

## 5 Diskussion

### 5.1 Eine sensitive Methode zur Messung von Nitrat/Nitrit in biologischen Systemen

#### 5.1.1 Entwicklung der Methode

Die ISO-NO-Elektrode misst die aktuelle freie NO-Konzentration in Lösung oder Gasphase, so dass mit ihr diese direkt über dem Gefäßendothel „in situ“ oder in Kultur sowie in anderen NO-bildenden Zellen wie z.B. Blutplättchen gemessen wurde (Tsukahara et al., 1993; Schmidt et al., 1994; Guo et al., 1996; Bertsch, 1996; Chakravarthy et al., 1998).

Die Nachweisgrenze von freiem NO in Lösung liegt für die Elektrode bei 1,5 nmol/l (Angabe des Herstellers; Bertsch, 1996), allerdings geben verschiedene Autoren auch höhere Werte an (Tsukahara et al., 1993:  $3,92 \pm 0,23$  nmol/l; Chakravarthy et al., 1998: 8 nmol/l NO). Hierbei bezieht sich die Nachweisgrenze auf eine Gleichgewichtsmessung mit in Lösung homogen verteiltem NO. Bei Messungen direkt über dem Gefäßendothel befindet sich die Elektrode im NO-aufnehmenden Medium und aktuell freigesetztes NO kann sofort gemessen werden, bevor es mit dem Gesamtmedium im Gleichgewicht steht. Bei der Messung in ungerührter Lösung über dem Gefäßendothel stellt sich oberhalb der Membran ein NO-Gradient ein, der sich nicht in eine homogene Gleichgewichtskonzentration umrechnen lässt.

Von besonderem Interesse ist nicht nur die von Endothelzellen bei Stimulation aktuell gebildete NO-Menge, sondern auch die permanente, basale NO-Bildung des Gefäßes in „Ruhestellung“. Allerdings ist diese basale NO-Bildung so niedrig, dass die „steady state“-Konzentration am Endothel unterhalb der Nachweisgrenze für NO liegt (s. 3.8.4.2) und somit der Nachweis von basal gebildetem, freiem NO in Lösung aufgrund der mangelnden Sensibilität der Methoden sehr problematisch ist. Die einzige Möglichkeit diese basale Bildungsrate zu ermitteln, besteht daher in einer kumulativen Messung, d.h. über längere Zeit das gebildete NO in Lösung sammeln und bestimmen. Wegen der kurzen Halbwertszeit von NO (<6,5 Sekunden, Cocks et al., 1995), das in Lösung durch Sauerstoff bzw. Oxidasen des Gefäßes oxidiert wird (Stamler et al., 1992), wird dann nicht freies NO, sondern Nitrit resp. Nitrat bestimmt. Hierbei wird nicht die lokale Konzentration - der Gradient - direkt über dem Endothel gemessen, sondern die homogene Konzentration im NO-auffangenden Medium (vorliegende Arbeit; Chakravarthy et al., 1998). Aufgrund der Vermischung ergibt

sich eine Verdünnung, so dass aus einer lokal hohen Konzentration eine wesentlich niedrigere Endkonzentration im Medium entsteht, d.h. die sich einstellende Endkonzentration ist vom Volumen des Ansatzes abhängig.

Die Problematik bei einer kumulativen Messung von NO liegt vor allem in der kurzen Halbwertszeit des Moleküls, die mit Werten im Bereich von einer Sekunde (Kelm, 1996), 5 Sekunden (Ignarro, 1989; Bertsch, 1996) bis 6,4 Sekunden (Gryglewski et al., 1986; Moncada et al., 1991 und Cocks et al., 1995) angegeben wird. Da NO sich durch Oxidation zu Nitrit und Nitrat einem elektrochemischen Nachweis entzieht, ist die Menge an freiem NO meist zu gering, um einen Konzentrationsbereich oberhalb der Nachweisgrenze zu erreichen. Des Weiteren ist zu beachten, dass NO ein Gas ist, welches zusätzlich der Lösung entweichen kann, wodurch die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze liegen können.

Die Lebensdauer von NO ist abhängig vom  $pO_2$ , vom pH, der Anwesenheit von Hydroxylradikalen, eisenhaltigen Molekülen und der Aktivität verschiedener Enzyme. Dies führt insbesondere in proteinhaltigen, biologischen Proben zu einer zusätzlich verkürzten Halbwertszeit.

In der Oxidation von NO zu Nitrit und Nitrat liegt jedoch auch eine Möglichkeit zu einer kumulativen Messung von NO: wird die Menge an Nitrit (nach Umwandlung des Nitrats zu Nitrit) bestimmt, so kann man auf die Menge an gebildetem NO schließen, da es sich um eine stöchiometrische Umwandlung handelt. Zwar kann es in Anwesenheit von Superoxidanion-Radikalen zu der Bildung von Peroxynitrit aus NO kommen (Stamler et al., 1992), welches mit der Elektrode nicht direkt erfasst werden kann. Da Peroxynitrit aber instabil ist und schnell zu Nitrat und Nitrit zerfällt, wird es doch miterfasst. Bei der Chemilumineszenzmessung mit dem Sievers-Analysegerät wird diese Umwandlungsreaktion genutzt: es werden Nitrat und Nitrit zu NO reduziert, anschließend mit Ozon derivatisiert und die Chemilumineszenz gemessen (Menon, 1991). Somit spielt bei dieser Methode die Halbwertszeit keine Rolle.

