

6 Pharmakologisch-biochemisch-experimenteller Teil

6.1 Born-Test

Der Einfluß der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen auf die Thrombozytenaggregation *in vitro* wurde mit Hilfe des Born-Tests [53] nach der von *Seuter* [54] modifizierten Methode untersucht. Humanes plättchenreiches Plasma (PRP) wird mit definierter Konzentration der Testsubstanz in Dimethylsulfoxid (DMSO)/ HEPES-Puffer vier Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zusatz von 20 µL des Kollagen Reagenzes HormuL (8 µg/ mL, Firma Nycomed) wurde die Aggregation ausgelöst.

Kollagen wird die Thrombozytenaggregation ausgelöst. Deren Ausmaß wird durch photometrische Messung der veränderten Lichttransmission bestimmt. Dabei gilt eine direkte Proportionalität zwischen Aggregatanzahl und Zunahme der Lichttransmission. Durch graphische Auswertung ergibt sich so für jede Konzentration einer Substanz eine Transmissions/ Zeit-Kurve, deren maximale Transmission h bestimmt wird Abb. 50. Als Vergleich sowie Überprüfung des Testmodells dient eine Acetylsalicylsäure-Lösung (Aspisol) in HEPES-Puffer¹. Diese Vergleichslösung² zeigte bei einer Konzentration von 175 µmol/L eine 50%-ige Hemmung. Einige der Stoffe lösten sich nicht in DMSO/ HEPES-Puffer und mußten daher in DMSO/ PRP gelöst werden. Die thrombozytenaggregationshemmende Eigenwirkung von DMSO ist von *Ernst* [55], *Claus* [56] und *Rehse et al.* [57] untersucht worden. Sie beträgt bei einer 1,25%igen Lösung noch 40%. Unterhalb einer Konzentration von 0,3% DMSO ist keine Hemmung mehr zu beobachten. Daher bleibt der DMSO-Anteil bei allen Messungen unter 0,3%.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte wurden die IC_{50} -Werte der verschiedenen Testsubstanzen graphisch ermittelt. Hierzu wurden die verschiedenen Konzentrationen logarithmisch gegen ihre jeweiligen Hemmungen in % aufgetragen. An dem Schnittpunkt der Kurve mit der 50%-Linie wird dann die halbmaximale Hemmkonzentration abgelesen.

1. 1mM wässrige 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure-Lösung

2. 32,4mg in 5mL HEPES

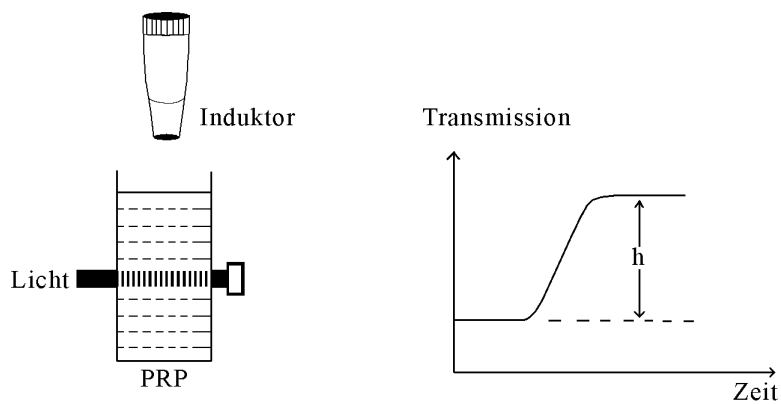


Abb. 50: Schematischer Aufbau des Born-Tests und T/Z Kurve

Tab. 34: Beurteilung der antiaggregatorischen Wirkung in Abhängigkeit von der IC_{50}

IC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]	Beurteilung der Wirkung
< 1	sehr gut
1-50	gut
50-150	mäßig
150-300	schwach
> 300	wirkungslos

6.2 Laser-Thrombose-Modell

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.

Dieses Modell beruht auf Versuchen von *Weichert* [63] und *Seiffge* [64] und wurde von *Kesselhut* [65] und *Schein* [66] etabliert. *Ciborski* [67] standardisierte die Messmethode und entwickelte das Verfahren zur statistischen Auswertung.

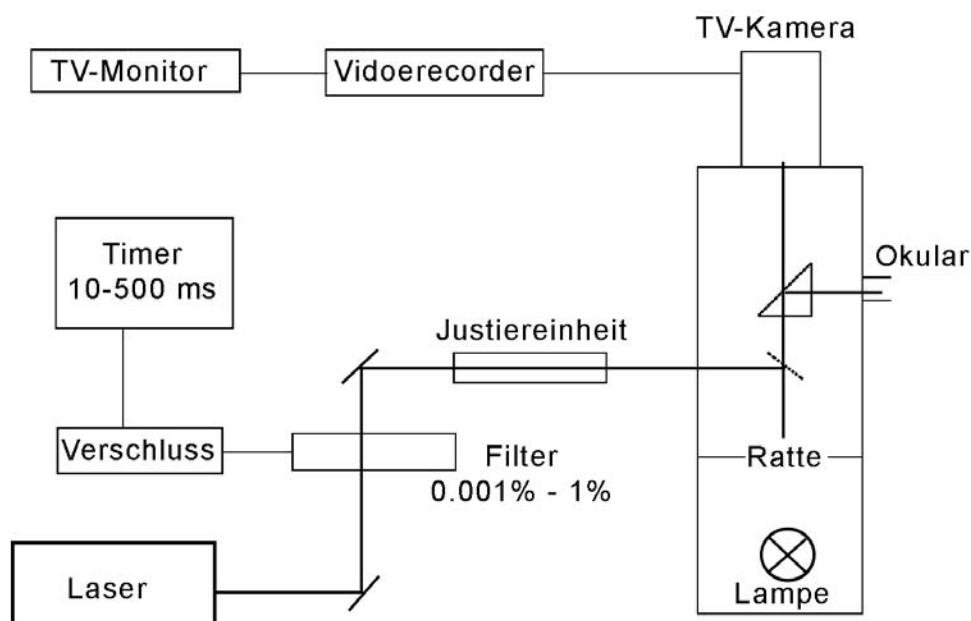


Abb. 51: Schematischer Aufbau des Laser-Thrombose-Modells

6.2.1 Versuchsdurchführung

Die Testsubstanzen werden in einer 1% igen Gummi Arabicum-Lösung suspendiert und in einer Dosierung von 60mg/kg Körpergewicht durch eine Schlundsonde per os appliziert. Nach zwei Stunden wird das Mesenterialgewebe der narkotisierten Ratten freigelegt und die laserinduzierte Thrombusbildung auf dem TV-Monitor beobachtet.

Für den Kontrollwert werden 9 Tiere an jeweils 6 Stellen (Venolen, Arteriolen) untersucht. 5 Tieren wird die Testsubstanz verabreicht. Auch hier werden jeweils 6 Stellen (Venolen, Arteriolen) mit dem Laser beschossen.

6.2.2 Auswertung

Die zur Bildung eines Thrombus benötigte Anzahl der Laserschüsse pro Gefäßstelle wird sowohl für Arteriolen als auch für Venolen gezählt. Als Thrombus wird hier ein Gerinsel von mindestens der Größe eines Leukozyten (10-12 μ m) definiert. An unbehandelten Ratten wird in diesem Testmodell nach ein bis zwei Laserschüssen eine Thrombusbildung beobachtet. Wenn nach fünf Schüssen kein Thrombus definierter Größe induziert wurde, wird die Untersuchung an dieser Gefäßstelle beendet und eine Expositionszahl von sechs angenommen.

Thrombusbildungsindex (TBI):

Der TBI errechnet sich aus dem Quotienten der Summe der benötigten Laserschüsse und der Anzahl der untersuchten Gefäßstellen je Tier und Gefäßart. Ein TBI von 6 entspricht einer maximalen Thrombozytenaggregationshemmung.

Mittlerer Thrombusbildender Index (mTBI):

Der mTBI ist das arithmetische Mittel aus einer Messreihe mit einer bestimmten Anzahl von Tieren.

