.3</b>	0.01
10	2-Fluor-	1	n.s.		0.08	0.003	n.s.		0.1	0.004
		3	n.s.		0.09	0.003	n.s.		0.1	0.007
		6	n.s.		<b>0.2</b>	0.007	0.03	0.001	<b>0.5</b>	0.01
		24	n.s.		<b>0.2</b>	0.008	<b>0.04</b>	0.001	<b>0.5</b>	0.02
		48	<b>0.03</b>	0.001	0.1	0.01	0.03	0.001	<b>0.5</b>	0.03

Tab. 21: Arylazoamidoxime in der gaschromatographischen N<sub>2</sub>O Bestimmung

			Arylazoamidoxime in der N <sub>2</sub> O-Bestimmung							
			Methode (Tabelle 35 auf Seite 134)							
Stoff Nr.	R	Inkubationszeit (h)	A	SD	B	SD	C	SD	D	SD
			Umsetzungsrate (%)							
12	4-Trifluormethyl-	1	0.1	0.001	1.7	0.07	0.3	0.02	4.3	0.04
		3	0.2	0.003	1.3	0.05	0.7	0.02	5.0	0.08
		6	0.2	0.006	1.4	0.02	1.6	0.10	5.1	0.08
		24	0.3	0.009	1.9	0.02	<b>3.3</b>	0.06	<b>8.0</b>	0.09
		48	<b>0.6</b>	0.04	<b>3.2</b>	0.07	2.6	0.13	6.9	0.18
21	4-Phenyl-	1	0.03	0.001	0.2	0.01	0.04	0.001	1.5	0.08
		3	0.04	0.001	0.3	0.01	0.1	0.003	1.2	0.07
		6	0.04	0.001	0.5	0.02	0.2	0.005	1.5	0.09
		24	0.1	0.01	<b>0.5</b>	0.03	1.2	0.01	<b>2.7</b>	0.04
		48	<b>0.3</b>	0.02	0.5	0.01	<b>1.4</b>	0.04	1.2	0.05
22	2,6-Dichlor-	1	0.03	0.001	0.4	0.004	0.4	0.02	1.9	0.08
		3	0.03	0.001	0.4	0.03	1.0	0.07	3.2	0.24
		6	0.1	0.004	0.5	0.04	1.7	0.14	3.7	0.13
		24	0.1	0.002	0.7	0.04	4.1	0.1	<b>8.5</b>	0.55
		48	<b>0.2</b>	0.01	<b>0.7</b>	0.06	<b>4.7</b>	0.3	5.5	0.45

Auffallend ist die bei einigen Verbindungen deutliche Umsetzungsrate bei Methode C. Bei dieser Methode wird nur der Katalysator Fe<sup>III</sup> FTPPCl zugesetzt. Bei den Verbindungen **4**, **12**, **21** und **22** ergab diese Methode in der Lachgas-Bestimmung jedoch deutlich messbare Umsetzungsrate. Es überrascht jedoch, daß bei der Umsetzung von Verbindung **5**, die hier die höchste Umsetzung bei Methode D zeigte, fast keine Umsetzung bei Methode C zu messen war. Auch wurde bei dieser Verbindung die maximale Umsetzungsrate schon nach einer Inkubationszeit von einer Stunde erreicht. Danach fiel sie leicht wieder ab.

Das Testsystem zeigt die besten Umsetzungsraten bei Zusatz von beiden Reagentien (Methode D) und somit das gute Zusammenspiel des Katalysators und des Sauerstoffdonators unter den angegebenen Reaktionsbedingungen.

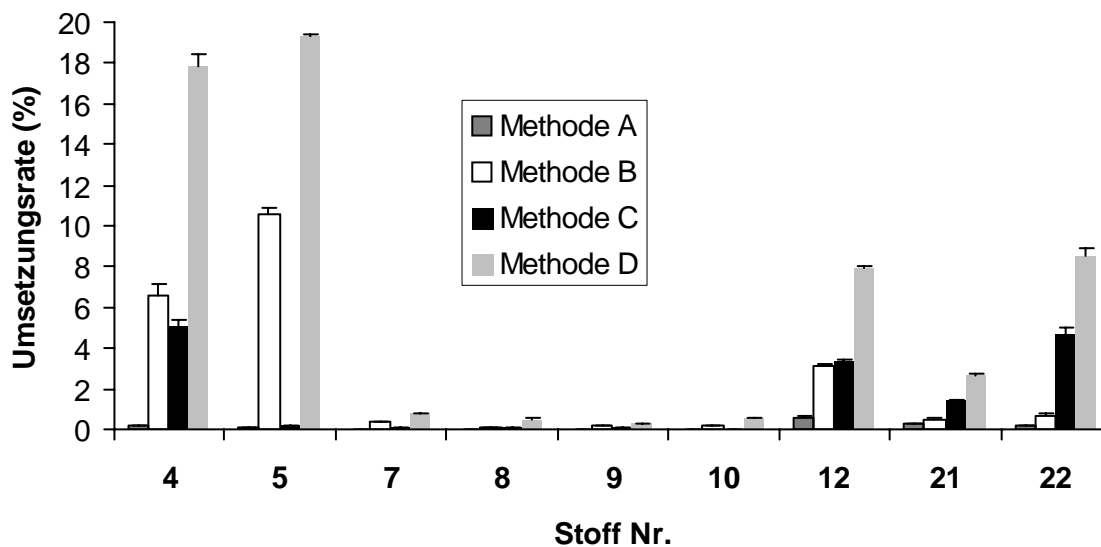


Abb. 32:  $N_2O$ -Bildung aus Arylazoamidoximen (Methoden: Tabelle 35 auf Seite 134)

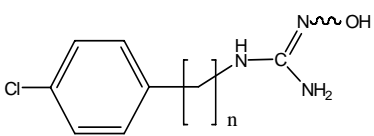
### 3.4.2.2 Arylazoamidine und 1-Amidino-2-arylhydrazine

Arylazoamidine und 1-Amidino-2-arylhydrazine zeigen unter den beschriebenen Testbedingungen keine Lachgas-Freisetzung.

### 3.4.2.3 *N*-Hydroxyguanidine

Die *N*-Hydroxyguanidine zeigen Umsetzungsraten von maximal 2,29% **3**. Bei der Vermessung von Verbindung **3** wurde etwas mehr N<sub>2</sub>O detektiert als bei Verbindung **1**. Es fällt allerdings auf, daß die Tests nach Methode C (nur Fe<sup>III</sup> TPPCl) sehr schlechte Umsetzungen ergeben. Anders als bei den Arylazoamidoximen führt der Zusatz des Sauerstoffdonators (Methode B) zu höheren N<sub>2</sub>O-Mengen (Tab. 22).

Tab. 22: N<sub>2</sub>O Bestimmung der *N*-Hydroxyguanidine

			<b><i>N</i>-Hydroxyguanidine in der N<sub>2</sub>O Bestimmung</b> <b>Methode</b> (Tabelle 35 auf Seite 134)							
			<b>A</b>	<b>SD</b>	<b>B</b>	<b>SD</b>	<b>C</b>	<b>SD</b>	<b>D</b>	<b>SD</b>
<b>Stoff Nr.</b>	<b>n</b>	<b>Inkubationszeit (h)</b>	<b>Umsetzungsraten (%)</b>							
<b>1</b>	0	1	0.03	0.002	0.7	0.03	n.s.		0.8	0.07
		3	0.03	0.001	0.4	0.04	0.02	0.001	0.9	0.03
		6	0.03	0.001	0.9	0.08	0.03	0.001	1.1	0.05
		24	0.04	0.003	1.1	0.08	0.04	0.002	<b>1.5</b>	0.03
		48	<b>0.1</b>	0.006	<b>1.2</b>	0.06	<b>0.1</b>	0.004	1.2	0.14
<b>3</b>	1	1	0.03	0.002	1.6	0.02	0.03	0.001	1.6	0.09
		3	0.03	0.001	1.8	0.04	0.02	0.001	<b>1.9</b>	0.01
		6	0.03	0.001	1.6	0.05	0.1	0.004	<b>1.9</b>	0.09
		24	0.04	0.002	<b>2.3</b>	0.06	0.2	0.003	1.7	0.05
		48	<b>0.1</b>	0.002	2.2	0.15	<b>0.2</b>	0.003	1.2	0.04

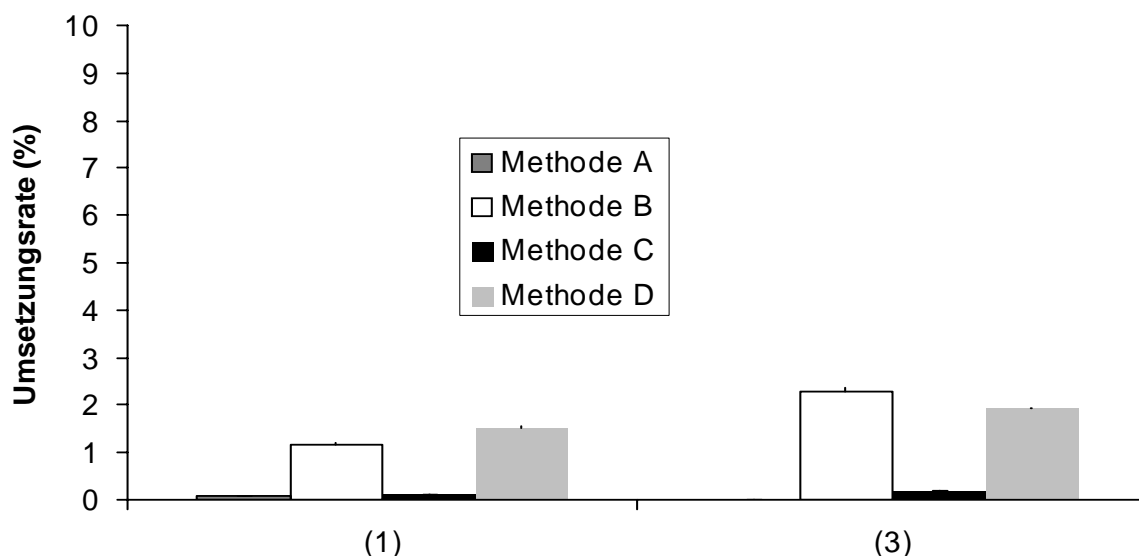


Abb. 33: N<sub>2</sub>O Bildung aus *H*-Hydroxyguanidinen (Methoden: Tabelle 35 auf Seite 134)

### 3.4.2.3 Beurteilung der Ergebnisse der Lachgas-Bestimmung

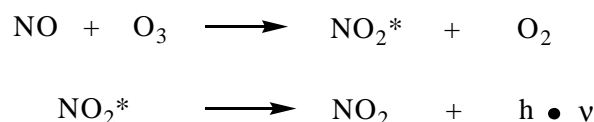
Diese Methode beleuchtet nur einen kleinen Ausschnitt der Oxidationen der Testsubstanzen. Hier wird die Oxidation des Stickstoffs von N<sup>-I</sup> zu N<sup>+I</sup> gemessen. Alle anderen Oxidationsstufen werden nicht erfasst. Es konnte jedoch eine zum Teil sehr deutliche Oxidation zu dieser Oxidationsstufe festgestellt werden. Vor allem die *para*-substituierten Arylazoamidoxime **4** und **5** zeigten eine hohe Oxidationsbereitschaft. Die *N*-Hydroxyguanidine zeigen wenig und die Arylazoamide und 1-Amidino-2-arylhydrazine zeigen keine Lachgas-Freisetzung. Die höchsten Umsetzungsdaten konnten bei der Umsetzung nach Methode D gemessen werden, bei der der Sauerstoffdonator (Abbildung 52 auf Seite 132) und der Katalysator (Abbildung 53 auf Seite 133) anwesend waren. Dies belegt die Funktion des Testsystems.

