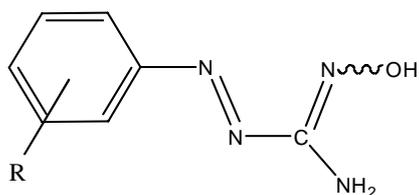


4 Zusammenfassung

4.1 Ergebnisse

Die Arylazoamidoxime **4**, **5** und **10** liefern im Born-Test eine gute (nach Tabelle 34 auf Seite 126) *in vitro*-Thrombozytenaggregationshemmung (Tabelle 9 auf Seite 44).



Arylazoamidoxime	
Verbindung	R
4	4-Chlor-
5	4-Fluor-
7	3-Chlor-
8	2-Chlor-
9	3-Fluor-
10	2-Fluor-
12	4-Trifluormethyl-
21	4-Phenyl-
22	2,6-Dichlor-

Im *in vivo*-Laser-Thrombose-Modell erreicht Verbindung **4** mit einer 22%igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen die besten Werte aller getesteten Verbindungen (Tabelle 13 auf Seite 50). Die Verbindungen **10**, **9** und **21** erreichen eine ca. 10%ige Hemmung der Thrombusbildung.

Die Verbindungen **9**, **4**, **8** und **5** zeigen im Blutdruckmodell bei einer Konzentration von 60mg/kg eine deutliche Blutdrucksenkung (maximal 21%). Die Ergebnisse der beiden *in vivo*-Testmodelle, in denen die Substanzen oral verabreicht werden, zeigen, daß sie resorbiert worden sind.

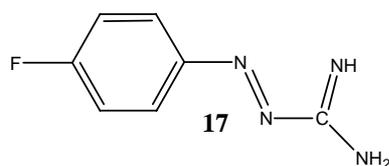
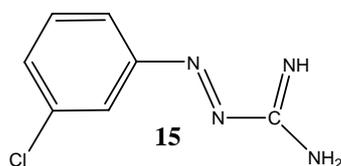
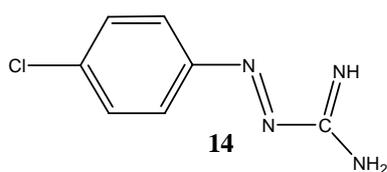
Die Arylazoamidoxime **5** und **4**, außerdem **22**, **12** und **21** zeigen die besten Ergebnisse bei der Lachgas-Bestimmung (Tabelle 21 auf Seite 66). Hierdurch wird ihre gute Oxidierbarkeit belegt.

Die Umsetzungen der Verbindungen **5**, **12** und **21** mit NO-Synthasen ohne L-Arginin ergeben NO-Freisetzungen von max. 15,7%-33,8% der Freisetzung durch L-Arginin (Tabelle 26 auf Seite 78). Die Verbindungen **12** und **21** hatten im Blutdruckmodell keine signifikante Blutdrucksenkung ergeben. Da sie jedoch eine signifikante *in vivo*-Hemmung der Thrombusbildung zeigten, sind auch diese resorbiert worden.

Bei der Umsetzung mit NO-Synthasen bei Anwesenheit von L-Arginin aktivieren die Verbindungen **21**, **5**, **4** und **22** die Enzyme weit über das Maß ihrer eigenen Umsetzung in Gegenwart des Enzyms. So erzielt Verbindung **21** bei der Umsetzung mit iNOS 20,1% der Nitritmenge der Umsetzung von L-Arginin mit iNOS. Hingegen wird bei der Anwesenheit von L-Arginin bei der Inkubation 507% der Nitritmenge bezogen auf den Kontrollwert mit L-Arginin erreicht

(Tabelle 29 auf Seite 91). Damit wirkt Verbindung **21** als Aktivator der iNOS. Diese Aktivierung wird wahrscheinlich durch einen allosterischen Effekt ausgelöst, d.h. der Effektor bindet oder wechselwirkt in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms und verändert so die Konformation derart, daß das Substrat L-Arginin besser an die Bindungsstelle gelangen bzw. eine stärkere Bindung eingehen kann.

Es fällt auf, daß Verbindung **4** keinerlei Umsetzung in Gegenwart der NO-Synthasen ohne Anwesenheit von L-Arginin erreicht. Die Anwesenheit von L-Arginin bei der Inkubation bewirkt jedoch einen deutlichen Anstieg der NO-Freisetzung bis auf 484% des Kontrollwerts bei der iNOS. Da alle drei Isoenzyme aktiviert werden, liegt jedoch keine Spezifität für ein Isoenzym vor.