Die Angabe als prozentuale Hemmung der Thrombusbildung dient dem besseren Vergleich der antithrombotischen Wirkung der Substanzen. Es gilt folgende Gleichung:

Die Standardabweichung **SD** und der Standardfehler s_x werden nach den üblichen Methoden berechnet [73]. Die Signifikanz der durchgeführten Messreihen wird mit Hilfe des Rangsummen-

$$\text{Hemmung der Thrombusbildungshemmung (in Prozent)} = \frac{mTBI(\text{Test}) - mTBI(\text{Kontrolle})}{6 - mTBI(\text{Kontrolle})} \cdot 100$$

tests nach *Wilcoxon, Mann und Whitney* [74] überprüft. Ergibt sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p > 0.5$ wird das Ergebnis als nicht signifikant (n. s.) gewertet.

Acetylsalicylsäure (ASS) führt unter diesen Testbedingungen nach *Camehn* [75] in einer Konzentration von 60mg/Kg Körpergewicht zu einer $48 \pm 10\%$ igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen und zu einer $20 \pm 5\%$ igen Hemmung in den Venolen ($p < 0.002$). Bei einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht beträgt die Hemmwirkung von **ASS** 18% in den Arteriolen und 3% in den Venolen

Die Hemmwirkung des NO-Donors **Molsidomin** (Corvaton®) beträgt bei einer Dosierung von 10 mg/kg in den Arteriolen 21%.

6.3 Das Blutdruck-Modell

Der Blutdruck von spontan hypertensiven Inzuchttratten wurde vor und nach der Gabe der Testsubstanzen gemessen. Hierzu wurde mit einem indirekten, nicht invasiven Blutdruckmesssystem der Firma Föhr Medical Instruments (BMN-1701) gearbeitet.

Der Blutdruck der Ratte läßt sich nicht mit der Riva Rocci Methode messen. Die Gefäßdurchmesser sind zu gering und die Herzfrequenz ist mit ca. 350-400 Schlägen pro Minute so hoch, daß keine Korotkow-Geräusche mehr hörbar sind. Stattdessen wird ein Piezo-Kristall zur Blutdruckmessung benutzt. Piezo-Kristalle zeigen bei Druck oder Zug an der Oberfläche eine meßbare elektrische Spannung (Piezo-Effekt).

Am Rattenschwanz führt die Durchblutung zu einer geringfügigen Änderung des Schwanzdurchmessers, welche durch die Druckdifferenz Systole/ Diastole verursacht wird. Das in Kunststoff eingegossene Piezo-Plättchen wird dadurch minimal verformt und es kommt an der Oberfläche des Kristalls zu einer Elektronenverschiebung. Dieser Effekt wird verstärkt und aufgezeichnet.

Bei Raumtemperatur ist der Rattenschwanz allerdings kaum durchblutet, da er hauptsächlich aus Bindegewebe besteht. Um das Meßprinzip anwenden zu können, muß die Durchblutung des Schwanzes erhöht werden. Dies geschieht durch eine Erwärmung der Ratte in einer auf 37°C temperierten Plexiglasröhre und damit die Erzeugung einer leichten Hyperthermie. Die natürliche Wärmeaustauschfunktion des Schwanzes wird somit aktiviert und der Schwanz wird stärker durchblutet.

Der Rattenschwanz befindet sich außerhalb der Plexiglasröhre. An ihm wird sowohl die Messmanschette als auch eine Staumanschette angelegt. Nach einer Aufwärmzeit von 10 Minuten wird die Staumanschette deutlich über dem systolischen Blutdruck aufgepumpt. Beim Ablassen des Drucks registriert der Piezokristall ab dem systolischen Blutdruck eine geringe Pulsation, deren Amplitude beim weiteren Ablassen auf ein Maximum steigt. Graphisch kann nun der genaue Beginn der Pulsation und damit der systolische Blutdruck ermittelt werden. Die Frequenz des sinusförmigen Pulsationssignals entspricht der Herzfrequenz, welche ebenfalls registriert wird.

6.3.1 Versuchsdurchführung

Zur Kontrollwertbestimmung wird acht bis zehn Tieren ähnlichen Blutdrucks nach 0, 2, 4, 6 und 24 Stunden der Blutdruck gemessen. Je Tier und Zeitpunkt werden drei Messungen vorgenommen. Sechs der Tiere mit den geringsten Blutdruckschwankungen werden ausgewählt.

Nach der Messung der 24h-Werte folgt die Applizierung der Testsubstanz als Suspension per Schlundsonde. Um tageszeitliche Schwankungen des Blutdrucks auszugleichen, werden die Tiere zu den gleichen Uhrzeiten wie die Kontrollwerte am Vortag vermessen.

Es wurden Konzentration von 10mg/kg und/ oder 30mg/kg und/ oder 60mg/kg oral verabreicht.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Rangsummentests nach *Wilcoxon, Mann und Whitney* [74] überprüft. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p > 0,1$ wird das Ergebnis als nicht signifikant (n.s.) bewertet.

Der Blutdruck ist abhängig von vielen Faktoren, wie auch dem Streßzustand. Daher ist es sehr wichtig, daß die Ratten den Versuch gewohnt sind und keine Angst haben. Die Werte sind nur reproduzierbar, wenn die Tiere den Tester kennen und „mögen“. Es erfordert viel Zeit und Fingerspitzengefühl, bis die Ratten während des Tests ruhig sind, denn auch zu starke Bewegungen stören die Blutdruckmessung. Glücklicherweise liegt es im Naturell von Ratten, sich durch schmale Röhren zu schieben, so daß der Aufenthalt in der warmen Plexiglasröhre für sie keine Bedrohung darstellt.

6.4 Untersuchungen zur NO Freisetzung

6.4.1 Gaschromatographische N₂O-Bestimmung

6.4.1.1 Aufbau der Modellreaktion

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^{III}- und Mn^{III}-Komplexe synthetischer Porphyrine die Oxygenierung organischer Substrate durch Iodosobenzol katalysieren können.

Auf Grund der höheren Effektivität von Diacetoxy-Iodosobenzol-Derivaten [80] und der guten Handhabbarkeit wird hier das mit Trifluoressigsäure acylierte Iodosobenzol als Sauerstoffdonator verwendet (Abb. 52). Es liegt in polaren Lösungsmitteln im Gleichgewicht mit der dissoziierten Form vor. Das Gleichgewicht liegt überwiegend auf der Seite der undissoziierten Form [81]. Sauerstoffdonatoren übertragen kein Sauerstoffatom auf den Porphyrin-Eisen-Komplex, sondern die austretende Gruppe des Sauerstoffdonators bindet mit an den Komplex und wird erst zum Zeitpunkt des Oxygenierungsschritts abgespalten [82].

Als Katalysator wird hier ein Tetraphenylporphyrin mit einem dreiwertigen Eisenatom als Zentralatom (Fe^{III}-TPP) eingesetzt (Abb. 53).

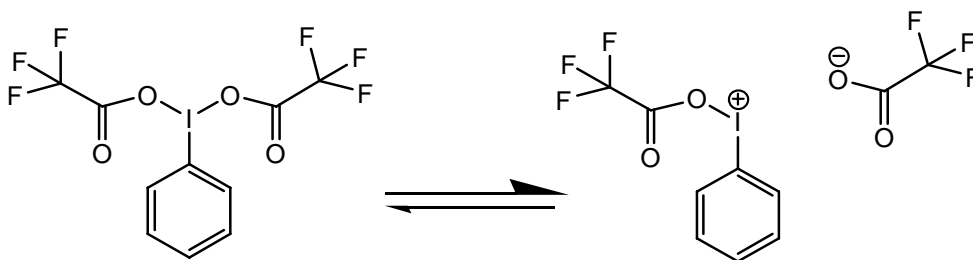


Abb. 52: Sauerstoffdonator [Bis-(trifluoroacetoxy)-iod]-benzol im Gleichgewicht mit seiner dissoziierten Form