Die hier gemessenen Daten können auf Grund der unterschiedlichen Inkubationszeiten nur schwer mit den Ergebnissen der Chemilumineszenzmessung (Seite 72, Kapitel 3.4.3) verglichen werden, ergeben aber ein schärferes Bild der getesteten Substanzen und helfen, ihre *in vivo*- und *in vitro*-Wirkungen zu verstehen.

### 3.4.3 NO-Bestimmung mittels Chemilumineszens (Oxidation N<sup>-I</sup> zu N<sup>+II</sup>)

#### 3.4.3.1 Allgemeines

Diese Methode bestimmt die Menge an freigesetztem NO anhand folgender Gleichung:



Stickstoffmonoxid wird mit Ozon versetzt. Dabei entstehen angeregtes Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>) und Sauerstoff. Angeregtes Stickstoffdioxid setzt seine Anregungsenergie in Form von Photonen frei, die ein Emissionsmaximum bei 1200nm haben. Diese Strahlen werden mittels eines Chemilumineszens-Analysators detektiert [83]. Die gebildete Menge an NO verhält sich dabei proportional zur Intensität des Chemilumineszenssignals. Methode siehe Seite 132, Kapitel 6.4.1.

Wie bei der vorher beschriebenen gaschromatographischen N<sub>2</sub>O-Bestimmung (Seite 65, Kapitel 3.4.2) wird auch durch diese Methode nur ein kleiner Ausschnitt der Oxidation betrachtet. Jedoch kann dieser Ausschnitt helfen, die Eigenschaften der Substanzen besser beurteilen zu können.

#### 3.4.3.2 Ergebnisse der NO-Chemilumineszens-Messung

##### 3.4.3.2.1 Arylazoamidoxime

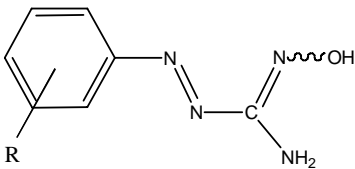
Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen bei den Arylazoamidoximen nur geringe Umsetzungsraten unter den beschriebenen Bedingungen

Die besten Umsetzungsraten werden bei Methode B gemessen. Verbindung **8** zeigt mit 2,18% Umsetzung den besten Wert. Eine Struktur-Wirkungs-Beziehung läßt sich nur schwer aufstellen, da die Verbindungen mit mehr als 1% Umsetzungsrate bei Methode B sowohl ortho-(Verbindung **8**) als auch meta-(Verbindung **7** und **9**) und sogar para-substituiert sind (Verbindung **5a**).

Methode D liefert mit maximal 1% (Verbindungen **5a**, **8** und **10**) Umsetzungsrate niedrigere Werte als Methode B. Die Begründung hierfür könnte eine über NO hinausführende Oxidation,

etwa zu  $N^{+III}$  (Nitrit) oder  $N^{+V}$  (Nitrat) in Methode D sein. Diese können jedoch mit dem vorliegenden Versuch nicht nachgewiesen werden.

**Tab. 23:** Arylazoamidoxime im NO-Chemilumineszenztest

		<b>Arylazoamidoxime im NO-Chemilumineszenztest</b>  <b>Methode</b> (Tabelle 36 auf Seite 135)							
Stoff Nr.	R	A	SD	B	SD	C	SD	D	SD
		Umsetzungsrate (%)							
<b>4a</b>	4-Chlor-	n.s.		0.4	0.01	n.s.		0.3	0.005
<b>5a</b>	4-Fluor-	n.s.		1.3	0.03	n.s.		<b>1.0</b>	0.01
<b>7</b>	3-Chlor-	n.s.		1.5	0.03	n.s.		0.8	0.02
<b>8</b>	2-Chlor-	n.s.		<b>2.2</b>	0.09	n.s.		<b>1.0</b>	0.04
<b>9</b>	3-Fluor-	n.s.		1.2	0.08	n.s.		0.3	0.003
<b>10</b>	2-Fluor-	n.s.		0.6	0.008	n.s.		0.9	0.01
<b>12</b>	4-Trifluormethyl-	n.s.		0.8	0.01	n.s.		0.3	0.002
<b>21</b>	4-Phenyl-	n.s.		0.6	0.05	n.s.		0.3	0.002
<b>22</b>	2,6-Dichlor-	n.s.		0.1	0.001	n.s.		0.2	0.001

a.synthetisiert von *Bade* [68]

### Einfluß der Belichtung

Beispielhaft wurden einige Substanzen nicht nur unter Lichtausschluß inkubiert sondern auch unter Tageslicht- und UV-Licht-Einfluß (Abb. 34).

Tab. 24: Einfluss von Licht auf den NO-Chemilumineszenstest

			<b>Lichteinfluss auf Arylazoamidoxime im NO-Chemilumineszenstest</b>  <b>Methode</b> (Tabelle 36 auf Seite 135)							
			<b>A</b>	<b>SD</b>	<b>B</b>	<b>SD</b>	<b>C</b>	<b>SD</b>	<b>D</b>	<b>SD</b>
<b>Stoff Nr.</b>	<b>R</b>	<b>Belichtung</b>	<b>Umsetzungsrate (%)</b>							
<b>8</b>	2-Chlor-	Lichtaus-schluß	n.s.		<b>2.2</b>	0.09	n.s.		1.0	0.04
		Tageslicht	n.s.		1.6	0.04	n.s.		0.3	0.01
		UV-Licht	n.s.		0.3	0.002	n.s.		0.1	0.001
<b>10</b>	2-Fluor-	Lichtaus-schluß	n.s.		0.6	0.008	n.s.		0.9	0.01
		Tageslicht	n.s.		1.0	0.06	n.s.		<b>1.4</b>	0.02
		UV-Licht	n.s.		1.4	0.01	n.s.		0.8	0.005

Es zeigt sich ein deutlicher Einfluß der Lichtverhältnisse auf den NO-Chemilumineszenstest. Allerdings ist er nicht einheitlich (Abb. 34). Während bei Verbindung **8** die Erhöhung der von außen zugeführten Energie zu einer niedrigeren NO<sub>2</sub>-Menge führt, ergibt sie bei Verbindung **10** eine erhöhte Umsetzungsrate.

Es wäre zu diskutieren, ob im Fall von Verbindung **8** die erhöhte Energiezufuhr zu einer weiteren Oxidation des Stickstoffs führt, womit weniger NO detektiert werden würde.

Im Fall von Verbindung **10** scheint die vermehrte Energiezufuhr die Menge an NO<sub>2</sub> zu erhöhen. Dies könnte daran liegen, daß durch die Fluorsubstitution im Vergleich mit der Chlorsubstitution ein stärkerer -M-Effekt vorliegt, der eine Oxidation erschwert. Dafür spricht auch, daß mit Verbindung **8** insgesamt höhere Umsetzungsraten erzielt wurden als mit Verbindung **10**.



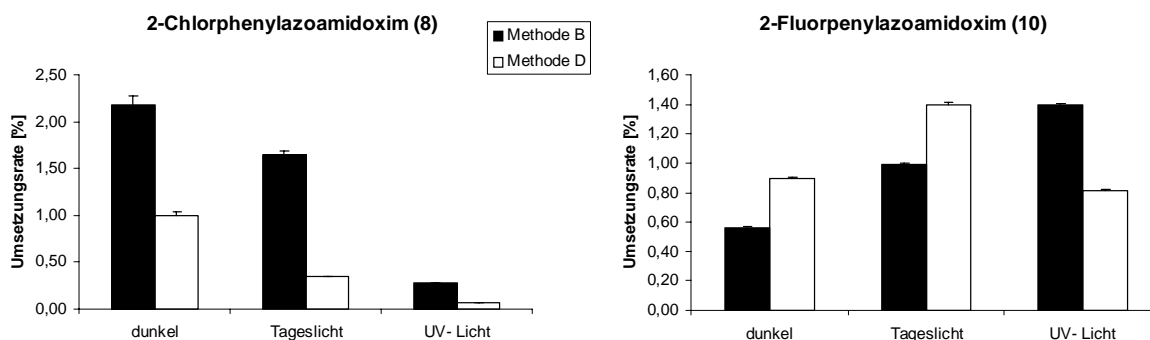


Abb. 34: Einfluss von Licht auf den NO-Chemilumineszenstest (Methoden: Tabelle 36 auf Seite 135)

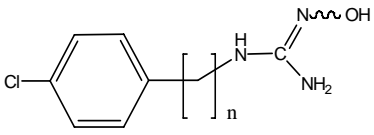
### 3.4.3.2.2 Amidine

Arylazoamidine und 1-Amidino-2-arylhrazine zeigten keine NO-Freisetzung im beschriebenen Testmodell.

### 3.4.3.2.3 N-Hydroxyguanidine

Die gemessenen Umsetzungsrate durch die oben beschriebene Methode der Chemilumineszenzmessung sind als sehr gering einzustufen (Tab. 25). Es wird eine maximale Umsetzungsrate von 0,09% detektiert (Verbindung 1 bei Methode D). Es ist dabei nicht auszuschließen, daß eine Oxidation zu anderen Oxidationsstufen des Stickstoffs stattgefunden hat.

Tab. 25: N-Hydroxyguanidine im NO-Chemilumineszenstest

		N-Hydroxyguanidine im NO-Chemilumineszenstest							
		Methode (Tabelle 36 auf Seite 135)							
Stoff Nr.	n	A	SD	B	SD	C	SD	D	SD
		Umsetzungsrate (%)							
1	0	n.s.		0.1	0,002	n.s.		0.1	0.006
3	1	n.s.		0.04	0.002	n.s.		n.s.	

### 3.4.3.3 Beurteilung der Ergebnisse der NO-Chemilumineszenz -Messung

Die Ergebnisse dieser Methode zeigen geringe bis sehr geringe Umsetzungsraten der Testsubstanzen durch das oben beschriebene Modell der Chemilumineszenzmessung. Es wird nur die Oxidation von  $N^{\text{I}}$  zu  $N^{\text{II}}$  detektiert. Alle weiteren Oxidationen zu Stickstoffen mit anderen Oxidationsstufen werden in diesem Modell nicht berücksichtigt. Es werden nur „Momentaufnahmen“ der Oxidation herausgegriffen. Damit ist die Aussagekraft dieser Methode begrenzt. Sie stellt einen Teil der Gesamtbeurteilung der Oxidierbarkeit der hier synthetisierten Verbindungen dar. Da jedoch Chemilumineszenz detektiert werden konnte, ist das vorgestellte Modell nicht ungeeignet, Oxidationen durch das vorgestellte Testsystem nachzuweisen.

