

4 Ergebnisse

4.1 Sensitivität der Elektrode

Nach jedem Wechsel der Membran wurde die Elektrode neu geeicht.

Aus einer 10^{-2} -molaren Stammlösung KNO_2 wurde eine Konzentrationsreihe von 5×10^{-6} bis 10^{-7} mol/l frisch angesetzt. Mit dieser Lösung erfolgte die Eichung der Elektrode.

In Abbildung 6 ist eine Originalregistrierung des NO-Signals nach Gabe von je $50 \mu\text{l}$ der KNO_2 -Lösung gezeigt.

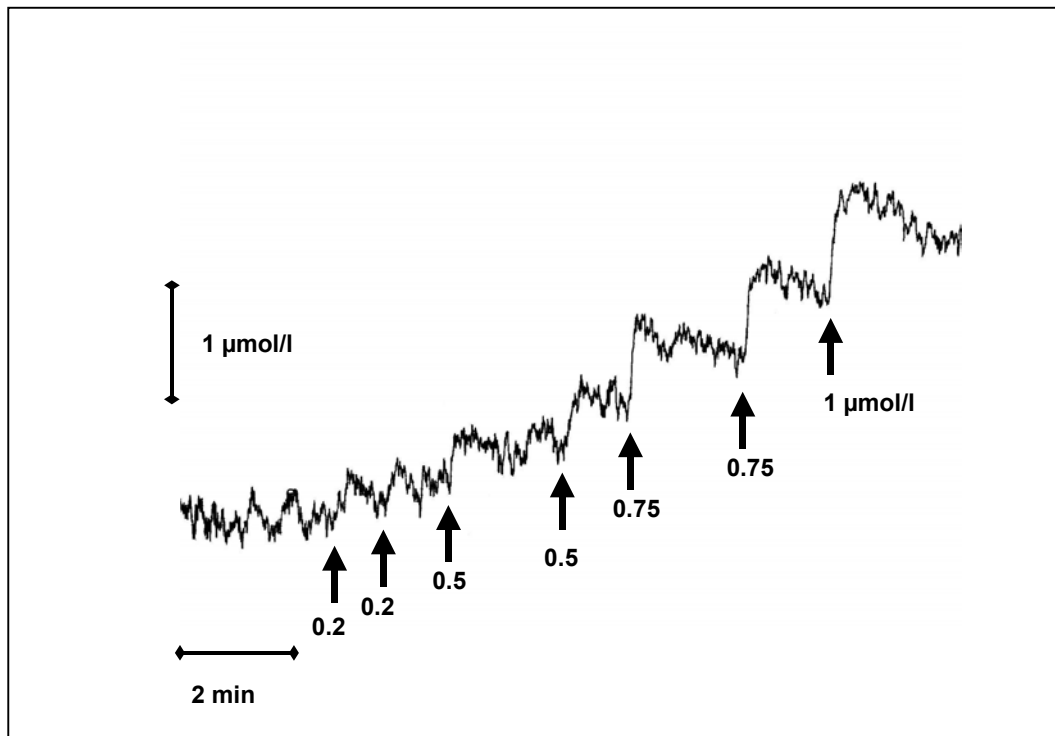


Abbildung 6: Auszug aus einer Eichung mit KNO_2 -Lösung unterschiedlicher Konzentrationen, Originalregistrierung des NO-Signals

Für die verschiedenen Probenvolumina (Zusatz von 50 μl , 100 μl , 200 μl der KNO_2 -Lösung) wurden jeweils Eichreihen angefertigt, die in Abbildung 7 mit der dazugehörigen Regressionsgerade dargestellt sind.

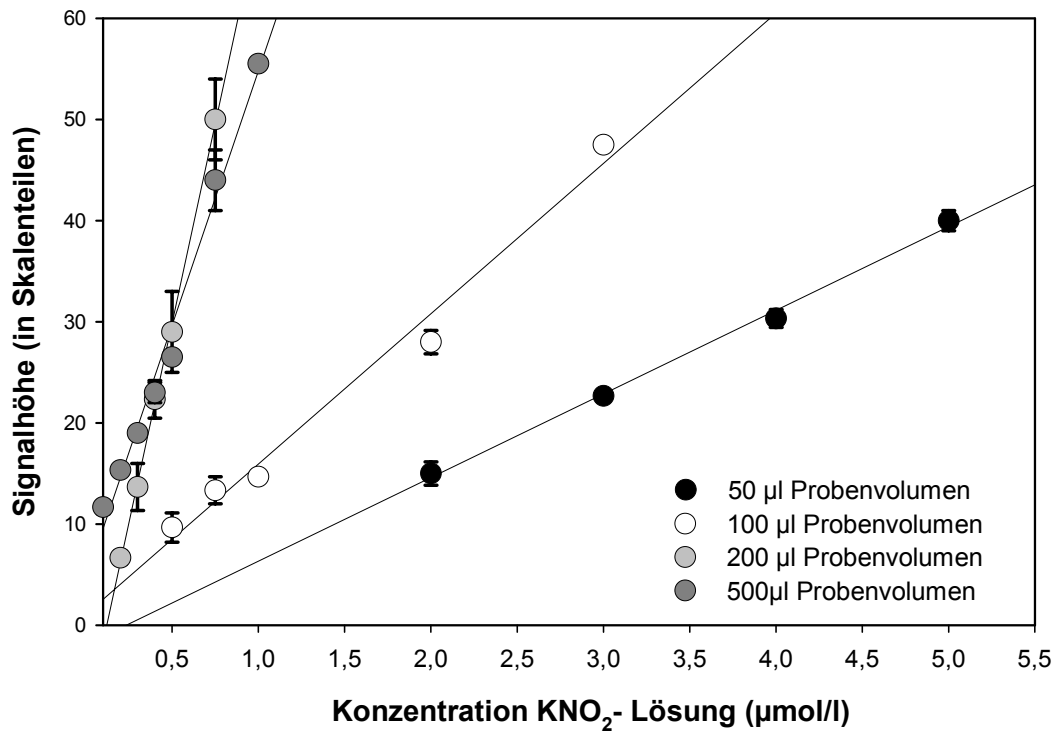


Abbildung 7: Nitrit-Eichreihe (10 ml Vorlage + Probenvolumen)
mit Volumenkorrektur

Entsprechend der sich bei Zugabe unterschiedlicher Probenvolumina in der Vorlage einstellenden Konzentrationen ergeben sich unterschiedliche Verdünnungen in der Vorlage und somit verschiedene Nachweisgrenzen für die in der zu analysierenden Lösung vorliegenden Konzentration. Diese sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden stehen im selben Verhältnis zueinander wie die Probenvolumina.

Volumen (µl)	50	100	200	500
Nachweisgrenze (mol/l)	1×10^{-6}	$0,75 \times 10^{-6}$	$0,2 \times 10^{-6}$	$0,1 \times 10^{-6}$
Steigung	7,45	14,56	27,41	72,70
Regressionskoeffizient r^2	0,9958	0,9968	0,9934	0,9755

Tabelle 4-1: Nachweisgrenzen von NO in Abhängigkeit des Probenvolumens.

*Die Nachweisgrenze ist hierbei definiert als die minimale Konzentration (mol/l), bei der das produzierte Signal dreimal größer ist als das Rauschsignal
[modifiziert nach: Kiechle et al., 1993]*

Aus oben Genanntem ergibt sich, dass mit der verwendeten Methode über die maximal mögliche Erhöhung des Zugabevolumens (auf 500 µl) der Nachweis von Nitrit im 0,1 µmolaren Bereich möglich ist.

In Abbildung 8 ist die Eichgerade für dieses maximale Probenvolumen mit Regression, Vertrauensbereich und Konfidenzintervall dargestellt.

