

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Hausschwein

Vergleichende NO-Messungen wurden an der Koronararterie des Hausschweines durchgeführt. Die hierzu benötigten Organe stammen von 70-90 kg schweren, 5-7 Monate alten Schlachtschweinen aus dem Kölner Schlachthof, Fa. FVK GmbH, Liebigstr.120. Die Entnahme der Herzen erfolgte ungefähr 15 Minuten nach dem Schlachten der Tiere. Die Koronararterien wurden großzügig mit anhängendem Gewebe herauspräpariert und mehrmals mit vorbegaster Nährlösung (Zimmertemperatur) durchspült. Der Transport der Gewebeproben zum Institut für Pharmakologie erfolgte in einem mit carbogengesättigter Tyrodelösung gefülltem Gefäß; die Transportzeit betrug dabei ungefähr 20 Minuten.

3.2 Physiologische Nährlösungen

3.2.1 Normal-Tyrode-Lösung

Als Perfusionsmedium bei der Gefäßpräparation wurde carbonbegaste, eiweißfreie Normal-Tyrode-Lösung (NT-Lösung) verwendet, die am Versuchstag frisch aus Stammlösungen angesetzt wurde. Durch Begasung mit Carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂, Fa. Linde, Höllriegelskreuth) wurde eine O₂-Sättigung erzielt und der pH auf 7,4 eingestellt. Die NT-Lösung hatte folgende molare Zusammensetzung:

Na ⁺	161,11 mmol/l
K ⁺	5,36 mmol/l
Ca ²⁺	1,80 mmol/l
Mg ²⁺	1,05 mmol/l
Cl ⁻	147,95 mmol/l
HCO ₃ ⁻	23,80 mmol/l
H ₂ PO ₄ ⁻	0,42 mmol/l
Glucose	10,0 mmol/l

Die Herstellung erfolgte mittels mehrerer Stammlösungen mit folgender Zusammensetzung:

CaCl₂-Stammlösung: MG= 147,02 2,25 mol/l
Ansatz: 165,57 g auf 500 ml Aqua bidest (A. bidest)

MgCl₂-Stammlösung: MG= 203,30 1,05 mol/l
Ansatz: 106,83 g auf 500 ml A. bidest

Diese beiden Stammlösungen wurden bei der Herstellung der folgenden drei Stammlösungen verwendet:

Stammlösung I:

NaCl	MG= 58,44	3,42 mol/l	200 g
KCl	MG= 74,56	0,13 mol/l	10 g
CaCl ₂ -Stammlösung	MG= 147,02	2,25 mol/l	20 ml
MgCl ₂ -Stammlösung	MG= 203,30	1,05 mol/l	25 ml
A. bidest ad 1000 ml			

Stammlösung II:

NaHCO ₃	MG= 84,01	0,59 mol/l	50 g
A. bidest ad 1000 ml			

Stammlösung III:

NaH ₂ PO ₄	MG= 137,99	0,04 mol/l	5,8 g
----------------------------------	------------	------------	-------

Vor Versuchsbeginn wurden jeweils 40 ml der Stammlösungen I und II, sowie 10 ml der Stammlösung III und 2 g Glucose zu einer Vorlage (200 ml) von entmineralisiertem Wasser gegeben und ad 1000 ml aufgefüllt.

3.2.2 HEPES-Puffer

Als physiologische Nährlösung während der Inkubation der Experimente wurde ein HEPES-Puffer [4-(2-Hydroethyl)-1-piperazinethansulfonsäure] folgender Zusammensetzung verwendet:

NaCl	MG= 58,44	140 mmol/l	8,18 g
KCl	MG= 74,56	5 mmol/l	0,37 g
CaCl ₂	MG= 147,02	2 mmol/l	0,29 g
MgCl ₂	MG= 203,30	1 mmol/l	0,20 g
HEPES	MG= 238,30	10 mmol/l	2,38 g
Glucose	MG= 198,17	10 mmol/l	1,98 g

Alle Substanzen stammen von der Firma Merck, Darmstadt und haben p.a. Qualität, die Glucose entsprach den Anforderungen des EAB 97.

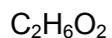
Der physiologische pH-Wert von 7,4 wurde mit 1 molarer NaOH eingestellt und der Puffer ohne Glucose bei 4°C aufbewahrt. Die Glucose wurde am Versuchstag jeweils frisch dazugegeben.

3.3 Lösungsmittel

3.3.1 Kaliumphosphatpuffer (50 mmol/l)

8,0 ml einer 0,5 molaren Natriummonohydrogenphosphat-Lösung wurden mit 2,0 ml einer 0,5 molaren Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung vermischt und mit A. bidest zu 100 ml aufgefüllt. Die Lösung mit dem pH-Wert 7,4 wurde im Kühlschrank aufbewahrt und zur Herstellung der NADPH/FAD-Reaktionslösung verwendet.

3.3.2 Dimethylsulfoxid (DMSO)



Sigma, Deisenhofen

MG= 78,13

Das Lösungsmittel hatte p.a. Qualität und wurde bei verschiedenen Verdünnungen eingesetzt.

3.4 Kalibrierungs-/Messlösung für die NO-Elektrode

Zur Überführung von Nitrit in NO bei der Kalibrierung und Messung wurde mit einer Reaktionslösung folgender Zusammensetzung gearbeitet:

KI	MG= 166,01	0,10 mol/l
K ₂ SO ₄	MG= 174,27	0,14 mol/l
H ₂ SO ₄	MG= 98,08	0,10 mol/l

Als NO-Titrationslösung diente Kaliumnitritlösung (KNO₂, MG= 85,10) verschiedener Konzentrationen.

Alle Substanzen stammen von der Firma Sigma, Deisenhofen und wiesen p.a. Qualität auf. Die Lösungen wurden vor jeder Kalibrierung bzw. Messung frisch hergestellt.

3.5 Testsubstanzen

3.5.1 Calciumkanalmodulatoren

3.5.1.1 Amlodipin

2-(2-Aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methylpyridin-3,5-dicarbonsäure-3-ethyl-5-methylester

Pfizer, Karlsruhe

MG= 408,88

Zur Herstellung einer 10^{-3} -molaren Stammlösung wurden 5,67 mg Amlodipinbesilat (MG= 567,10) in 10 ml A. bidest gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Aliquots dieser Stammlösung wurden im Tiefkühlschrank aufbewahrt und erst kurz vor Versuchsbeginn aufgetaut. Für die Versuche wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-7} mol/l hergestellt. Die 10^{-3} -molare Lösung wurde mit A. bidest und HEPES (in einer 1:1 Verdünnung) hergestellt, die weiteren Verdünnungen bis zu einer Konzentration von 10^{-7} mol/l wurden mit HEPES hergestellt.