Auffällig ist, daß NO-Bildung nur bei den hydroxylierten Verbindungen (Arylazoamidoxime und *N*-Hydroxyguanidine) gemessen werden konnten (Tab. 23) und (Tab. 25). Die gemessenen Umsetzungsraten von maximal 2,18% bei Methode B (Verbindung **8**) liegen dabei deutlich höher als die vergleichbaren Umsetzungsraten bei Methode D (maximal 0,99%). Aufgrund des neben dem Sauerstoffdonator vorliegenden Katalysator  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPCl}$  wären bei Methode D höhere Umsetzungsraten zu erwarten gewesen. Es ist zu vermuten, daß das Zusammenspiel von Sauerstoffdonator und Katalysator eine weitergehende Oxidation der hydroxylierten Testsubstanzen verursacht, die jedoch durch dieses Testsystem nicht erfaßt werden kann.

Bei der NO-Bestimmung mittels Chemilumineszenzmessung wird im Gegensatz zur gaschromatographischen  $\text{N}_2\text{O}$ -Bestimmung keine Umsetzung bei Methode C erreicht. Anscheinend wird die Oxidation des Stickstoffs auf  $N^{\text{I}}$  ( $\text{NO}^-$ ) besser durch das eisenhaltige Porphyrin katalysiert als die Oxidation auf  $N^{\text{II}}$  ( $\text{NO}$ ). Zu Bedenken ist allerdings die Inkubationszeit. Bei der  $\text{N}_2\text{O}$ -Bestimmung werden die maximalen Umsetzungsraten meist erst nach 24-48 h erreicht. Die Inkubationszeit bei der NO-Chemilumineszenzmessung dauert maximal 68 min. Somit können beide Meßsysteme nur schwer miteinander verglichen werden.

## **3.5 Inkubationen mit NO-Synthasen**

### **3.5.1 Inkubation ohne Anwesenheit von L-Arginin**

In den vorher beschriebenen Tests wurden Wirkungen auf die Thrombozytenaggregation (Born-Test und Laser-Thrombose-Modell) oder den Blutdruck beschrieben. Auch wurde die Oxidierbarkeit der Testsubstanzen anhand zweier Modelle (NO-Chemilumineszenstest und gaschromatographische N<sub>2</sub>O-Bestimmung) getestet. Nun soll, um den Wirkmechanismus zu untersuchen, eine Umsetzung mit NO-Synthasen erfolgen. Die Testsubstanzen werden dazu mit drei Isoenzymen der NO-Synthase umgesetzt. Die bNOS, eNOS und iNOS (Seite 6, Kapitel 1.2) werden dabei nach unterschiedlichen Methoden (siehe Seite 137, Kapitel 6.5.1) mit den Testsubstanzen statt dem natürlichen Substrat L-Arginin umgesetzt. Die Menge an freigesetztem NO wird daraufhin mit Hilfe eines Nitrit Assays bestimmt (Seite 139, Kapitel 6.5.1.1).

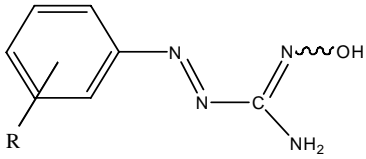
Um die Einflüsse der Testsubstanzen bei Anwesenheit des natürlichen Substrats L-Arginin zu untersuchen, wurde eine Testreihe durchgeführt, bei der die Umsetzung der Testsubstanzen bei Anwesenheit von L-Arginin stattfand.

### 3.5.2 Ergebnisse der Inkubation mit NO-Synthasen ohne Anwesenheit von L-Arginin

#### 3.5.2.1 Arylazoamidoxime

Wie in Tabelle 26 zu sehen, werden durch den Zusatz von verschiedenen NO-Synthasen zum Teil deutliche Umsetzungsraten der Testsubstanzen erreicht. Diese sind jeweils bezogen auf die Umsetzung von L-Arginin.

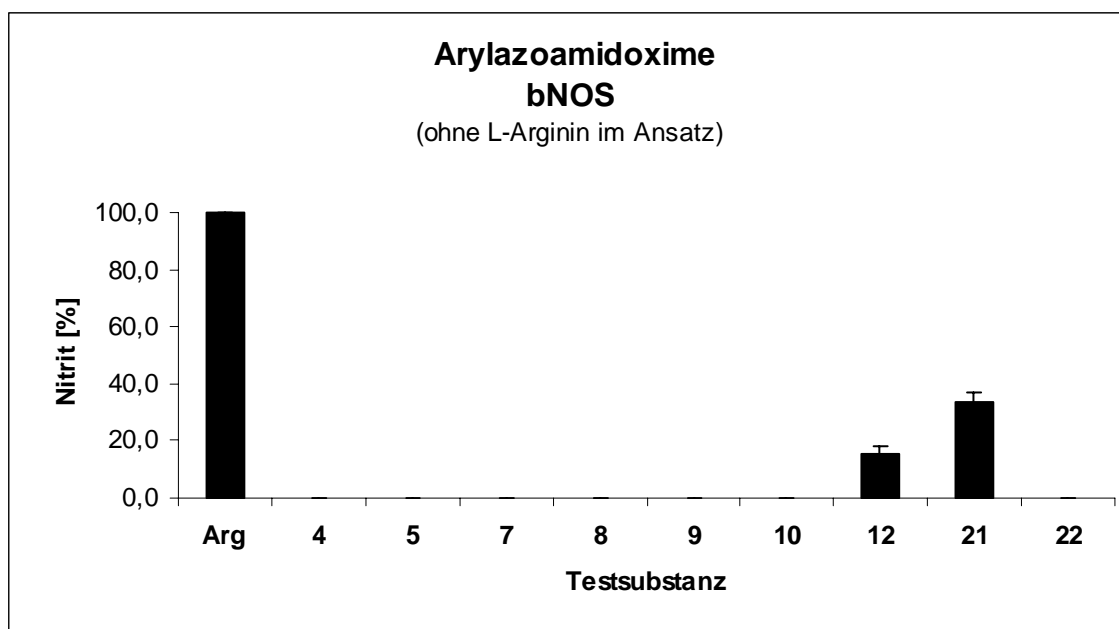
**Tab. 26:** Arylazoamidoxime mit NO-Synthasen inkubiert (ohne Zusatz von L-Arginin) n.q.= nicht quantifizierbar

		<b>Arylazoamidoxime</b> <b>Inkubation mit NO-Synthasen</b> <b>(% der Umsetzung mit L-Arginin)</b>					
Stoff	R	bNOS	SD (%)	eNOS	SD (%)	iNOS	SD (%)
L-Arginin	Kontrolle	100		100		100	
4 <sup>a</sup>	4-Chlor-	n.q.		n.q.		n.q.	
5 <sup>a</sup>	4-Fluor-	n.q.		10.2	1.4	27.8	11.0
7	3-Chlor-	n.q.		12.3	2.5	n.q.	
8	2-Chlor-	n.q.		16.8	1.8	16.6	7.4
9	3-Fluor-	n.q.		n.q.		n.q.	
10	2-Fluor-	n.q.		11.0	6.8	12.0	8.7
12	4-Trifluormethyl-	15.7	2.6	8.8	1.6	8.2	6.3
21	4-Phenyl-	33.8	3.2	14.7	1.9	20.1	13.0
22	2,6-Dichlor-	n.q.		4.0	2.6	n.q.	

a.synthetisiert von *Bade* [68]

### 3.5.2.1.1 bNOS

Die Umsetzung der Arylazoamidine mit der bNOS zeigt nur bei zwei Verbindungen eine quantifizierbare Nitrit-Freisetzung. Diese Substanzen **12** und **21** tragen beide einen großen Substituenten in para Stellung. Verbindung **4** zeigt interessanterweise keine Umsetzung, obwohl seine 4-Chlor-Substitution isoster zu der 4-Trifluormethyl-Substitution von Verbindung **21** ist. Die Umsetzungsrate von Verbindung **21** erreicht mit fast 34% ein gutes Drittel der L-Arginin Umsetzung und stellt damit die beste Nitrit-Freisetzung der Arylazoamidoxime dar.



**Abb. 35:** Durch bNOS freigesetztes Nitrit aus Arylazoamidoximen

### 3.5.2.1.2 eNOS

Die Umsetzung der Arylazoamidoxime mit eNOS zeigt Umsetzungsraten von maximal 17% (Verbindung **8**). Alle Testverbindungen bis auf **4** und **9** zeigen eine Umsetzung. Es lässt sich nur schwer eine Struktur-Wirkungs-Beziehung aufstellen, da sowohl para-, als auch meta- und ortho-substituierte Verbindungen eine Nitrit-Freisetzung bewirken. Auch weisen die beiden Stoffe ohne quantifizierbare Umsetzung verschiedene Substitutionen auf. Verbindung **21** erreicht wie schon bei der Umsetzung mit bNOS (Abb. 35) einen der besten Werte (14,7%).

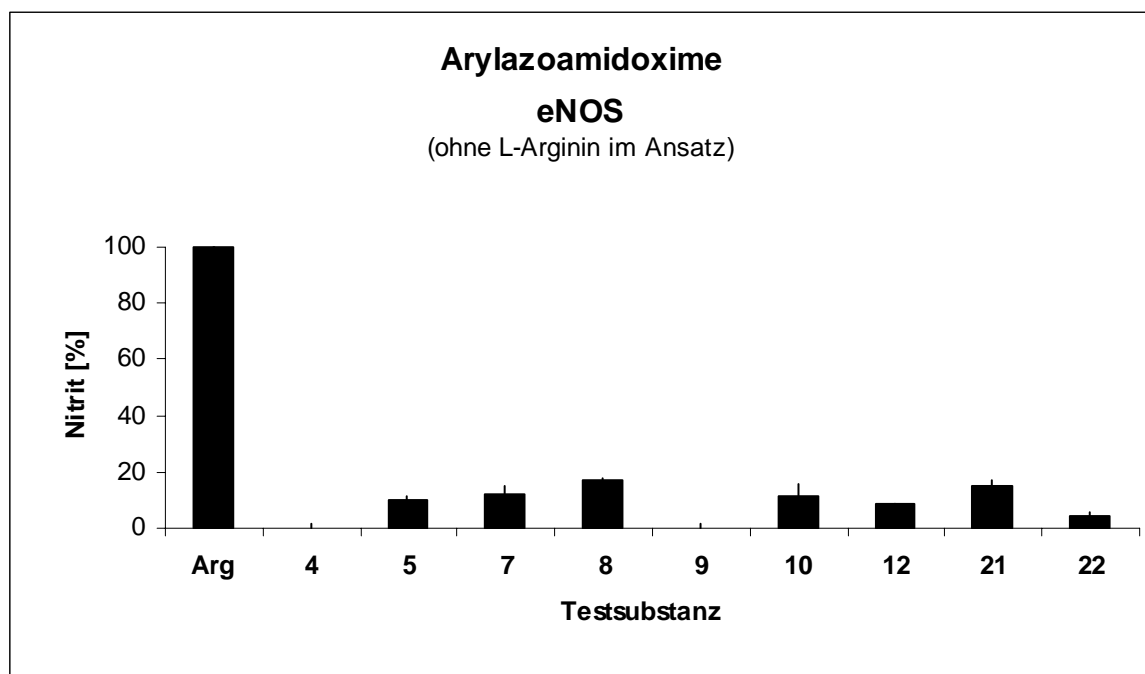


Abb. 36: Durch eNOS freigesetztes Nitrit aus Arylazoamidoximen

### 3.5.2.1.3 iNOS

Mit 27,8% Umsetzung zeigt Verbindung **5** den besten Wert bei der Umsetzung mit iNOS. Eine Substitution in para-Stellung scheint zu einer besseren Umsetzung mit der iNOS zu führen, denn auch Verbindung **21** erreicht mit ca. 20% eine deutliche Umsetzung. Desweiteren folgen die unsymmetrisch substituierten Verbindungen **8** und **10**. Verbindung **12** zeigt wie schon bei den beiden anderen Isoenzymen eine leichte Umsetzung und ist damit nicht spezifisch. Verwunderlich ist, daß Verbindung **4** bei keinem der drei Isoenzyme eine Umsetzung zeigt.