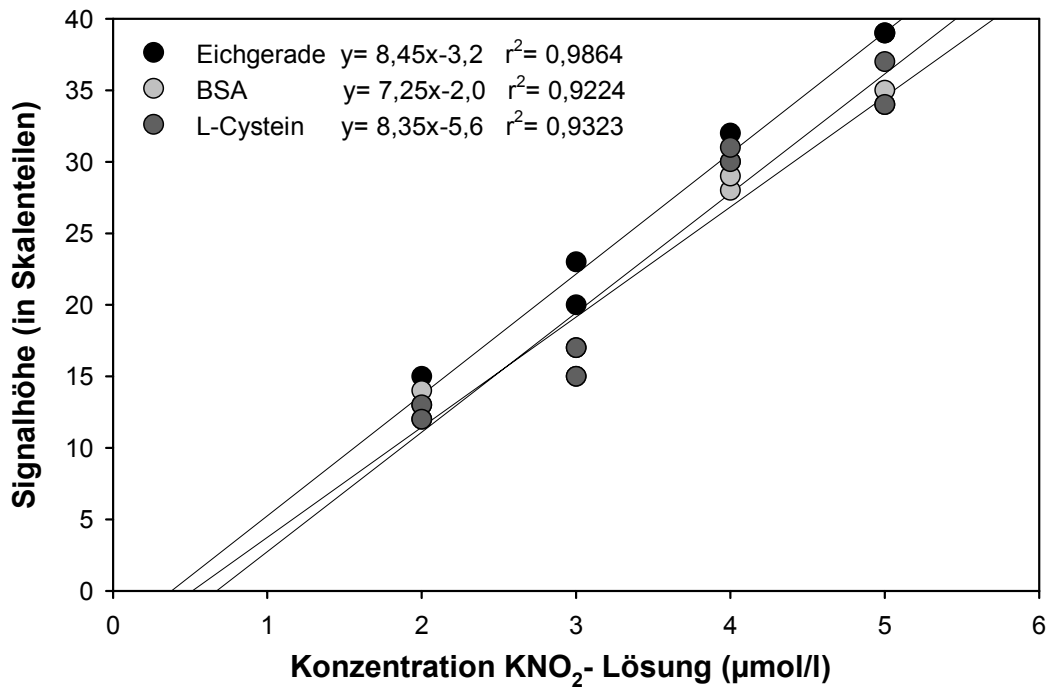


Abbildung 8: Nitrit-Eichreihe und Einfluss von Protein (BSA, 1mg/ml; n=4) und SH-Gruppen (L-Cystein, 1 mmol/l; n=4) auf die Nitrat/Nitrit-Analytik (10 ml Vorlage + 50 µl Probenvolumen)

4.2 Selektivität der Elektrode

4.2.1 Einfluss von Proteinen auf die Nitrat/Nitrit-Analytik

Um zu ermitteln, ob hohe Proteinkonzentrationen die Nitrat/Nitrit-Analytik stören, wurden die Nitrit-Lösungen mit Rinderserumalbumin (BSA; 1 mg/ml) versetzt und in Eichreihen die Signalhöhen mit der BSA-freien Kontrolle verglichen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Steigung der Ausgleichsgeraden der Eichung mit und ohne BSA-Zusatz (s. Abbildung 8).

4.2.2 Einfluss von SH-Gruppen auf die Nitrat/Nitrit-Analytik

Zur Überprüfung der Wirkung von SH-Gruppen auf die Nitrat/Nitrit-Analytik, wurden die Nitrit-Lösungen mit L-Cystein (1 mmol/l) versetzt. In Eichreihen mit und ohne L-Cystein wurden Steigung der Ausgleichsgeraden verglichen (s. Abbildung 8).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

4.3 Basale Nitrat/Nitrit-Bildung am Gefäßendothel

4.3.1 Charakterisierung der basalen Nitrat/Nitrit-Bildung

4.3.1.1 Zeitabhängigkeit der Nitrit-Bildung

Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Nitrit-Bildung wurden für eine Messreihe jeweils Stücke aus einer Koronarie wie unter 3.8.3.1 beschrieben eingesetzt. Die maximale Inkubationsdauer betrug 45 Minuten, wobei zu den angegebenen Zeiten jeweils der Ansatz eines Teilstückes analysiert wurde. In Abbildung 9 ist ein typischer Zeitverlauf dargestellt.

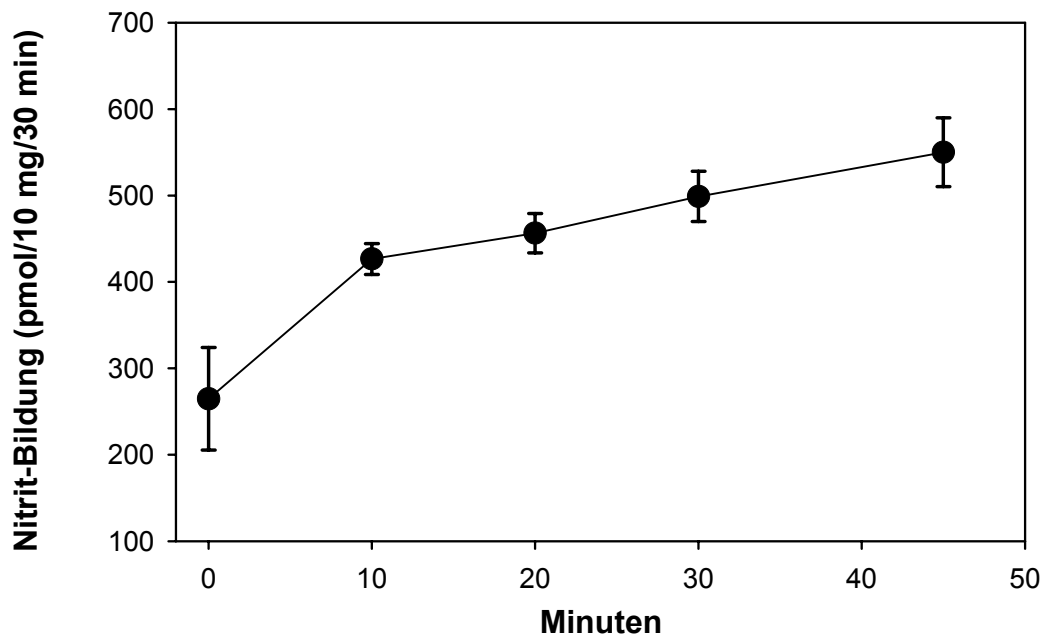


Abbildung 9: Zeitverlauf der unstimulierten Nitrit-Bildung aus dem Gefäßendothel (n=4)

In der Initialphase der Inkubation scheint ein überproportionaler nicht-linearer Anstieg vorhanden zu sein. Daher wurden in der Folge zu Äquilibrationszwecken alle Proben 10 min vorinkubiert und danach in temperiertes frisches Medium umgesetzt. Wie die Abbildung 10 zeigt, erfolgt die anschließende Nitritbildung in zwei konsekutiven 30 Minuten-Phasen (nach der 1. wurde das Gefäß in frisches, temperiertes Medium überführt) über längere Zeit mit konstanter Rate.

Da sich nach 30 Minuten in einem Volumen von 500 μ l immer eine gut messbare Nitrat/Nitrit-Konzentration ergab, wurde diese Inkubationszeit für die standardisierte Versuchsanordnung gewählt.

