

2 Literaturübersicht

2.1 Pleiotrope Wirkungen von Calciumantagonisten vom Dihydropyridin-Typ

Wie bereits erwähnt, haben die DHP neben der Vasodilatation verschiedene, vom L-Typ-Calciumkanal unabhängige Wirkungen. So kommt es unter dem Einfluss von DHP zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation und damit klinisch zu einer antithrombotischen Wirkung. Thrombozyten exprimieren ebenfalls keine L-Typ-Calciumkanäle (Doyle, Ruegg, 1985), dementsprechend müssen auch hier andere Mechanismen als die Calciumkanalblockade für diesen Effekt verantwortlich sein. Diskutiert wurde eine Wirkung über die Thromboxane, sowohl eine Hemmung der TXA₂-Synthese (Manninen, 1996) als auch eine Blockade von TXA₂-Rezeptoren (Johnson et al., 1990). Darüberhinaus wurde eine Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase (Norman, 1983) beschrieben. Noch ältere Arbeiten verweisen auf eine Hemmung der α -Adreno-Rezeptoren (Atlas, Adler, 1981). Neuere Befunde zeigen, dass während der Aktivierung/Aggregation der Thrombozyten die thrombozytäre NO-Synthase aktiviert wird, um als negativer Feedback-Mechanismus einem thrombotischen Prozeß entgegenzuwirken (Berkels et al., 1997; Malinski et al., 1993). Die Nifedipin-induzierte Hemmung der Aggregation kann durch Hemmung der NO-Synthase aufgehoben werden (Berkels et al., 1994), so dass sie auf eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit durch Nifedipin zurückgeführt werden kann. Damit würden sich auch die Befunde einer stärkeren Wirkung der DHP in vivo erklären, wo eine konzertierte Wirkung von NO aus Endothel und Blutplättchen vorliegt (Takahara et al., 1985).

NO selbst hemmt die Thrombozytenaktivierung/-aggregation (Radomski et al., 1987). Aus dem Endothel und von Thrombozyten freigesetzt, führt es über Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und Anstieg von cGMP, Inhibition der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3) und Verminderung des intrazellulären Calciums und Hemmung der Cyclooxygenase-Aktivität, zur Hemmung der TXA₂-Bildung (Loscalzo, 2001), so dass die Wirkung der DHP-Calciumantagonisten ohne Widerspruch zu bisherigen in der Literatur beschriebenen Befunden auf eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit zurückgeführt werden kann.

Des Weiteren werden den DHP protektive Eigenschaften bezüglich der Bildung von atherosklerotischen Läsionen zugeschrieben (Fleckenstein-Grun et al., 1994; Lichtlen et al., 1990). Der genaue Mechanismus ist noch unklar. Auch hier könnten Endothel(NO)-vermittelte Prozesse beteiligt sein. Nach heutigen Vorstellungen scheint bei den initialen

Schritten der Atherogenese die Aufnahme von Oxy-LDL und Ac-LDL ins Endothel von Bedeutung zu sein (Gaut, Heinecke, 2001). Nach DHP-Gabe beobachteten Berkels et al. (2000) eine verminderte LDL-Aufnahme in Endothelzellen, die nach Hemmung der NOS aufgehoben war. Ähnliche Effekte wie mit Nifedipin wurden auch mit NO-Liberatoren erzielt. Ebenso können nachfolgende Schritte der Atherogenese - Adhäsion von Makrophagen am Endothel, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen - durch NO gehemmt werden (Scott-Burdon, Bühler, 1988; Kataoka et al., 1997).

2.2 NO-Bildung im Endothel und Wirkung von NO

Die Bildung von NO wird durch die Enzymfamilie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Heute werden konstitutive und induzierbare Isoformen der NO-Synthase unterschieden (Bredt, 1999; Lacza et al., 2001). Eine konstitutive Form - nNOS (resp. bNOS) - findet sich in hohem Maße im peripheren und zentralen Nervensystem. Eine andere, der nNOS ähnliche Form, ist die in den Mitochondrien enthaltene mtNOS (Kanai et al., 2001). Eine weitere NO-Synthase - eNOS - kommt in Zelltypen des kardiovaskulären Systems vor. Die induzierbare Form - iNOS - wird unter basalen Bedingungen nicht exprimiert, sondern wird u.a. in Polymorphonukleäre Leukozyten (PMN), Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Blutgefäße nur nach Stimulation mit inflammatorischen Reizen wie bakteriellen Lipopolysacchariden und Zytokinen (Interleukin 1, Tumornekrosefaktor), mit einer Verzögerung von mehreren Stunden induziert.