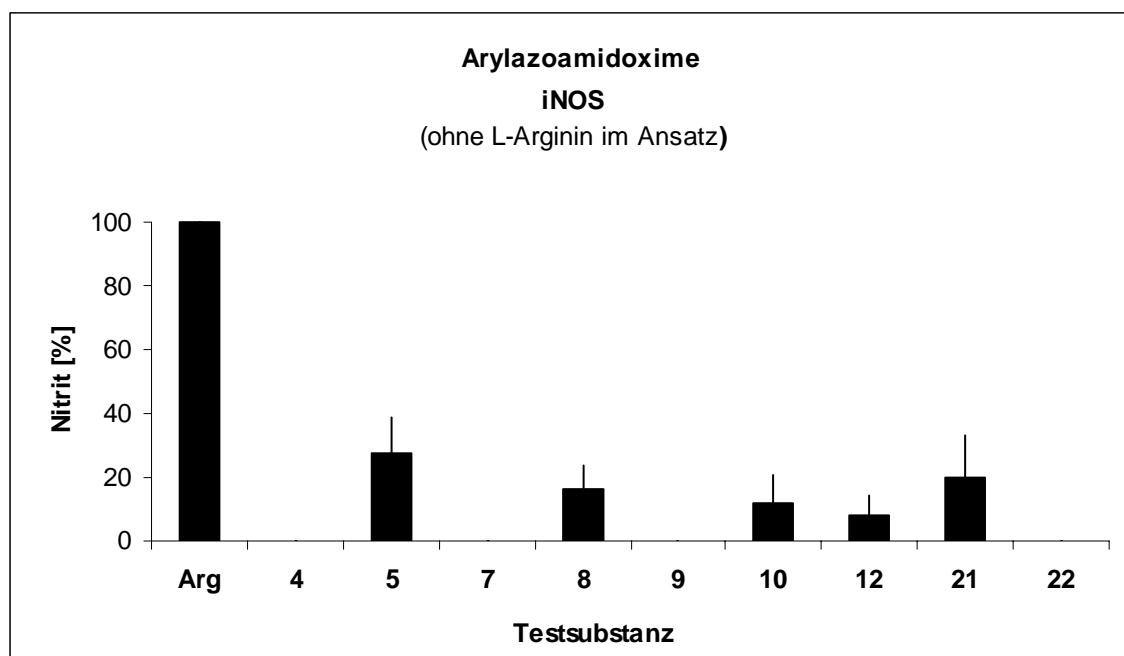
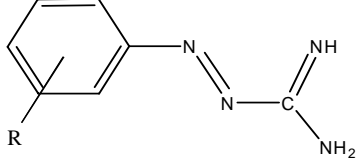


Abb. 37: Durch iNOS freigesetztes Nitrit aus Arylazoamidoximen

### 3.5.2.2 Arylazoamidine

Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse der Inkubation der drei getesteten Arylazoamidine mit NO-Synthasen. Die Ergebnisse werden nachfolgend beschrieben und beurteilt.

**Tab. 27:** Arylazoamidine mit NO-Synthasen inkubiert (ohne Zusatz von L-Arginin) n.q. nicht quantifizierbar

		<b>Arylazoamidine</b> <b>Inkubation mit NO-Synthasen</b> <b>(% der Umsetzung mit L-Arginin)</b>					
Stoff	R	bNOS	SD (%)	eNOS	SD (%)	iNOS	SD (%)
L-Arginin	Kontrolle	100	20.0	100	24.9	100	17.7
<b>14</b>	4-Chlor-	n.q.		17.6	1.6	19,2	7,6
<b>15</b>	3-Chlor-	n.q.		n.q.		n.q.	
<b>17</b>	4-Fluor-	n.q.		26.6	2.9	11.3	2.9

#### 3.5.2.2.1 bNOS

Es ergeben sich keine quantifizierbaren Umsetzungen bei den beschriebenen Versuchsbedingungen.



### 3.5.2.2.2 eNOS

Nach der Umsetzung der Testverbindungen mit eNOS zeigt sich eine NO-Freisetzung von 26,6% bezogen auf den Kontrollwert L-Arginin bei Verbindung **17**. Auch Verbindung **14** zeigt mit 17,6% eine deutliche NO Freisetzung. Die meta-substituierte Verbindung **15** hingegen zeigt keine messbare Umsetzung.

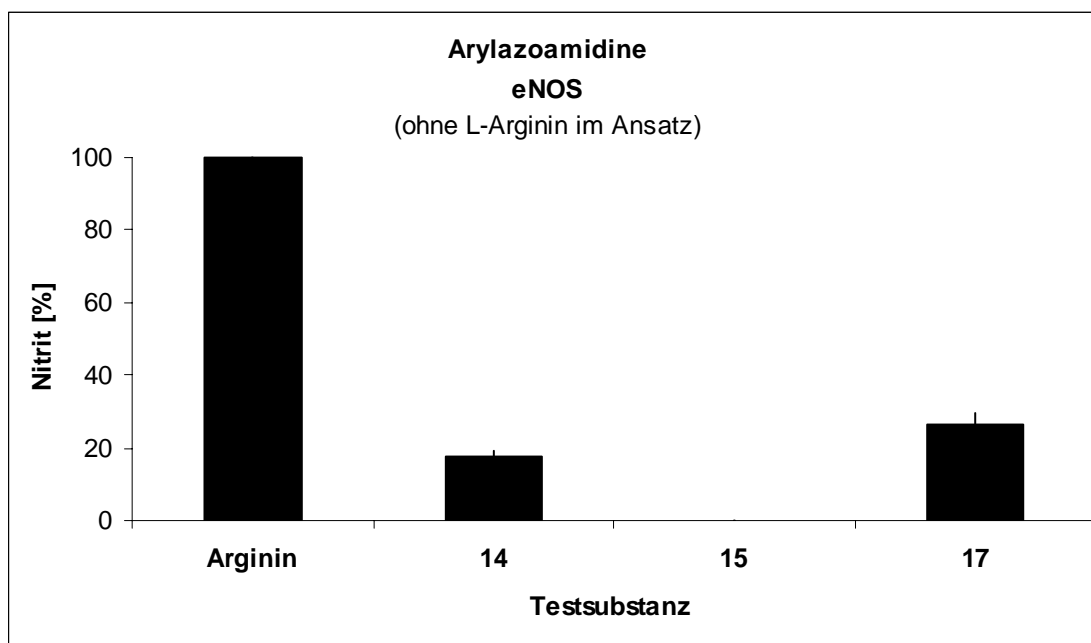


Abb. 38: Durch eNOS freigesetztes Nitrit aus Arylazoamidinen

### 3.5.2.2.3 iNOS

In Abbildung 39 sind die Ergebnisse der Inkubation der Arylazoamidine mit iNOS zu sehen. Auch hier kann überraschenderweise eine Umsetzung beobachtet werden. Die Verbindungen **14** und **17** zeigen mit 19,2% und 11,3% vom Kontrollwert deutliche NO-Freisetzungen. Verbindung **15** hingegen zeigt keine messbare Freisetzung. Da die Verbindungen **14** und **15** sich nur in der Stellung der Chlorsubstitution am Aromaten unterscheiden, spricht dies für eine spezifische Umsetzung der para-substituierte Verbindungen.

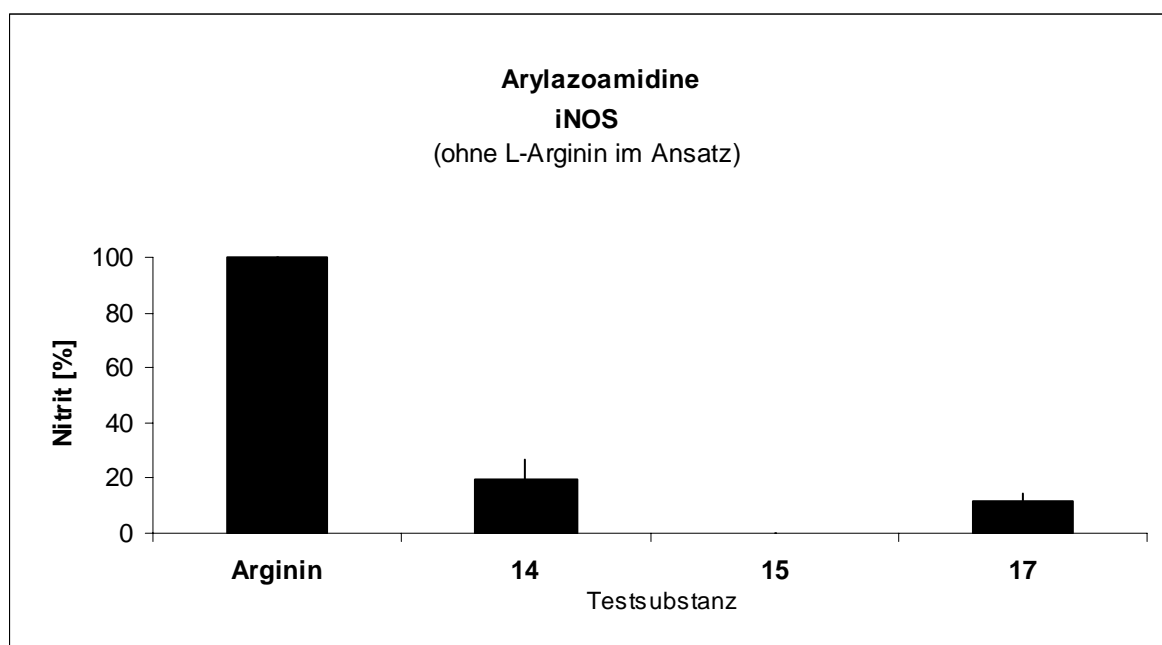


Abb. 39: Durch iNOS freigesetztes Nitrit aus Arylazoamidinen

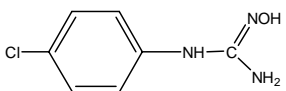
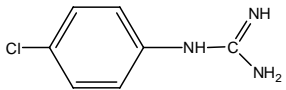
### 3.5.2.3 1-Amidino-2-arylhydrazine

Es wurde keine signifikante NO-Freisetzung unter den gegebenen Bedingungen festgestellt.