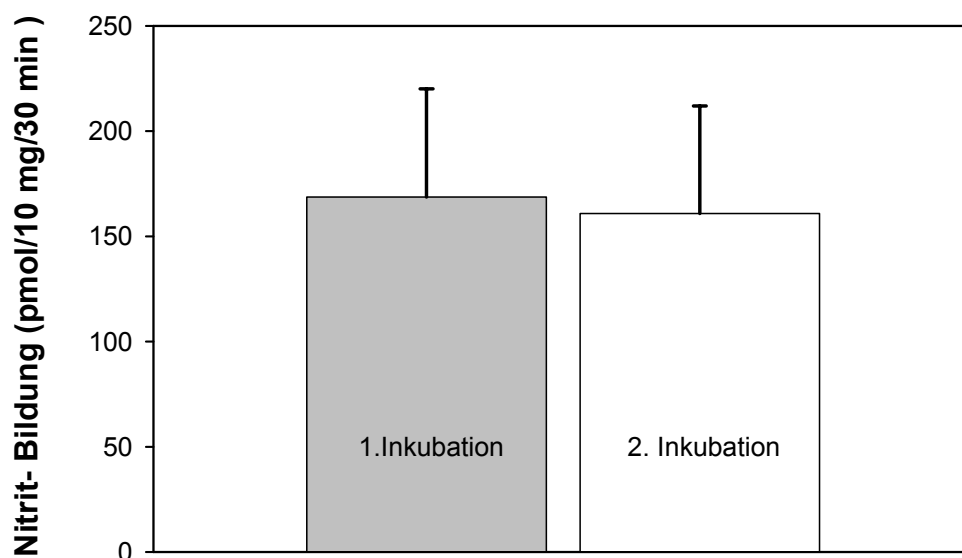


Abbildung 10: Basale Nitrit-Bildung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (n=4);
(Einzelheiten s. Text)

4.3.1.2 Nitrit-Bildung in Abhängigkeit von der Größe der Gewebeprobe

Abbildung 11 zeigt, dass die Nitrat/Nitrit-Bildung auch von der Größe der Gewebeprobe abhängig ist, je größer der Gefäßabschnitt, desto größer die Nitrit-Bildung. Darüber hinaus ist aus der Abbildung 11 die biologische Streubreite der Koronararterien bezüglich ihrer Aktivität zur Nitrat/Nitrit-Bildung ersichtlich, die Bildung ist von der entsprechenden Enzym-/Proteinmenge eines Gewebes abhängig. Da sich verschiedene Gefäße hinsichtlich Durchmesser und Wandstärke sehr stark unterscheiden können, wurde darauf geachtet, dass der Durchmesser und die Wandstärke der verschiedenen Stücke vergleichbar waren, denn nur wenn die Relation von Endothel zu Restgewebe ungefähr konstant ist, können die Messwerte auf ein Durchschnittsgewicht der Koronarien bezogen werden. Deshalb wurden für vergleichende Messungen immer benachbarte Stücke aus derselben Koronarie verwendet (intraindividueller Vergleich).

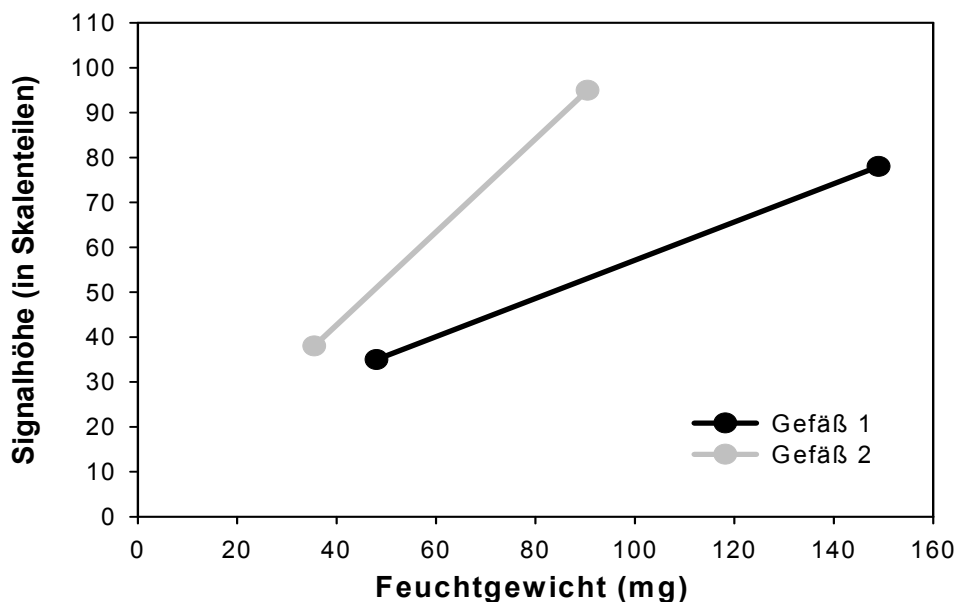


Abbildung 11: Nitrit-Bildung nach 30 Minuten Inkubation in Abhängigkeit von der Größe der Gefäßprobe (resp. in Abhängigkeit von der vorhandenen Enzymmenge; exemplarisch gezeigt an zwei verschiedenen Gefäßen: es wurden je aus einem Gefäß verschieden schwere Stücke entnommen).

4.3.1.3 Einfluss des Gefäßendothels auf Nitrit im Inkubationsmedium

Unsere Messungen zur Nitrit/Nitrat-Bildung von Schweinekoronarien ergaben keine messbare Nitritkonzentration im Inkubationsmedium nach 30 Minuten, aber messbare Nitratwerte, so dass sich die Frage ergab, ob das gebildete Nitrit während der 30 Minuten in Lösung durch das Gefäß oxidiert wird oder ob das Nitrit vor der Abgabe an das Medium bereits intrazellulär zu Nitrat oxidiert wird. Zur Klärung dieser Frage wurde dem Inkubationsansatz Nitrit zugefügt und die Wiederfindungsrate ermittelt.

Mit dem unter 3.8.4.1 beschriebenen Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass die Signale von Gefäß + KNO_2 -Lösung ($2 \mu\text{mol/l}$) geringgradig höher waren als die Signale der reinen KNO_2 -Lösung ($9,5 \pm 6,5\%$; $n=3$); alles exogen zugeführtes Nitrit wurde also wiedergefunden. Würde exogenes Nitrit vom Gefäß umgesetzt, wäre eine deutlich kleineres Signal zu verzeichnen. Exogen zugeführtes Nitrit wird also nicht vom Gefäß zu Nitrat umgesetzt.

4.3.2 Endothelabhängigkeit des Nitrat/Nitrit-Signals

4.3.2.1 Wirkung des unspezifischen NOS-Hemmstoffes N-Mono-Methyl-L-Arginin

N-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) ist ein Inhibitor der NO-Synthasen (eNOS, bNOS, iNOS). Unter seinem Einfluss kommt es zu einer signifikanten Verminderung der Signale der NO-Freisetzung (Abbildung 12).

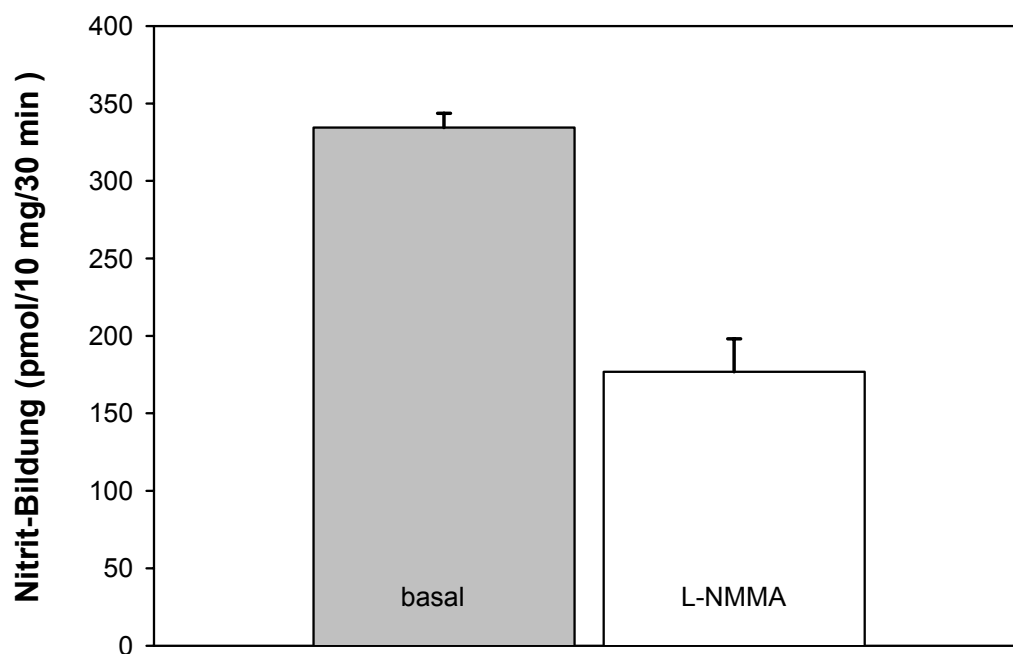


Abbildung 12: Hemmung der basalen Nitrit-Bildung durch L-NMMA (0,1 mmol/l)
(n=4)

4.3.2.2 Wirkung eines iNOS-spezifischen Inhibitors auf die Nitrat/Nitrit-Bildung

N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamide (1400 W) ist bei einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l ein relativ selektiver Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), so dass die Schweinekoronarien mit dieser Konzentration inkubiert wurden.