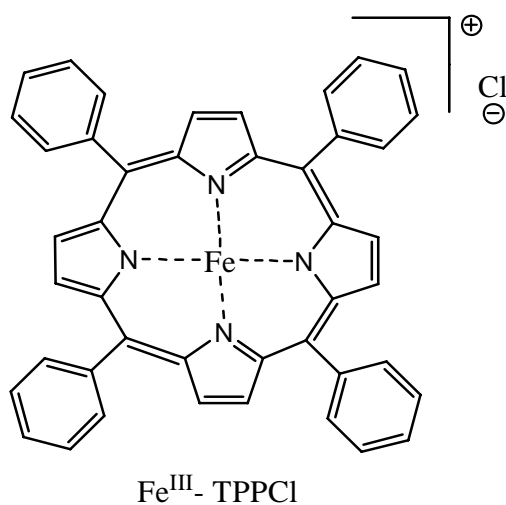
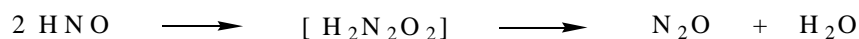


Abb. 53: Struktur des Eisen^{III}-Tetraphenylporphyrin-Komplexes

6.4.1.2 Meßprinzip

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⁻ oxidiert wird. Nitrosowasserstoff (HNO) ist eine instabile Verbindung, die leicht zur hyposalpetrigen Säure (H₂N₂O₂) dimerisiert und in Distickstoffmonoxid (N₂O) und Wasser zerfällt:



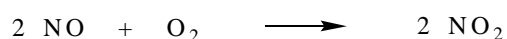
Unter physiologischen Bedingungen liegt HNO (P_{K_s}=4,7) überwiegend als Nitroxyl-Anion (NO⁻) vor [87]. Die Dimerisierung zum Hyponitrit (N₂O₂²⁻) und die Umsetzung zum Lachgas (N₂O) erfolgen sehr schnell. Daher kann die aus den Verbindungen freigesetzte HNO-Menge nur indirekt über das gebildete N₂O bestimmt werden [88] [89].

Die N₂O-Bestimmung erfolgt gaschromatographisch (Perkin Elmer F22; Headspace technik; Porapak Q-Edelstahlsäule und Elektroneneinfangdetektor ECD, Nachweisgrenze 1nmol)). Die Auswertung der Messungen erfolgt automatisch über die Integration der Peakflächen (AUC) anhand einer Kalibriergraden, die mit Gasverdünnungen aus reinem N₂O und Stickstoff erstellt wird.

Die Messungen müssen unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden, da NO-rasch von Sauerstoff zu Peroxonitrit (ONOO⁻) oxidiert wird, welches schnell zu NO₃⁻ isomerisiert [23]:



Außerdem könnte entstandenes NO von Sauerstoff zu NO₂ oxidiert werden:



Die Unterscheidung von N₂O und NO₂ ist gaschromatographisch nicht möglich, da beide Gase unter den gegebenen Bedingungen die gleiche Retentionszeit zeigen [90]. Da der ECD jedoch eine wesentlich geringere Empfindlichkeit für NO₂ aufweist, spielen Spuren von Sauerstoff keine Rolle.

6.4.1.3 Versuchsdurchführung

Die Testsubstanzen werden wie bei der NO-Chemilumineszenz-Bestimmung in Phosphatpuffer (pH 7,4)/ Ethanol 1:1 gelöst und 20 min mit Argon anaerobisiert. Anschließend erfolgt je nach Methode Tabelle 35 die Einspritzung der Reagentien

Tab. 35: Methoden zur gaschromatographischen N₂O Bestimmung

Methode A:	Spontane NO-Freisetzung
Methode B:	Testsubstanz + Sauerstoffdonator
Methode C:	Testsubstanz + Fe ^{III} TPP Cl
Methode D:	Testsubstanz + Sauerstoffdonator + Fe ^{III} TPPCl

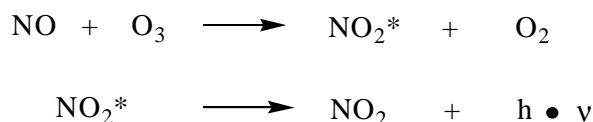
Die Testsubstanz wurde mit einer Konzentration von 3µM, der Sauerstoffdonator und der Eisenkomplex (Fe^{III} TPPCl) mit einer Konzentration von jeweils 1mM eingesetzt.

Jeweils drei Reaktionsgefäße werden 1, 3, 6, 24 oder 48 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor dann der Inhalt des Gasraums mit Argon in den Gaschromatographen gespült wird (Headspace-Technik).

6.4.2 NO-Bestimmung mittels Chemilumineszens

6.4.2.1 Meßprinzip

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



Stickstoffmonoxid wird mit Ozon versetzt. Dabei entstehen angeregtes Stickstoffdioxid (NO_2^*) 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 (Ansyco; NO-Analysator AC 30M; Karlsruhe) detektiert [83]. Die gebildete Menge an NO verhält sich dabei proportional zur Intensität des Chemilumineszenssignals. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Kalibriergraden.

6.4.2.2 Versuchsdurchführung

Die Testsubstanzen werden in Phosphatpuffer (pH 7,4)/ Ethanol 1:1 gelöst und 20 min mit Argon anaerobisiert. Anschließend erfolgt je nach Methode Abb. 36 die Einspritzung der Reagentien

Tab. 36: Methoden zur NO Chemilumineszens-Bestimmung

Methode A:	Spontane NO-Freisetzung
Methode B:	Testsubstanz + Sauerstoffdonator
Methode C:	Testsubstanz + Fe^{III} TPP Cl
Methode D:	Testsubstanz + Sauerstoffdonator + Fe^{III} TPP Cl

Die Testsubstanz wurde mit einer Konzentration von $3\mu\text{M}$, der Sauerstoffdonator und der Eisenkomplex (Fe^{III} TPPCl) mit einer Konzentration von jeweils 1mM eingesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C wird der Luftraum der Reaktionsgefäße für 2 min mit Argon durchspült. Dabei wird das gebildete NO in den Analysator getrieben, wo es mit Ozon versetzt und die Emission gemessen wird. Mit dieser Headspace-Technik (NO-Messung aus der

Gasphase) macht man sich die extrem niedrige Löslichkeit von NO in wäßrigen sauerstofffreien Lösungen [84] zu Nutze.

Nach der ersten Meß-/ Spülphase wird dasselbe Reaktionsgefäß erneut für 5 min inkubiert und wieder für 2 min mit Argon gespült. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis kein NO mehr gemessen werden kann (maximal 10 Messungen). Jede Substanz wird pro Methode 3 mal vermessen. Untersuchungen der vermessenen Lösungen nach dem Versuch wurden nicht durchgeführt.

Da eine NO-Abspaltung aus bestimmten Substanzklassen durch Lichtbestrahlung beschrieben ist [76] [85], wurden einige Verbindungen zusätzlich auch unter Tageslichteinfluss und/ oder UV-Licht-Bestrahlung gemessen.

6.5 Inkubation mit NO Synthasen

6.5.1 Inkubation ohne Anwesenheit von L-Arginin

Die Inkubation erfolgt nach einer im Arbeitskreis *Clement* etablierten Methode. Auf der Basis einer Arbeit von *Kwon* [11] wurde die Methode von *Waldmann* [93] und *Bluhm* [94] validiert. Dazu wurden die Testsubstanzen mit sämtlichen Cofaktoren und der jeweiligen NO-Synthase versetzt. Es wurden rekombinant gewonnene humane NO-Synthasen (bNOS, eNOS und iNOS) eingesetzt Tabelle 39. Die für die Inkubation mit NO-Synthasen eingesetzten Cofaktorkonzentrationen sowie benötigte Pufferzusammensetzungen sind in Table 37 und Table 38 zusammengefaßt. Die Cofaktoren werden in 20fach konzentrierten Stammlösungen aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Eine Ausnahme bilden nur CaCl_2 und MgCl_2 , welche bei 4 °C aufbewahrt und für jede Inkubation mit Puffer verdünnt werden. Zur Inkubation der iNOS wird nach *Hevel* [90] MgCl_2 als Cofaktor eingesetzt, bei bNOS und eNOS CaCl_2 . Auch die verwendeten Puffer sind bei den einzelnen NO-Synthasen verschieden. So benötigt die bNOS zur Umsetzung einen thiolhaltigen Puffer (Puffer A), da nach *Gorren* [91] Thiole das Isoenzym stabilisieren. Zur Inkubation von eNOS und iNOS hingegen wird reiner Triethanolaminpuffer (Puffer B) verwendet.