### 3.5.2.4 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin (**1**) und 4-Chlorphenylguanidin (**23**)

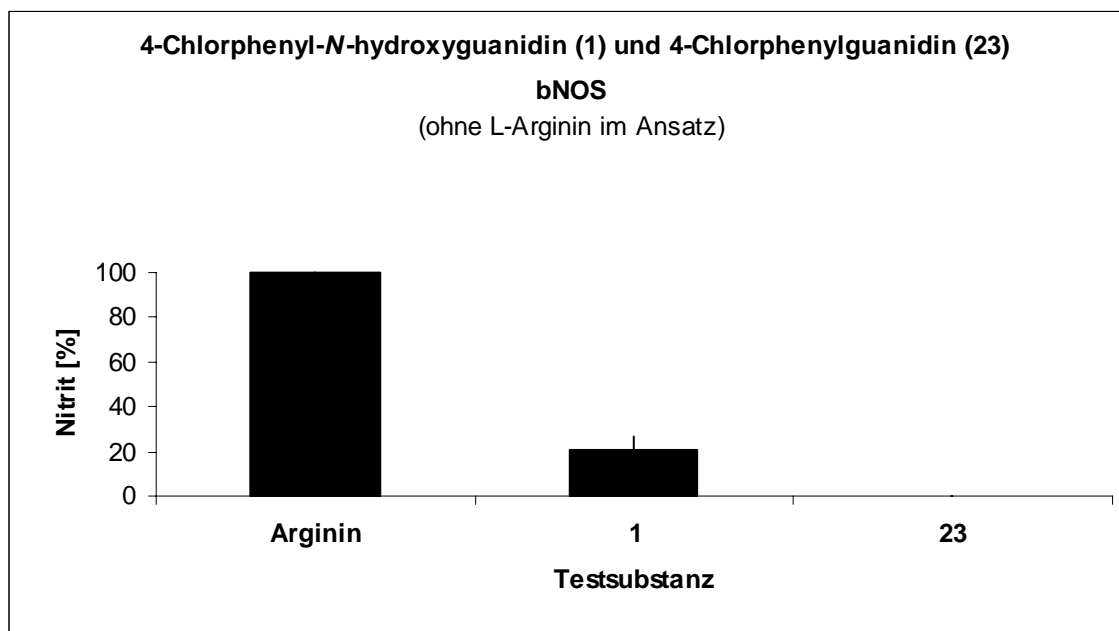
Die Ergebnisse des Hydroxyguanidins **1** und des Guanidins **23** zeigen erwartungsgemäß sehr unterschiedliche NO-Freisetzungen. Während Verbindung **23** keine Umsetzungen zeigt, erreicht Verbindung **1** deutliche Ergebnisse. Vor allem bei der Umsetzung mit eNOS kann die Wirkung der Verbindung mit einer über 230%igen NO-Freisetzung klar detektiert werden.

**Tab. 28:** 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin und 4-Chlorphenylguanidin mit NO-Synthasen inkubiert (ohne Zusatz von L-Arginin)

Stoff	R	Inkubation mit NO-Synthasen (% der Umsetzung mit L-Arginin)					
		bNOS	SD (%)	eNOS	SD (%)	iNOS	SD (%)
L-Arginin	Kontrolle	100	20	100	24.9	100	17.7
<b>1</b>		20.3	6.3	231.9	28.8	31.8	15.7
<b>23</b>		n.q.		n.q.		n.q.	

### 3.5.2.4.1 bNOS

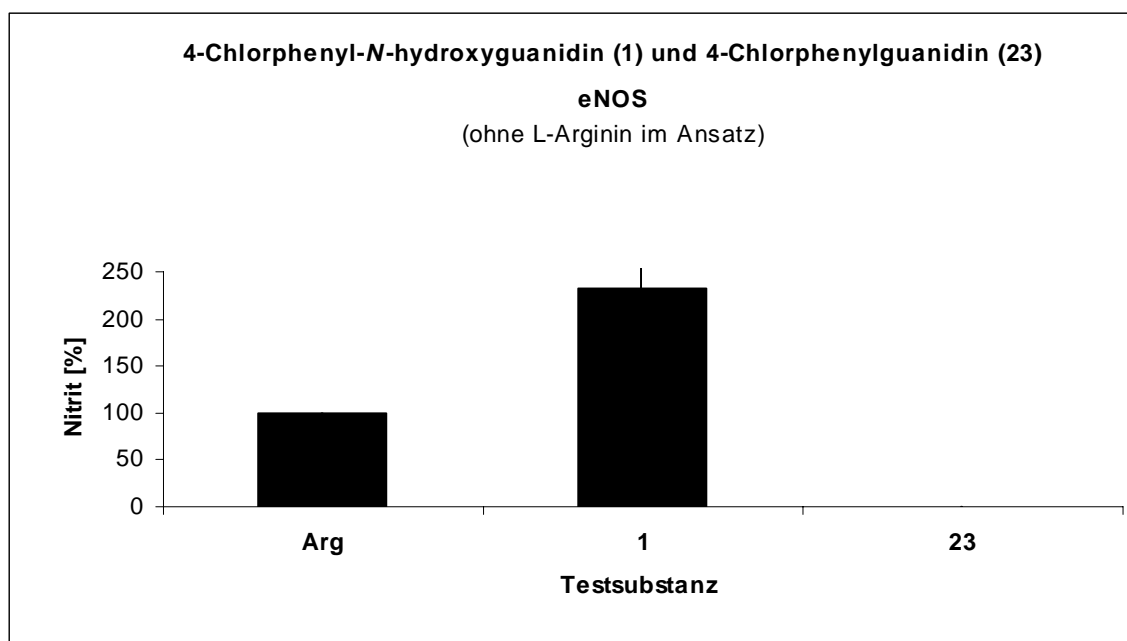
Die Umsetzung der Testsubstanzen mit bNOS führt zu einer 20%igen NO-Freisetzung (bezogen auf die Umsetzung von L-Arginin) bei Verbindung **1**. Damit ist der Effekt bei der Inkubation mit bNOS niedriger als durch die Inkubation von iNOS und eNOS. Verbindung **23** zeigt keinen Effekt.



**Abb. 40:** Durch bNOS freigesetztes Nitrit aus 4-Chlorphenyl-N-hydroxyguanidin und 4-Chlorphenylguanidin

### 3.5.2.4.2 eNOS

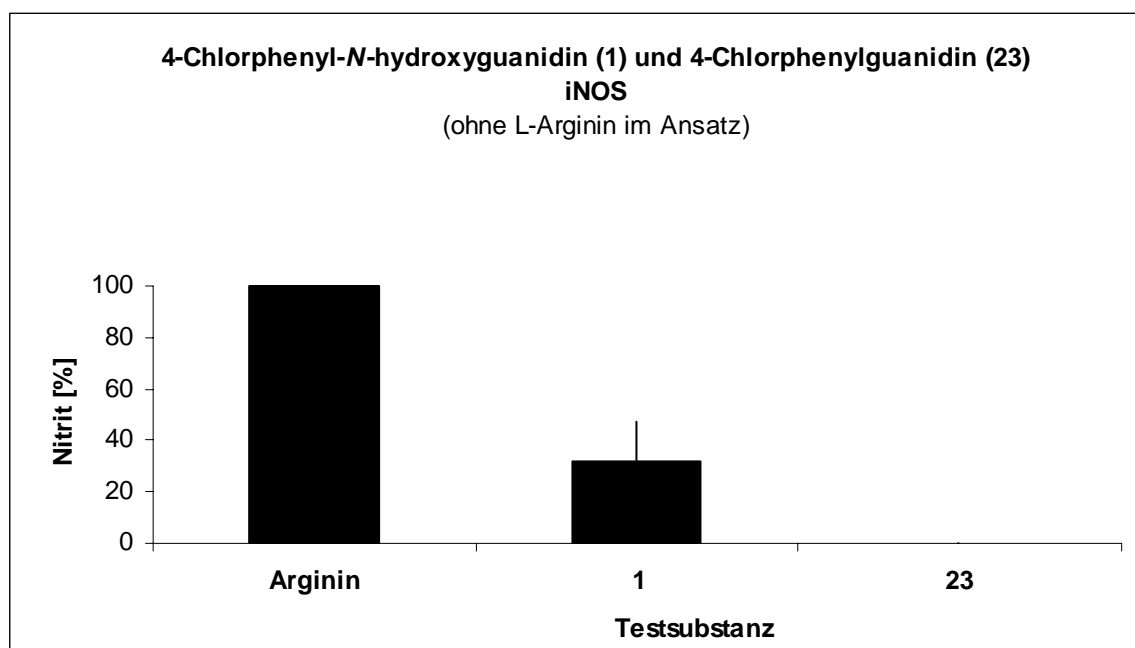
Die Umsetzung des Hydroxyguanidins **1** mit eNOS ergibt die deutlichste NO-Freisetzung aller getesteten Verbindungen dieser Arbeit. Mit einem Wert der mehr als doppelt so hoch ist wie der Wert der Freisetzung mit L-Arginin (231,9%) zeigt die Testverbindung ausgeprägte Affinität zu der getesteten endothelialen NO-Synthase. Da L-Arginin ein gutes körpereigenes Substrat der NO-Synthase ist, kann 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin (**1**) als potentes *in vitro*-Substrat der eNOS bezeichnet werden. Das 4-Chlorphenylguanidin (**23**) zeigt hingegen keinerlei NO-Freisetzung und verhält sich damit erwartungsgemäß.



**Abb. 41:** Durch eNOS freigesetztes Nitrit aus 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin und 4-Chlorphenylguanidin

### 3.5.2.4.3 iNOS

Verbindung **1** setzt auch bei Inkubation mit iNOS unter den angegebenen Bedingungen NO frei. Mit einer Menge von ca 30% der Menge von einer Inkubation mit L-Arginin ist dies ca. um den Faktor 10 weniger als bei der Inkubation mit bNOS und eNOS. Es handelt sich damit um eine spezifische Reaktion.



**Abb. 42:** Durch iNOS freigesetztes Nitrit aus 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin und 4-Chlorphenylguanidin

### 3.5.3 Ergebnisse und Diskussion

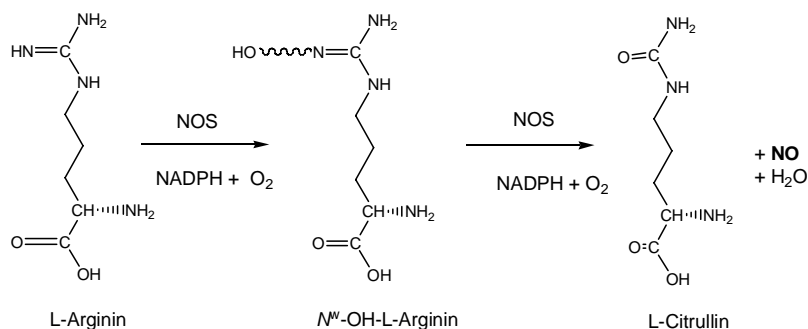
Die Inkubation mit bNOS erzeugte mit 33,8% bei Verbindung **21** die stärkste NO-Freisetzung (Tabelle 26 auf Seite 78). Damit erreichte ein Arylazoamidoxim mit großem Substituenten in para-Stellung die besten Werte. Die zweitgrößte Umsetzung wurde von Verbindung **1** erreicht (Tabelle 28 auf Seite 85). Mit einer NO-Freisetzung von 20,3% verglichen mit der Umsetzung von L-Arginin konnten hier Werte im gleichen Größenbereich gemessen werden.

Fast alle Arylazoamidoxime und alle getesteten Arylazoamidine sowie das Guandin **23** konnten mit Hilfe der bNOS nicht umgesetzt werden. Alleine das Arylazoamidoxim **12** konnte noch eine 15,7%ige Umsetzung erreichen. Aufgrund der allgemein niedrigen Umsetzungsraten ist deutlich geworden, daß keine der getesteten Substanzen bei den beschriebenen Testbedingungen ein gutes Substrat der bNOS ist.

Die endotheliale NO-Synthase setzt viele der Arylazoamidoxime und zeigt sogar bei den Arylazoamidinen **14** und **17** eine NO-Freisetzung von 17,6% bzw 26,6%.