Abbildung 13 zeigt keinen signifikanten Unterschied der Nitrat/Nitrit-Bildung durch Zugabe des iNOS-Inhibitors.

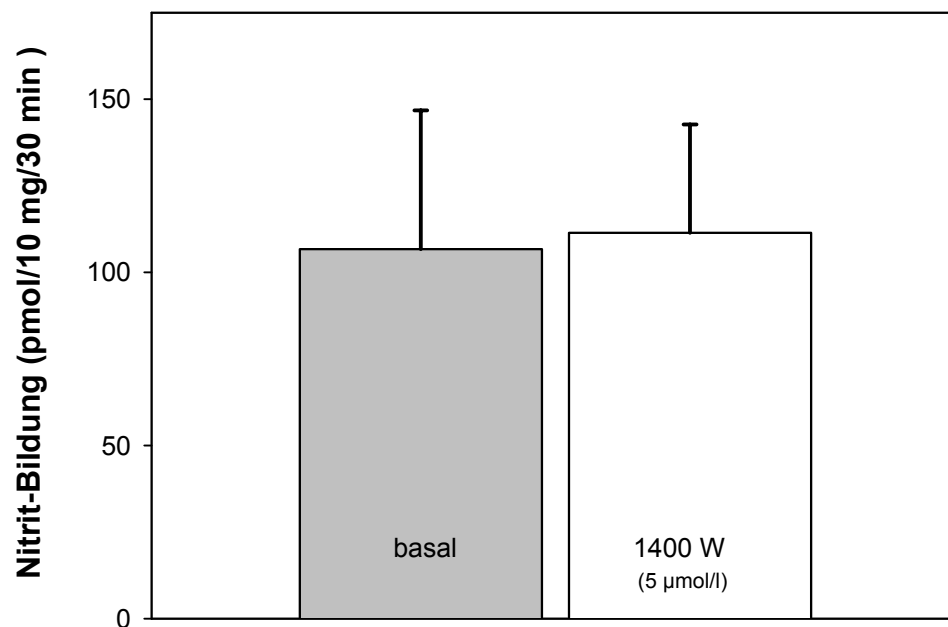


Abbildung 13: Wirkung des iNOS-Inhibitors 1400 W (5 µmol/l) auf die basale Nitrit-Bildung (n=4)

4.3.2.3 Substratabhängigkeit der NO-Bildung

L-Arginin ist das Substrat der NOS aus dem endogenes NO und L-Citrullin gebildet wird. Eine Erhöhung der L-Arginin-Konzentration im Inkubationsansatz von 0 auf 1 mmol/l führt zu einer signifikanten Zunahme der Nitrat/Nitrit-Bildung (s. Abbildung 14).

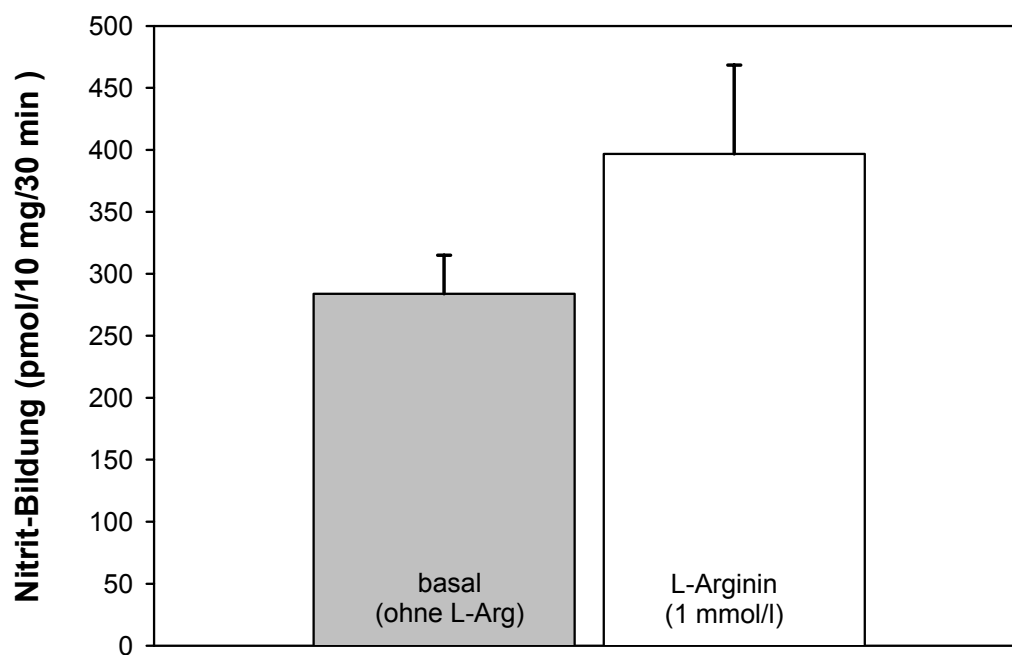


Abbildung 14: Substratabhängige Stimulation der Nitrit-Bildung durch L-Arginin (1 mmol/l);
(n=4)

4.3.2.4 Steigerung der NO-Bildung durch Rezeptoraktivierung

Bradykinin, Carbachol und Substanz P bewirken jeweils über spezifische Rezeptoren eine Aktivierung der endogenen NO-Synthese im Endothel der Koronararterie und damit eine erhöhte NO-Bildung. Daher wurde die NO-Bildung durch diese Substanzen in für sie typischen Wirkkonzentrationen anhand der Nitrat/Nitrit-Bildung geprüft.

Abbildung 15 ist eine Originalregistrierung, darin sind die Signale der NO-Bildung des Gefäßendothels ohne Substratzugabe (basal) und die durch Zugabe von Carbachol (1 $\mu\text{mol/l}$) nach 30-minütiger Inkubation gezeigt.

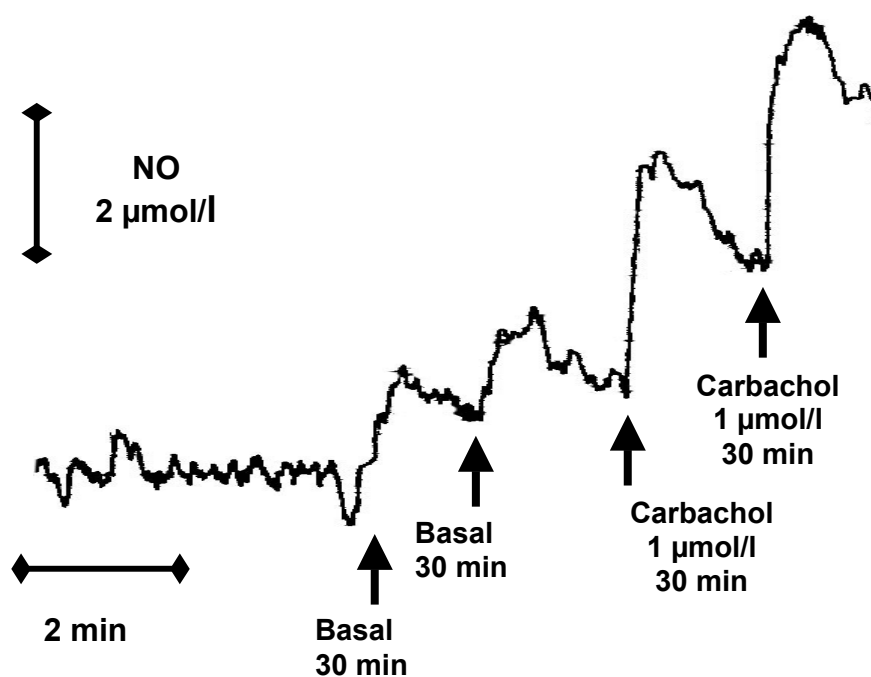


Abbildung 15: Originalregistrierung basales NO-Signal, NO-Signal nach Carbachol-Zugabe

Die relative Steigerung im Vergleich zur basalen Nitrit-Bildung ist in Abbildung 16 dargestellt. Durch 10^{-8} mol/l Bradykinin resp. 10^{-6} mol/l Carbachol wird die Nitrit-Bildung nahezu verdoppelt, während die Steigerung durch Substanz P (3×10^{-7} mol/l) etwas geringer ausfiel.