Die Arylazoamidine **17** und **14** zeigen mit halbmaximalen Hemmkonzentrationen von 3 $\mu\text{mol/L}$ und 14 $\mu\text{mol/L}$ die besten Thrombozytenaggregationshemmungen im Born-Test (Tabelle 10 auf Seite 45). Beim Laser-Thrombose-Modell zeigt Verbindung **14** mit einer 8%igen Hemmung in den Arteriolen signifikante *in vivo*-thrombushemmende Eigenschaften.

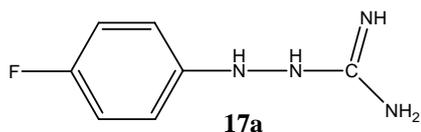
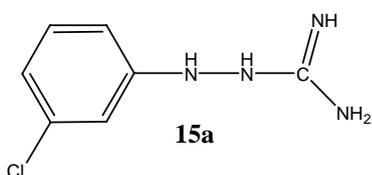
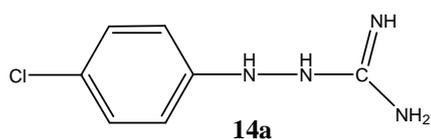
Die *in vivo*-blutdrucksenkenden Eigenschaften von Verbindung **14** und **17** sind die stärksten hier gemessenen (Verbindung **14**: 30mg/Kg = 15% Blutdrucksenkung; 60mg/Kg = 34%; Verbindung **17**: 30mg/Kg = 11%). Sie liegen damit im Bereich der Referenzsubstanz Molsidomin (Tabelle 18 auf Seite 58). Der

Mechanismus dieser Blutdrucksenkung ist nicht geklärt. Überraschend ist jedoch die Umsetzung der Arylazoamidine in Gegenwart von NO-Synthasen (eNOS und iNOS) ohne Anwesenheit von L-Arginin (Tabelle 27 auf Seite 82). Dieser Effekt ist allerdings mit maximal 26,6% der Nitritmenge der Kontrollsubstanz L-Arginin nicht sehr stark und vermag wahrscheinlich nicht, die deutliche Blutdrucksenkung zu erklären. Auf Grund der Strukturähnlichkeiten wäre ein blutdrucksenkender Mechanismus analog zu dem Arzneistoff Guanfacin (Abbildung 30 auf Seite 61)

denkbar. Guanfacin aktiviert zentrale α_2 -Rezeptoren und senkt durch die Verringerung der Noradrenalinausschüttung den Blutdruck.

Andererseits hemmen die Substanzen **14** und **17** die NO-Synthasen im *in vitro*-Test bei Anwesenheit von L-Arginin maximal um 90%, woraus eine Blutdruckerhöhung resultieren könnte (Tabelle 30 auf Seite 95). Im *in vivo*-Test kann jedoch eine deutliche Blutdrucksenkung beobachtet werden.

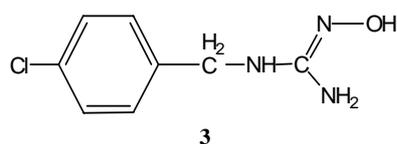
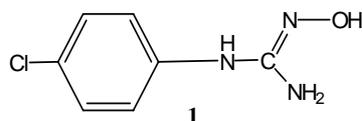
Verbindung **15** liefert als einzige meta-substituierte Verbindung der getesteten Arylazoamidine fast durchgängig geringe oder keine Umsetzungen. Dies könnte mit sehr spezifischen Enzym-Substrat-Reaktionen erklärt werden, bei denen eine meta-substituierte Verbindung nicht in das aktive Zentrum der Enzyme paßt.



Die 1-Amidino-2-arylhydrazine zeigen zwar keine *in vitro* Thrombozytenaggregationshemmung im Born-Test, jedoch eine signifikante Hemmung der Thrombusbildung im *in vivo*-Laser-Thrombose-Modell. Die Ergebnisse vor allem von Verbindung **14a** im *in vivo* Blutdruckmodell zeigen ähnlich gute Blutdrucksenkungen wie die der Arylazoamidine (Tabelle 19 auf Seite 59). Da hier weder eine Oxidierbarkeit im Chemilumineszens- oder Lachgas-Test gemessen und auch keine Umsetzung mit NO-Synthasen festgestellt werden konnte, ist auch hier eine Blutdrucksenkung analog zu Guanfacin (siehe oben) möglich. Dieser Mechanismus würde aber die

Verringerung der Thrombusbildung *in vivo* nicht erklären. Anscheinend wirken die 1-Amidino-2-arylhydrazine nur *in vivo*.