Nach dem gleichen Prinzip der Analyse - Rückführung von Nitrit zu NO - wird im Reaktionsablauf der Kalibrierung der ISO-NO-Elektrode verfahren: Nitrit wird in saurer Jodid-Lösung stöchiometrisch zu NO reduziert und gemessen (s. 3.8.2), so dass dieses Prinzip in dieser Arbeit auf die Analyse biologischer Proben angewendet wurde.

Die gebildeten Nitritmengen (in pmol) werden hier bei den Gefäßversuchen auf das Feuchtgewicht und eine Zeit von 30 Minuten bezogen. Für einen direkten Bezug auf die mit Endothel bedeckte Fläche hätte von jedem Gefäßstück die Integrität des Endothels analysiert werden müssen. Da immer Gefäße gleicher Ordnung und Wandstärke verwendet

wurden, sollte einem Flächenareal eine proportionale Gewebemenge entsprechen, so dass eine konstante Relation gegeben ist (s. 3.8.3.1). Die Gefäßstücke wurden im Experiment aufgespannt, so dass es durch diese Manipulation bei einer Ermittlung der Fläche zu signifikanten Fehlern hätte kommen können.

In Vorversuchen dieser Arbeit war bei Messungen mit Zellen und Gefäßen in den jeweiligen Inkubationsmedien so gut wie kein Nitrit nachweisbar gewesen. Dieses Phänomen wurde bereits von Kelm (1996) beobachtet. Als er die Metabolisierung von NO in wäßrigen Lösungen mittels der photometrischen Methode nach Griess untersuchte, fand er  $87 \pm 9\%$  des in das System eingeleiteten NO als Nitrat und den Rest als Nitrit wieder. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Summe der Nitrat- und Nitrit-Bildung analysiert. Das Redoxpotential der sauren Jodidlösung kann nur Nitrit, nicht Nitrat oxidieren. Um das entstandene Nitrat in die Messung mit einbeziehen zu können, musste es gesondert reduziert werden. Dazu wird in verschiedenen kommerziellen Nitrat/Nitrit-Tests die Nitrat-Reduktase eingesetzt (Nitric Oxide Colorimetric Assay, Boehringer Mannheim; Nitrate/Nitrite Assay Kit, R&D Systems GmbH, Wiesbaden), die Nitrat zu Nitrit umwandelt, wie z.B. zur Analyse von humanem Urin resp. Überständen von Gewebekulturen (Gilliam et al., 1993). Dieses Nitrit ist, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, mit der Elektrode nach Reduktion mit der sauren Jodidlösung als NO messbar. Der von der Firma WPI vertriebene Nitralyzer zur Reduktion von Nitrat hat sich in Vorversuchen der Arbeit aufgrund von Metalloxidablagerungen in der Lösung als unbrauchbar herausgestellt.

### 5.1.2 Vergleich mit anderen Messmethoden

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode mit der ISO-NO-Elektrode hat im Vergleich mit den anderen, unter 2.3 besprochenen Methoden zur NO-Bestimmung mehrere Vorteile. Das Detektionslimit für die zu untersuchende Lösung mit der ISO-NO-Elektrode liegt, wie unter 4.1 beschrieben, bei 0,1 µmol/l Nitrit und weist damit gegenüber anderen Methoden eine hohe Sensitivität auf; im Vergleich dazu ist mit dem Griess-Assay (Boehringer Mannheim) Nitrit ab 0,3 µmol/l, mit dem Nitrat/Nitrit-Assay von R&D 2,5 µmol/l (R&D Systems GmbH, Wiesbaden) und mit dem Sievers-Gerät, wie bereits erwähnt, 1 µmol/l Nitrit nachweisbar. Demgegenüber liegt das Detektionslimit mit der EPR-Messung bei 4 µmol/l weit über den physiologischen NO-Konzentrationen (Bertsch, 1996).

Auch sind die benötigten Probenvolumina bei dem hier beschriebenen Verfahren deutlich kleiner als bei den meisten anderen Methoden; in dieser Arbeit wurde mit Volumina von 50 µl bis maximal 200 µl gearbeitet. Für den Griess-Assay werden Probenvolumina von 500 µl benötigt (Angabe Nitric Oxide Colorimetric Assay, Boehringer Mannheim), im Fluorometric Assay arbeitet man mit 80 µl (Angabe R&D Systems GmbH, Wiesbaden), bei der Analyse mit dem Sievers-Gerät wird das hohe Maß an Sensitivität nur über Volumina von 1000 µl erreicht (Angabe des Herstellers).