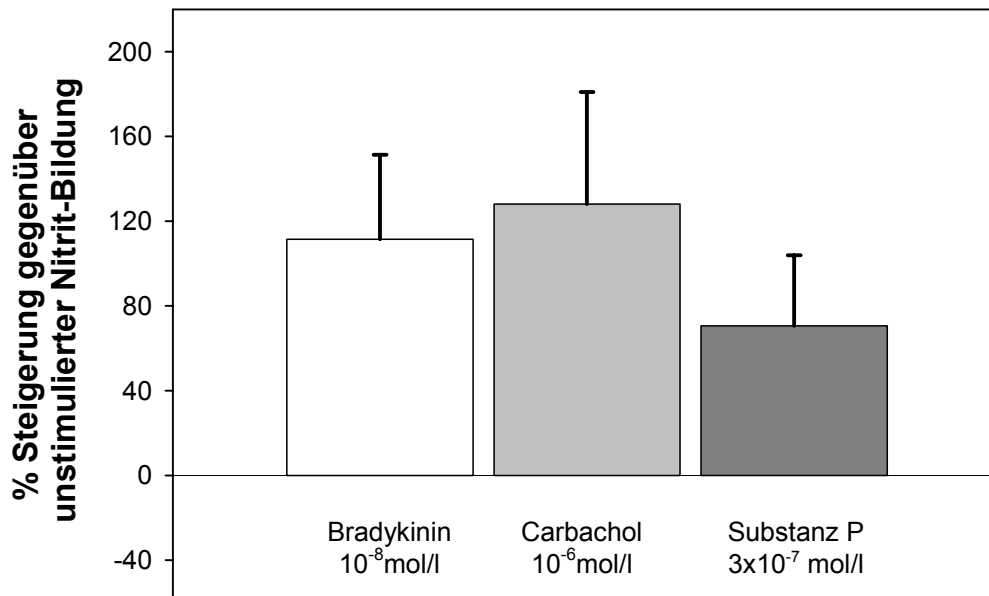


Abbildung 16: Relative Steigerung der Nitrat/Nitrit-Bildung gegenüber der basalen Freisetzung durch Rezeptorstimulation (n=4)

4.3.3 Stimulation der NO-Bildung durch Scherkräfte

Unter der Einwirkung von Scherkräften bildet das Gefäßendothel vermehrt NO, deshalb wurde versucht mit den unter 3.8.3.1 beschriebenen Versuchsbedingungen "Scherstress" für das Endothel zu simulieren. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob diese Scherstress-abhängige Komponente noch weiter gesteigert werden kann.

4.3.3.1 Basale Nitrit-Bildung unter Scherstress

Wie in Abbildung 17 dargestellt, steigt die Nitrat/Nitrit-Bildung unter Scherstress signifikant auf das 3-4fache an.

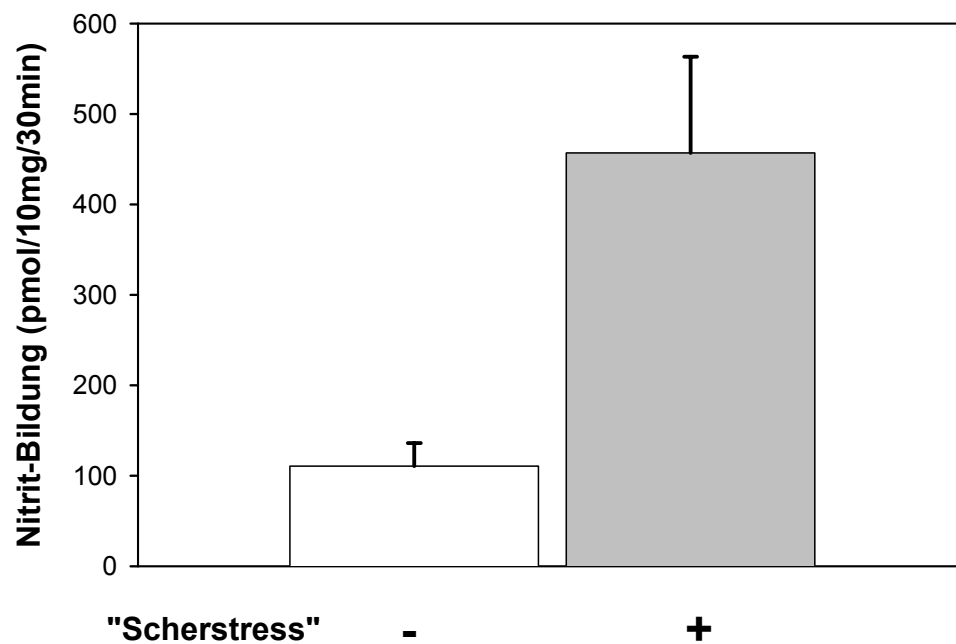


Abbildung 17: Stimulation der Nitrit-Bildung des Koronarendothels durch Scherkräfte (n=5)

4.3.3.2 Einfluss von L-Arginin und L-NMMA unter Scherstress

Durch Einfluss von L-Arginin (10^{-3} mol/l) konnten die unter Scherstress erzielten Werte weiter gesteigert werden. Der relative Zuwachs unter Scherstress ($+77,3 \pm 25,2\%$) war signifikant größer als ohne Scherstress ($+11,5 \pm 4,7\%$) (s. Abbildung 18).

Durch L-NMMA (10^{-4} mol/l) ist sowohl die basale als auch die Scherstress-induzierte Nitrat/Nitrit-Bildung hemmbar. In Relation bleibt der hemmbare Anteil gleich.

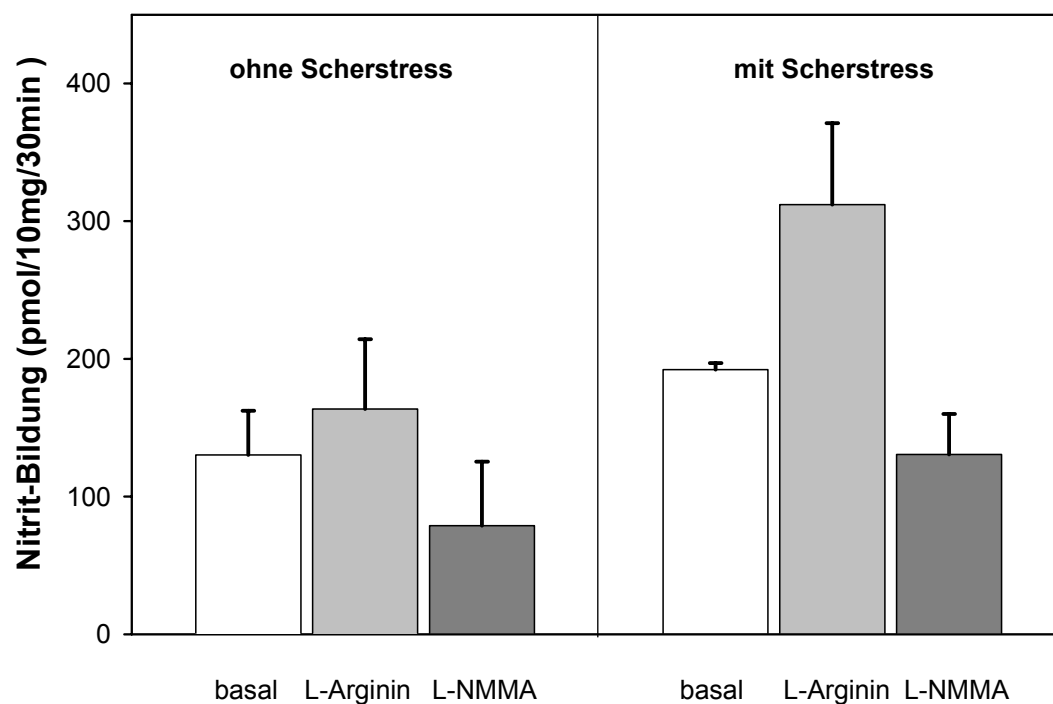


Abbildung 18: Wirkung von L-Arginin (1 mmol/l) und L-NMMA (0,1 mmol/l); (n=4)

4.3.3.3 Wirkung eines iNOS-spezifischen Inhibitors

Wie schon unter 4.3.2.2 gezeigt, hat 1400 W ohne Scherstress keinen Einfluss auf das Gefäßendothel. Unter Scherstressbedingungen mit signifikant erhöhten basalen Nitrat/Nitrit-Werten kann die Nitrit-Bildung durch 5 $\mu\text{mol/l}$ 1400 W geringfügig, aber nicht signifikant ($-13,1 \pm 5,7\%$) gehemmt werden (s. Abbildung 19).