3.5.1.2 Bay K 8644

Bayer, Leverkusen

MG= 356,30

In 1 ml DMSO wurden 3,56 mg der Substanz gelöst. Ausgehend von dieser 10^{-2} -molaren Stammlösung wurde eine 10^{-3} -molare Lösung in DMSO/HEPES (1:1) hergestellt, alle weiteren Verdünnungen erfolgten in HEPES.

3.5.1.3 Bay O 5572

Bayer, Leverkusen

MG= 444,53

4,45 mg wurden in 1 ml DMSO zu einer 10^{-2} -molaren Stammlösung angesetzt. Eine 10^{-3} -molare Lösung wurde in DMSO/HEPES (Verdünnung 1:1) hergestellt, die weiteren Verdünnungen bis 10^{-7} mol/l wurden in HEPES hergestellt.

3.5.1.4 Bay W 9798

Bayer, Leverkusen

MG= 383,37

3,83 mg wurden in 1 ml DMSO gelöst, aus dieser 10^{-2} -molaren Stammlösung wurde eine 10^{-3} -molare Lösung in DMSO/HEPES (1:1) und alle weiteren Lösungen in HEPES hergestellt.

3.5.1.5 Mibefradil

1- isopropyl-naphth- 2- yl methoxyacetat

$C_{29}H_{38}FN_3O_3$

Roche, Grenzach-Wyhlen

MG= 568,50

Für die Versuche wurde eine 10^{-2} -molare Stammlösung angesetzt, indem 5,69 mg in 1 ml DMSO gelöst wurden. Eine 10^{-3} -molare Lösung wurde mit DMSO und HEPES (1:1 verdünnt), die folgenden Verdünnungen bis 10^{-7} mol/l mit HEPES hergestellt.

3.5.1.6 Nifedipin (Bay a 1040)

1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4(2-nitrophenyl)pyridin-3,5-dicarbonsäuredimethylester

Bayer, Leverkusen

MG= 345,30

3,45 mg Nifedipin wurden in 1 ml DMSO gelöst. Diese 10^{-2} -molare Stammlösung diente als Ausgang für eine Verdünnungsreihe von 10^{-3} (in DMSO/HEPES) bis zu einer Konzentration von 10^{-7} mol/l (mit HEPES hergestellt). Da Nifedipin unter Lichteinwirkung rasch inaktiviert wird, erfolgte die Herstellung der Verdünnungsreihe und die Durchführung der Versuche unter Natriumlicht (Spektrallampe, Schwabe; Natrium-Leuchte, Osram).

3.5.1.7 Nisoldipin

Isobutyl-1,4-Dihydro-5-methoxycarbonyl-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)3-pyridincarboxylat

Bayer, Leverkusen

MG= 386,40

Es wurden 3,86 mg in 1 ml DMSO zu einer 10^{-2} -molaren Stammlösung angesetzt. Daraus wurde eine 10^{-3} -molare Lösung in DMSO/HEPES (1:1 verdünnt) hergestellt. Alle weiteren Lösungen wurden in HEPES verdünnt.

3.5.1.8 Nitrendipin

1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenylpyridin)-3,5-dicarbonsäure-3-ethyl-5-methylester

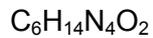
Bayer, Leverkusen

MG= 360,30

Es wurden 3,6 mg in 1 ml DMSO zu einer 10^{-2} -molaren Lösung angesetzt, eine 10^{-3} -molare Lösung wurde in DMSO und HEPES (Verdünnung 1:1) hergestellt. Alle weiteren Verdünnungen wurden in HEPES hergestellt.

3.5.2 Chemikalien und Substrate

3.5.2.1 L-Arginin



Merck, Darmstadt

MG= 174,20

1,7 mg wurden in 1 ml HEPES gelöst, aus dieser 10^{-2} -molaren Stammlösung wurde eine 10^{-3} -molare Lösung hergestellt.

3.5.2.2 Bradykinin

Arg- Pro- Pro- Gly- Phe- Ser- Pro- Phe- Arg 3 acetat

Serva, Heidelberg

MG= 1060,20

10,6 mg Bradykinin wurden in 1 ml A. bidest zu einer 10^{-2} -molaren Stammlösung gelöst und in HEPES bis zu einer 10^{-9} -molaren Lösung verdünnt.

3.5.2.3 Carbachol

Carbamoylcholinhydrochlorid



Merck, Darmstadt

MG= 182,65

1 mg wurde in 550 μl HEPES zu einer 10^{-2} -molaren Stammlösung gelöst und bis zu einer 10^{-4} -molaren Lösung verdünnt.

3.5.2.4 L-Cystein

2-Amino-3-mercaptopropionsäure

$C_3H_7NO_2S$

Merck, Darmstadt

MG= 121,16

12,12 mg wurden in 10 ml HEPES zu einer 10^{-2} -molaren Stammlösung gelöst und entsprechend weiter verdünnt.

3.5.2.5 FAD

Flavin-adenin-dinukleotid

$C_{27}H_{31}N_9O_{15}P_2Na_2$

Sigma, Deisenhofen

MG= 829,50

5 mg FAD wurden in 0,833 ml Phosphatpuffer gelöst und um eine Zehnerpotenz verdünnt. Die Lösung wurde in Portionen bei $-21^{\circ}C$ aufbewahrt. Kurz vor Versuchsbeginn wurden gleiche Volumina NADPH und FAD aufgetaut und zusammengeführt (entsprechend einer 1:1 Verdünnung).

3.5.2.6 1400 W

N-(3-(Aminomethyl)benzylacetamin) Dihydrochlorid

$C_{10}H_{15}N_3 \cdot 2 HCl$

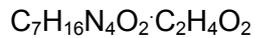
Alexis Corporation, San Diego, USA

MG= 250,30

Es wurden 2,5 mg der Substanz in 1 ml HEPES zu einer 10^{-2} -molaren Stammlösung gelöst und entsprechend weiter verdünnt.

3.5.2.7 N-Mono-Methyl-L-Arginin (L-NMMA)

N-Methyl-L-Arginin (Acetat)



Sigma, Deisenhofen

MG= 248,30

Es wurden 2,5 mg in 1 ml HEPES gelöst, um eine 10^{-2} -molare Stammlösung zu erhalten. Daraus wurde eine 10^{-4} -molare Lösung hergestellt.

