

Aus dem Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln

eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Calciumkanalmodulatoren vom Dihydropyridin-Typ erhöhen die endotheliale NO-Bildung

Entwicklung einer sensitiven Methode zur Nitrit-Bestimmung von biologischen Proben

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Svenja Purol-Schnabel geb. Purol
Tierärztin aus Köln

Berlin 2003

Journal-Nr.: 2692

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael F. G. Schmidt
Erster Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. vet. Rudolf Scherkl
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Klaus
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Angelika Richter

Tag der Promotion: 07.03.2003

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Pleiotrope Wirkungen von Calciumantagonisten vom Dihydropyridin-Typ	3
2.2	NO-Bildung im Endothel und Wirkung von NO	4
2.3	Nachweismethoden von Stickstoffmonoxid, Möglichkeiten der NO-Detektion	6
2.4	Konzept der neuen Methode	10
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Versuchstiere	12
3.1.1	Hausschwein	12
3.2	Physiologische Nährlösungen	12
3.2.1	Normal-Tyrode-Lösung	12
3.2.2	HEPES-Puffer	14
3.3	Lösungsmittel	14
3.3.1	Kaliumphosphatpuffer (50 mmol/l)	14
3.3.2	Dimethylsulfoxid (DMSO)	15
3.4	Kalibrierungs-/Messlösung für die NO-Elektrode	15
3.5	Substanzen	16
3.5.1	Calciumkanalmodulatoren	16
3.5.2	Chemikalien und Prüfsubstanzen	19
3.6	Zellkultur	23
3.6.1	Präparation der Aorten	23
3.6.2	Isolierung der Endothelzellen	24
3.6.3	Kultivierung der Endothelzellen	24
3.6.4	Subkultivierung der Zellen	25
3.7	Präparation der Arteria coronaria des Hausschweines	25

3.8	Direkte Stickstoffmonoxid-Messung mit der ISO-NO-Elektrode	25
3.8.1	Aufbau der ISO-NO-Elektrode	26
3.8.2	Kalibrierung der ISO-NO-Elektrode	28
3.8.3	Experimentelle Versuchsdurchführung	29
3.8.4	Vorversuche zur Standardisierung der Methode	32
3.8.5	Berechnung der gebildeten Nitritkonzentration	33
3.8.6	Überprüfung des Gefäßendothels auf Funktionsfähigkeit	34
3.8.7	Porcine Endothelzellen: Messung von NO aus Zellüberständen	36
3.9	Statistik	39
4	ERGEBNISSE	40
4.1	Sensitivität der Elektrode	40
4.2	Selektivität der Elektrode	44
4.2.1	Einfluss von Proteinen auf die Nitrat/Nitrit-Analytik	44
4.2.2	Einfluss von SH-Gruppen auf die Nitrat/Nitrit-Analytik	44
4.3	Basale Nitrat/Nitrit-Bildung am Gefäßendothel	45
4.3.1	Charakterisierung der basalen Nitrat/Nitrit-Bildung	45
4.3.2	Endothelabhängigkeit des Nitrat/Nitrit-Signals	49
4.3.3	Stimulation der NO-Bildung durch Scherkräfte	54
4.3.4	Wirkung von L-Typ Calciumkanalmodulatoren vom Dihydropyridintyp auf die Nitrat/Nitrit-Bildung	57
4.4	Basale Nitrat/Nitrit-Bildung in der Endothelzellkultur	63
4.4.1	Basale Nitrat/Nitrit-Bildung von PAEC unter Scherstress und Einfluss von L-NMMA	63
4.4.2	Wirkung von Nifedipin auf die Nitrat/Nitrit-Bildung unter Scherkräften in der Endothelzellkultur	64
5	DISKUSSION	64
5.1	Eine sensitive Methode zur Messung von Nitrat/Nitrit in biologischen Systemen	65
5.1.1	Entwicklung der Methode	65
5.1.2	Vergleich mit anderen Messmethoden	68

5.2	Basale NO-Bildung	69
5.3	Scherstress-induzierte NO-Bildung	73
5.4	Dihydropyridine und endotheliale NO-Freisetzung	75
5.4.1	Freisetzung von NO	77
5.4.2	Dihydropyridine und Scherstress-induzierte NO-Freisetzung	77
5.4.3	Antioxidative Effekte der DHP	78
5.4.4	Therapeutisches Wirkspektrum der DHP	79
6	ZUSAMMENFASSUNG	80
7	SUMMARY	82
8	LITERATURVERZEICHNIS	84
9	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN	101