Die Freisetzung von NO aus Arylazoamidinen überrascht, da bisher in der Literatur keine sauerstofffreien NO-Donoren außer L-Arginin bekannt sind [110].

Die NO-Freisetzung aus L-Arginin verläuft in zwei Schritten (Abb. 43). Zunächst entsteht die Zwischenstufe *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-Arginin, die dann in einem weiteren Schritt oxidativ zu L-Citrullin und NO gespalten wird [108].



**Abb. 43:** NOS katalysierte Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO über die Zwischenstufe *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-Arginin

Ausgehend von der These, daß Arylazoamidine analog zu L-Arginin in zwei Schritten umgesetzt werden, überrascht die Tatsache, daß die Arylazoamidoxime nur mäßige bis keine NO-Freisetzung zeigen (Tabelle 26 auf Seite 78). Sie sollten als Zwischenstufe analog zu *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-Arginin von NO-Synthasen umgesetzt werden und schon nach einem Schritt NO freisetzen.

Eine mögliche Erklärung wäre eine Umsetzung der Arylazoamidine in zwei Schritten, zwischen denen sich das Molekül nicht oder nur teilweise vom Enzym ablöst. In diesem Fall würde das Arylazoamidoxim als Zwischenstufe nur temporär in einem Komplex mit dem Enzym vorliegen. Dies würde die geringere NO-Freisetzung der Arylazoamidoxime erklären.

Um diese These zu untermauern, wurde nach dem potentiellen Produkt der Reaktion von 4-Chlorphenylazoamidin mit iNOS gesucht. Dazu wurde das Citrullin-Analogon 4-Chlorphenylazocarboxamid synthetisiert und eine HPLC-Analytik entworfen. Nach der Inkubation von Verbindung **14** mit iNOS unter den oben beschriebenen Bedingungen "Durchführung des Nitrit-Assays ohne Anwesenheit von L-Arginin" auf Seite 139 konnte jedoch kein 4-Chlorphenylazocarboxamid detektiert werden. Somit konnte vorerst nicht geklärt werden, mit welchem Mechanismus die Arylazoamidine (Verbindungen **14** und **17**) NO freisetzen. Hier besteht noch Klärungsbedarf.

4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin (**1**) stellt ein echtes Substrat für die eNOS dar. Es konnte in diesem *in vitro* -Versuch mehr als doppelt so stark umgesetzt werden wie das physiologische Substrat L-Arginin (231,9%).

Auch die iNOS konnte das 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin (**1**) am besten umsetzen (31,8%). Als weitere Verbindungen ließen sich die Arylazoamidoxime **5** (27,8%) und **21** (20,1%) umsetzen. Die Arylazoamidine **14** und **17** können auch bei Gegenwart von diesem Isoenzym der NO-Synthase umgesetzt werden und erreichen überraschenderweise 19,2% und 11,3%.

Erstauulich schlecht schnitt Verbindung **4** ab. Dieses Arylazoamidoxim ist sowohl dem 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin (**1**) als auch dem 4-Chlorphenylazoamidin (**14**) strukturell sehr ähnlich, konnte aber keine NO-Freisetzung zeigen. Es scheint eine sehr spezifische Struktur nötig zu sein, um eine Umsetzung mit einem der Enzyme zu ermöglichen. Die strukturellen Unterschiede der drei Isoenzyme werden deutlich, wenn man die bevorzugten Substrate und ihre Umsetzungsraten mit den jeweiligen Isoenzymen vergleicht.



### 3.5.4 Inkubation bei Anwesenheit von L-Arginin

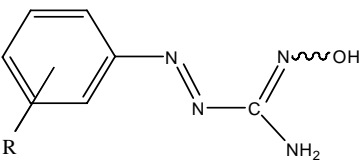
Im menschlichen Körper liegen Arzneistoffe nicht isoliert, sondern neben körpereigenen Stoffen vor. Sie unterliegen damit vielfältigen Interaktionen. Um einen Einfluß der Testsubstanzen auf die NO-Synthasen bei Anwesenheit des natürlichen Substrats L-Arginin zu testen, wurde den Inkubationsansätzen L-Arginin hinzugegeben. (Methode siehe Seite 144, Kapitel 6.5.2.1).

### 3.5.5 Ergebnisse der Inkubation mit NO-Synthasen bei Anwesenheit von L-Arginin

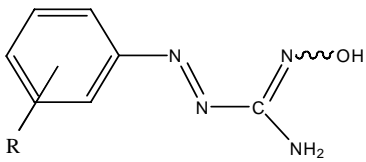
#### 3.5.5.1 Arylazoamidoxime

Die untersuchten Arylazoamidoxime haben bei Anwesenheit von L-Arginin eine zum Teil deutlich aktivierende Wirkung auf die NO-Synthasen (Tab. 29). Einige Verbindungen zeigen keine oder nur eine geringe Veränderung der Nitritmengen im Nitrit-Assay. Unter ihnen sind vor allem ortho- und meta-halogensubstituierte Verbindungen **7**, **8**, **9** und **10**. Einige der para-substituierten Verbindungen (**4** und **21**) aktivieren die NO-Synthasen sehr deutlich.

Tab. 29: Arylazoamidoxime mit NO-Synthasen inkubiert (mit Zusatz von L-Arginin)

		<b>Arylazoamidoxime</b> <b>Inkubation mit NO-Synthasen</b> <b>bei Anwesenheit von 0,5 mM L-Arginin</b> <b>(% Freisetzung bezogen auf den Kontrollwert)</b>					
Stoff	R	bNOS	SD (%)	eNOS	SD (%)	iNOS	SD (%)
L-Arginin	Kontrolle	100	1	100	25	100	24
<b>4<sup>a</sup></b>	4-Chlor-	332	9	388	25	484	29
<b>5<sup>a</sup></b>	4-Fluor-	140	12	105	10	149	2
<b>7</b>	3-Chlor-	103	3	107	2	112	7
<b>8</b>	2-Chlor-	107	2	115	3	113	8
<b>9</b>	3-Fluor-	100	4	99	4	100	8
<b>10</b>	2-Fluor-	93	3	96	6	87	13

Tab. 29: Arylazoamidoxime mit NO-Synthasen inkubiert (mit Zusatz von L-Arginin)

		<b>Arylazoamidoxime</b> <b>Inkubation mit NO-Synthasen</b> <b>bei Anwesenheit von 0,5 mM L-Arginin</b> <b>(% Freisetzung bezogen auf den Kontrollwert)</b>					
Stoff	R	bNOS	SD (%)	eNOS	SD (%)	iNOS	SD (%)
21	4-Phenyl-(0,1mM)	310	7	387	10	507	5
22	2,6-Dichlor-	183	5	150	30	193	15

a.synthetisiert von *Bade* [68]

### 3.5.5.1.1 bNOS

Unter der Inkubation mit eNOS bei Anwesenheit von L-Arginin zeigen vier der getesteten Verbindungen deutlich gesteigerte Nitritwerte (Abb. 44). Verbindung **5** steigert die Nitritmenge auf 140 % bezogen auf den Kontrollwert. Verbindung **22** zeigt mit 183 % fast eine Verdopplung der gemessenen Nitritmenge. Mehr als eine Verdreifachung der Werte wird durch Zusatz der Stoffe **4** (332 %) und **21** (310 %) erhalten.

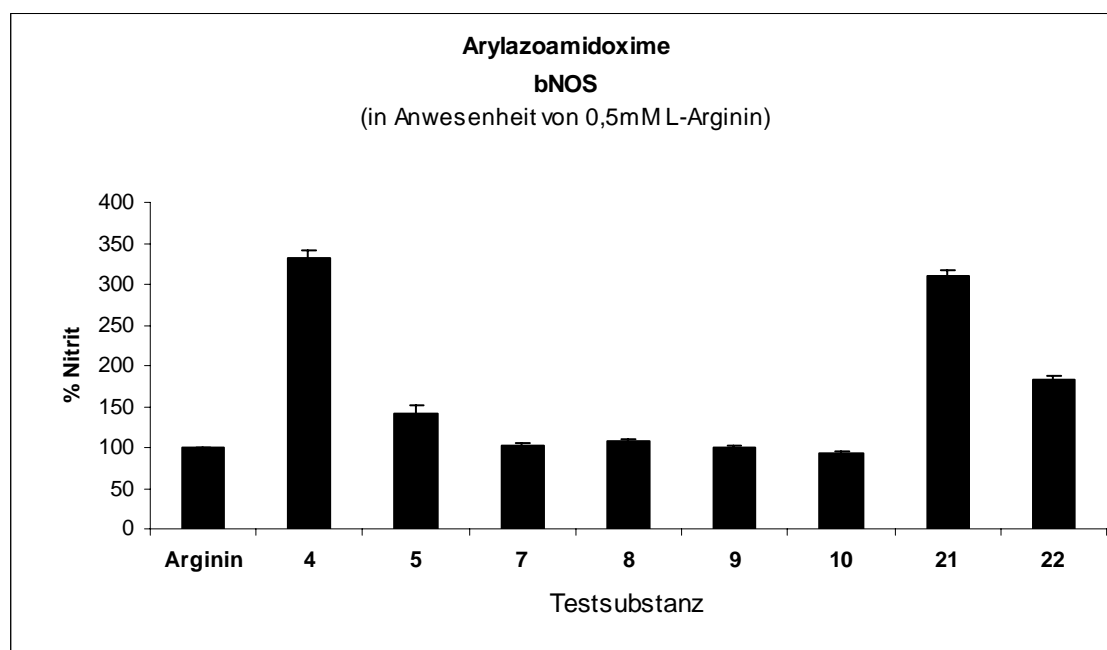
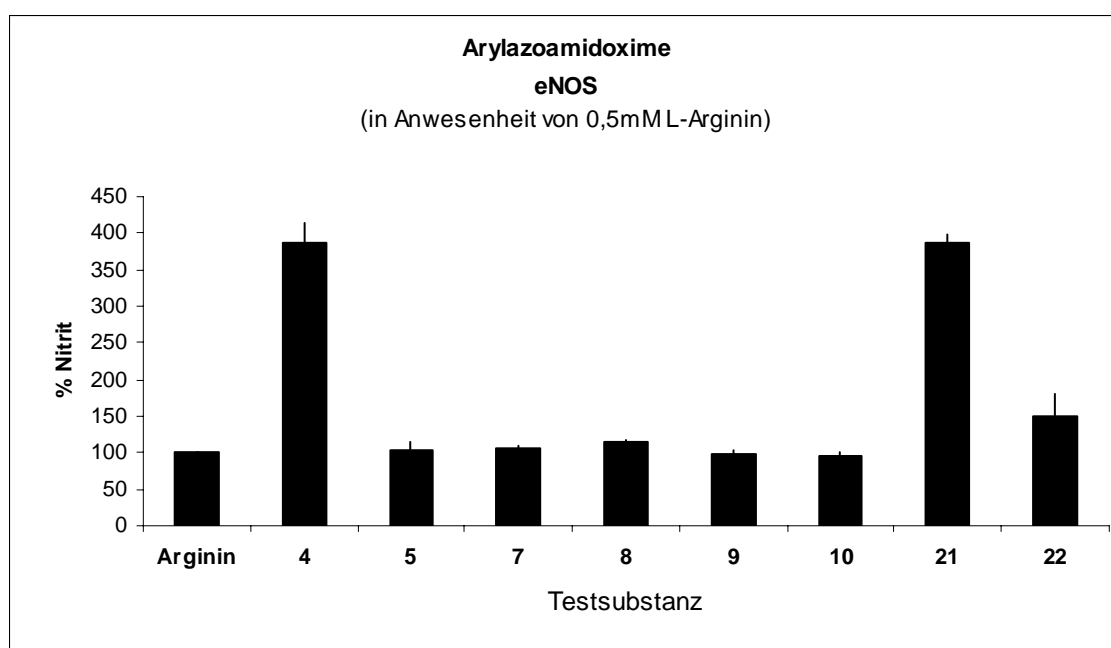