3.5.2.8 NADPH

Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)



Alexis Corporation, San Diego, USA

MG= 833,40

5 mg NADPH wurden in 1,65 ml Phosphatpuffer gelöst und in Portionen im Tiefkühlschrank bei -21°C aufbewahrt. Die benötigte Menge wurde jeweils vor Versuchsbeginn aufgetaut und verwendet.

3.5.2.9 Nitrat-Reduktase

aus *Aspergillus species* (lyophilisiert)

Roche Diagnostics, Mannheim

Die in einer Portion enthaltenen 20 U wurden in 2 ml A. bidest gelöst und in Portionen im Tiefkühlschrank bei -21°C aufbewahrt.

Bei 4°C aufbewahrt ist diese fertige Lösung eine Woche haltbar.

3.5.2.10 Substanz P

Arg- Pro- Lys- Pro- Gln- Gln- Phe- Phe- Gly- Leu- Met- NH₂

Sigma, Deisenhofen

MG= 1347,60

1 mg des vasoaktiven Polypeptides wurden in 2475 µl A. bidest zu einer 3×10^{-4} -molaren Lösung angesetzt und in 30 µl-Aliquots im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Kurz vor Versuchsbeginn wurde die Lösung aufgetaut und eine 10^{-3} -molare Lösung mit A. bidest und HEPES (1:1 verdünnt) hergestellt. Die Verdünnung erfolgte im weiteren mit HEPES bis zu einer Konzentration von 3×10^{-9} mol/l.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Präparation der Aorten

Im Kölner Schlachthof wurden die Aorten der kurz zuvor geschlachteten Schweine präpariert und in sterilem, mit Antibiotika versetztem und auf 4°C temperiertem PBS-Puffer zum Institut für Pharmakologie transportiert.

Als Transportmedium für die im Schlachthof präparierten Schweineaorten zur Kultivierung der Endothelzellen diente ein PBS-Puffer (0,01 molar) folgender Zusammensetzung:

NaCl	MG= 58,44	136,89 mmol/l	8,00 g/l
KCl	MG= 74,56	2,68 mmol/l	0,20 g/l
NaH ₂ PO ₄	MG= 141,96	8,10 mmol/l	1,15 g/l
KH ₂ PO ₄	MG= 136,09	1,47 mmol/l	0,20 g/l
A. bidest ad 1000 ml			

Alle Substanzen stammen von der Firma Merck, Darmstadt.

Der pH-Wert von 7,4 wurde durch Zugabe von 1 molarer NaOH eingestellt (pH-Meter 323, Fa. WTW, Weilheim). Am Tag vor der Präparation der Aorten wurde die Lösung bei 1 bar, 121°C für 20 Minuten autoklaviert (Varioklav 400 EV, H+P Labortechnik GmbH, Berlin) und wurde anschließend bei 4-5°C gelagert.

Es wurden je 1,0 g Penicillin-G und Streptomycinsulfat in 10 ml PBS-Puffer gelöst, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Am Präparationstag wurde die aufgetaute antibiotikahaltige Lösung dem PBS-Puffer zugefügt (100 mg/l).

Penicillin-G	MG= 356,40	1670 U/mg	(Sigma, Deisenhofen)
Benzylpenicillin			
Streptomycin	MG= 1457,40	798 U/mg	(Sigma, Deisenhofen)
Streptomycinsulfat			

3.6.2 Isolierung der Endothelzellen

Die enzymatische Ablösung der Endothelzellen (EC) erfolgte durch die Behandlung mit einer neutralen Protease (1 mg/ml Medium M 199) aus *Bacillus polymyxa*:

Dispase	0,45 U/g	(Sigma, Deisenhofen)
---------	----------	----------------------

Es wurden pro Aorta 5 mg Dispase eingewogen, in 5 ml Medium 199 (M 199) gelöst und anschließend steril filtriert (0,2 µm Porengröße, Fa. Sterifix Luer Lock).

3.6.3 Kultivierung der Endothelzellen

Zur Kultivierung der EC wurden M 199 mit 2200 mg/l NaHCO₃ und 158 mg/l NaH₂PO₄ verwendet, die nach Zugabe weiterer Komponenten (s.u.) als M 199 komplett bezeichnet wurde. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂, 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert (Brutschrank: Fa. Heraeus Instruments GmbH, Typ B 5060 EC-CO₂, Hanau).

Das M 199 komplett wurde wie folgt zusammengesetzt:

Penicillin-G/ Streptomycinsulfat	50,0/50,0 mg		
L-Glutamine L-2-Aminoglutaramic acid	5,0 ml	MG=146,1	(Lösung, 200 mM, G7513; Sigma, Deisenhofen)
HEPES-Puffer 7,5 ml 2-[4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl]ethansulfonsäure			(Lösung, 1 M, HO887; Sigma, Deisenhofen)
Fetales Kälberserum (FCS)	50 ml		(Lösung, F7524, Sigma, Deisenhofen)
M 199	ad 500 ml		(Lösung, M2154; Sigma, Deisenhofen)

3.6.4 Subkultivierung der Zellen

0,25% Trypsin (Protease)-EDTA

(Lösung steril, 2,5 g porcines Trypsin, 0,2 g EDTA.4 Na/l HBSS, T4049; Sigma, Deisenhofen)

3.7 Präparation der Arteria coronaria des Hausschweines

Die Koronararterien wurden bereits am Schlachthof aus der Kranzfurche des Herzens gelöst. Dazu wurde das Herz mit der rechten Herzhälfte nach oben auf einem Präparierblock aus Styropor fixiert. Da der Verzweigungsgrad der linken Koronararterie (A. coronaria sinistra) im proximalen Teil im Gegensatz zur rechten Koronararterie (A. coronaria dextra) sehr ausgeprägt ist, wurde aus präparationstechnischen Gründen nur die rechte Koronararterie entnommen.

Ein ungefähr 8 cm langes Teilstück wurde aus dem Gewebeverband herauspräpariert und nach grober Entfernung des epikardialen Fettgewebes mehrmals mit vorbegeaster NT-Lösung zur Entfernung des Restblutes orthograd durchspült. Diese Arteriensegmente wurden in einem Transportgefäß mit carbogengesättigter NT-Lösung zum Institut für Pharmakologie transportiert und dort in einem Präparierbecken in carbogenbegaster NT-Lösung (Zimmertemperatur) vollständig vom anhängenden Gewebe befreit.