Bemerkenswert ist auch bei dieser Verbindungsgruppe (vor allem Verbindung **17a**) die zum Teil deutliche Hemmung der NO-Synthasen bei Anwesenheit von L-Arginin (Tabelle 31 auf Seite 95).

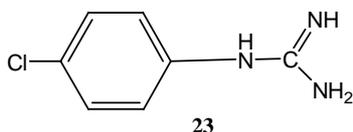


Die Ergebnisse der *N*-Hydroxyguanidine **1** und **3** im Born-Test zeigen eine „gute“ (nach Tabelle 34 auf Seite 126) *in vitro*-Thrombushemmung (Tabelle 12 auf Seite 46). Im Laser-Thrombose-Modell werden signifikante Hemmungen erreicht (Tabelle 16 auf Seite 53). Die *in vivo*-Blutdrucksenkung ist signifikant und bei Verbindung **3** mit 18% bei 60mg/kg deutlich stärker ausgeprägt als bei Verbindung **1** mit 8% bei gleicher Dosierung (Tabelle 20 auf Seite 60).

Eine Oxidierbarkeit der Verbindungen konnte weder mit der Chemilumineszens- noch mit der Lachgasbestimmung nach-

gewiesen werden.

4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin (**1**) zeigt bei der Inkubation mit eNOS eine mehr als doppelt so hohe NO-Freisetzung (231%) wie bei dem Kontrollwert mit L-Arginin. Damit erreicht Verbindung **1** die stärkste Umsetzung von NO-Synthasen ohne Anwesenheit von L-Arginin in dieser Arbeit (Tabelle 28 auf Seite 85). Bei der Inkubation mit eNOS bei Anwesenheit von L-Arginin wird interessanterweise eine ähnlich hohe Umsetzung gemessen (254%). Somit können hier allosterische Effekte, wie sie oben beschrieben wurden, ausgeschlossen werden.



4-Chlorphenylguanidin (**23**) überrascht durch seine gute Aktivierung der NO-Synthasen bei Anwesenheit von Arginin. Es wird bei der Inkubation mit iNOS eine mehr als vierfache Menge Nitrit freigesetzt verglichen mit der Inkubation von L-

Arginin alleine (Tabelle 32 auf Seite 96). Der Mechanismus dieser Aktivierung könnte ebenfalls durch die Interaktion der Verbindung mit einer weiteren Bindungsstelle ausgelöst werden. Damit wirkt das Guanidin **23** als Aktivator der NO-Synthase. Diese Aktivierung findet allerdings bei allen drei Isoenzymen statt. Damit liegt keine Spezifität für ein Isoenzym vor.

Insgesamt lässt sich feststellen:

1. 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxyguanidin zeigt gute *in vivo*- und *in vitro*-Hemmungen der Thrombusbildung und signifikante *in vivo*-Blutdrucksenkungen. Bei der Umsetzung mit der endothelialen NO-Synthase wird eine deutliche NO-Freisetzung festgestellt. Spezifische NO-Donor Eigenschaften dieser Substanz konnten damit belegt werden

2. Arylazoamidoxime zeigen zum Teil gute *in vivo*- und *in vitro*-Hemmungen der Thrombusbildung. Auch werden deutliche *in vivo*-Blutdrucksenkungen erreicht. Man kann von einer oralen Verfügbarkeit der Substanzen sprechen. Einige Arylazoamidoxime zeigen mäßige, einige zeigen geringe Umsetzungen mit NO-Synthasen ohne Anwesenheit von L-Arginin. Ein deutlich aktivierender Effekt zeigt sich bei einigen Arylazoamidoxime bei der Umsetzung mit NO-Synthasen in Anwesenheit von L-Arginin.

Diese Effekte stehen in Abhängigkeit von der Struktur und Position der Substitutionen am Aromaten. Die *in vivo*-Effekte werden eher von Verbindungen mit para-substituierten oder Fluor-substituierten Aromaten ausgelöst. Die *in vitro*-Effekte wurden fast ausschließlich bei Verbindungen mit para-substituierten Aromaten beobachtet. Auf Grund der beobachteten Effekte kann eine NO-Donor-Aktivität angenommen werden.

3. Arylazoamidine werden durch Oxidation aus den jeweiligen 1-Amidino-2-arylhydrazinen gebildet und zeigen die besten hier gemessenen *in vitro*-Hemmungen der Thrombusbildung und der *in vivo*-Blutdrucksenkung. Auch eine deutliche *in vivo*-Hemmung der Thrombusbildung konnte beobachtet werden. Es erfolgt eine Umsetzung in Gegenwart von NO-Synthasen. Die beobachteten Effekte sind von der Struktur eines para-substituierten Aromaten abhängig und legen nahe, daß eine NO-Donor-Aktivität vorliegt, die aber nicht belegt werden konnte.