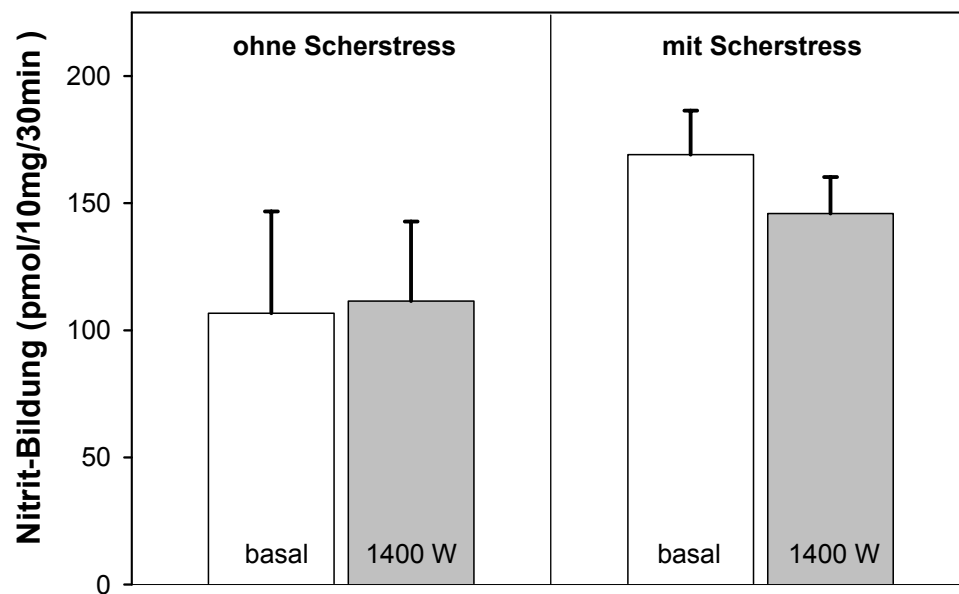


Abbildung 19: Wirkung des iNOS-Inhibitors 1400 W (5 $\mu\text{mol/l}$) auf die basale und die durch Scherstress erhöhte Nitrat/Nitrit-Bildung ($n=4$)

4.3.4 Wirkung von L-Typ Calciumkanalmodulatoren vom Dihydropyridintyp auf die Nitrat/Nitrit-Bildung

Verschiedene Calciumkanalmodulatoren wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Nitrat/Nitrit-Bildung untersucht (s.3.8.3.1). In Tabelle 4-2 sind die prozentualen Steigerungen durch Dihydropyridine (DHP) gegenüber der basalen Nitrat/Nitrit-Freisetzung aufgeführt. Es wurde in zwei verschiedenen Konzentrationsbereichen gemessen. Bei der Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ wurden keine signifikanten Steigerungen festgestellt, während bei 1 $\mu\text{mol/l}$ eine signifikante Zunahme der Nitrit-Bildung eintrat.

	0,1 $\mu\text{mol/l}$	1 $\mu\text{mol/l}$
Nifedipin	23 \pm 54 %	190 \pm 17 %
Nisoldipin	14 \pm 15 %	137 \pm 28 %
Bay K 8644	43 \pm 46 %	52 \pm 21 %

Tabelle 4-2: Prozentuale Steigerung der Nitrat/Nitrit-Bildung durch verschiedene DHP in 0,1 $\mu\text{molarer}$ und 1 $\mu\text{molarer}$ Konzentration (n=4)

In Abbildung 20 ist die Wirkung der verschiedenen Calciumkanalmodulatoren bei der Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$, bei Amlodipin bei der Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$, dargestellt.

Für die verschiedenen Dihydropyridine ist das Ausmaß der Steigerung unterschiedlich: Amlodipin > Nifedipin > Nisoldipin > Nitrendipin > Bay K 8644 \geq Bay O 5572 \geq Bay W 9798. Amlodipin bewirkt im Gegensatz zu den anderen Testsubstanzen bereits in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ eine signifikante Erhöhung der Nitrit-Bildung und wurde deshalb in der Aufreihung der Steigerungen als die Substanz mit der größten Auswirkung bewertet.

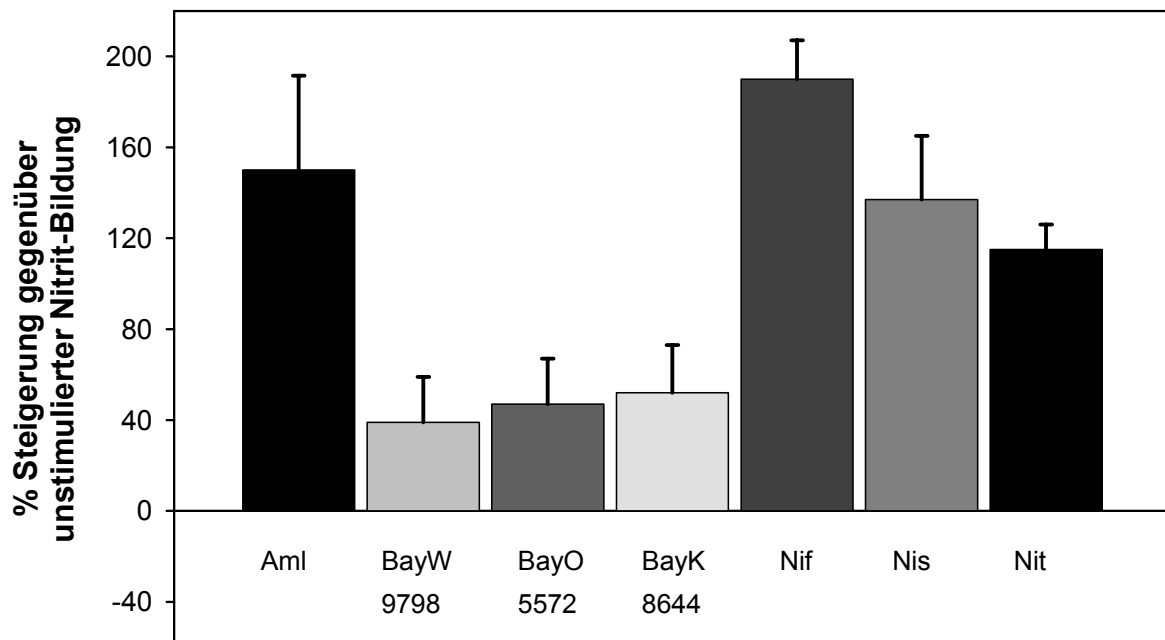


Abbildung 20: Zunahme der Nitrat/Nitrit-Bildung durch verschiedene DHP [prozentuale Steigerung gegenüber der basalen Bildung] (n=4); mit Ausnahme von Amlodipin wurden alle Substanzen in einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ dem Inkubationsmediumm zugefügt

Die von Amlodipin in verschiedenen Konzentrationen bewirkten Steigerungen der Nitrit-Bildung sind in Tabelle 4-3 aufgeführt.