3.8 Direkte Stickstoffmonoxid-Messung mit der ISO-NO-Elektrode

Die ISO-NO-Elektrode (ISO-NO-Meter, WPI, World Precision Instruments, Sarasota) ermöglicht eine amperometrische Messung der Konzentration an freiem NO in wäßrigen Lösungen über einen Konzentrationsbereich von 2 nmol/l bis 20 µmol/l. Die Selektivität der ISO-NO-Elektrode ist bedingt durch eine spezifische Polymermembran, durch welche die NO-Moleküle diffundieren und an der Arbeitselektrode oxidiert werden. Das daraus resultierende elektrische Stromsignal ist proportional zur NO-Konzentration an der äußeren Oberfläche der Membran. Der Redox-Strom kann kontinuierlich registriert werden und wird in pA bzw. nA oder über einen Umrechnungsfaktor (1 pA= 1,55 nmol/l NO) in nmol/l bzw. µmol/l angezeigt.

3.8.1 Aufbau der ISO-NO-Elektrode

Die ISO-NO-Elektrode besteht aus einem Anzeigegerät und der Messelektrode, die über ein Kabel miteinander verbunden sind. Das Messgerät ist über den Analog- Ausgang mit einem y-t Schreiber verbunden, auf dem die NO-Signale kontinuierlich registriert werden. Die Anzeige erscheint nach Einstellung eines Messknopfes in pA/nA bzw. in nmol/ μ mol. Nachdem der Hintergrundstrom stabile Werte angenommen hat, wird der Zero Adjust-Knopf so eingestellt, dass eine Nullpunkt- Ablesung auf jeder Skala erreicht wird. Der Nullpunkt wurde vor jeder Messung überprüft und während des Versuches nicht mehr verstellt.

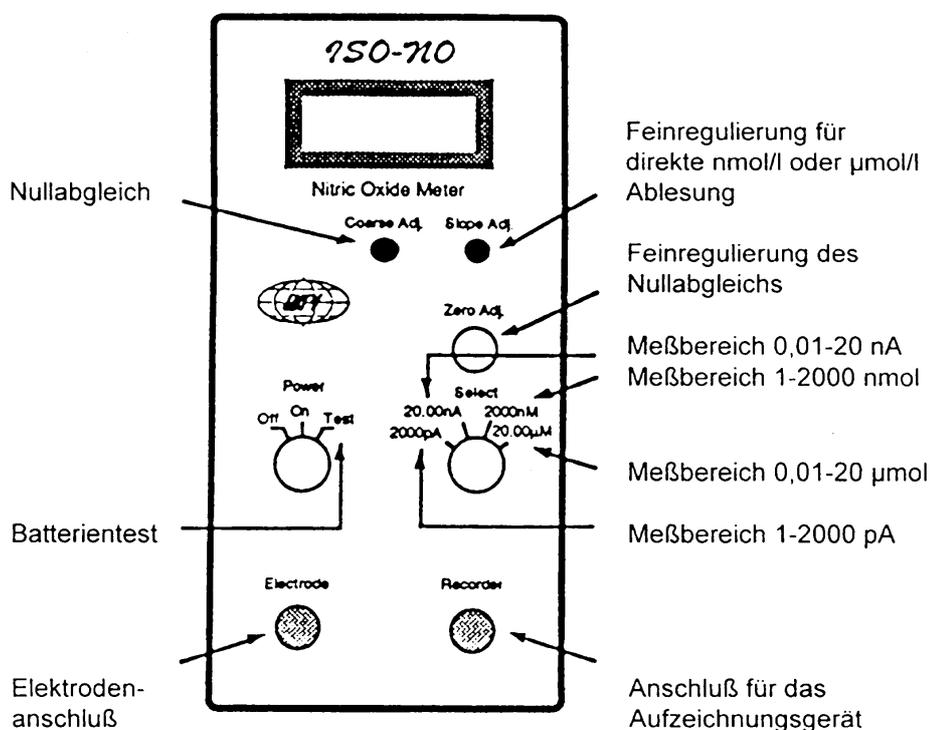


Abbildung 2: Messgerät der ISO-NO-Elektrode

Die Elektrode ist eine Kombination aus Arbeitselektrode und einer Referenzelektrode, die sich in der von der Firma WPI mitgelieferten Elektrolytlösung befinden. Vom Versuchsmedium sind diese Messelemente durch die für NO durchlässige Membran abgetrennt. Dazu wird eine Metallhülse (2 mm Durchmesser), deren oberes Ende mit der Membran verschlossen ist, mit Elektrolyt gefüllt, über die Messelemente geschoben und an den "Einstab"-Messfühler angeschraubt.

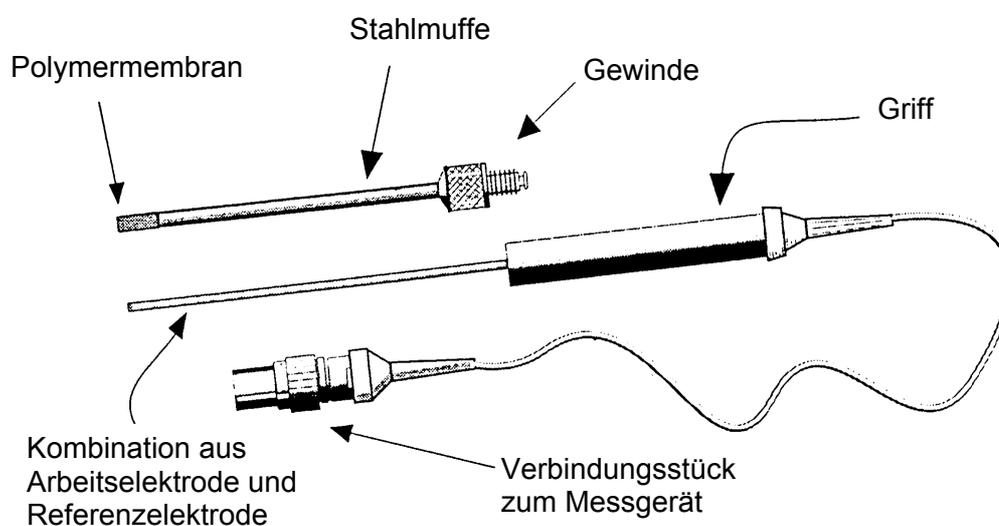


Abbildung 3: Aufbau der NO-Messelektrode

3.8.2 Kalibrierung der ISO-NO-Elektrode

Die Kalibrierung wurde jeweils nach Wechsel der Membran durchgeführt.