Abkürzungen

A. bidest	Aqua bidest
BK	Bradykinin
cAMP	cyclisches Adenosin-3-5-Monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3-5-Monophosphat
DHP	Dihydropyridin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
EAB	Europäisches Arzneimittelbuch
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Fa	Firma
GC-MS	Gaschromatographie-Massspektrometrie
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroethyl-)-1-piperazinethanolsulfonsäure
HUVEC	humane Endothelzellen der Umbilicalvene
HWZ	Halbwertszeit
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LDL	low density lipoproteins (Lipoproteine von niedriger Dichte)
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
MetHb	Methämoglobin
MG	Molekulargewicht
n	Versuchszahl
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OxyHb	Oxyhämoglobin
p.a.	pro analysis
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
RMEC	Endothelzellen der retinalen Microgefäße
RT	Raumtemperatur
TXA ₂	Thromboxan A ₂

9 Vorabveröffentlichungen

Purol-Schnabel S, Rösen R, Berkels R, Khorgami P, Bartels H, Klaus W:

A new sensitive method to measure the NO/nitrite-content in different biological systems.

Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 361(Suppl.4): R 50, 2000

Bartels H, Kirmizigül I, Mayer M, Purol-Schnabel S, Rösen R.:

The antioxidative effect of the dihydropyridine- Ca²⁺- antagonists may be enhanced in the presence of a multilammellar membrane preparation.

Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 359 (Suppl.3): R 71, 1999

Berkels R, Rösen R, Purol-Schnabel S, Bartels H, Marsen T, Egink G, Klaus W:

Nifedipine treatment of endothelial cells increases the NO bioavailability by antioxidative mechanisms but without altering mRNA or protein levels.

Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 361(Suppl.4): R 73, 2000

Berkels R, Purol-Schnabel S, Rösen R:

A new method to measure nitrate/nitrite with a NO-sensitive electrode.

J. Appl. Physiol. 90, 317-320, 2001

Berkels R, Rösen R, Bartels H, Purol-Schnabel S, Kirmiziguel I, Farmer H, Born GVR, Klaus W:

The dihydropyridine calcium antagonist nisoldipine induces an enhanced bioavailability of nitric oxide-possible implications of antioxidative properties.

Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 364: 110-116, 2001

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Klaus gilt mein besonderer Dank für die Auswahl des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die finanzielle Unterstützung.

Besonders herzlich danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Renate Rösen für ihre wunderbare, fachliche und persönliche Betreuung. Sie war jederzeit ansprechbar, Probleme wurden gemeinsam gelöst, anregende und freundliche Gespräche machten das Arbeiten leicht. Danken möchte ich ihr auch für die intensive Betreuung während der Zeit der Niederschrift dieser Arbeit.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. vet. Rudolf Scherkl bedanke ich mich für die Bereitschaft, meine Arbeit veterinärmedizinisch zu betreuen.

Meiner Arbeitsgruppe danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders möchte ich Herrn Henning Bartels für seine fachliche und freundschaftliche Unterstützung danken.

Dem Team der Werkstatt, insbesondere Herrn Markus Speckmann, danke ich für die immer schnelle Hilfe bei technischen Problemen.

Herrn Stefan Kaulbersch und Herrn Mark Maier der Agentur Enorm gilt mein Dank für ihre Hilfe in der letzten Zeit meiner Arbeit, der Bereitstellung eines konzentrierten Arbeitsumfeldes und somit der Hilfe bei der schnellen Fertigstellung.

Frau Anja Krick danke ich für ihre Hilfe bei der Formgebung der Arbeit.

Bei Frau Caro Johner bedanke ich mich für ihre begleitende fachliche Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann, der mich in der ganzen Zeit liebevoll und konstruktiv unterstützt hat und mir emotional stets zur Seite stand.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Svenja Purol-Schnabel, geb. Purol
Geburtsdatum: 23.05.1972
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

1978 - 1982 Mühlenfeldschule, Kerpen
1982 - 1991 Tagesheimgymnasium Kerpen
Abschluß Abitur
1991 – 1997 Studium der Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
September 1997 Approbation als Tierärztin
Nov. - Dez. 1997 Hospitanz in der tierärztlichen Praxis Dr. Schulze-Zumloh,
Erfstadt
Feb. – April 1998 Praktikum im Geschäftsbereich Tiergesundheit, Ressort
Forschung, Institut für Infektionskrankheiten der Bayer AG,
Monheim
April 1998 Beginn der Promotion am Institut für Pharmakologie der
Universität zu Köln
1998 – 2000 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmakologie
seit Juni 1999 Assistenz-Tierärztin (Teilzeit) in der Kleintierpraxis
Dr. med. vet. U. Kessel, Bergheim

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.