Tab. 37: Konzentration der Cofaktoren und der Testsubstanz bei der NOS-Inkubation

Cofaktor	Konzentration im Inkubationsansatz
CaCl ₂	0,5 mM
MgCl ₂	1 mM
FAD	5 µM
FMN	5 µM
NADPH	0,5 mM
BH ₄	10 µM
Calmodulin	10 µg/mL
L-Arginin (Kontrollwerte)	1 mM

Tab. 38: Zusammensetzung der Puffer zur Inkubation der NOS

Puffer A zur Inkubation mit bNOS	Puffer B zur Inkubation mit eNOS und iNOS
50 mM Triethanolamin	50 mM Triethanolamin PH 7,5
1 mM CHAPS	
10 mM Mercaptoethanol	
0,5 mM EDTA	
PH 7,0	

Tab. 39: Eingesetzte Enzyme mit Aktivitäten

NOS-Isoenzym	Quelle	Protein-konzentration (mg/mL)	Aktivität [nmol/(mg x min)]
bNOS, human	Mayer ^a , rekombinant	2,2	800
eNOS, human	aus <i>Pichia pastoris</i> -Hefezellen, Leber ³⁷⁾	2,7	184
iNOS, human	Alexis GmbH, Grünberg; rekombinant aus <i>Sf9</i> -Insektenzellen	>iNOS 5,0	> 1

a.Prof. B. Mayer, Universität Graz, Österreich

6.5.1.1 Durchführung des Nitrit-Assays ohne Anwesenheit von L-Arginin

Die Testsubstanzen werden in DMSO vorgelöst und mit dem zur Inkubation des jeweiligen Isoenzyms benötigten Puffer versetzt. Es bleibt eine Konzentration von 1,25% DMSO im Inkubationsansatz. Laut *Bluhm* [94] ist der Einfluß von 1,25% DMSO im Inkubationsansatz als akzeptabel zu bewerten. Teilweise entstanden Suspensionen, die alle für 30 s mit Hilfe eines Vibrationsmischers homogenisiert wurden. Die Endkonzentration der Testsubstanzen betrug 1 mM. Als Positivkontrolle wurde den Kontrollwerten L-Arginin (1mM) zugesetzt.

Ein typischer Inkubationsansatz bestand aus 60 µL einer Mischung sämtlicher Cofaktoren und der NOS, 10 µL Puffer und 10µL der Testverbindung (L-Arginin bei Blindwert b und den Kontrollwerten). Eine Standardinkubation enthielt 24 Proben, die 12 verschiedene Ansätze jeweils doppelt enthielten.

Jeder Ansatz bestand aus:

- 1 Blindwert a mit Enzym aber ohne L-Arginin,
- 1 Blindwert b ohne Enzym mit L-Arginin,
- 2 Kontrollwerten mit L-Arginin und Enzym
- und jeweils 2 Werten für 4 Testsubstanzen

- Der Inkubationsansatz wurde für 30 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert.
- Nicht umgesetztes NADPH muß entfernt werden, da es das intermediär auftretende Diazoniumion und den Azofarbstoff Abb. 55 reduziert [90] und somit zu falsch niedrigen Ergebnissen führt. Daher wurde anschließend 20 µL einer Mischung aus gleichen Teilen Natriumpyruvat (1,6mM) und L-Lactatdehydrogenase (LDH-Aktivität 20 Units/mL) hinzugegeben und weitere 20 min bei 37°C inkubiert (Abbildung 54 auf Seite 140).

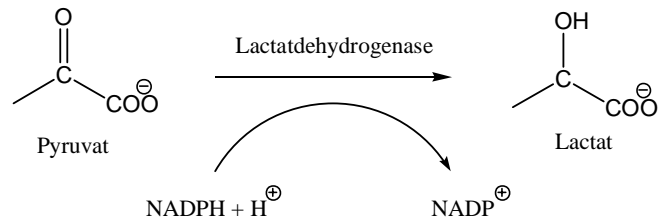


Abb. 54: Überschüssiges NADPH wird durch Lactatdehydrogenase verbraucht.

- Zum Abstoppen wurde der Ansatz mit 50 μL Acetonitril versetzt.
- Um Niederschläge der Enzyme oder ungelöster Substanz zu entfernen, wurde 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert.
- 100 μL des Überstands wurden mit jeweils 10 μL Sulfanilamid- und Naphthylethylen-diaminhydrochlorid-Lösung versetzt Abb. 55 und nach 5 min die Absorption bei 543 nm gegen Blindwert a doppelt gemessen.

Der Mittelwert der Absorptionen des Kontrollwerts (L-Arginin) wurde als 100% definiert und der Mittelwert der 8 Absorptionen pro Testsubstanz ergab die prozentuale NO_2^- -Entstehung. Zur Quantifizierung der Nitritmenge wurden eine Kalibrierung und eine Wiederfindung durchgeführt.

6.5.1.2 Theorie des Nitrit-Assays

NO reagiert in sauerstoffhaltigen wässrigen Lösungen quantitativ zu Nitrit⁴⁰⁾. Aus Nitrit entsteht in salzsaurem Milieu Nitrosylchlorid. Dieses reagiert mit Sulfanilamid zu dem intermediären Diazohydroxid, aus dem nach Protonierung Wasser eliminiert wird. Das entstandene Diazoniumion reagiert nun in einer elektrophilen Substitutionsreaktion mit dem aktivierten Aromaten des Naphthylethyldiamins zu einem Azofarbstoff Abb. 55.

Das pH-Optimum der Reaktion liegt im schwach sauren bis neutralen Bereich, da aromatische Amine im stark sauren protoniert vorliegen und damit ihren nukleophilen Charakter verlieren. Im stark basischen kann sich aus Diazohydroxid das Diazotat-Ion bilden, das nicht dehydratisiert werden kann.

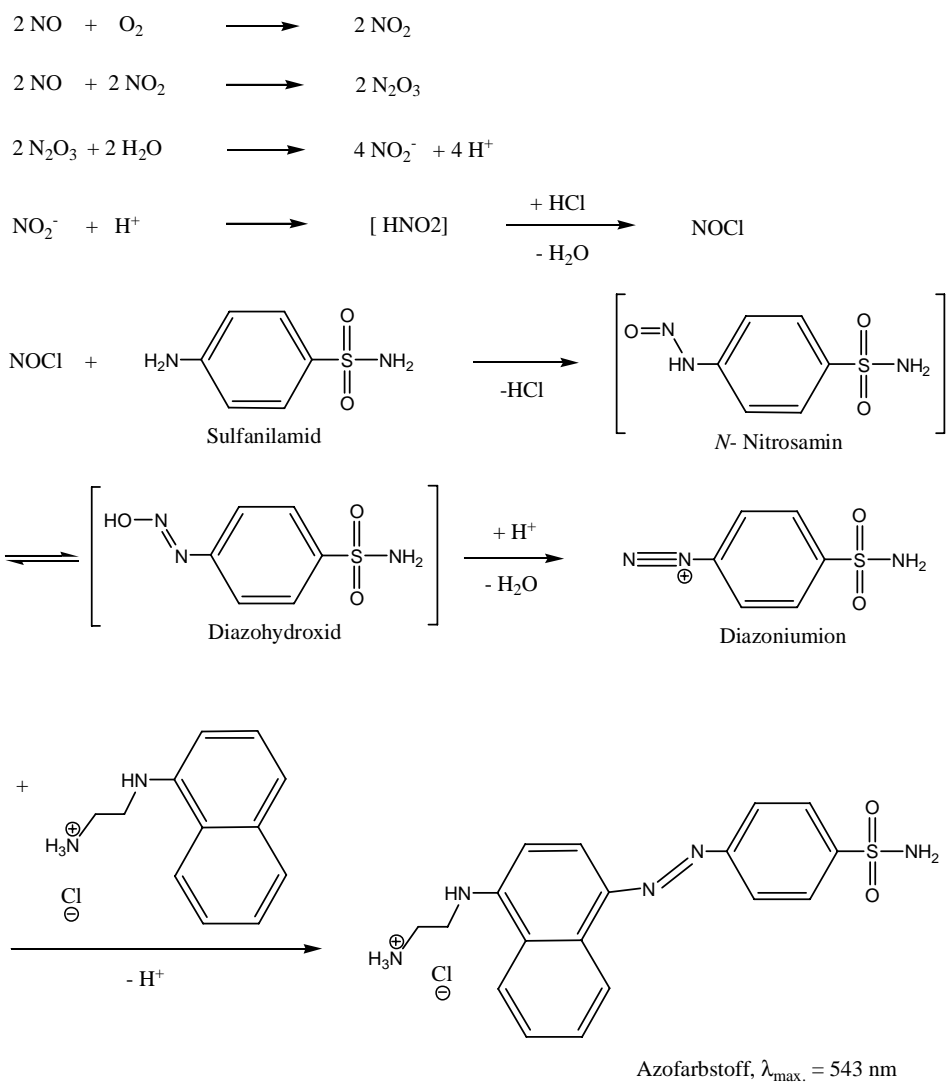


Abb. 55: Griess Reaktion: NO bildet in sauerstoffhaltigen, wässrigen Lösungen Nitrit. Dieses reagiert mit Sulfanilamid und Naphthylethyldiamin zum Azofarbstoff und wird photometrisch detektiert.