Diese Methode entspricht einer chemischen Titration und basiert auf der stöchiometrischen Bildung von NO aus KNO₂. Anhand der folgenden Gleichung kann die aus KNO₂ umgesetzte Menge an NO in der Eichlösung (0,1 mol/l H₂SO₄, 0,1 mol/l KJ, 0,14 mol/l K₂SO₄) quantitativ bestimmt und mit der Anzeige auf dem NO-Messgerät verglichen werden.



10 ml der Eichlösung werden in ein Becherglas überführt, die Elektrode wird mit der Spitze ca. 2 mm in die Lösung eingetaucht. Unter ständigem Rühren mittels eines Magnetrührstäbchens werden verschiedene Konzentrationen KNO₂-Lösung in jeweils konstantem Volumen zugegeben, die Werte aufgezeichnet und eine Eichkurve erstellt.

Die Messlösung hatte Zimmertemperatur, da eine höhere Temperatur einen Anstieg des Hintergrundstroms bewirkt, welcher sich in einer unruhigeren Basislinie widerspiegelt und das Signal-Rausch-Verhältnis ungünstig verringert. Außerdem nimmt mit steigender Temperatur die Löslichkeit von NO in wässrigen Lösungen ab (Archer, 1993).

3.8.3 Experimentelle Versuchsdurchführung

3.8.3.1 Versuchsanordnung

Nach der Präparation der Schweinekoronararterie (3.7) wurden die Gefäßabschnitte für den jeweiligen Versuch in ca. 1 cm lange Stücke geschnitten, in Längsrichtung aufgeschnitten und jeweils mit der Endothelseite nach außen an einem am unteren Ende mit Haken versehenen Plexistab (\varnothing 3 mm, 13 cm hoch) aufgespannt und sofort in ein mit 500 μ l Medium gefülltes Röhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) umgesetzt. In jedem Inkubationsgefäß befand sich also ein Stab mit dem von Flüssigkeit bedecktem Gefäßstück. Die Röhrchen wurden in einem auf 25°C temperierten Wasserbad für zehn Minuten im jeweiligen Medium vorinkubiert und dann in frisches Medium identischer Zusammensetzung (auf 25°C äquilibriert) umgesetzt und die im jeweiligen Experiment vorgesehene Zeit inkubiert. Die im Gegensatz zu der physiologischen Temperatur von 37°C geringere Temperatur war gewählt worden, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass die Elektrode extrem temperaturempfindlich ist, so dass bei höherer Temperatur der Messlösung ein dadurch bedingtes Signal erzeugt wurde, das eine quantitative Aussage erschweren würde.

Nach definierten Zeiten wurden die Gefäßstücke aus dem Medium entfernt. Zur Nitrat/Nitrit-Analytik wurden jetzt 50 μ l einer NADPH/FAD-Mischung zugegeben, vermischt und eine Minute bei Raumtemperatur äquilibriert. Dann wurden 15 μ l Nitrat-Reduktase dazugegeben, vermischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, dadurch wurde Nitrat vollständig in Nitrit überführt. Die Messung erfolgte unmittelbar nach dieser Zeit: In eine Vorlage von 10 ml der Messlösung in einem Becherglas wurde die Elektrode ca. 2 mm in die Messlösung eingetaucht, unter ständigem Rühren auf eine konstante Basislinie äquilibriert. Dem Inkubationsansatz wurde jeweils ein Aliquot von 50–200 μ l entnommen und der Vorlage zugeführt. Die Werte wurden aufgezeichnet.

Die Probenzugabe erfolgte stets unter vorsichtigem Eintauchen der Pipettenspitze in die Messlösung und langsamer Entleerung der Pipette. In Vorversuchen war ausgetestet worden, dass durch zu nahes Pipettieren an der Elektrode es zu „Zugabepeaks“ kam, andererseits mussten Diffusionseffekte durch eine zu entfernte Zugabe ausgeschlossen werden, weshalb die Messungen unter ständigem Rühren stattfanden. Auch ein zu großes Probenvolumen führte zu Irritationen der Elektrode, so dass nicht beliebig große Volumina zugegeben werden konnten. Das maximal mögliche Zugabevolumen betrug 0,5 ml. Die maximale Menge an Probenvolumen, die insgesamt pro Versuch zugegeben werden konnte, betrug 1 ml, also zehn Prozent des Vorlagevolumens. Danach musste die Messlösung erneuert werden, da der Verdünnungseffekt zu groß wurde.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Nitritbildung verschiedener Gefäße einer relativ großen Streubreite unterliegt, weshalb jeweils Stücke einer Koronararterie für vergleichende Experimente verwendet wurden.

Nach Beendigung des Versuches wurde das Standard-Feuchtgewicht der Gefäßstücke ermittelt. Dazu wurden die Stücke für eine Minute unter 1 kg mit Filterpapier (S&S Rundfilter, Typ 595, Firma Schleicher & Schnell, Dassel) getrocknet und anschließend gewogen.

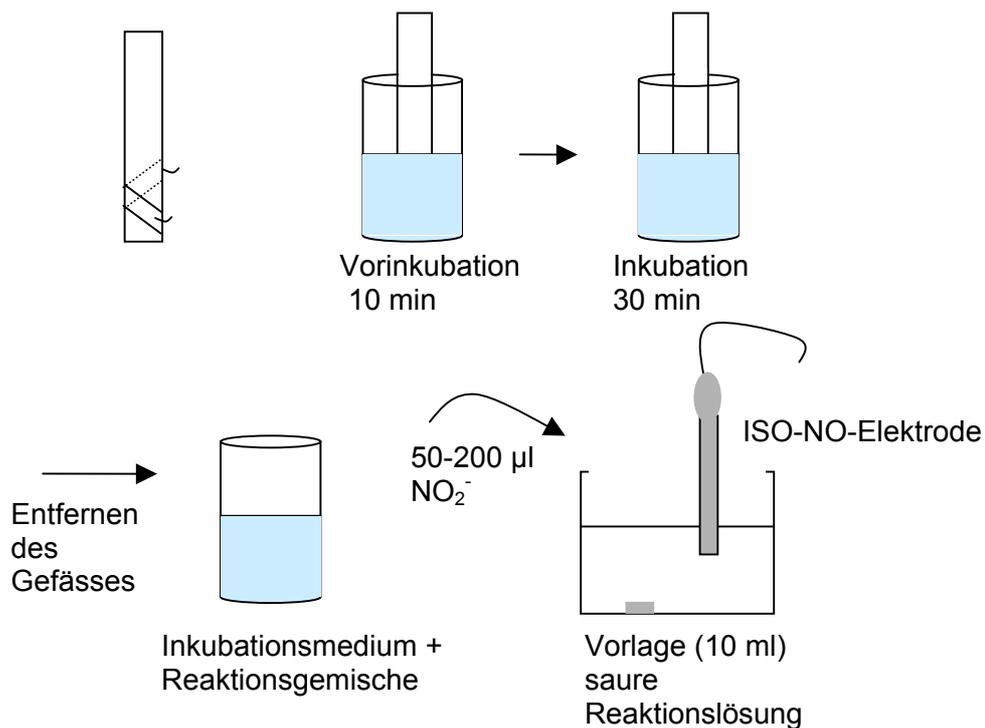


Abbildung 4: Versuchsanordnung

3.8.3.2 Versuchsanordnung unter Scherstressbedingungen

Die NO-Bildung des Endothels ist abhängig von an der Zellmembran wirkenden Scherkräften, „dem Scherstress“. Um diesen Einfluss zu quantifizieren, wurde der o.g. Versuchsaufbau etwas modifiziert.