Im Gegensatz zu anderen Methoden gibt es bei dem hier beschriebenen Verfahren keine Verfälschungen durch den Gehalt an SH-Gruppen und Proteinen in biologischen Proben, welche die Nitrat/Nitrit-Analytik stören könnten. Wie unter 4.2.1 und 4.2.2 gezeigt, kommt es in Gegenwart hoher Konzentrationen von SH-Gruppen oder Proteinen in der Lösung zu keiner Beeinflussung der NO-Messung: Weder L-Cystein in einer Konzentration von 1 mmol/l noch Proteine in der Lösung (1 mg/ml) stören die Nitrit-Analytik. Demgegenüber zeigte der Griess-Assay im Vergleich zu der Gaschromatographie-Masspektrometrie (GC-MS) bei Messungen in humanem Urin und Plasma in Gegenwart von SH-Verbindungen und Proteinen starke Abweichungen, während in Abwesenheit von SH-Gruppen und Proteinen die Ergebnisse mit beiden Methoden vergleichbar waren (Tsikas et al., 1997). Cystein-Konzentrationen von 1 mmol/l führen zu einer deutlichen Reduktion der Absorption im Griess-Assay und damit zu einer Minderbestimmung. Dafür spielt insbesondere die Art der Vorbehandlung der Probe eine Rolle, die Proteinfällung durch Säure führt zur Umwandlung von Nitrit zu S-Nitroso-Verbindungen und anderen Reaktionsprodukten und somit zum Verlust von Nitrit.

Die OxyHb-Methode ist aufgrund photometrischer Interferenzen in eiweißhaltigen Medien (menschliches Plasma oder Blut) nicht anwendbar (Kelm, 1996). Ebenso gibt es

Interferenzen bei der Anwendung des Fluorimetrischen Assay's (R&D) in Gegenwart von Proteinen wie fetalem Kälberserum oder bovinem Serumalbumin.

## 5.2 Basale NO-Bildung

Wie auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt, findet am Gefäßendothel eine messbare, permanente NO-Bildung resp. Freisetzung statt, allerdings fällt ein Vergleich der von verschiedenen Autoren beschriebenen basalen NO-Mengen aufgrund der angewendeten, unterschiedlichen Methoden (direkte und indirekte Messmethoden), der unterschiedlichen Spezies (Ratte, Hamster, Hund, Schwein, Mensch), den unterschiedlichen Gefäßarten (Aorta, A. coronaria, A. femoralis, A. mesenterica) und den daraus resultierenden Maßeinheiten (pmol/mg Gewebe, nmol/l, nmol/min) schwer. In Tabelle 5-1 findet sich eine exemplarische Darstellung verschiedener Arbeiten an isolierten Gefäßen (ex vivo) aus der Literatur.

<b>Autor</b>	<b>NO/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Angabe Wert mit Maßeinheit</b>	<b>Gefäßart</b>	<b>Spezies</b>	<b>Messung im Fluss</b>
Guo et al. (1996)	NO	40-220 pmol/ 10 mg Gewebe	Aorta	Ratte	/
Mochizuki et al.(1999)	NO	15-231 nmol/l	A. femoralis	Hund	18-72 ml/min
Reber et al. (2000)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4,5 µmol/l	A.mesenterica	Schwein	9 ml/min

*Tabelle 5-1: exemplarische Darstellung von Literaturangaben an isolierten Gefäßen nach ausgewählten Parametern*

Ex vivo wurde in der vorliegenden Arbeit mittels der ISO-NO-Elektrode eine basale Nitrit-Freisetzung aus dem Gefäßendothel von isolierten Schweinekoronararterien von 350 pmol/10 mg Gewebe/30 min ermittelt. Dieser Wert passt gut zu den in der Literatur beschriebenen Werten, auch wenn Methodik, Spezies und Gefäßart variieren. So wurde für isolierte Rattenaorten ein Wert von 40-220 pmol NO/10 mg Gewebe (Guo et al., 1996) ermittelt (ohne Angabe in welcher Zeit). Für isolierte A. femoralis von Hunden wurde bei konstanter Perfusionsrate (von 18,5 ml/min bis 72,3 ml/min) eine flussabhängige

NO-Konzentration von 15-231 nmol/l ermittelt, die bei Stase (Fluss= 0 ml/min) 90 nmol/l beträgt (Mochizuki et al., 1999). Auch hier finden sich keine Angaben zur Inkubationszeit, Gewebemenge, rezirkulierendem Gesamtvolumen resp. Angaben über die Umwandlung zu Nitrat/Nitrit, die für eine Schätzung der Gesamtkapazität der NO-Bildung notwendig wären.

In der gleichen Größenordnung scheint die NO-Bildung von Mesenterialarterien vom Schwein zu liegen, mit 4,5  $\mu\text{mol/l}$  Nitrit bei konstantem Fluss (9 ml/min) (Reber et al., 2000); auch hier fehlt für die Vergleichbarkeit die Gewebemenge resp. Endothelfläche.