Amlodipin	
0,01 $\mu\text{mol/l}$	-14 \pm 5 %
0,05 $\mu\text{mol/l}$	95 \pm 102 %
0,1 $\mu\text{mol/l}$	150 \pm 42 %

Tabelle 4-3: Prozentuale Steigerung der Nitrat/Nitrit-Bildung durch Amlodipin in verschiedenen Konzentrationen (n=4)

4.3.4.1 Wirkung des T-Typ-Calciumkanalblockers Mibefradil auf die Nitrat/Nitrit-Bildung

Da Amlodipin auf die Nitrat/Nitrit-Bildung stärker wirksam war als die anderen L-Typ-Calciumkanalmodulatoren und es auch T-Typ-inhibitorische Eigenschaften besitzt, wurde Mibefradil als relativ selektiver T-Kanal-Blocker untersucht. Die signifikante Erhöhung der Nitrit-Bildung durch Mibefradil in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ ist in Abbildung 21 dargestellt.

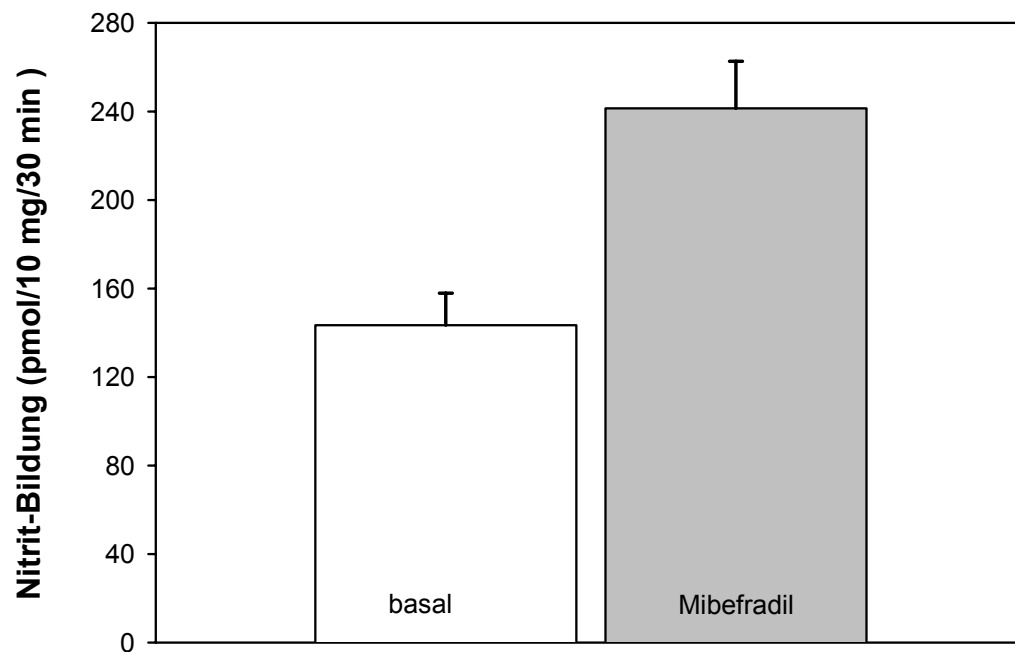


Abbildung 21: Wirkung des T-Typ-Calciumkanalblockers Mibefradil (0,1 $\mu\text{mol/l}$) auf die Nitrat/Nitrit-Bildung (n=4)

4.3.4.2 Hemmung der Nifedipin-induzierten Nitrat/Nitrit-Bildung durch L-NMMA

Die durch Nifedipin (1 $\mu\text{mol/l}$) gesteigerte Nitrat/Nitrit-Bildung kann vollständig durch L-NMMA (1 mmol/l) inhibiert werden (s. Abbildung 22).

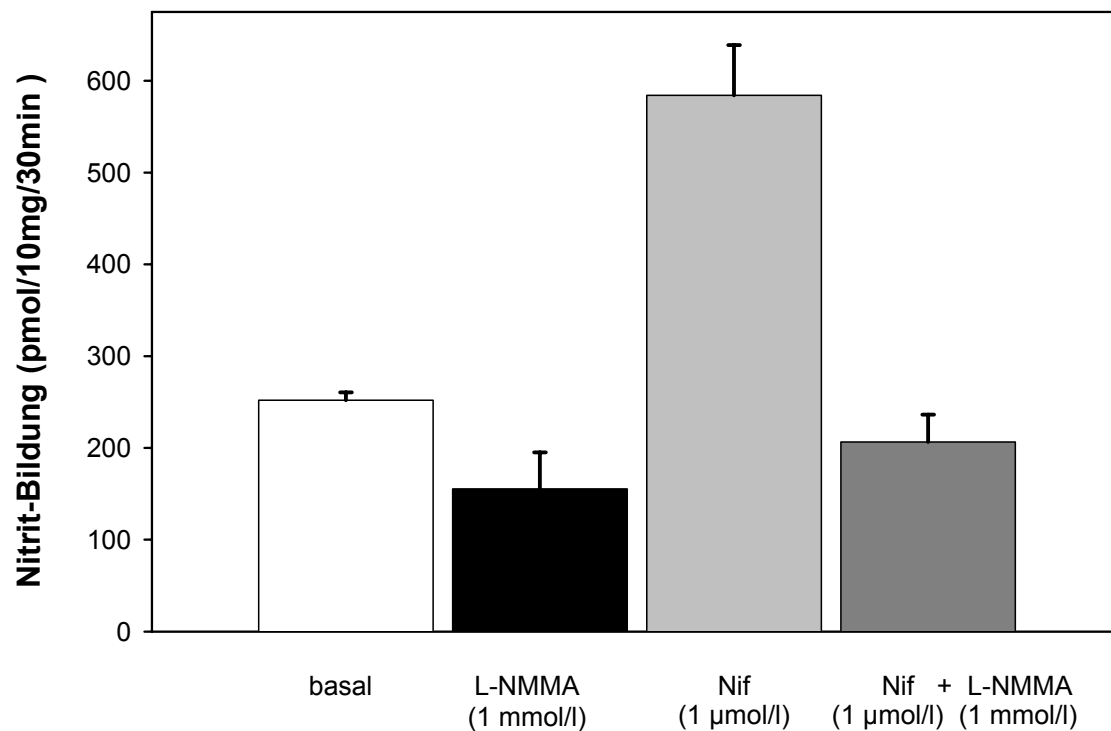


Abbildung 22: Hemmung der basalen und Nifedipin-induzierten Nitrat/Nitrit-Bildung durch L-NMMA (n=4)

4.3.4.3 Wirkung von Nifedipin auf die Nitrat/Nitrit-Bildung unter Scherstress

Da Dihydropyridine den Scherstress-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom erhöhen sollen, wurde geprüft, ob durch Nifedipin in einer Schwellenkonzentration von $0,5 \mu\text{mol/l}$ die Scherstress-stimulierte Nitrat/Nitrit-Bildung erhöht wird. Wie die Abbildung 23 demonstriert, steigert Nifedipin $0,5 \mu\text{mol/l}$ die Scherstress-abhängige Nitrat/Nitrit-Bildung nicht.