6.5.1.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde eine Nitrit-Kalibrierkurve im Bereich von 0-50 μM Nitrit erstellt. Anschließend wurden zur Wiederfindung Inkubationen bei den angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt Abb. 37. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit wurde das Enzym durch fünfminütiges Kochen inaktiviert und die entsprechenden Nitritkonzentrationen zugesetzt. Es wurden jeweils 2 Proben doppelt vermessen und der Mittelwert aufgetragen Abb. 56.

Um die Abweichung der Kalibrierung und der Wiederfindung auszudrücken, wird die mittlere Wiederfindungsrate ermittelt. Photometrischen Daten werden nach dem Umrechnen mit Hilfe der Kalibriergerade auch mit der mittleren Wiederfindungsrate verrechnet, um die Testbedingungen in die Berechnung mit einzubeziehen.

Wenn das eingesetzte System keine Interaktionen mit entstandenem NO oder Nitrit einginge, wäre die mittlere Wiederfindungsrate 100%. Geringere Werte bedeuten eine Minderung der NO/Nitrit-Menge durch die eingesetzten Komponenten und damit falsch niedrige Werte. Hier werden mittlere Wiederfindungsraten von über 100% gefunden Abb. 40. Dies liegt wahrscheinlich an großen Streuungen durch die geringe Probenanzahl. Sowohl die Kalibrierungs-als auch die Wiederfindungskurven zeigen einen guten Korrelationskoeffizienten und verlaufen damit im gemessenen Bereich linear. Damit kann eine Proportionalität der Absorptionen und der Nitrit-Konzentrationen für den gemessenen Bereich (0-50 μM) festgestellt werden.

Tab. 40: Korrelationskoeffizienten und mittlere Wiederfindungsraten des Kalibrierung und der Wiederfindung bei NO-Synthasen.

NOS Isoenzym (human)	Korrelationskoeffizient r^2	Mittlere Wiederfindungsrate [%]
bNOS	0,9987	106,4
eNOS	0,9989	104,8
iNOS	0,9989	103,3

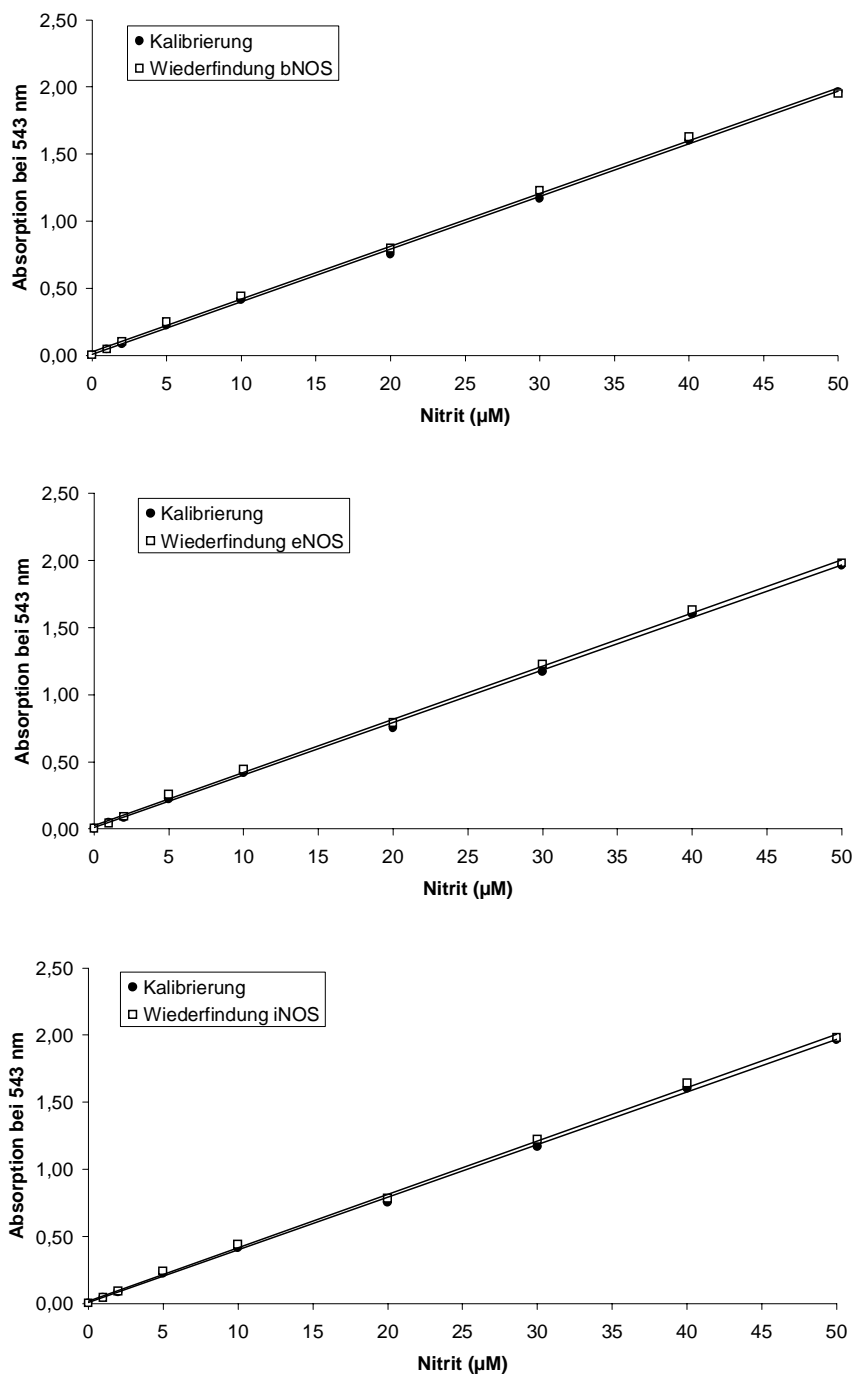


Abb. 56: Nitrit Kalibrierungskurve für den Bereich 0-50 µM

6.5.2 Inkubation bei Anwesenheit von L-Arginin

Die Inkubation erfolgt nach einer im Arbeitskreis *Clement* etablierten Methode. Auf der Basis einer Arbeit von *Kwon* [11] wurde die Methode von *Waldmann* [93] und *Bluhm* [94] validiert. Dazu wurden die Testsubstanzen mit sämtlichen Cofaktoren und der jeweiligen NO-Synthase versetzt. Es wurden rekombinant gewonnene humane NO-Synthasen (bNOS, eNOS und iNOS) eingesetzt (Tabelle 39). Die für die Inkubation mit NO-Synthasen eingesetzten Cofaktorkonzentrationen sowie benötigte Pufferzusammensetzungen sind in Tabelle 37 auf Seite 138 und Tabelle 38 auf Seite 138 zusammengefasst. Die Cofaktoren werden in 20fach konzentrierten Stammlösungen aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Eine Ausnahme bilden nur CaCl₂ und MgCl₂, welche bei 4 °C aufbewahrt und für jede Inkubation mit Puffer verdünnt werden. Zur Inkubation der iNOS wird nach *Hevel* [90] MgCl₂ als Cofaktor eingesetzt, bei bNOS und eNOS CaCl₂. Auch die verwendeten Puffer sind bei den einzelnen NO-Synthasen verschieden. So benötigt die bNOS zur Umsetzung einen thiolhaltigen Puffer (Puffer A), da nach *Gorren* [91] Thiole das Isoenzym stabilisieren. Zur Inkubation von eNOS und iNOS hingegen wird reiner Triethanolaminpuffer (Puffer B) verwendet.