Entsprechend variieren die in der Literatur beschriebenen in vivo Werte (exemplarische Darstellung der Literaturangaben in Tabelle 5-2), wie die folgenden Beispiele belegen.

<b>Autor</b>	<b>NO/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Angabe Wert mit Maßeinheit</b>	<b>Ort der Messung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Messung im Fluss</b>
Brovkovich et al.(1998)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> / NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1 $\mu\text{mol/l}$	Blut, Lungen- parenchym	Ratte	/
"	NO	52 nmol/l	A. femoralis	Kaninchen	/
Figuroa et al.(1999)	NO	20 $\mu\text{mol/l}$	Backentasche	Hamster	3 $\mu\text{l/min}$

*Tabelle 5-2: exemplarische Darstellung von Literaturangaben nach ausgewählten Parametern, in vivo Werte*

Im Blut von Ratten wurden in vivo basale Nitrat/Nitrit-Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  ermittelt (Brovkovich et al., 1998; Griess-Assay). In der Femoralarterie von Kaninchen wurde eine basale NO-Konzentration von 52 nmol/l gemessen (Brovkovich et al., 1998; Malinski-Elektrode). Demgegenüber wurde in vivo in der Backentasche von Hamstern eine basale Nitrit-Freisetzung von 60 pmol/min bei 3  $\mu\text{l}$  Fluss/min festgestellt. (Figuroa et al., 1999, Sievers-Gerät). Dies entspricht z.B. einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  Nitrit, die relativ hoch erscheint.

Entsprechend variierende Angaben finden sich in der Literatur zur Nitrit-Bildung von Endothelzellen in Kultur. In Tabelle 5-3 findet sich eine exemplarische Darstellung der in Zellkultur beschriebenen NO-Freisetzungen verschiedener Autoren.

<b>Autor</b>	<b>NO/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Angabe Wert mit Maßeinheit</b>	<b>Zellart</b>	<b>Spezies</b>	<b>Messung</b>
Kelm et al. (1988)	NO	2,3 nmol// 10 <sup>6</sup> Zellen	Aorten- endothel	Schwein	2 ml/min
Termin et al. (1992)	NO	0,14-1,2 nmol// 10 <sup>6</sup> Zellen	Aorten- endothel	Rind	6 ml/min
Guo et al. (1996)	NO	1,4-5 nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen	Aorten- endothel	Ratte	/
Tsukahara et al.(1993)	NO	260 nM	HUVEC	Mensch	/
Chakravarthy et al.(1998)	NO	130 nmol//	RMEC	Mensch	/

*Tabelle 5-3: : exemplarische Darstellung von Literaturangaben nach ausgewählten Parametern, Endothelzellkultur*

In der vorliegenden Arbeit wurde aus Aortenendothelzellen vom Schwein eine basale Nitrit-Freisetzung von  $186 \text{ pmol}/3 \times 10^5 \text{ Zellen}/30 \text{ min}$  ermittelt. Ebenfalls aus Aortenendothelzellen vom Schwein finden sich in der Literatur Werte für die NO-Freisetzung von  $2,3 \text{ nmol}/10^6 \text{ Zellen}$ , bei einem Fluß von  $2 \text{ ml}/\text{min}$  (Kelm et al., 1988; Bioassay). Aus Rinderendothelzellen wurden bei einem konstanten Fluss von  $6 \text{ ml}/\text{min}$  eine Konzentration von  $0,14\text{-}1,2 \text{ nmol}/10^6 \text{ Zellen}$  freigesetzt (Termin et al., 1992; Sievers-Gerät). Vergleichend dazu wurden aus Endothelzellen der Rattenaorta  $1,4\text{-}5 \text{ nmol}/10^6 \text{ Zellen}$  ermittelt (Guo et al., 1996; ISO-NO-Elektrode). Aus HUVEC-Zellen wird eine absolute Menge von  $260 \pm 47 \text{ nM}$  NO im Inkubationsmedium angegeben, jedoch werden weder die Menge des Mediums noch die Zellkonzentration näher bestimmt (Tsukahara et al., 1993; ISO-NO-Elektrode). Messungen an RMECs ergaben eine basale NO-Konzentration von bis zu  $130 \text{ nmol}/10^6 \text{ Zellen}$  (Chakravarthy et al., 1998; ISO-NO-Elektrode).

Allerdings weist keiner der genannten Autoren nach, dass es sich bei der gemessenen basalen Freisetzung wirklich um eine permanente Freisetzung handelt oder ob die Freisetzung zeitweise, vielleicht periodisch, erfolgt. So behaupten Kanai et al. (1995), es gäbe keine kontinuierliche basale NO-Freisetzung. Dagegen sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Hier wurde gezeigt, dass es sich am Gefäßendothel um eine kontinuierliche NO-Freisetzung über die Zeit handelt. Schon in Vorversuchen wurde eine Linearität der Nitrat/Nitrit-Freisetzung über die Zeit ermittelt, des Weiteren zeigten konsekutive Inkubationen, dass die Freisetzung auch über einen längeren Zeitraum konstant bleibt (s. 4.3.1.1). Die Ergebnisse von Mochizuki et al. (1999) sprechen ebenfalls gegen die Argumentation von Kanai et al. (1995) und für eine kontinuierliche NO-Freisetzung aus dem Gefäßendothel, da dort die Gewebe einem kontinuierlichen Fluss ausgesetzt sind und kontinuierlich NO gemessen werden kann.