Es wurde ein 6 mm hohes, im Durchmesser 9 mm dickes, scheibenförmiges Magnetrührplättchen (Merck, Darmstadt) am unteren Ende eines Plexistabes befestigt. Seitlich an dem Magnetrührplättchen waren Haken angebracht worden, an denen die Gefäßstücke mit der Endothelseite nach außen aufgespannt wurden. Die so aufgespannten Gefäße wurden in Plastikröhrchen (\varnothing 1,3 cm, 5 cm hoch, Merck, Darmstadt) in 500 μ l Medium zehn Minuten ohne Scherstress vorinkubiert. Anschließend wurden sie in 500 μ l frischem, temperiertem Medium identischer Zusammensetzung mit Hilfe eines Magnetrührers (IKAMAG RCT, IK Labortechnik, Staufen) bei 100 rpm für die gewünschte Inkubationsdauer rotiert.

Vergleichend wurden Stücke des Gefäßes in entsprechendem Medium wie unter 3.8.3.1 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gefäßstücke aus dem Medium entfernt. Die Nitrat/Nitrit-Bestimmung erfolgte wie unter 3.8.3.1 beschrieben.

3.8.3.3 Kontrollversuche

Als Voraussetzung für stabile und reproduzierbare Messungen wurden vor jeder neuen Versuchsserie Kontrollversuche durchgeführt, um mögliche Störfaktoren auszuschließen:

1. Stabilität der Basislinie

Die Elektrode wurde ca. 2 mm in die Messlösung getaucht und unter ständigem Rühren wurde abgewartet, bis sich eine stabile Basislinie eingestellt hatte. Erst dann wurde mit der Zugabe der Analyselösung begonnen.

Konnte die Basislinie nicht stabilisiert werden, wurde der Versuch nicht begonnen.

2. Einfluss von Lösungsmitteln (Kontamination mit Nitrit)

Vor jedem Versuch wurde das Inkubationsmedium (HEPES) auf Kontamination mit Nitrit getestet, indem das entsprechend definierte Probenvolumen zupipettiert wurde. Bei positiven Werten wurde das Lösungsmittel erneuert bzw. die Differenz zwischen Substanzeffekt und Lösungsmittelleffekt ermittelt und die Werte entsprechend korrigiert. Auch die jeweiligen Prüfsubstanzen wurden entsprechend getestet.

3.8.4 Vorversuche zur Standardisierung der Methode

3.8.4.1 Nitritmessung im Reaktionsansatz

1. Damit die ermittelten Signalwerte einer Nitrit-Konzentration zugeordnet werden können, wurde nach jedem Wechsel der Membran eine Kalibrierung (Methode s. 3.8.2) mit definierten Volumina verschiedener Konzentrationen von KNO_2 -Lösung durchgeführt, so dass auf diese Weise standardisierte Signalwerte erhalten wurden.
2. In Vorversuchen wurden Gefäßstücke in HEPES oder in anderen Medien für definierte Zeiten inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Gefäßstücke entfernt. Ein Aliquot des Inkubationsmediums wurde direkt zur Nitrit-Bestimmung in die Messlösung gegeben. Dabei wurden keine oder nur sehr niedrige Signale erhalten, so dass diese Art der Messung verworfen wurde.
3. Die Menge an Nitrat-Reduktase, die zugesetzt werden muss, um alles in der Lösung befindliche Nitrat in Nitrit umzuwandeln, wurde in Vorversuchen ermittelt. Es ergab sich ein benötigtes Volumen von 15 μl Nitrat-Reduktase pro 500 μl Probe.
4. Im Rahmen der „negativen“ Nitritbildung der Gefäße wurde überprüft, ob in den Inkubationsansatz gegebenes, exogenes Nitrit vom Gefäß oxidiert wird. Dazu wurde jeweils ein Gefäßstück in HEPES unter Zusatz von 2 $\mu\text{molarer}$ KNO_2 -Lösung für 30 Minuten inkubiert. Die Werte wurden mit einem parallel inkubierten Reagenzienleerwert verglichen.
5. Die Nitrit-Freisetzung einzelner Gefäße kann stark variieren. Aus diesem Grund wurden bei jedem Versuch für die vergleichenden Messungen Stücke aus jeweils dem selben Gefäß verwendet (intraindividueller Vergleich). Daraus ergibt sich auch, dass unterschiedliche Versuche in ihrem Ergebnis nicht miteinander verglichen werden können, da bei jedem Gefäß eine andere basale NO-Bildung zugrunde liegt. War die Aktivität des Gefäßes zu gering, um auswertbare Signale bei geringem Probenvolumen

zu erhalten, konnte man die Signalhöhen über die Menge des zugegebenen Probenvolumen verstärken, d.h. je nach Aktivität wurde ein Probenvolumen von 50 µl, 100 µl verwendet. Allerdings wurde innerhalb einer Messreihe das anfänglich gewählte Probenvolumen beibehalten.

3.8.4.2 Messung im Inkubationsansatz

In Vorversuchen wurde versucht, die basale NO-Bildung direkt mit der Elektrode im Inkubationsansatz (Röhrchen mit 500 µl HEPES und aufgespanntem Gefäßstück) zu messen. Nach einiger Zeit stellte sich eine Basislinie ein und weitere Messdauer ergab keine über die Grundlinie hinausgehenden Signale. Die quantitative Messung der basalen NO-Freisetzung war so nicht möglich.

Nach Inkubation der Gefäßstücke, anschließender Entfernung dieser aus dem Ansatz und Behandlung des Mediums mit Nitrat-Reduktase wurde die Messung von NO ermöglicht (s. 3.8.3.1).