4. 1-Amidino-2-arylhydrazine schließlich zeigen Effekte in der *in vivo*-Hemmung der Thrombusbildung und eine deutliche *in vivo*-Blutdrucksenkung. Es konnte keine *in vitro*-Umsetzung mit NO-Synthasen ermittelt werden. Der Mechanismus der *in vivo*-Effekte konnte nicht geklärt werden.

4.2 Diskussion

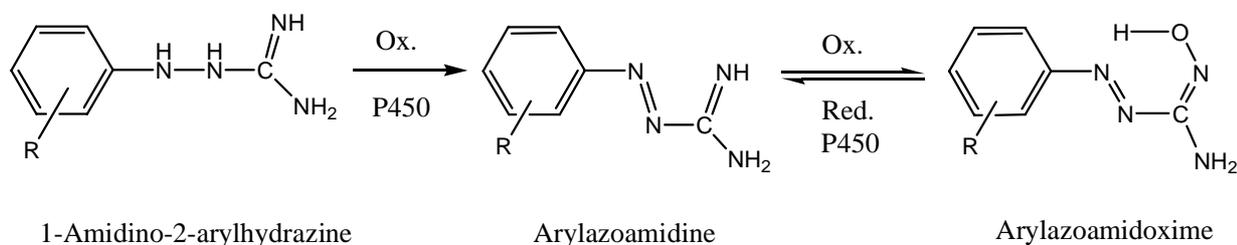


Abb. 49: Zusammenhang der Testverbindungen

Die synthetisierten Verbindungen stehen zum Teil in einem engen chemischen und metabolischen Zusammenhang. So ist zum Beispiel die Oxidation von Hydrazinen zu Azogruppen durch Cytochrom P450 in der Literatur ^[116] beschrieben. Dies legt den Schluß nahe, daß 1-Amidino-2-arylhydrazine durch eine solche Reaktion *in vivo* zu Arylazoamidinen oxidiert werden können. Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, daß 1-Amidino-2-arylhydrazine fast keine *in vitro* Umsetzungen zeigen, jedoch *in vivo* deutliche, zum Teil denen der Arylazoamidine entsprechenden Ergebnisse erreichen. Es scheint in diesem Fall eine fast vollständige Oxidation zu den Arylazoamidinen stattzufinden.

Die Reduktion der Arylazoamidoxime zu Arylazoamidinen wurde in dieser Arbeit in *in vitro* Versuchen bestätigt (Kapitel 3.6.1.1 auf Seite 102). Somit konnte ein weiterer metabolischer Zusammenhang der Testsubstanzen aufgezeigt werden. Durch diese Reduktion scheint aber nur ein Teil der Stoffmenge umgesetzt zu werden (dies belegt auch die *in vitro* Reduktion), da die Arylazoamidoxime im *in vivo* Laser-Thrombose-Modell bessere Ergebnisse erzielen (Kapitel 3.2.2 auf Seite 50), die Arylazoamidinee jedoch deutlich bessere *in vivo* Blutdrucksenkungen ergeben (Kapitel 3.3.2.1 auf Seite 56). Beide Substanzklassen zeigen *in vitro* Ergebnisse bei Born-Test und der Umsetzung mit NO-Synthasen.

Eine theoretische Verknüpfung der Testsubstanzen leitet sich aus dem Mechanismus der NO-Freisetzung aus L-Arginin ab. Hier wird im ersten Schritt eine NO-Synthase-vermittelte Oxidation von L-Arginin zu *N*^ω-Hydroxy-L-Arginin beobachtet ^[10]. Analog dazu wäre die Oxidation von Arylazoamidinen zu Arylazoamidoximen zu betrachten. In diesem Fall liefern die L-Arginin-

Analoge (Arylazoamidine) bessere Umsetzungen mit NO-Synthasen als die *N*^ω-Hydroxy-L-Arginin-Analoga (Arylazoamidoxime) (Kapitel 3.5.2.1 auf Seite 78). Eine *in vivo* Oxidation der Arylazoamidine zu Arylazoamidoximen durch NO-Synthasen kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Allerdings gibt es einen deutlichen Unterschied in dem Effekt der Testsubstanzen auf die NO-Synthasen bei Anwesenheit von Arginin. Während 1-Amidino-2-arylhydrazine und Arylazoamidine als allosterische Hemmer wirken (Kapitel 3.5.5.2 auf Seite 94), zeigen einige Arylazoamidoxime eine deutliche Aktivierung der NO-Synthasen (Kapitel 3.5.5.1 auf Seite 91).