Generell besteht bei der Bestimmung der basalen NO-Freisetzung aus dem Endothel sicherlich die Frage, ob es sich hierbei um „echte“ basale NO-Bildung handelt oder ob die Gewebe, die bei vielen Versuchen dem Fluss von Blut resp. Perfusionsmedium ausgesetzt sind, hier auf den Scherstress eventuell bereits mit einer erhöhten NO-Freisetzungsrates reagieren.



### 5.3 Scherstress-induzierte NO-Bildung

Endothelzellen haben die Fähigkeit, ihre NO-Freisetzungsraten schnell den Änderungen des Flusses anzupassen. Sowohl unter basalen als auch unter stimulierten Bedingungen steigert Scherstress die NO-Freisetzung (Kelm et al., 1991). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen damit voll im Einklang. Gegenüber der basalen Freisetzung ergab sich unter Scherstress eine drei- bis vierfache Steigerung der Nitrat/Nitrit-Bildung sowohl am „nativen“ Gefäßstück als auch in der Endothelzellkultur.

In vivo ist die Endothelzellschicht als wesentlicher Bestandteil der Blutgefäßwand dem zirkulierenden Blut direkt ausgesetzt und maßgeblich an der Regulation des Gefäßdurchmessers beteiligt. Die Endothelzellen unterliegen dabei drei verschiedenen Typen mechanischer Krafteinwirkung: 1. dem Dehnungsstress, der von Deformationen im Gefäßumfang herrührt und entlang der Gefäßwand wirkt; 2. dem normalen Stress, der radial auf die Gefäßwand einwirkt und vom hydrostatischen Druck abhängig ist und 3. dem tangentialen Stress, dem „Scherstress“, der überwiegend durch den Blutfluß bedingt ist und entlang der Längsrichtung der Gefäße wirkt (Panarro, McIntire, 1993).

Eine weitere Unterscheidung des Scherstress erfolgt anhand der verschiedenen Qualitäten: stetiger laminarer; periodisch oszillierender und turbulenter Scherstress. Turbulenter Stress scheint die NO-Freisetzung in HUVEC-Zellen nicht zu stimulieren, alle anderen Arten führen zu einer erhöhten Freisetzung von NO (Noris et al., 1995). Der genaue Mechanismus, der zur Erhöhung der NOS-Aktivität durch Scherstress führt, ist nicht geklärt. Die Erhöhung der NO-Bildung unter laminarem Scherstress scheint einem biphasischen Verlauf zu folgen. Erst kommt es zu einem schnellen, zeitlich begrenzten Anstieg der NO-Freisetzung aus dem Endothel, welcher calciumabhängig und scherstressunabhängig ist. Darauf folgt ein scherstressabhängiger und calciumunabhängiger Schritt, durch den, weiteren Scherstress vorausgesetzt, eine dauerhafte NO-Produktion erfolgt (Kuchan, Frangos, 1994). Die vermutete Calcium-Ab- resp. Unabhängigkeit begründen Kuchan und Frangos (1994) mit dem beobachteten Verhalten unter Einfluss von  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Antagonisten. Die genaue Rolle von Calcium und Calmodulin in diesem Prozeß ist aber noch nicht vollständig verstanden. Die Hypothese des biphasischen NO-Anstiegs wurde mittlerweile bestätigt (Ayajiki et al., 1996; Corson et al., 1996; Papadaki et al., 1998; Mochizuki et al., 1999). Der NO-Anstieg wird über die eNOS vermittelt, wobei es, wie bereits 1993 von Tsukahara et al. vermutet und in neueren Arbeiten (Corson et al., 1996; Reber et al., 2000) bestätigt, zu einer Phosphorylierung der eNOS über eine Proteinkinase kommt. Tyrosinkinase-Inhibitoren hemmen die NO-Freisetzung resp. Phosphatase-Inhibitoren steigern sie. Die Vermittlung über die eNOS konnte mittels der in dieser Arbeit verwandten Methode bestätigt werden. N-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) als unspezifischer NO-Synthase-

Hemmer führte sowohl bei der basalen als auch bei der Nitrat/Nitrit-Bildung unter Scherstress zu einer signifikanten Erniedrigung der Nitrit-Freisetzung am Gefäßendothel und in der Endothelzellkultur (s. 4.3.3.2, 4.4.1). Im Verhältnis wurden die basale und die stimulierte Freisetzung in gleichem Maße gehemmt.