Abb. 44: Prozentuale NO-Freisetzung der Arylazoamidoxime durch bNOS bei Anwesenheit von 0,5 mM L-Arginin

### 3.5.5.1.2 eNOS

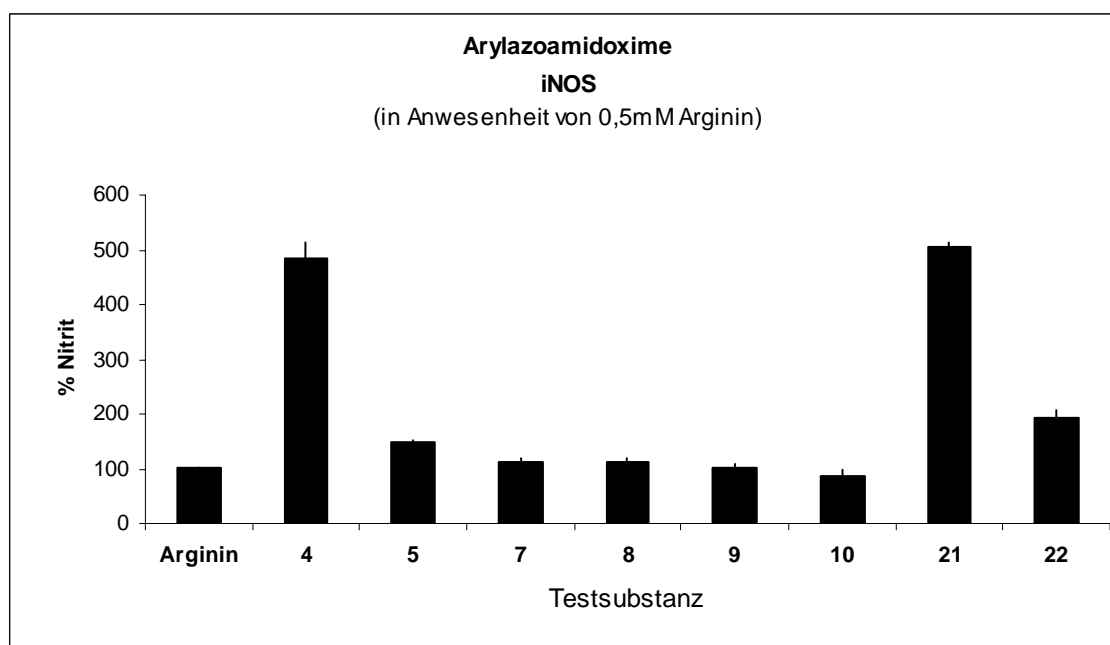
Die Aktivierung der eNOS erfolgt durch drei der getesteten Verbindungen im deutlichen Maße (Abb. 45). Verbindung **22** bedingt eine Steigerung der detektierten Nitritmenge auf 150 % bezogen auf den Kontrollwert. Die stärksten Aktivierungen konnten aber nach der Inkubation mit Verbindung **4** (388 %) und Verbindung **21** (387 %) gemessen werden. Diese beiden Substanzen erreichen damit fast eine Vervierfachung des L-Arginin-Effekts.



**Abb. 45:** Prozentuale NO-Freisetzung der Arylazoamidoxime durch eNOS bei Anwesenheit von 0,5 mM L-Arginin

### 3.5.5.1.3 iNOS

Die iNOS kann durch die hier getesteten Verbindungen am stärksten aktiviert werden (Abb. 46). Die Verbindungen **5** und **22** erreichen mit 149 % bzw. 193 % gute aktivierende Eigenschaften. Dieser Effekt wird aber durch die beiden Verbindungen übertroffen, die auch schon die bNOS und die eNOS am stärksten aktiviert haben. Verbindung **4** erreicht mit 484 % und Verbindung **21** mit 507 % eine Verfünffachung der detektierten Nitritmenge bezogen auf den Kontrollwert. Diese Verbindungen zeigen damit die stärkste NO-Synthase-Aktivierung, die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde.



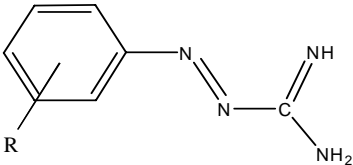
**Abb. 46:** Prozentuale NO-Freisetzung der Arylazoamidoxime durch iNOS bei Anwesenheit von 0,5 mM L-Arginin

### 3.5.5.2 Arylazoamidine

Durch den Zusatz von L-Arginin zu den typischen Inkubationsansätzen (“Durchführung des Nitrit-Assays ohne Anwesenheit von L-Arginin” auf Seite 139) der Arylazoamidine **14** und **17** ergibt sich eine Hemmung der NO-Freisetzung (Tabelle 30 auf Seite 95). Verbindung **17** zeigt hier die stärkste Enzymhemmung. Diese Hemmung ist mit Nitritmengen auf 25 % (bNOS), 9 % (eNOS) und 31 % (iNOS) bezogen auf den Kontrollwert allerdings eher gering. Als stärkstes wird die eNOS gehemmt. Die Nitritmengen, die durch die beiden anderen Isoenzyme freigesetzt

werden, sind allerdings nicht viel höher, so daß man hier nicht von einer spezifischen Hemmung sprechen kann.

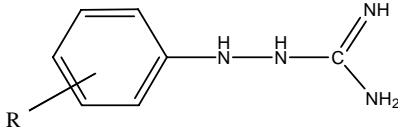
**Tab. 30:** Arylazoamidine mit NO-Synthasen inkubiert (mit Zusatz von L-Arginin)

		<b>Arylazoamidine</b> <b>Inkubation mit NO-Synthasen</b> <b>bei Anwesenheit von 0,5 mM L-Arginin</b> <b>(% der Umsetzung mit L-Arginin)</b>					
Stoff	R	bNOS	SD (%)	eNOS	SD (%)	iNOS	SD (%)
<b>L-Arginin</b>	Kontrolle	100	1	100	25	100	24
<b>14</b>	4-Chlor-	67	13	29	2	67	7
<b>17</b>	4-Fluor-	25	1	9	5	31	3

### 3.5.5.3 1-Amidino-2-arylhydrazine

Der Zusatz der 1-Amidino-2-arylhydrazine **14a** und **17a** in einen L-Arginin enthaltenden Inkubationsansatz führt zu einer schwachen Hemmung der NO-Synthasen (Tabelle 31 auf Seite 95). Verbindung **17a** zeigt hier die stärksten Hemmungen mit Nitritmengen auf 34 % (bNOS), 13 % (eNOS) und 12 % (iNOS) bezogen auf den Kontrollwert. Diese Werte können allerdings nur als schwache Hemmung der NO-Synthasen beurteilt werden. Es liegt auch keine eindeutige Spezifität vor. Alle 3 Isoenzyme werden ähnlich stark gehemmt.

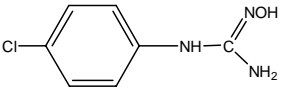
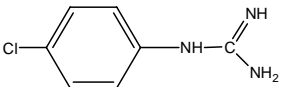
**Tab. 31:** 1-Amidino-2-arylhydrazine mit NO-Synthasen inkubiert (mit Zusatz von L-Arginin)

		<b>1-Amidino-2-arylhydrazine</b> <b>Inkubation mit NO-Synthasen</b> <b>bei Anwesenheit von 0,5 mM L-Arginin</b> <b>(% der Umsetzung mit L-Arginin)</b>					
Stoff	R	bNOS	SD (%)	eNOS	SD (%)	iNOS	SD (%)
<b>L-Arginin</b>	Kontrolle	100	1	100	25	100	24
<b>14a</b>	4-Chlor-	69	20	22	3	46	4
<b>17a</b>	4-Fluor-	34	3	13	2	12	1

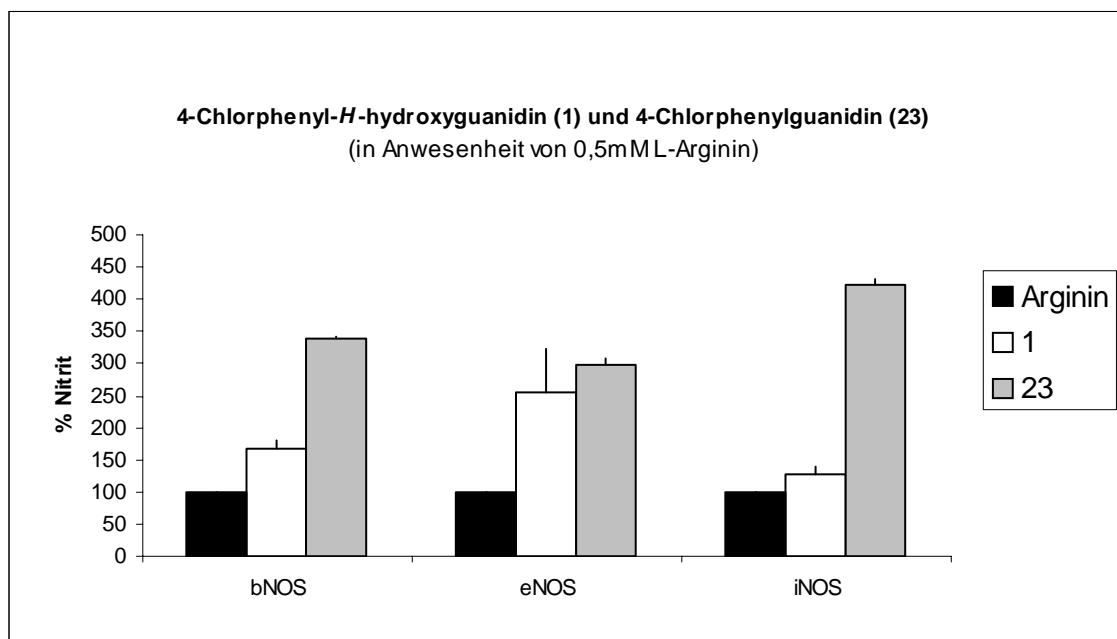
### 3.5.5.4 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin (**1**) und 4-Chlorphenylguanidin (**23**)

Beide untersuchten Stoffe erhöhen die Menge an Nitrit, die nach Inkubation mit NO-Synthasen und L-Arginin detektiert werden kann. In Tabelle 32 ist ersichtlich, daß vor allem das 4-Chlorphenylguanidin **23** einen sehr stark aktivierenden Einfluß ausübt. Die gemessenen Nitritmengen steigen durch Zusatz von **23** auf bis zu 422 % (iNOS) bezogen auf den Kontrollwert. Auch die Werte der bNOS-(338 %) und eNOS-Inkubation (297 %) belegen eine sehr starke NO-Synthaseaktivierung, die aber nicht sehr spezifisch ist, da alle 3 Isoenzyme aktiviert werden (Abb. 47).