Die Beurteilung der Ergebnisse fällt teilweise schwer, da verschiedene Wirkmechanismen zum Teil gleichgerichtet, zum Teil entgegengerichtet von den Testverbindungen ausgelöst werden. Es können drei verschiedene Wirkmechanismen in Betracht gezogen werden:

1. Wirkung als NO-Donor
2. Wirkung als NO-Synthase-Effektor
3. Zentrale α_2 -Aktivierung analog zu Guanfacin (Kapitel 3.3.2.5 auf Seite 61).

Arylazoamidoxime scheinen sowohl als NO-Donoren als auch als NO-Aktivatoren zu wirken. Es können Umsetzungen mit NO-Synthasen sowohl ohne Anwesenheit als auch bei Anwesenheit von L-Arginin gemessen werden. Durch die *in vivo*-Reduktion der Arylazoamidoxime zu den Arylazoamidinen kommt ein weiterer Mechanismus hinzu. Die Arylazoamidine zeigen *in vitro* bei Anwesenheit von L-Arginin eine Hemmung der NO-Synthasen. Die Ergebnisse im *in vivo*-Blutdrucktest zeigen jedoch eine deutliche Senkung des Blutdrucks. Somit muß von einem weiteren Wirkmechanismus ausgegangen werden, der stärker als die Hemmung der NO-Synthasen ist. Hier wird auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit ein zentraler Wirkmechanismus wie der von Guanfacin angenommen. Dieser zeichnet sich durch eine α_2 -Aktivierung aus, bei der die Ausschüttung von Noradrenalin gedrosselt wird. Dieses führt dann zu einer Blutdrucksenkung.

Die hier beschriebenen Verbindungen muß man mit Ausnahme der *N*-Hydroxyguanidine, die deutliche NO-Donor Eigenschaften vorweisen, als „dirty drugs“ bezeichnen. Die Stoffe interagieren mit verschiedenen Strukturen und zeigen so verschiedene Wirkmechanismen. Da dies zu entgegengerichteten Wirkungen und schwer vorhersagbaren Interaktionen kommen kann, sind dies problematische Eigenschaften. Es gibt allerdings eine Reihe von „dirty drugs“ auf dem

Arzneimittelmarkt, die seit vielen Jahren erfolgreich eingesetzt werden (trizyclische Antidepressiva, Amiodaron, viele Ergoline und Neuroleptika usw.^[117])

4.3 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten einige interessante Fragen nicht geklärt werden. Der Mechanismus der Blutdrucksenkung der Arylazoamidine konnte nicht belegt werden. Um den Mechanismus über eine zentrale α_2 -Aktivierung zu beweisen, müßten Rezeptorbindungsstudien evtl. mit Guanfacin oder Moxonidin als Vergleichssubstanz durchgeführt werden.

Auch ist der Mechanismus der Umsetzung der Arylazoamidine mit NO-Synthasen nicht geklärt. Das Citrullin-Analogon (4-Chlorphenylazocarboxamid) der Umsetzung von 4-Chlorphenylazoamidin mit NO-Synthasen analog zu dem Mechanismus der natürlichen NO-Freisetzung aus L-Arginin konnte nicht gefunden werden. Hier müßte unter veränderten Bedingungen wie z.B. höheren Enzymkonzentrationen weitere Untersuchungen stattfinden.

Die *in vivo*-Oxidation der 1-Amidino-2-arylhydrazine zu den Arylazoamidinen wurde bisher nicht belegt. Daher könnten Studien dazu mit Cytochrom P450-Enzymquellen durchgeführt werden.

Interessant wäre auch eine genauere Beleuchtung der Auswirkungen der *in vivo*-Reduktion von 4-Chlor-*N*-hydroxyguanidin zu 4-Chlorphenylguanidin. 4-Chlor-*N*-hydroxyguanidin wirkt als NO-Donor vor allem bei der Umsetzung mit eNOS und zeigt bei Anwesenheit von L-Arginin ähnliche Umsetzungen. Die Reduktion von 4-Chlor-*N*-hydroxyguanidin durch Cytochrom P450 konnte vom Arbeitskreis *Clement* gezeigt werden. Das Produkt der Reduktion 4-Chlorphenylguanidin zeigt jedoch eine deutliche Aktivierung aller Isoenzyme der NO-Synthase (Tabelle 32 auf Seite 96). Somit würde durch die Reduktion ein ebenfalls wirksamer Metabolit entstehen.