6.5.2.1 Durchführung des Nitrit-Assays bei Anwesenheit von L-Arginin

Die Testsubstanzen werden in DMSO vorgelöst und mit dem zur Inkubation des jeweiligen Isoenzyms benötigten Puffer versetzt. Es bleibt eine Konzentration von 1,25% DMSO im Inkubationsansatz. Teilweise entstanden Suspensionen, die alle für 30 s mit Hilfe eines Vibrationsmischers homogenisiert wurden. Die Endkonzentration der Testsubstanzen betrug 1 mM und die Endkonzentration von L-Arginin betrug 0,5mM. Die Kontrollwerten enthielten L-Arginin (0,5mM) aber keine Testsubstanz.

Ein typischer Inkubationsansatz bestand aus 60 µL einer Mischung sämtlicher Cofaktoren, L-Arginin und der NOS, 10 µL Puffer und 10µL der Testverbindung. Eine Standardinkubation enthielt 24 Proben, die 12 verschiedene Ansätze jeweils doppelt enthielten.

Jeder Ansatz bestand aus:

- 2 Blindwerte ohne Enzym,
- 2 Kontrollwerten mit L-Arginin und Enzym aber ohne Testsubstanz
- jeweils 2 Werten für 4 Testsubstanzen

- Der Inkubationsansatz wurde für 30 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert.
- Nicht umgesetztes NADPH muß entfernt werden, da es das intermediär auftretende Diazoniumion und den Azofarbstoff Abb. 55 reduziert [90] und somit zu falsch niedrigen Ergebnissen führt. Daher wurde anschließend 20 µL einer Mischung aus gleichen Teilen Natriumpyruvat (1,6mM) und L-Lactatdehydrogenase (LDH-Aktivität 20 Units/mL) hinzugegeben und weitere 20 min bei 37°C inkubiert (Abbildung 54 auf Seite 140).
- Zum Abstoppen wurde der Ansatz mit 50 µL Acetonitril versetzt.
- Um Niederschläge der Enzyme oder ungelöster Substanz zu entfernen, wurde 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert.
- 100µL des Überstands wurden mit jeweils 10µL Sulfanilamid-und Naphthylethylen-diaminhydrochlorid-Lösung versetzt Abb. 55 und nach 5 min die Absorbtion bei 543 nm gegen Blindwert a doppelt gemessen.

Der Mittelwert der Absorbtionen der Kontrollwerte wurde als 100% definiert und der Mittelwert der 8 Absorptionen pro Testsubstanz ergab die prozentuale NO₂⁻-Entstehung.

Zur Quantifizierung der Nitritmenge wurden eine Kalibrierung und eine Wiederfindung durchgeführt (siehe Seite 142, Kapitel 6.5.1.3).

6.6 **Versuchsbedingungen zum Nachweis von 4-Chlorphenylazocarboxamid (26) aus der Reaktion von 4-Chlorphenylazoamidin (14) und NO-Synthasen.**

Der Frage, wie eine Verbindung wie 4-Chlorphenylazoamidin (14) mit Hilfe von NO-Synthasen Stickstoffmonoxid freisetzen kann, sollte nachgegangen werden. Ist eine Reaktion nach dem Schema der physiologischen Reaktion von L-Arginin über *N*^ω-Hydroxy-L-Arginin zu L-Citrullin (Abbildung 1 auf Seite 2) möglich? Zu diesem Zweck wurde das potentielle Produkt dieser Reaktion (4-Chlorphenylazocarboxamid (26)) synthetisiert und eine Analytik zur Untersuchung der Reaktion entworfen.

6.6.1 **HPLC-Analytik zur Trennung von 4-Chlorphenylazoamidin (14) und 4-Chlorphenylazocarboxamid (26)**

Zur Trennung von 4-Chlorphenylazoamidin (14) und 4-Chlorphenylazocarboxamid (26) wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Die Trennung erfolgte mittels Ionenpaarchromatographie unter folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe	W600 Pumpe mit W600 E System-Controller, Fa. Waters, Milforg, CT, USA
Detektor	W486 Tunable Absorbance Detector, Fa. Waters, Milford, CT, USA
Autosampler	Automatischer Probennehmer W 700 Satellite WISP, Fa. Waters, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom TM Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom TM SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	LiChrocart 250 x 4mm LiChrospher 60 RP-select B (Partikeldurchmesser: 5µm), Vorsäule RP-select B 4 X 4mm, Fa. Merck, Darmstadt
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)
Mobile Phase	10mM Octylsulfonat/Acetonitril 71:29 (v/v) pH 6,3

HPLC-Pumpe	W600 Pumpe mit W600 E System-Controller, Fa. Waters, Milforg, CT, USA
Flußrate	1,0mL/min, isokratisch
Laufzeit	20 min
Injektionsvolumen	10µL, 20µL
Detektion	320 nm
Retentionszeiten	4-Chlorphenylazocarboxamid: 12min 4-Chlorphenylazoamidin: 16min

Die zur Fließmittelherstellung verwendete 10mM Octylsulfonat-Lösung wurde vor der Mischung mit Acetonitril durch Vakuumfiltration (Sartorius Membranfilter 0,45µm, F. Sartorius AG, Göttingen) von Partikeln befreit und nach Acetonitrilzusatz für 15min im Ultraschallbad entgast. Zur Vermeidung von Lufteinschlüssen wurde in die mobile Phase Helium (20mL/min) eingeleitet.

6.6.2 Nitrit Assay zur Umsetzung von 4-Chlorphenylazoamidin

Der Nitrit Assay wurde analog zu der Methode "Inkubation ohne Anwesenheit von L-Arginin" auf Seite 137 und "Durchführung des Nitrit-Assays ohne Anwesenheit von L-Arginin" auf Seite 139 durchgeführt. Die Methode wurde dahingehend verändert, daß kein Zusatz von Pyruvat und Lactatdehydrogenase erfolgte. Diese Zusätze werden nur zur Entfernung von überschüssigem NADPH benötigt, weil dieses die Farbreaktion stört. In diesem Fall wurde aber keine Farbreaktion durchgeführt, sondern die direkte Trennung der Produkte in einer HPLC-Säule.

Daher wurde nach der Inkubation die Reaktion mit kaltem Aceton abgestoppt und 10µl des Überstands nach Zentrifugation in der oben beschriebenen HPLC-Methode aufgetrennt. Um eine detektierbare Menge an Produkt zu erlangen, wurde die Inkubationszeit auf bis zu 120min erhöht. Außerdem wurde das Injektionsvolumen auf 20µL erhöht.

6.7 Reduktion der Arylazoamidoxime

6.7.1 Materialien

NADH und NADPH wurden von Fa. Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Für die HPLC-Analytik wurde Acetonitril LiChrosolv (Fa. LGC Promochem, Wesel) eingesetzt. Die Enzymquellen wurden vom Arbeitskreis Clement isoliert und quantifiziert. Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei Fa. Merck, Darmstadt, in höchster verfügbarer Reinheit erworben.

6.7.2 Geräte

Für die Inkubation wurden Reference-Pipetten der Fa. Eppendorf, Hamburg, sowie 1,5 ml Reaktionsgefäße (FA. Sarstedt, Nürnberg) verwendet. Das Schüttelwasserbad GFL 1087 stammte von der Gesellschaft für Labortechnik. Des Weiteren wurden ein Vibrationsmischer IKA Vibrax VXR (Fa. Jahnke und Kunkel, Staufen) und eine Mikroliterzentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen) benutzt. Die verwendeten Geräte zur HPLC-Analytik werden im folgenden Abschnitt aufgeführt.