Eine weitere Überlegung zu der erhöhten NO-Freisetzung unter Scherstress ist die, ob es möglicherweise unter Scherstress-Einfluss zu einer vermehrten Expression der iNOS kommt. Die induzierbare NO-Synthase – Typ II, iNOS – wird nicht kontinuierlich in Endothelzellen exprimiert, lediglich nach Stimulation mit inflammatorischen Reizen wie bakteriellen Lipopolysacchariden und Zytokinen (Interleukin 1, Tumornekrosefaktor) wird diese Isoform in den entsprechenden Zellen mit einer Verzögerung von mehreren Stunden induziert. Die Aktivität der iNOS ist calciumunabhängig und die gebildeten NO-Mengen liegen um 2-3 Zehnerpotenzen höher als bei der eNOS (Yui et al., 1991). Basal hat die iNOS im gesunden Gefäß also keinen Einfluss. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses gezeigt, da der spezifische iNOS-Hemmer N-(3-(aminomethyl)-benzyl)acetamidin (1400 W) (Garvey et al., 1997; Thomsen et al., 1997) unter basalen Bedingungen keine Veränderung in der Nitrit-Freisetzung bewirkt hat. Unter Scherstress kam es zu einer leichten, nicht signifikanten Erniedrigung der Nitrit-Freisetzung. Papadaki et al. (1998) haben anhand eines Western Blots ebenfalls gezeigt, dass die iNOS bei dieser Scherstress-induzierten NO-Freisetzung keine Rolle spielt. Kuchan und Frangos (1994) sprechen davon, dass die Calciumunabhängigkeit nicht durch die iNOS zu erklären sei, führen dieses allerdings nicht weiter aus.

## 5.4 Dihydropyridine und endotheliale NO-Freisetzung

Alle in dieser Arbeit untersuchten Calciumkanalmodulatoren vom Dihydropyridin-Typ (DHP) haben die Nitrat/Nitrit-Bildung erhöht (s. 4.3.4), diese verstärkte NO-Freisetzung aus dem Endothel scheint ein calciumkanal-unabhängiger Substanzklassen-Effekt der DHP zu sein (Günther et al., 1991; Berkels et al., 1999). Auch Dhein et al. (1999) sprechen von einem Gruppenphänomen der DHP, wobei das Ausmaß von der Substanz, dem Gefäßtyp und der Spezies abhängig zu sein scheint.

Da in Endothelzellen der L-Typ Calciumkanal nicht exprimiert wird, müssen DHP über andere Signalwege das vermehrte Nitrat/Nitrit freisetzen. Der antioxidative Effekt kann als Ursache ausgeschlossen werden, da mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfahren eine Änderung der kumulativen Nitrat/Nitrit-Bildung, die Endoxidationsstufe, ermittelt wird. Durch die antioxidative Wirkung der DHP kann zwar die Halbwertszeit von NO verlängert werden, was zu einer höheren transienten Konzentration von NO führt. Dies hat eine verzögerte Nitrat/Nitrit-Bildung zur Folge, aber keinen Einfluss auf das Ausmaß der kumulativen Nitrat/Nitrit-Bildung.

Bei der Detektion von kumulativem Nitrat/Nitrit muss zwischen der Folge einer NO-Bildung und einer NO-Freisetzung unterschieden werden. Die NO-Bildung findet enzymabhängig im Endothel statt und ist damit durch Inhibition der eNOS blockierbar. Dementsprechend sollte die Stimulation der eNOS durch DHP die NO-Bildung im Gefäßendothel und damit die Kumulation von Nitrit resp. Nitrat erhöhen, während durch Hemmung der eNOS die DHP-Effekte vermindert resp. aufgehoben werden, wie unter 4.3.4.2 gezeigt. Amlodipin steigerte von den untersuchten DHP bereits bei 10-fach niedrigerer Konzentration als alle anderen DHP die Nitrat/Nitrit-Bildung. Dies entspricht dabei in ihrem Ausmaß dem von Zhang und Hintze (1998, 2000) beschriebenen Effekt. Allerdings vermochten diese u.a. Autoren (Mügge et al., 1991; Zhang, Hintze, 1998) keine Nitrat/Nitrit-Erhöhung durch Nifedipin nachzuweisen, während andere Autoren durchaus auch für Nifedipin diesen Effekt verifizieren konnten (Berkels et al., 1996; Ding und Vaziri, 2000; Kitakaze et al., 2000; Brovkovych et al., 2001). Ein Grund für die o.g. divergierenden Befunde bezüglich des Nifedipins könnte in der Sensitivität der Nachweisverfahren liegen. Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Elektrode können geringere NO-Konzentrationen sichtbar gemacht werden als mit dem Griess-Assay, bei dem die durch Nifedipin induzierten Änderungen an der Nachweisgrenze liegen. Das Gleiche gilt für die elektrochemische Messung von NO mit der Elektrode (Brovkovych et al., 2001). Dafür sprechen auch die Befunde von Kitakaze et al. (2000) am ischämischen Hundeherzen, die nach Nifedipin-Gabe

mit dem Griess-Assay keine Steigerung der Nitrat/Nitrit-Bildung, wohl aber nach eNOS-Hemmung eine verminderte Kardioprotektion von Nifedipin beschreiben.