In Endothelzellen und in PMNs ist die eNOS konstitutiv exprimiert und bildet basal kontinuierlich NO. Da diese Form der NO-Synthase Calcium- und Calmodulin abhängig ist (d.h. sie bindet Calmodulin nur in Gegenwart erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen), kann sie durch Anstieg des intrazellulären freien Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und/oder durch Einstrom von extrazellulärem Calcium (Graier et al., 1990) von unter 100 nM auf über 200 nM aktiviert werden (Förstermann et al., 1991).

Das entstehende NO diffundiert aus den Endothelzellen sowohl in das Gefäßlumen als auch in die glatte Muskulatur der Gefäßwand. Abluminal sezerniertes NO führt zur Modulation des Blutdruckes, indem die lösliche Guanylatcyclase in der glatten Muskulatur aktiviert wird (Rapaport, Murad, 1983) und somit durch die Bildung von cGMP aus GTP (durch Abspaltung von Pyrophosphat) über Phosphorylierung verschiedener Enzyme und Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (in der glatten Muskelzelle) eine Vasorelaxation bewirkt (Kukovetz, Holzmann, 1985). Durch Hemmung der Synthase steigt unmittelbar der Blutdruck an (Vallance et al., 1989). Neben dieser Akut-Regulation des Blutgefäßtonus wirkt NO auch proliferationshemmend auf die intimalen glatten Gefäßmuskelzellen (Scott-Burden et al.,

1992). Luminal freigesetztes NO inhibiert die Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand (Moncada, 1992) und hemmt, wie bereits beschrieben, die Thrombozytenaktivierung/-aggregation.

Des Weiteren können höhere Konzentrationen von NO in verschiedenen Zellen die Apoptose aktivieren (Sarih et al., 1993; Ankarcona et al., 1994; Fehsel et al., 1995; Lane, Gross, 1999). In der glatten Muskulatur der Gefäße kann die Apoptose durch Änderung des iNOS-Gens ausgelöst werden (Iwashina et al., 1998). NO kann auch direkt über eine Reaktion mit der DNA den Zelltod hervorrufen (Inoue, Kawanishi, 1995).

In der unspezifischen Immunabwehr werden Bakterien und Parasiten von Makrophagen durch Bildung von NO (durch Induktion der iNOS) und Superoxidanionen abgetötet (Schmidt, 1994). NO kann aber auch als Zellgift gegen körpereigene Zellen wirken. So kommt es beim „oxidative burst“ durch die Zellen der unspezifischen Immunabwehr zur Bildung von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid-Radikalen und zu einer zytotoxischen Wirkung des sich daraus bildenden Peroxynitrits. Im septischen Schock induzieren Zytokine in den glatten Muskelzellen die Bildung der iNOS und somit eine vermehrte Freisetzung von NO, welche zu einer maximalen Vasodilatation und zu einem massiven Blutdruckabfall mit Schocksymptomatik führt (Thiemermann, 1997).

Eine pathologische Folge der NO-Produktion ist in einer frühen Krankheitsphase des Diabetes mellitus Typ I zu beobachten. Durch Interleukin-1 β kann die iNOS in insulinproduzierenden pankreatischen B-Zellen, Endothelzellen und/oder infiltrierenden leukozytären Zellen induziert werden und über die gesteigerte NO-Bildung zu einer Insulinitis, dem Untergang pankreatischer B-Zellen und zum Totalausfall der Insulinproduktion führen (Ankarcona et al., 1994; Kaneto et al., 1995).