6.7.3 Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze

Ein typischer Inkubationsansatz für die Charakterisierung der Biotransformation der Arylazoamidoxime zu den Arylazoamidine setzte sich wie folgt zusammen: 300µg Protein, 3mM Arylazoamidoxim in DMSO angelöst und mit Phosphatpuffer 100mM pH 6,3 versetzt. Die maximale DMSO-Konzentration im Ansatz betrug 3%. 1mM NADH in 100mM Phosphatpuffer. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 150µL.

Die Inkubation erfolgte für 30min bei 37°C im Schüttelwasserbad. Durch Zugabe von 150µl eisgekühltem Methanol wurde die Reaktion beendet. Je 10µL des Überstandes der zentrifugierten Ansätze (5min bei 9000 U/min) wurden mittels der folgenden HPLC-Methode aufgetrennt und detektiert.

6.7.4 HPLC-Analytik

6.7.4.1 HPLC-Analytik zur Trennung von 4-Chlorphenylazoamidoxim (4) und 4-Chlorphenylazoamidin (14)

Zur Quantifizierung der gebildeten Menge an 4-Chlorphenylazoamidin und somit zur Berechnung der Umsetzungsrate wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Die Trennung von 4-Chlorphenylazoamidoxim und 4-Chlorphenylazoamidin erfolgte mittels Ionenpaarchromatographie unter folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe	W600 Pumpe mit W600 E System-Controller, Fa. Waters, Milford, CT, USA
Detektor	W486 Tunable Absorbance Detector, Fa. Waters, Milford, CT, USA
Autosampler	Automatischer Probennehmer W 700 Satellite WISP, Fa. Waters, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	LiChrocart 250 x 4mm LiChrospher 60 RP-select B (Partikeldurchmesser: 5µm), Vorsäule RP-select B 4 X 4mm, Fa. Merck, Darmstadt
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)
Mobile Phase	10mM Octylsulfonat/Acetonitril 73:27 (v/v) pH 6,3
Flußrate	1,0mL/min, isokratisch
Laufzeit	25 min
Injektionsvolumen	10µL
Detektion	320 nm
Retentionszeiten	4-Chlorphenylazoamidoxim: 14,5min 4-Chlorphenylazoamidin: 19min

Die zur Fließmittelherstellung verwendete 10mM Octylsulfonat-Lösung wurde vor der Mischung mit Acetonitril durch Vakuumfiltration (Sartorius-Membranfilter 0,45µm, F. Sartorius AG,

Göttingen) von Partikeln befreit und nach Acetonitrilzusatz für 15min im Ultraschallbad entgast. Zur Vermeidung von Lufteingüssen wurde in die mobile Phase Helium (20mL/min) eingeleitet.

Kalibrierung und Wiederfindung des 4-Chlorphenylazoamidins (14)

Die Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten erfolgte über die bei einer 6-Punkt-Kalibrierung erhaltenen Signalflächen (Abbildung 57 auf Seite 150). Dazu wurden je Substanzkonzentrationen von 0,1 bis 14 μ M in einem 1:1 (v/v)-Gemisch aus Phosphatpuffer pH 6,3 und Methanol gelöst und mittels oben aufgeführter Methode vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die oben genannten Konzentrationen an 4-Chlorphenylazoamidin dem in [6.7.3] beschriebenen Inkubationsansatz zugesetzt. Anstelle des aktiven Proteins wurden äquivalente Mengen hitzedenaturierter Mikrosomen (5min bei 95°C) eingesetzt und auf den Cofaktorzusatz wurde verzichtet. Die Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten gemäß der unter [6.7.3] beschriebenen Methode. Es wurden jeweils 2 Proben jeder Konzentration doppelt vermessen (n=4).

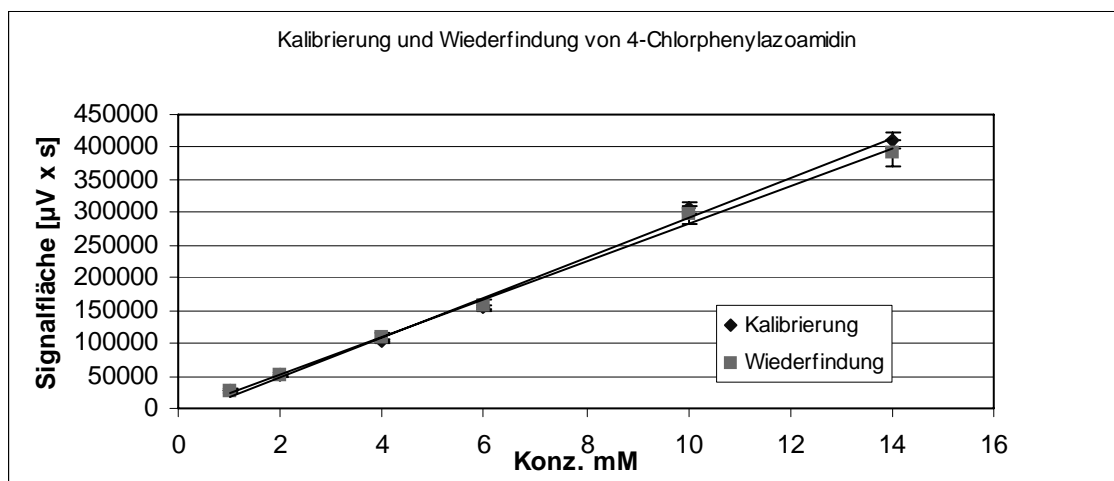


Abb. 57: Kalibrierung und Wiederfindung von 4-Chlorphenylazoamidin. Korrelationskoeffizienten: Kalibrierung $r^2=0,9951$; Wiederfindung: $r^2=0,9969$.

6.7.4.2 HPLC-Analytik zur Trennung von 4-Fluorphenylazoamidoxim (5) und 4-Fluorphenylazoamidin (17)

Zur Quantifizierung der gebildeten Menge an 4-Fluorphenylazoamidin und somit zur Berechnung der Umsetzungsraten wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Die Trennung von 4-Fluorphenylazoamidoxim und 4-Fluorphenylazoamidin erfolgte mittels Ionenpaarchromatographie unter folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe	W600 Pumpe mit W600 E System-Controller, Fa. Waters, Milforg, CT, USA
Detektor	W486 Tunable Absorbance Detector, Fa. Waters, Milford, CT, USA
Autosampler	Automatischer Probennehmer W 700 Satellite WISP, Fa. Waters, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom™ CHromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	LiChrocart 250 x 4mm LiChrospher 60 RP-select B (Partikeldurchmesser: 5µm), Vorsäule RP-select B 4 X 4mm, Fa. Merck, Darmstadt
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)
Mobile Phase	10mM Octylsulfonat/Acetonitril 73:27 (v/v) pH 6,3
Flußrate	1,0mL/min, isokratisch
Laufzeit	28 min
Injektionsvolumen	10µL
Detektion	320 nm
Retentionszeiten	4-Fluorphenylazoamidoxim: 16min 4-Fluorphenylazoamidin: 21min

Die zur Fließmittelherstellung verwendete 10mM Octylsulfonat-Lösung wurde vor der Mischung mit Acetonitril durch Vakuumfiltration (Sartorius-Membranfilter 0,45µm, F. Sartorius AG, Göttingen) von Partikeln befreit und nach Acetonitrilzusatz für 15min im Ultraschallbad entgast.

Zur Vermeidung von Luft einschlüssen wurde in die mobile Phase Helium (20mL/min) eingeleitet.

Kalibrierung und Wiederfindung des 4-Fluorphenylazoamidins (17)

Die Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten erfolgte über die bei einer 6-Punkt-Kalibrierung erhaltenen Signalfächen (Abbildung 58 auf Seite 152). Dazu wurden je Substanzkonzentrationen von 0,1 bis 14µM in einem 1:1 (v/v)-Gemisch aus Phosphatpuffer pH 6,3 und Methanol gelöst und mittels oben aufgeführter Methode vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die oben genannten Konzentrationen an 4-Fluorphenylazoamidin dem in [6.7.3] beschriebenen Inkubationsansatz zugesetzt. Anstelle des aktiven Proteins wurden äquivalente Mengen hitzedenaturierter Mikrosomen (5min bei 95°C) eingesetzt und auf den Cofaktorzusatz wurde verzichtet. Die Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten gemäß der unter [6.7.3] beschriebenen Methode. Es wurden jeweils 2 Proben jeder Konzentration doppelt vermessen (n=4).