3.8.5 Berechnung der gebildeten Nitritkonzentration

Anhand der jeweils gültigen Eichgeraden wurde die Nitritmenge, die in der jeweiligen Inkubationszeit von dem untersuchten Gefäß gebildet wurde, berechnet.

Durch Einsetzen des entsprechenden Messwertes y (bei den Versuchen mit Koronarien bezogen auf 10 mg Feuchtgewicht) in die ermittelte Ausgleichsgerade ($y = mx + b$) erhält man direkt die Konzentration von Nitrit in der Messlösung. Für den speziellen Inkubationsansatz muss eine Volumenkorrektur durchgeführt werden (500 µl Inkubationsansatz + 50 µl NADPH/FAD-Gemisch + 15 µl Nitrat-Reduktase = $0,565 \times 10^{-3}$ l), indem mit diesem Gesamtvolumen die zuvor ermittelte Konzentration multipliziert wird. Somit erhält man die Nitritmenge in nmol/10 mg FG/30 min, die von 10 mg Gewebe im Inkubationsvolumen in der Inkubationszeit 30 Minuten gebildet wurde.

Entsprechend wurde in den Versuchen mit Zellüberständen verfahren (s. 3.8.7.4). Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden und wurde auf 30 min umgerechnet ($\times 0,25$). Da die mit Endothel überzogene Fläche in diesen Versuchen 7 cm² betrug (Subkonfluenz), erfolgt die Angabe zur Nitrit-Freisetzung in nmol/7 cm²/30 min. Da die Werte der Nitritbildung so niedrig waren, sind die Ergebnisse aller Versuche in pmol/10 mg/30 min bzw. pmol/7 cm²/30 min angegeben.

3.8.6 Überprüfung des Gefäßendothels auf Funktionsfähigkeit

Über Parallelversuche wurde an einem Myographen die Intaktheit des Gefäßendothels im Bioassay gesichert.

Dazu wurden die Gefäßstücke in ca. 5 mm lange Ringsegmente geschnitten und auf jeweils zwei rostfreie Edelstahltriangeln geschoben. Eine Triangel wurde an einer Schraube am unteren Ende eines Plexiglasstabes fixiert, der seinerseits im Haltestativ des Organbades festgeschraubt wurde. Dann wurde die obere Triangel über einen Synthofilfaden vertikal mit dem Hebel des dazugehörigen Dehnungs-Messstreifen verbunden und in mit begaster Tyrodelösung gefüllten, auf 37°C temperierten Organbädern (Fa. Dr. Dinkelacker & Co., Mainz) mit einer Vorspannung von 20 mN aufgespannt. Die Gefäße wurden so 45 Minuten äquilibriert, wobei infolge der Vorspannung und des durch die erwärmte Tyrodelösung einsetzenden Temperaturreizes eine begrenzte Gefäßerweiterung erfolgte. Nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes wurde mit der Substanzzugabe begonnen. Die Änderung des Gefäßtonus wurde mit vier Dehnungsmesswertaufnehmern (DMS-Aufnehmer, Typ T6V5, Fa. Fleck) isometrisch gemessen, über Gleichspannmessbrücken (Fa. Fleck) verstärkt und auf einem Messdatenerfassungs- und Analysesystem (Maclab/8, Analog Digital Instruments LTD, Macintosh LC, Apple Computer Cupertino) kontinuierlich registriert (Chart V 3.2 von Macknight, B. Washington M. Hamel, ADI).

Eine schematische Darstellung vom Aufbau und der Fixierung der Gefäßsegmente ist der Abbildung 5 zu entnehmen.

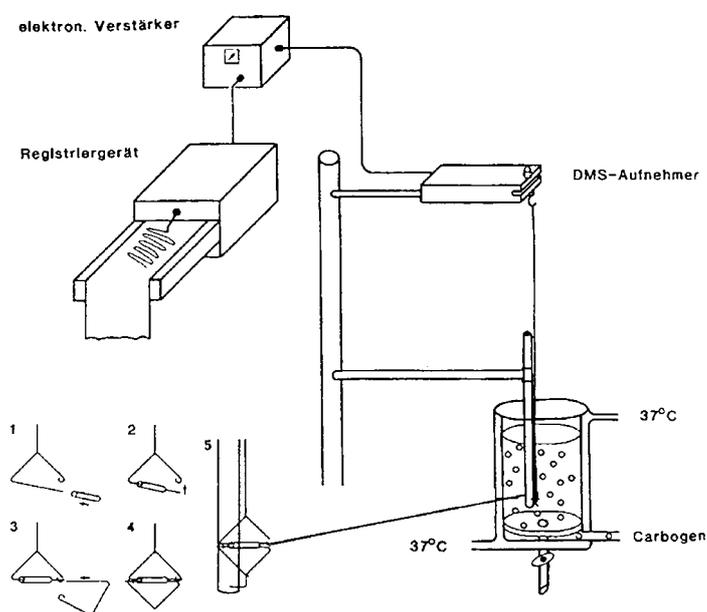


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Myographen (Fixierung der Aortensegmente in der Versuchsanordnung: 1-5)

Vor Überprüfung der endothelialen Funktion erfolgte eine Tonisierung der GefäÙe mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Pharmacia Upjohn, Erlangen) in einer Konzentration von $20 \mu\text{mol/l}$. Nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes wurde die Endothelfunktion durch Zugabe des Neurotransmitters Substanz P (90 nmol/l) überprüft. Substanz P setzt NO aus dem GefäÙendothel frei, somit ergab sich bei intaktem Endothel eine Dilatation, welche allerdings aufgrund einer spontanen Toleranzentwicklung des Substanz P-Rezeptors nur von kurzer Dauer war. Eine Quantifizierung der Endothelfunktion erfolgte durch prozentuale Umrechnung der registrierten Substanz P-Relaxation auf den initialen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Tonus. Nur Arterienringe mit einer mindestens 70 %-igen Substanz P-Dilatation wurden als endothelhaltig gewertet.

3.8.7 Porcine Endothelzellen: Messung von NO aus Zellüberständen

Endothelzellen setzen NO frei, somit besteht die Möglichkeit, mit der bereits am Gefäßendothel von Koronarien verwendeten Methode auch in Zellüberständen von kultivierten Endothelzellen Nitrat/Nitrit nachzuweisen.

3.8.7.1 Isolierung der Porcinen Endothelzellen (PAEC)

Die Gewinnung der Schweineendothelzellen wurde nach einer modifizierten Methode nach Booyse et al. (1975) durchgeführt.