Die Aktivität der eNOS kann durch verschiedene Stimuli erhöht werden, z.B. binden verschiedene vasoaktive Substanzen wie z.B. Acetylcholin und Histamin, an spezifische Rezeptoren der Endothelzellen und erhöhen die NO-Bildung (Amezcuca et al., 1988; Rapaport et al., 1983) bzw. die freie intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration. Ein anderer Mechanismus der Regulation der eNOS ist ihre Translokation aus dem Cytoplasma in die Plasmamembran durch Veresterung mit Myristinsäure, wodurch die erhöhte Aktivität gegenüber der gelösten Form erhöht wird (Sakoda et al., 1995). Eine Aktivierung mittels Proteinkinasen führt zur Phosphorylierung der eNOS und damit zu einer erhöhten NO-Freisetzung, wobei dieser Mechanismus auf der Stimulation durch verschiedene Stoffe (z.B. Ionomycin) (Tsukahara et al., 1993) oder auf der mechanischen Stimulation, dem Scherstress, beruhen kann (Reber et al., 2000).

Die genannten Mechanismen führen alle zu einer Stimulation der NO-Bildung und ergeben dadurch eine nachweisbare Konzentration an NO. Unter Ruhebedingungen, d.h. einer „basalen“ Bildung, ist die Konzentration an NO jedoch sehr niedrig und mittels der gängigen Methoden am Rande der Nachweisbarkeit.

2.3 Nachweismethoden von Stickstoffmonoxid, Möglichkeiten der NO-Detektion

Zur Analytik des Stickstoffmonoxids werden sowohl indirekte als auch direkte Messmethoden verwendet, welche sich z.T. unmittelbar aus dem NO-Stoffwechsel (Abbildung 1) ableiten.

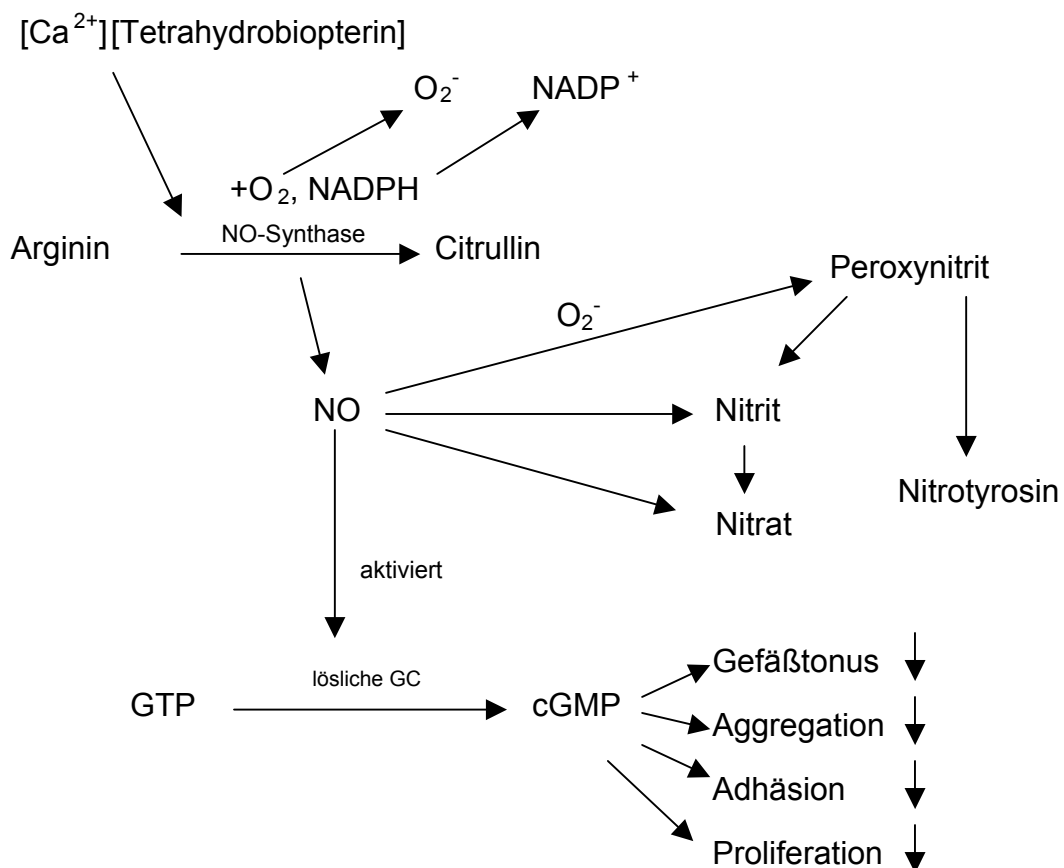


Abbildung 1: NO-Stoffwechsel-Schema

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten des **indirekten** Nachweises von NO – z.B. über seine Reaktionsprodukte im biologischen System oder über die Aktivität der NO-Synthase:

1. Im Bioassay kann NO über seinen biologischen Effekt, die Änderung des Gefäßtonus, analysiert werden. NO bewirkt durch Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase in glatten Muskelzellen eine Relaxation, welche im Versuch z.B. an endothelfreien Rattenaorten nachgewiesen werden kann (Gryglewski et al., 1986). Die Funktion ist abhängig von cGMP, d.h. einer funktionsfähigen Signalkaskade, so dass zusätzlich zur nicht limitierten Substrat- und Cofaktorversorgung eine Kopplung an die lösliche Guanylatcyclase und den kontraktile Apparat des glatten Muskels intakt sein müssen. Ist die NO-Synthase-Aktivität pathologisch erhöht, aber kein Produkt nachweisbar, so ist dies mit dem Bioassay nicht erfassbar. Der Bioassay zeigt nur das funktionell wirksame NO auf. Der Nachweis über die Gefäßrelaxation hat auch den Nachteil, dass die Relaxation durch das Abbauprodukt Peroxynitrit hervorgerufen werden kann und eine gewisse Verzögerungszeit des biologischen Systems miteingerechnet werden muss.
2. Biochemisch kann die NO-induzierte Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch Quantifizierung des cyclischen Guanosinmonophosphates (cGMP) erfasst werden (Murad, 1994), wie dies z.B. mit einem Radioimmunoassay (RIA) (Kelm, 1996) oder ELISA erfolgen kann.
3. Über die Bildung von Citrullin kann man auf die Aktivität der NO-Synthase schließen (Robbins et al., 1993), was bei ausreichender Substrat- und Cofaktorzufuhr die unter optimalen Bedingungen vorhandene NO-Bildung widerspiegelt. Demgegenüber lässt sich die Reduktaseaktivität der NOS über den Verbrauch an NADPH bestimmen, die bei ungestörtem Substratfluß identische Werte wie beim Citrullinassay liefern sollte. Um jeweils eine Aussage über die Enzymmenge machen zu können, wäre z.B. eine weitere quantitative Bestimmung über einen Western Blot möglich.

Des Weiteren kann die indirekte NO-Bestimmung über die Nitrat/Nitrit-Bildung erfolgen, da die Summe von Nitrat und Nitrit stöchiometrisch wie NO gebildet wird:

4. Die "Griess-Reaktion" beruht auf der Umsetzung von Griess-Reagenz (Sulfanilsäure/N-(1-naphthyl)ethylendiamin) mit Nitrit zu einem Diazofarbstoff, dessen Absorption im sichtbaren Bereich bei 548 nm bestimmt wird (Gustafsson et al., 1991), da die Absorption bei dieser Wellenlänge proportional zur Nitrit-Konzentration ist. Das

Detektionslimit für Nitrit liegt in Abhängigkeit von der Sensitivität des Photometers und des molaren Extinktionskoeffizienten bei einer Konzentration von 0,3 µmol/l (benötigtes Probenvolumen 500 µl). Bei dem Nitrat/Nitrit-Assay der Firma R&D, welcher auch auf der Griess-Reaktion beruht, liegt das Detektionslimit bei 2,5 µmol/l, wobei für den Test nur 80 µl der zu analysierenden Lösung benötigt werden. Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass es zu Interaktionen zwischen den vor allem in biologischen Proben vorhandenen SH-Gruppen und dem Griess-Assay kommt und dadurch der Nachweis von NO gestört wird (Tsikas et al., 1997).