Über welchen Mechanismus die gesteigerte Nitrat/Nitrit-Bildung abläuft, ist nach wie vor Diskussionsgegenstand. Möglich wäre eine Aktivitätserhöhung der eNOS und/oder eine Erhöhung der eNOS-Expression, wie für einige DHP gezeigt (Ding, Vaziri, 2000). Neuere Arbeiten zeigen keine erhöhte Expression der eNOS nach chronischer Nifedipin-Exposition (Berkels et al., 2001). Die Aktivität der eNOS kann durch das Vorhandensein von Calcium und Calmodulin reguliert werden (Bredt, Snyder, 1990). Extrazelluläres Calcium gelangt auf noch unbekanntem Weg ins Endothel und führt dort zu einer Steigerung der eNOS-Aktivität und somit zu einer erhöhten NO-Freisetzung. Das Entfernen von extrazellulärem Calcium kann die NO-Freisetzung deutlich inhibieren (Long, Stone, 1985; Bredt, Snyder, 1990; Moncada et al., 1991; Salameh, 1996). Sowohl die Arbeiten von Zhang und Hintze (1998, 2000) als auch die von Kitakaze et al. (2000) lassen für Amlodipin und Nifedipin eine Bradykinin-vermittelte NO-Bildung vermuten, da die beschriebenen Effekte sowohl durch eNOS-Inhibitoren als auch durch BK<sub>2</sub>-Antagonisten aufhebbar waren.

Bradykinin bindet an den endothelialen BK<sub>2</sub>-Rezeptor, durch Aktivierung der Phospholipase C wird aus Phosphatidyl-4,5-diphosphat Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) abgespalten, welches auf Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums wirkt, wodurch Calcium in das Cytoplasma einströmt. Dieses bewirkt einen Calciumeinstrom von extrazellulär, die eNOS wird aktiviert und somit die NO-Bildung erhöht (Arnal et al., 1999). Es ist fraglich, ob und an welcher Stelle die DHP in diesem Schema wirken. Aufgrund des im Nebenwirkungsspektrum der DHP nicht vorhandenen trockenen Reizhustens (Sweetman, 2002) scheint eine direkte Erhöhung der Bradykinin-Freisetzung nicht wahrscheinlich. Möglich wäre eine Verstärkung des Calciumeinstroms (Salameh, 1996).

### 5.4.1 Freisetzung von NO

Die ins Medium abgegebene NO-Menge hängt nicht nur von der aktuellen Bildung im Endothel ab, sondern könnte größer sein, da, wie z.B. kürzlich in den Erythrozyten entdeckt, NO auch aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden könnte (Pawloski et al., 2001). Auch dann würden höhere NO-Konzentrationen detektiert und in der Folge höhere Nitrat/Nitrit-Konzentrationen, ohne dass NO vermehrt gebildet würde. Diese NO-Freisetzung wäre nicht durch NOS-Hemmer blockierbar, müsste aber in Gegenwart eines Hemmstoffes der NOS einer Tachyphylaxie unterliegen. Eine kontinuierliche Freisetzung von NO aus Speichern könnte erklären, warum trotz hoher Konzentrationen der NOS-Hemmer und langer Vorinkubationszeit die NO/Nitrit-Werte nicht vollständig auf Null abgesenkt werden konnten. Tachyphylaxie konnte von Bertsch (1996) für Bradykinin-induzierte NO-Bildung, nicht aber für Nifedipin-induzierte nachgewiesen werden.

### 5.4.2 Dihydropyridine und Scherstress-induzierte NO-Freisetzung

Nach wie vor wird eine Wirkung der Calciumkanalblocker in Abhängigkeit des auf das Gefäß wirkenden Scherstress diskutiert. Über einen scherstressabhängigen Calciumkanal soll es zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und damit zu einer Erhöhung der NO-Freisetzung aus dem Gefäßendothel kommen (Naruse und Sokabe, 1993; Salameh et al., 1996). Diese Wirkung erfolgt letztlich über die Calciumabhängigkeit der eNOS.

Unter Scherstress konnte mit Nitrendipin eine weitere Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration festgestellt werden (Salameh et al., 1996), aufgrund der Hemmbarkeit dieses Effektes sowohl durch Wegnahme von extrazellulärem Calcium als auch durch Zugabe von Gadolinium (Blocker für kation-selektive und dehnungs-aktivierte Kanäle) schließen die Autoren auf die Wirkung über einen scherstress-abhängigen Kanal. Mit Nifedipin wurde kein Effekt festgestellt (Naruse und Sokabe, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Nifedipin als „Modellsubstanz“ überprüft. Wenn die Wirkung über den scherstressabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal gesteigert wird, sollte vor allem im Bereich der Schwellenkonzentration von Nifedipin dieser Effekt deutlich werden. Unter 4.3.4.3 und 4.4.2 ist gezeigt, dass in Gegenwart von Nifedipin in Schwellenkonzentration keine über den Effekt des Scherstress hinausgehende Wirkung messbar war (natives Gefäß, Endothelzellkultur). Demgegenüber konnte in einer Konzentration von  $1 \mu\text{mol/l}$  unter Scherstress eine Erhöhung der basalen NO-Freisetzung durch Nifedipin festgestellt werden (Endothelzellkultur), wobei das Verhältnis von basaler zu stimulierter Freisetzung unabhängig vom Scherstress war, d.h. auch in höherer Nifedipin-