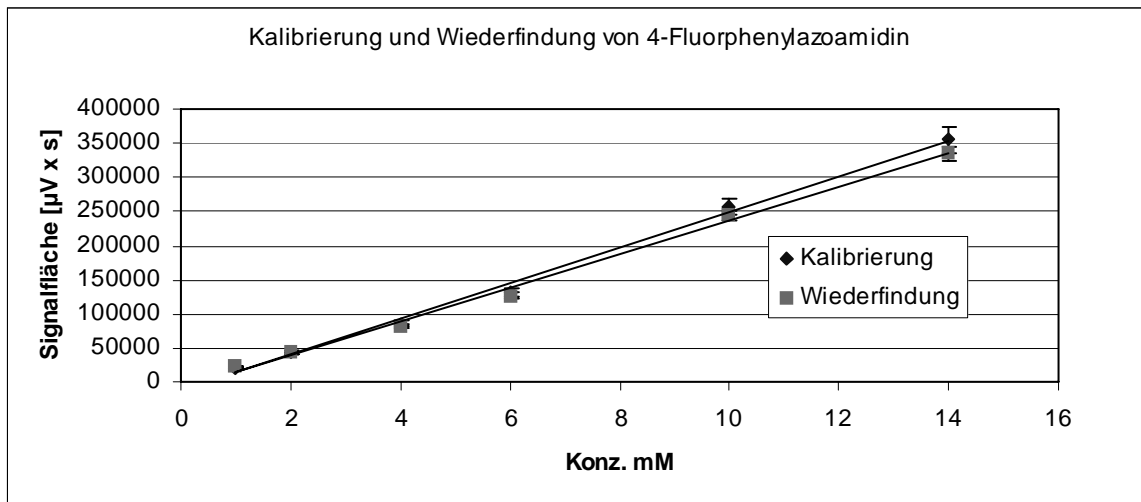


Abb. 58: Kalibrierung und Wiederfindung von 4-Fluorphenylazoamidin. Korrelationskoeffizienten: Kalibrierung $r^2=0,9958$; Wiederfindung: $r^2=0,996$.

6.7.4.3 HPLC-Analytik zur Trennung von 3-Chlorphenylazoamidoxim (7) und 3-Chlorphenylazoamidin (15)

Zur Quantifizierung der gebildeten Menge an 3-Chlorphenylazoamidin und somit zur Berechnung der Umsetzungsraten wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Die Trennung von 3-Chlorphenylazoamidoxim und 3-Chlorphenylazoamidin erfolgte mittels Ionenpaarchromatographie unter folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe	W600 Pumpe mit W600 E System-Controller, Fa. Waters, Milforg, CT, USA
Detektor	W486 Tunable Absorbance Detector, Fa. Waters, Milford, CT, USA
Autosampler	Automatischer Probennehmer W 700 Satellite WISP, Fa. Waters, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom™ CHromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	LiChrocart 250 x 4mm LiChrospher 60 RP-select B (Partikeldurchmesser: 5µm), Vorsäule RP-select B 4 X 4mm, Fa. Merck, Darmstadt
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)
Mobile Phase	10mM Octylsulfonat/Acetonitril 73:27 (v/v) pH 6,3
Flußrate	1,0mL/min, isokratisch
Laufzeit	25 min
Injektionsvolumen	10µL
Detektion	320 nm
Retentionszeiten	3-Chlorphenylazoamidoxim: 13min 3-Chlorphenylazoamidin: 18,5min

Die zur Fließmittelherstellung verwendete 10mM Octylsulfonat-Lösung wurde vor der Mischung mit Acetonitril durch Vakuumfiltration (Sartorius Membranfilter 0,45µm, F. Sartorius AG, Göttingen) von Partikeln befreit und nach Acetonitrilzusatz für 15min im Ultraschallbad entgast.

Zur Vermeidung von Luft einschlüssen wurde in die mobile Phase Helium (20mL/min) eingeleitet.

Kalibrierung und Wiederfindung des 3-Chlorphenylazoamidins (15)

Die Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten erfolgte über die bei einer 6-Punkt-Kalibrierung erhaltenen Signalflächen (Abbildung 59 auf Seite 154). Dazu wurden je Substanzkonzentrationen von 0,1 bis 14 μ M in einem 1:1 (v/v)-Gemisch aus Phosphatpuffer pH 6,3 und Methanol gelöst und mittels oben aufgeführter Methode vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die oben genannten Konzentrationen an 3-Chlorphenylazoamidin dem in [6.7.3] beschriebenen Inkubationsansatz zugesetzt. Anstelle des aktiven Proteins wurden äquivalente Mengen hitzedenaturierter Mikrosomen (5min bei 95°C) eingesetzt und auf den Cofaktorzusatz wurde verzichtet. Die Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten gemäß der unter [6.7.3] beschriebenen Methode. Es wurden jeweils 2 Proben jeder Konzentration doppelt vermessen (n=4).

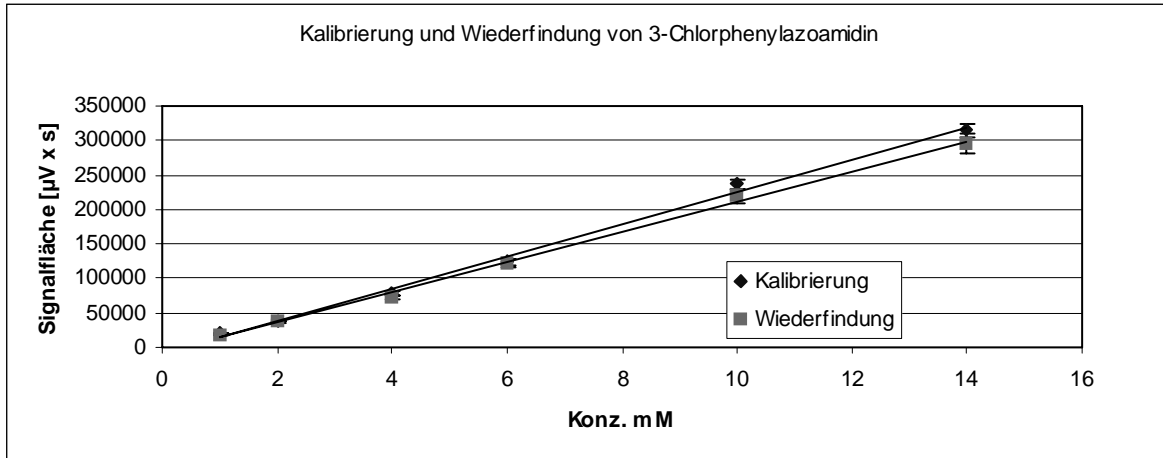


Abb. 59: Kalibrierung und Wiederfindung von 3-Chlorphenylazoamidin. Korrelationskoeffizienten: Kalibrierung $r^2=0,9963$; Wiederfindung: $r^2=0,9976$

6.7.5 Proteinquellen

Es wurde ein breites Spektrum humaner und porciner Enzymquellen für die Inkubation der Arylazoamidoxime genutzt, um ein möglichst differenziertes Bild der Reduktion der Testsubstanzen zu erhalten. Alle Enzymquellen wurden vom Arbeitskreis B. Clement in Kiel isoliert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Folgende Proteinquellen wurden für die Biotransformationsansätze genutzt:

Tab. 41: Übersicht der genutzten Enzymquellen (Arbeitskreis B. Clement, Kiel)

Enzymquelle	Charge	Proteingehalt [mg/mL]
Lebermitochondrien, human	13/12/00	18,0
Lebermitochondrien, porcine	25/11/02	9,1
Nierenmitochondrien, human	07/01	15,2
Nierenmitochondrien, porcine	12/02/01	50,1
Lebermikrosomen, human	13/12/00	35,4
Lebermikrosomen, porcine	12/10/00	70,14
Nierenmikrosomen, human	03/07/01	4,61
Nierenmikrosomen, porcine	12/02/01	49,9
9000g-Überstand, humane Leber	09/05/00	10,24
9000g-Überstand, porcine Leber	06/05/00	78,8
9000g-Überstand, humane Niere	22/05/00	2,8
9000g-Überstand, porcine Niere	26/05/00	21,6