5. Die Sensitivität des Griess-Assays kann in einer Variante, dem Fluorometric Assay (R&D), erhöht werden. Nitrit reagiert mit 2,3-Diaminonaphthalen (DAN) unter sauren Bedingungen zu dem fluoreszierenden 2,3-Diaminonaphthotriazol, über welches der Nachweis erfolgt. Bei einem Detektionslimit von 0,2 µmol/l ist dieser Assay zwar sensitiver, gleichzeitig erhöht sich aber auch die Störanfälligkeit. Es gibt Interferenzen mit Hämoglobin, fetalem Kälberserum, Rinderserumalbumin und Phenolrot (Misko et al., 1993).
6. Da der Griess-Assay v.a. für menschliche Plasma-Proben eine zu hohe Störanfälligkeit aufweist, wurde der Nachweis mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) versucht. Hier wird NO über eine ultraviolette Detektion von Nitrat und eine elektrochemische Detektion von Nitrit im Rahmen einer sog. Zweikanalanlage bestimmt. Wässrige Standards können unmittelbar aufgetragen werden, Proben menschlichen Blutes bedürfen aufgrund der kurzen Halbwertszeit von NO und Nitrit im Vollblut einer **schnellen** Aufarbeitung. Diese Methode ermöglicht eine simultane Bestimmung von Nitrit im nanomolaren Bereich und von Nitrat im mikromolaren Bereich. Das Detektionslimit liegt bei 3 nmol/l Nitrit in wässriger Probe und bei 10-50 nmol/l Nitrit in Plasma (Kelm, 1996; Preik-Steinhoff et al., 1996), erfordert aber einen hohen apparativen und zeitlichen Aufwand.
7. Ebenfalls spektrophotometrisch kann man NO mit der sog. OxyHb-Methode nachweisen. Im Rahmen einer Redoxreaktion des Hämoglobins reagiert NO mit dem am $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$ gebundenen Sauerstoff zu Nitrat- und Methämoglobin- (Fe^{3+}) , die Absorptionsdifferenz zwischen $\text{OxyHb}(\text{Fe}^{3+})$ und $\text{MetHb}(\text{Fe}^{3+})$ kann im Doppelwellen-Verfahren gemessen werden (Kelm et al., 1988). Obwohl die OxyHb-Methode mit einem Detektionslimit von 2 nmol/l gegenüber den anderen direkten NO-Messmethoden eine erhöhte Sensitivität für NO aufweist, besteht nur eine geringe Selektivität für NO. Schmidt et al. (1994) zeigten, dass diese Methode z.B.

nicht zwischen Nitrit und Peroxynitrit resp. NO differenzieren kann. Des Weiteren muß beachtet werden, dass NO durch Reaktion mit OxyHb abgefangen wird und NO-vermittelte negative Feedback-Regulationsmechanismen der NO-Synthese auf diese Weise aufgehoben werden können (Buga et al., 1993), wodurch es zu einer Verschiebung des physiologischen Gleichgewichtes hinsichtlich der Regulation der NO-Synthese kommen kann.

8. Bei dem Bestimmungsverfahren von NO mittels der Chemilumineszenz werden Nitrat/Nitrit der Proben zu NO reduziert und über ein inertes Trägergas (z.B. Argon, Helium) in den Analysator eingebracht. Mit Ozon wird NO zu teilweise angeregtem Stickstoffdioxid umgesetzt, die Lumineszenz beim Übergang aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand wird gemessen (Brien et al., 1991). Diese Methode kann, ebenso wie die Oxy-Hb-Methode und der Griess-Assay, bei der Erfassung von biologisch gebildetem NO nicht zwischen aktivem NO und dem inaktiven Metaboliten Nitrit unterscheiden (Palmer et al., 1987), so dass exogene Nitrite, Allylnitrit-Ionen oder Nitroso-Verbindungen in der Lösung ebenfalls zu erhöhten Werten führen können. Darüber hinaus ist der Transfer von NO aus der Lösung in die Gasphase durch Begasung mit inertem Gas nur für NO-Konzentrationen $>0,1 \mu\text{mol/l}$ effektiv (Kiechle et al., 1993).