Die im Kölner Schlachthof frisch entnommenen Schweineaorten wurden nach dem Transport in sterilem, mit Antibiotika versetztem und auf 4°C temperiertem PBS-Puffer von Fett, Bindegewebe und Blut freipräpariert. Anschließend wurden sie in einer M 199/PBS-Puffer-Mischung (1:1) in der Sterilbank (Lamin Air HB 2448, Fa. Heraeus Instruments GmbH, Hanau) zwischengelagert. Die darauf folgenden Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Aorten wurden entlang der Gefäßleiste aufgeschnitten und mit der luminalen Seite nach oben in den speziell für diesen Zweck angefertigten Kunststoffrahmen (6x10 cm, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Universität Köln) eingespannt. Die so freigelegte trapezförmige Fläche betrug ca. 18 cm². Zur Ablösung der Endothelzellen wurde diese Fläche mit 5 ml steril gefilterter (0,2 µm Porengröße) Dispaselösung (1 mg Dispase/1 ml M 199) 15 min bei 37°C im Brutschrank vorbehandelt. Um die Ablösung der Zellen zu forcieren, wurde die Endothelzellschicht nach dem Entfernen der Dispaselösung mittels einer Pasteurpipette zweimal mit je 2-3 ml M 199 komplett gespült. Währenddessen blieb die Aorta im Rahmen eingespannt. Die Ausbeute der ausgespülten Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Die 5 ml Zellsuspension wurden in eine Kunststoffpetrischale (20 cm², Fa. Falcon) überführt und im Brutschrank kultiviert. Die Endothelzellen waren nach ca. 4-6 Stunden angehaftet. Diese Primärkultur wurde als Passage 0 (P0) bezeichnet.

3.8.7.2 Kultivierung der Endothelzellen

24 Stunden nach der Präparation wurden die Zellen (P0) mit antibiotikahaltigem PBS-Puffer zweimal gewaschen. Die Zellen wurden, nach Zugabe von 4,5 ml frischem, zuvor im Wasserbad auf 37°C vorgewärmtem M 199 komplett, weiter im Brutschrank kultiviert. Jeden zweiten Tag wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Innerhalb von 3-4 Tagen wuchsen die Endothelzellen zu einem Monolayer.

3.8.7.3 Subkultivierung der Endothelzellen

Zur Subkultivierung der Kulturen wurde das Nährmedium abgesaugt. Um das Restserum zu entfernen, wurden die Zellen mit FCS (fetales Kälberserum)-freiem M 199 ab gespült. Nach 30-60 Sekunden Einwirkzeit von 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung pro Schale erfolgte die Ablösung der Zellen. Bei diesem enzymatischen Prozess kam es zu morphologischen Veränderungen der Zellen, die Zellen nahmen eine runde Form an und schwammen frei im Überstand. Nach dem Ablösen der Zellen wurde Trypsin durch Hinzufügen von FCS-haltigem Medium (M 199 komplett) inaktiviert, der enzymatische Prozess wurde somit gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 700 rpm (93,13 g) 5 Minuten zentrifugiert (Laborfuge 400, Heraeus Instruments GmbH, Hanau). Der Zellüberstand (Medium+ Trypsin) wurde abgesaugt. Der Zellpellet wurde in 5 ml M 199 verdünnt und in Kulturflaschen (25 cm², Fa. Nunc) ausgesät (5 ml/25 cm²). Alle zwei Tage fand ein Medienwechsel statt. Ein konfluenten Monolayer bildete sich nach ca. drei Tagen.

3.8.7.4 Messung von Nitrit aus Überständen von kultivierten Endothelzellen

Zur quantitativen Bestimmung der endothelialen NO-Freisetzung aus Endothelzellen wurden Endothelzellen der zweiten Zellpassage (P2) in Plastikpetrischalen (Nunc, 10 cm²) 48 Stunden bis zur Subkonfluenz (70-80 %) kultiviert (Dulbecco`s Modified Eagle Medium: DMEM komplett).

Nach Entfernen des Nährmediums wurden die Zellen einmal mit HEPES-Puffer gewaschen und anschließend mit 1 ml Medium pro Schale für zwei Stunden bei 37°C unter Zusatz verschiedener Substanzen inkubiert:

1. Nifedipin: 1 µmol/l
2. N-Methyl-L-Arginin: 0,1 mmol/l

Gleichzeitig wurde eine zellfreie Petrischale, die nur 1 ml HEPES-Puffer enthielt, als Blindwert ebenfalls für zwei Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeder Schale 500 µl Überstand unter Ausschluss des Tageslichtes entnommen, auf RT temperiert (30 min) und anschließend wie unter 3.8.3.1 beschrieben auf Nitrat/Nitrit untersucht.

Von jeder Probe wurde ein Volumen von 200 µl zu der Messlösung gegeben und die Werte aufgezeichnet (Natriumlicht). Das Volumen von 200 µl wurde aufgrund der in Vorversuchen ermittelten geringen Signalthöhen gewählt. Nach Zugabe von vier Proben wurde die Säure erneuert. Die weitere Messung wurde fortgesetzt sobald sich die Basislinie stabilisiert hatte.

3.8.7.5 Nitrit-Bildung in Zellkulturen unter Scherstressbedingungen

In einem weiteren Versuchsansatz sollte die Auswirkung von Scherstress auf die Endothelzellen untersucht werden.

Dazu wurden ebenfalls Endothelzellen der zweiten Zellpassage (P2) bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation wurde alle ein bis zwei Minuten ein Scherstress auf die Zellen ausgeübt, dazu wurden sie zehnmal mit jeweils 1000 µl des Inkubationsmediums überströmt, d.h. mit Hilfe einer Pipette wurde das Medium angesaugt und wieder abgelassen. Der weitere Ablauf entsprach dem oben beschriebenen.

3.9 Statistik

Die Auswertung der Messergebnisse der jeweiligen Versuchsserien erfolgte unter Angabe des Mittelwertes (\bar{x}) und des jeweiligen Standardfehlers des Mittelwertes (S.E.M.) von (n) Einzelversuchen. Allen graphischen und tabellarischen Darstellungen dieser Arbeit liegen diese Werte zugrunde.

Zur statistischen Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede wurde der zweiseitige t-Test für verbundene Stichproben angewandt. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen. Die signifikanten Unterschiede in den Abbildungen werden im Text erläutert.

Die Berechnungen und Darstellungen in dieser Arbeit wurden unter Verwendung von folgenden Computerprogrammen erstellt: Word 97 (Microsoft), Excel 97 (Microsoft), Power Point 97 (Microsoft) und Sigma Plot 5.0 (SPSS).