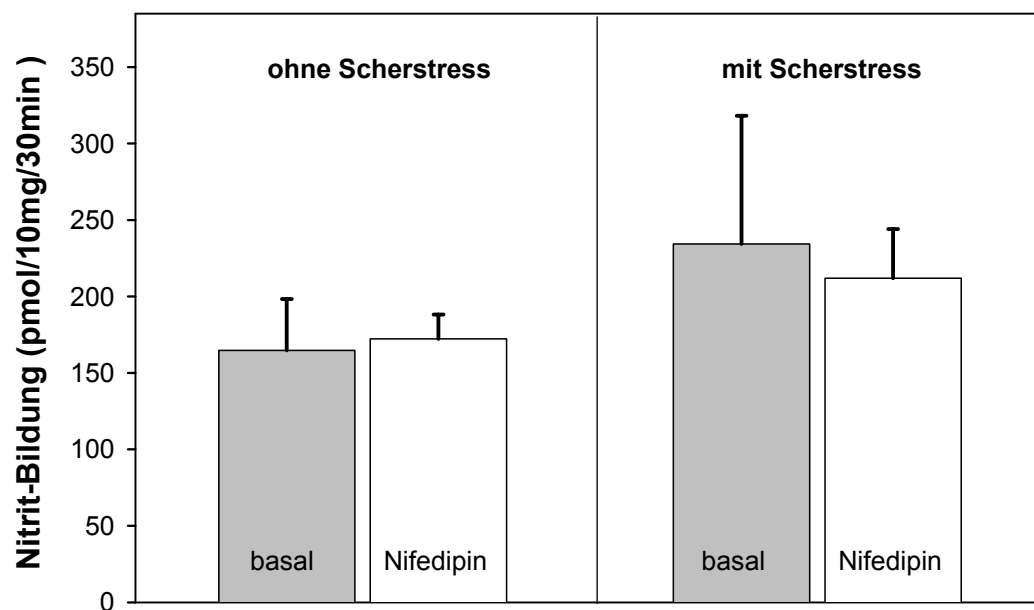


Abbildung 23: Stimulation der Nitrat/Nitrit-Bildung durch Scherstress und Nifedipin in Schwellenkonzentration $0,5 \mu\text{mol/l}$ ($n=3$)

4.4 Basale Nitrat/Nitrit-Bildung in der Endothelzellkultur

Endothelzellen in Kultur verringern mit jeder Passage die Expression der eNOS. Die basale Nitrat/Nitrit-Bildungsrate liegt niedriger als in den Gefäßen, weshalb längere Inkubationszeiten erforderlich sind.

4.4.1 Basale Nitrat/Nitrit-Bildung in porcinen Endothelzellen (PAEC) unter Scherstress und Einfluss von L-NMMA

Wie in Abbildung 24 dargestellt, lässt sich mit der hier angewandten Methodik (s. 3.8.7) die basale Nitrat/Nitrit-Bildung nachweisen. Unter Scherstress steigt auch in der Endothelzellkultur die Nitrat/Nitrit-Bildung um das 3-4 fache an.

Durch L-NMMA (0,1 mmol/l) ist sowohl die basale als auch die Scherstress-induzierte Nitrat/Nitrit-Bildung hemmbar.

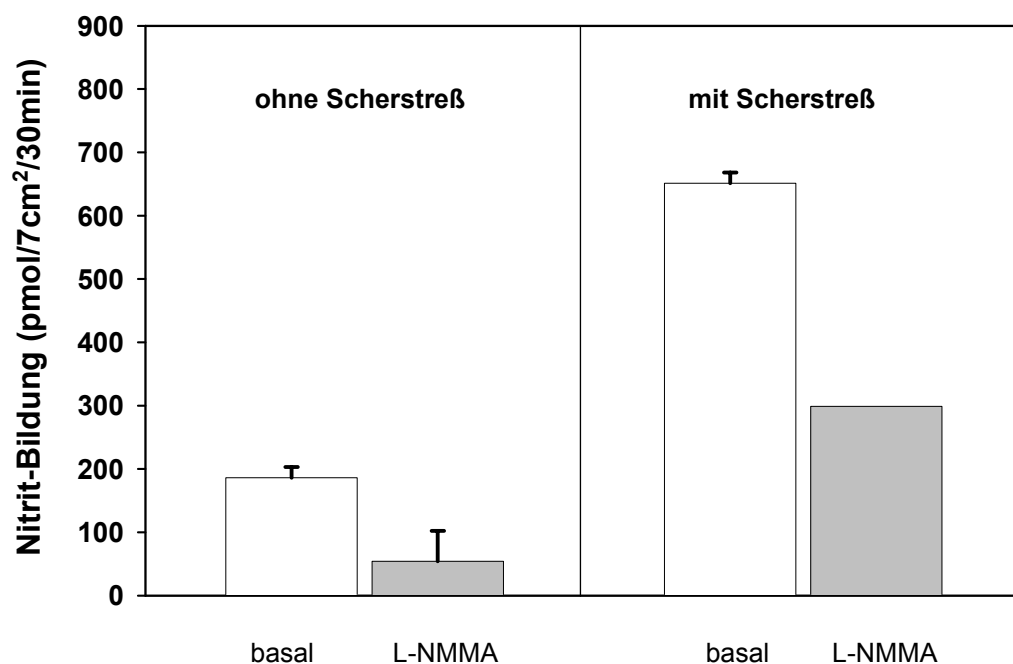


Abbildung 24: Stimulation der Nitrat/Nitrit-Bildung durch Scherstress und Hemmung durch L-NMMA (0,1 mmol/l) in der PAEC-Kultur (n=3)

4.4.2 Wirkung von Nifedipin auf die Nitrat/Nitrit-Bildung unter Scherkräften in der Endothelzellkultur

Die PAEC wurden während der Inkubationsphase „Scherstress“ ausgesetzt (s.3.8.7.5). Unter Scherstress war die Nitrat/Nitrit-Bildung signifikant gesteigert. Unter Scherstressbedingungen kommt es durch Nifedipin in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{mol/l}$ zu keiner Steigerung, durch Nifedipin in einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ zu einer weiteren aber geringen Erhöhung gegenüber der basalen Freisetzung (s.Abbildung 25).

Vergleicht man die Erhöhung der basalen Nitrit-Freisetzung durch Nifedipin ($+40 \pm 8\%$) mit der entsprechenden Erhöhung unter Scherstress ($+28 \pm 0,5\%$), so zeigt sich keine signifikante Verstärkung des Nifedipineffektes durch den Scherstress.

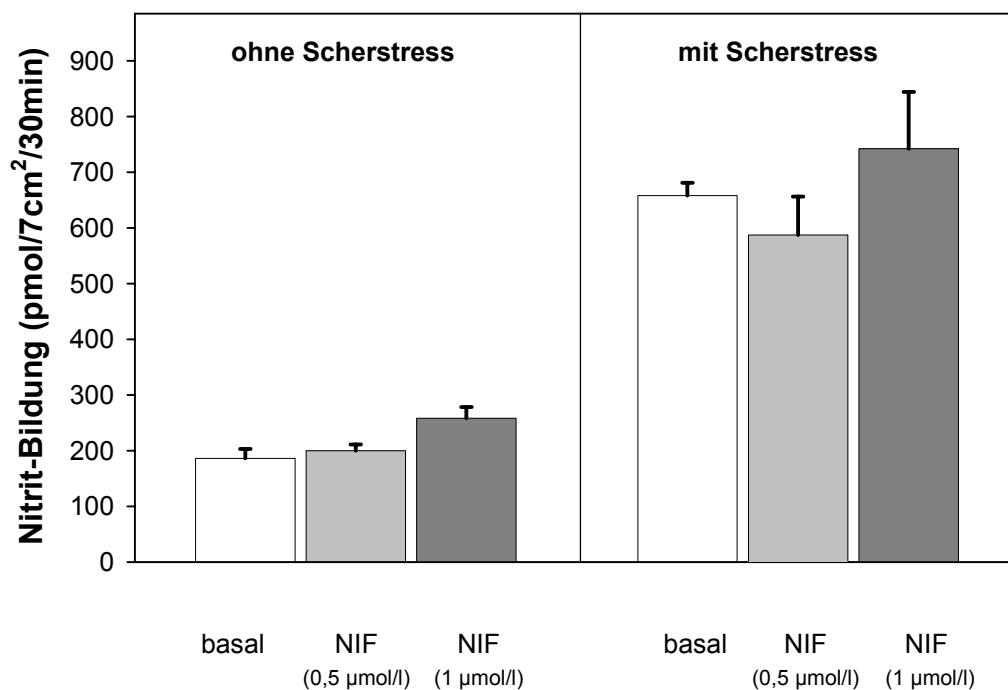


Abbildung 25: Erhöhung der Nitrat/Nitrit-Bildung durch Scherstress und Nifedipin in 0,1 $\mu\text{molarer}$ und 1 $\mu\text{molarer}$ Konzentration in der PAEC-Kultur (n=3)