**Tab. 32:** 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin und 4-Chlorphenylguanidin mit NO-Synthasen inkubiert (mit Zusatz von L-Arginin)

		<b>Inkubation mit NO-Synthasen bei Anwesenheit von 0,5 mM L-Arginin (% der Umsetzung mit L-Arginin)</b>					
<b>Stoff</b>	<b>R</b>	<b>bNOS</b>	<b>SD (%)</b>	<b>eNOS</b>	<b>SD (%)</b>	<b>iNOS</b>	<b>SD (%)</b>
L-Arginin	Kontrolle	100	1	100	25	100	24
<b>1</b>		169	10	254	68	128	11
<b>23a</b>		338	5	297	11	422	10

a.von D. Mansuy, Paris



**Abb. 47:** Inkubation von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin (**1**) und 4-Chlorphenylguanidin (**23**) mit NO-Synthasen bei Anwesenheit von L-Arginin.

### 3.5.6 Ergebnisse und Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß die untersuchten Arylazoamidoxime **4**, **5**, **21** und **22**, das *N*-Hydroxyguanidin **1** und das Arylguanidin **23** einen zum Teil stark aktivierenden Einfluß auf die drei getesteten humanen NO-Synthasen (bNOS, eNOS und iNOS) haben. Es wurde als höchster Wert die fünffache Nitritmenge des Kontrollwerts gefunden. Die Verbindungen **4**, **21** und **23** stellen die potentesten Aktivatoren der NO-Synthasen dieser Arbeit dar.

Dieser Einfluß zeigt sich nur bei zusätzlicher Anwesenheit von L-Arginin. Ohne L-Arginin im Ansatz ergibt sich maximal eine Nitritmenge von 33,8% (Verbindung **21** bNOS) bezogen auf den L-Arginin-Kontrollwert (Tabelle 26 auf Seite 78).

Die Abhängigkeit der Aktivierung der NO-Synthasen von dem natürlichen Substrat L-Arginin läßt vermuten, daß neben der Bindungsstelle für L-Arginin noch mindestens eine weitere Bindungsstelle für Aktivatoren an NO-Synthasen vorhanden ist. Die fehlende Spezifität der getesteten Substrate läßt außerdem auf ähnliche Strukturen der drei Isoenzyme in den Bindungsregionen schließen.

Verbindung **22** ist die einzige Verbindung, die einen aktivierenden Effekt und keine para-substituierte Struktur aufweist. Verbindung **22** weist mit seiner 2,6-Dichlorphenyl-Substitution eine symmetrische Anordnung der Halogene auf.

Doch die Halogensubstituierung scheint nicht entscheidend für die Aktivierung zu sein, da Verbindung **21** eine para-Phenyl-Substitution aufweist. Auch die Azoamidoxim-Struktur kann anscheinend durch die *N*-Hydroxyguanidin-oder die Guanidin-Struktur von Verbindung **1** bzw. **23** ersetzt werden.

Die getesteten Arylazoamidine und 1-Amidino-2-arylhydrazine zeigen eine Hemmung der NO-Synthaseaktivität maximal um den Faktor 10 (Tabelle 30 und Tabelle 31). Die stärkste Hemmung wird von Verbindung **17** und **17a** auf 9% (eNOS) bzw. 12% (iNOS) verursacht.

Verbindung **17** und **17a** sind zwar para-substituiert, jedoch nimmt die Fluor-Substitution einen kleineren Raum ein, als die Chlor- und die Phenyl-Substitution. Auch Verbindung **5** ist para-fluor-substituiert, und liegt mit seiner Aktivierung weit hinter der para-chlor-substituierten Verbindung **4** zurück.



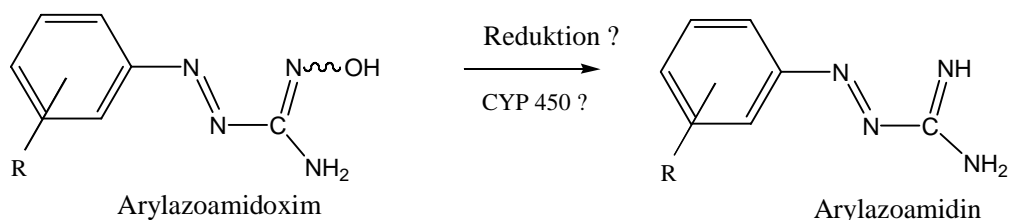
- Eine Strukturvoraussetzung zur NO-Synthase-Aktivierung könnte demnach ein größerer Substituent in para-Stellung des Aromaten sein.
- Fast alle NO-Synthase-Aktivatoren dieser Arbeit stellen *N*-hydroxylierte Verbindungen dar. Allerdings gibt es auch ein stark aktivierendes Arylguanidin (**23**).
- Die NO-Synthase-Inhibitoren dieser Arbeit sind fast ausschließlich unhydroxylierte Verbindungen.
- Es lässt sich sowohl bei der Hemmung als auch bei der Aktivierung keine eindeutige Spezifität für einzelne Isoenzyme erkennen.



## 3.6 Reduktion der Arylazoamidoxime

### 3.6.1 Zielsetzung

Arzneistoffe sind im menschlichen Körper zahlreichen Biotransformationsreaktionen ausgesetzt. Die Reduktion ist nur eine von vielen möglichen Biotransformationsreaktionen. Da die Reduktion von strukturverwandten *N*-Hydroxyguanidinen durch das Cytochrom P450-Enzymsystem schon von *Clement* [15] gezeigt werden konnte, sollte diese Reduktion der Testsubstanzen durch *in vitro*-Biotransformationsstudien näher untersucht und charakterisiert werden. Diesbezügliche Untersuchungen wurden zu den Arylazoamidoximen noch nicht durchgeführt. Die zu untersuchende Reduktion der Arylazoamidoxime an der Oximfunktion führt zu den Arylazoamidinen.



**Abb. 48:** Potentielle Reduktion der Arylazoamidoxime zu den Arylazoamidinen

Um diese prinzipiell mögliche Reduktion nachweisen zu können, wurden verschiedene Enzymsysteme eingesetzt, die diese Reaktion katalysieren könnten. Verwendet wurden Leber- und Nierenmikrosomen, Leber- und Nierenmitochondrien und 9000g Überstände, die jeweils von Schweinen oder Menschen stammten. Methode siehe "Reduktion der Arylazoamidoxime" auf Seite 148.

### 3.6.1.1 Ergebnisse der Reduktion der Arylazoamidoxime

Nach der Inkubation der drei getesteten Substanzen zeigt sich kein einheitliches Bild der Reduktion (Tab. 33). Die Testsubstanzen werden unterschiedlich stark in Gegenwart der Enzyme aus den verschiedenen Quellen reduziert.

**Tab. 33:** Ergebnisse der enzymatischen Reduktion von drei Arylazoamidoximen mit verschiedenen Enzymquellen.

Enzymquelle	Spezifische Aktivität [nmol/min/mg Protein]		
	4-Chlorphenyl-	4-Fluorphenyl-	3-Chlorphenyl-
Lebermitochondrien, human	1,22	0,00	0,10
Lebermitochondrien, porcine	0,81	1,04	0,17
Nierenmitochondrien, human	3,25	0,00	0,12
Nierenmitochondrien, porcine	3,92	1,77	0,17
Lebermikrosomen, human	17,16	2,89	0,38
Lebermikrosomen, porcine	1,68	0,11	0,11
Nierenmikrosomen, human	6,17	0,00	0,12
Nierenmikrosomen, porcine	1,99	0,20	0,12
9000g-Überstand, humane Leber	9,49	0,89	0,08
9000g-Überstand, porcine Leber	1,72	0,14	0,10
9000g-Überstand, humane Niere	3,69	0,00	0,14
9000g-Überstand, porcine Niere	1,89	0,38	0,08

Am stärksten erfolgt die Reduktion des 4-Chlorphenylazoamidoxims (**4**). Hier wird eine spezifische Aktivität von 17,16 nmol/min/mg Protein durch die humanen Lebermikrosomen erreicht. Auffallend ist, daß das 4-Chlorphenylazoamidoxim von allen Enzymquellen bis auf die Nierenmitochondrien immer von der humanen Version besser reduziert wird als von der porcinen. Bezogen auf die Lebermikrosomen zeigt sich eine 10-fach stärkere Reduktion durch die humanen

Enzyme (Tab. 33). Von allen porcinen Enzymquellen wird das 4-Chlorphenylazoamidoxim (**4**) am besten durch die porcinen Nierenmitochondrien reduziert (3,92 nmol/min/mg Protein).

Das 4-Fluorphenylazoamidoxim (**5**) wird deutlich weniger durch die verwendeten Enzymsysteme reduziert als Verbindung **4**. Die maximale spezifische Aktivität (2,89 nmol/min/mg Protein) wird jedoch ebenfalls bei der Umsetzung mit den humanen Lebermikrosomen erreicht. Dies entspricht etwa 1/6 der Reduktion von Verbindung **4** durch die gleiche Enzymquelle. Verbindung **5** wird zum Teil auch von porcinen Enzymquellen besser reduziert als von humanen (Lebermitochondrien, Nierenmitochondrien, Nierenmikrosomen und 9000g-Überstand Niere). Bei den humanen Enzymquellen ist keine Reduktion von Verbindung **5** nachweisbar.

Verbindung **7** wird von den drei getesteten Verbindungen am wenigsten reduziert. Die Enzymquellen zeigen hier maximal eine spezifische Aktivität von 0,38 nmol/min/mg Protein. Dieses Ergebnis wird von den humanen Lebermikrosomen erreicht. Damit zeigen diese auch bei Verbindung **7** die stärkste Reduktion.

### 3.6.1.2 Diskussion

Es wurde hier die enzymatische Reduzierbarkeit von drei verschiedenen Arylazoamidoximen getestet. Die verwendeten Enzyme stammten zum Teil vom Menschen und zum Teil von Schweinen. Es ergaben sich uneinheitliche Ergebnisse. Das 4-Chlorphenylazoamidoxim wurde besser von humanen Enzymen reduziert als von porcinen Enzymen. Das 4-Fluorphenylazoamidoxim wurde eher von porcinen Enzymen umgesetzt, wobei die Umsetzungsraten deutlich geringer ausfielen. Das 3-Chlorphenylazoamidin wurde von den drei Verbindungen am wenigsten reduziert (siehe Tabelle 33 auf Seite 102). Es kann jedoch festgehalten werden, daß alle drei Verbindungen durch einige der vorliegenden Enzymsysteme (Tabelle 41 auf Seite 155) reduziert werden.

Ziel dieser Testreihe war, die Reduktion der potentiellen Wirkstoffe zu untersuchen. Dabei ist davon ausgegangen worden, daß die durch die Reduktion der Arylazoamidoxime entstehenden Arylazoamide eine Inaktivierung bedeuten würde. Allerdings zeigen die Ergebnisse der NO-Freisetzung durch NO-Synthasen, daß Arylazoamide NO freisetzen (Abbildung 27 auf Seite 82) -und zwar teilweise besser als die analogen Arylazoamidoxime (Abbildung 26 auf Seite 78). Die Reduktion muß also in diesem Fall aus einem anderen Blickwinkel betrachtet werden. Bei der Reduktion der Arylazoamidoxime könnte es sich in diesem Fall also teilweise um eine Aktivierung handeln.