Konzentration kam es durch den Scherstress zu keiner weiteren Erhöhung der Nifedipin-stimulierten Nitrit-Freisetzung. Damit konnte gezeigt werden, dass diese Erhöhung scherstressunabhängig ist und Nifedipin nicht über scherstressaktivierte Calciumkanäle wirkt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse von Nifedipin und Nitrendipin zeigen, dass es sich bei der Scherstressabhängigen Wirkung wahrscheinlich nicht um einen generalisierten Gruppeneffekt der DHP, sondern um eine Substanz-spezifische Wirkung handelt. Allerdings muss beachtet werden, dass die Beurteilung der Effekte aufgrund der unterschiedlichen Versuchssysteme schwierig ist.

### 5.4.3 Antioxidative Effekte der DHP

NO kann durch reaktive Sauerstoffverbindungen, wie z.B. Superoxidanionen und Hydroxylradikale inaktiviert werden (Ignarro, 1990; Kerwin et al., 1993). Ein Abfangen dieser Radikale könnte die Halbwertszeit, Verfügbarkeit und Wirkung von NO verlängern (Hogg, 1998), letztlich erfolgt aber immer, wenn auch zu einem späteren Zeitpunkt, die Oxidation zu Nitrit/Nitrat. Somit kommt es durch antioxidative Wirkung nicht zu einer erhöhten Freisetzung, aber zu einer erhöhten transienten NO-Konzentration und damit zur Steigerung der Bioverfügbarkeit. In diesem Sinne könnten auch DHP über ihre antioxidativen Eigenschaften eine Verringerung der biologischen Inaktivierung von NO bewirken. Diese antioxidativen Auswirkungen waren bisher in Konzentrationsbereichen nachgewiesen worden, die weit über den therapeutischen Konzentrationen liegen (Mak, 1994). Mittlerweile wurden für Nifedipin die antioxidativen Effekte im therapeutischen Konzentrationsbereich nachgewiesen (Berkels et al., 2001; Brovkovych et al., 2001).

Eine andere Situation ergibt sich bei vermehrter Bildung von Peroxynitrit – dem erhöhtem „oxidativem Stress“. Peroxynitrit ist in der Lage, Tyrosinreste in Proteinen etc. zu nitrieren, so dass es sich der Nitrit/Nitrat-Analytik entzieht. Antioxidantien, die die Superoxidanionenbildung vermindern, können dann auf eine scheinbar höhere Nitrat/Nitrit-resp. NO-Bildung schließen lassen. Da sich aber nach wie vor (nur später) als Reaktionsendprodukte Nitrat und Nitrit ergeben, wird dieser antioxidative Effekt der DHP mit der hier beschriebenen Methodik nicht erfasst.

#### 5.4.4 Therapeutisches Wirkspektrum der DHP

Calciumkanalmodulatoren vom Dihydropyridin-Typ gehören nach wie vor zu den am häufigsten verschriebenen Medikamentenklassen zur Therapie der koronaren Herzkrankheit und der Hypertonie (Schwabe, Paffrath, 1998). Ihre vasodilatatorische Wirkung beruht nur zum Teil auf Blockade der L-Typ-Calciumkanäle an den glatten Gefäßmuskelzellen. Darüberhinaus könnte eine NO-Bildung aus dem Gefäßendothel zum Wirkungsspektrum beitragen (Gunther et al., 1992). Die vermehrte NO-Bildung könnte außerdem die Thrombozytenaggregation hemmen (Klaus et al., 1985; Moncada et al., 1991) und somit thrombozytischen Prozessen entgegenwirken, woraus sich günstige therapeutische Auswirkungen z.B bei Atherosklerose und Diabetes mellitus ergeben könnten (Brown et al., 1994). Bei prädispositionierten Patienten kann sich dieser Effekt durch eine Verminderung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten positiv auswirken (Berkels, Klaus, 2000).

DHP scheinen die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, die zur atherosklerotischen Intimaveränderung beitragen, zu hemmen (Kataoka et al., 1997; Khorgami, 1999) und dadurch die Bildung atherosklerotischer Läsionen abzuschwächen. Die klinische Relevanz dieses Effektes ist derzeit noch umstritten.

Zusätzlich könnten die antioxidativen Eigenschaften der DHP die Auswirkungen des oxidativen Stresses abschwächen (Mak, Weglicki, 1994; Bartels et al, 1999) und ebenfalls zur Verminderung der Atherosklerose beitragen.