Eine **direkte** Bestimmung von NO ist mit folgenden Verfahren möglich:

1. Elektronenspinresonanz-Messungen (EPR) erfassen Moleküle mit ungepaarten Elektronen und Radikale wie z.B. NO^{\bullet} (Henry et al., 1991). Da das Detektionslimit mit $4 \mu\text{mol/l}$ weit über den physiologischen NO-Konzentrationen liegt, ist dieses Messverfahren in biologischen Systemen nicht sensitiv genug. Die mangelnde Sensitivität kann durch integrale Messung über die Zeit mittels Scavenger überbrückt werden.
2. Mit der ISO-NO-Elektrode hat man die Möglichkeit, NO elektrochemisch direkt zu messen (Angabe des Herstellers WPI). Bertsch (1996) hat dieses im biologischen System anhand einer standardisierten Rezeptor-stimulierten NO-Bildung dargestellt. Dabei wurde die ISO-NO-Elektrode direkt über dem Gefäßendothel plziert, das aus dem Endothel freiwerdende NO diffundiert durch die hochspezifische Polymermembran und wird an der Elektrode mit einem konstant angelegten Potential von $0,9 \text{ V}$ oxidiert. Das elektrische Stromsignal ist proportional zur freien NO-Konzentration an der äußeren Oberfläche der Membran. Obwohl die

Polymermembran neben NO auch für einige andere Gase permeabel ist, wird die Selektivität für NO durch das angelegte Potential gewährleistet. O₂, CO, CO₂ und NO₂ stören den NO-Nachweis nicht (Bertsch, 1996). Von Bertsch (1996) wurde mittels chemischer Titration und NO-Gas-Lösungen eine hohe Sensitivität der Elektrode gezeigt, das Detektionslimit lag bei 1,5 nmol/l NO.

2.4 Konzept der neuen Methode

Wie bereits erwähnt, ist die am Gefäßendothel stattfindende permanente basale NO-Bildung sehr gering. Übertragen auf die experimentelle Versuchsanordnung kann das bedeuten, je niedriger die basale NO-Bildung, desto schonender wurde die Probe bei Präparation und im Experiment behandelt - aber desto problematischer ist auch die Analytik für „gebildetes“ NO.

Die basale NO-Bildung liegt unterhalb der Nachweisgrenzen der genannten Methoden, diese sind somit nicht sensitiv genug. Es stellt sich das Problem des Nachweises. Eine Möglichkeit der Erfassung geringer Bildungsraten wäre eine kumulative Messung, wodurch die NO-Menge messbar werden würde. Allerdings ist NO durch seine kurze Halbwertszeit kumulativ nicht zu fassen, es erfolgt schnell eine Umwandlung zu Nitrit und Nitrat.

Nitrit und Nitrat bleiben in menschlichem Plasma und in wässriger Lösung bis zu drei Stunden stabil (Kelm et al., 1994). Nitrit ist als Index der endothelialen NO-Formation nutzbar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der eNOS zu einem verminderten Serum-Nitrit-Spiegel führt, die Applikation von L-Arginin das basale Nitrit im Serum erhöht (Kelm et al., 1999). Dementsprechend kann man die stöchiometrische Reaktion des NO zu Nitrit und Nitrat nutzen, indem man Nitrat und Nitrit wieder zu NO zurückführt, was bei der Chemilumineszenzmessung mittels des Sievers-Gerätes genutzt wird. Allerdings ist das dabei verwendete Prinzip des Transportes von NO durch Begasung mit Inertgas nur für NO-Konzentrationen in der Probe von > 0,1 µmol/l effektiv. Für den Nachweis von nmolaren Mengen NO sind große Probenvolumina von 1 ml nötig, das hohe Maß an Sensitivität kann also nur durch sehr große Probenvolumina erreicht werden. Die Nachweisgrenze für Nitrit liegt bei 1 µmol/l. Im Gasraum misst das Sievers-Gerät ppb resp. ppm, entsprechend der Kalibrierung werden dann absolute Mengen an NO detektiert.

Der gleiche Ansatz wie bei der Chemilumineszenz (Sievers) - Reduktion von Nitrat/Nitrit zu NO - wird bei der Kalibrierung der ISO-NO-Elektrode mittels chemischer Titration verwendet. Allerdings wird mit der Elektrode das freigesetzte NO direkt in der Reaktionslösung gemessen, somit wird bei Anwendung dieses Prinzips auf biologische Proben das Problem

der nicht effektiven NO-Austreibung, das bei der Derivatisierung mit Ozon besteht, umgangen.

Aufgrund ihrer hohen Sensitivität könnten bereits geringe Konzentrationen an NO gemessen werden, so dass nach Standardisierung dieses Verfahrens die basale NO-Bildung resp. Stimulation durch DHP-Calciumantagonisten untersucht werden soll.