

6 Zusammenfassung

Die meisten der vorhandenen Nachweismethoden für NO sind nicht sensitiv genug, um die am Gefäßendothel stattfindende permanente, basale NO-Bildung zu messen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein Verfahren entwickelt und etabliert, welches sensibel genug ist, die basale NO-Bildung zu erfassen.

Die kurze Halbwertszeit von NO führt nach der endothelialen Bildung direkt zu einer stöchiometrischen Umwandlung zu Nitrit und in einem weiteren oxidativen Schritt (stöchiometrisch) zu Nitrat, so dass in einem Inkubationsansatz Nitrit und Nitrat kumulieren können. Die Konzentration an freiem NO bleibt dabei praktisch unterhalb der Nachweisgrenze. Mittels Nitrat-Reduktase wird Nitrat zurückgeführt zu Nitrit, welches in einer sauren Jodid-Messlösung zu NO reduziert und elektrochemisch mit der ISO-NO-Elektrode gemessen wird. Aufgrund der Stöchiometrie der Reaktionen geht kein NO verloren, so dass eine kumulative Messung des gebildeten Nitrats/Nitrits auf die gebildete NO-Menge schließen lässt.

Es wurde gezeigt, dass diese Bestimmungsmethode im Vergleich zu anderen Methoden sensibel (Nachweisgrenze bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Nitrit) und robust ist. Störungen durch Proteine ($\leq 1 \text{ mg/ml}$) oder SH-Verbindungen ($\leq 1 \text{ mmol/l}$), wie z.B. beim Griess-Assay vorhanden, treten hier keine auf.

Als basale NO-Bildungsraten wurden für Schweinekoronarien 350 pmol/10 mg Gewebe/30 min und für porcine Aortenendothelzellen (PAEC) 186 pmol/ 3×10^5 Zellen/30 min ermittelt. Unter Einfluss des unspezifischen NO-Synthase(NOS)-Inhibitors N-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) kommt es zu einer signifikanten Hemmung der Nitrat/Nitrit-Bildung.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Calciumkanalmodulatoren vom Dihydropyridin-Typ (DHP) (Amlodipin, Bay K 8644, Bay O 5572, Bay W 9798, Nifedipin, Nisoldipin, Nitrendipin) erhöhen die basale Nitrat/Nitrit-Bildung aus dem Gefäßendothel. Amlodipin ist bereits in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ wirksam, während dies bei den anderen DHP erst bei 10-fach höherer Konzentration der Fall ist. Mit L-NMMA ist die Wirkung von Nifedipin (als Vertreter der DHP) hemmbar.

Unter Einfluss von Scherkräften wird die basale Nitrat/Nitrit-Freisetzung sowohl im nativen Gefäß als auch in der Endothelzellkultur 3-4-fach gesteigert. Diese Erhöhung ist mittels L-NMMA hemmbar.

Nifedipin steigert auch unter Scherstress die Nitrat/Nitrit-Freisetzung, wobei das Verhältnis von basaler Freisetzung zu stimulierter Freisetzung unabhängig vom Scherstress ist.

Die Effizienz der Messung von basaler NO-Bildung und NO-Bildung unter Scherstress sowie der Einsatz der Methode in unterschiedlichen biologischen Systemen (z.B. auch Messung von NO im Effluat von Langendorff-Herzen) machen die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode zu einer guten Alternative gegenüber den bisher genutzten Verfahren.