

Diplomarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
Magistra der Pharmazie
an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Karl-Franzens-Universität Graz

Einfluss von Enzym-Inhibitoren auf die Bioaktivierung von Nitroglycerin in Schweinekoronarien

vorgelegt von

Marielies Hofinger

O.Univ.-Prof. Dr. Bernhard-Michael Mayer
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Karl-Franzens-Universität Graz

Graz, November, 2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Mechanismus der NO-vermittelten Vasodilatation	5
1.2	Geschichtlicher Überblick	9
1.3	Bioaktivierung von Nitroglycerin.....	13
1.3.1	ALDH2	14
1.3.2	Cytochrom P450	14
1.3.3	Glutathion S-Transferase.....	15
1.3.4	Glutathion-Synthase	16
1.3.5	Xanthinoxidoreduktase.....	16
1.4	Nitrattoleranz - Tachyphylaxie.....	18
1.5	Ziele & Hypothesen	20
2	Methodik	21
2.1	Chemikalien	21
2.2	Puffer & Lösungen.....	23
2.3	Blutgefäße.....	26
2.3.1	Ratten Aorten	26
2.3.2	Rinder- & Schweinekoronarien	26
2.4	Organbad-Versuche	26
2.5	Statistische Analyse	27
2.6	Inhibitoren	28
2.6.1	CYP450 Inhibitoren.....	29
2.6.2	Glutathion S-Transferase Inhibitoren	30
2.6.3	Hemmstoff der Glutathionsynthese	31
2.6.4	Xanthinoxidoreduktase-Inhibitor	31
2.6.5	ALDH2	32
2.6.6	L-NNA/D-NNA	33
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Einfluss der Vorkontraktion.....	35
3.2	CYP450 Inhibitoren	36
3.3	GST Inhibitoren	38
3.4	Hemmstoff der Glutathionsynthese	40
3.5	Xanthinoxidoreduktase-Inhibitor	41

3.6	ALDH2.....	42
3.7	L-NNA/D-NNA	44
4	Diskussion	45
5	Zusammenfassung.....	49
6	Summary.....	50
7	Abkürzungen	51
8	Danksagung	53
9	Literaturverzeichnis	54

1 Einleitung

1.1 Mechanismus der NO-vermittelten Vasodilatation

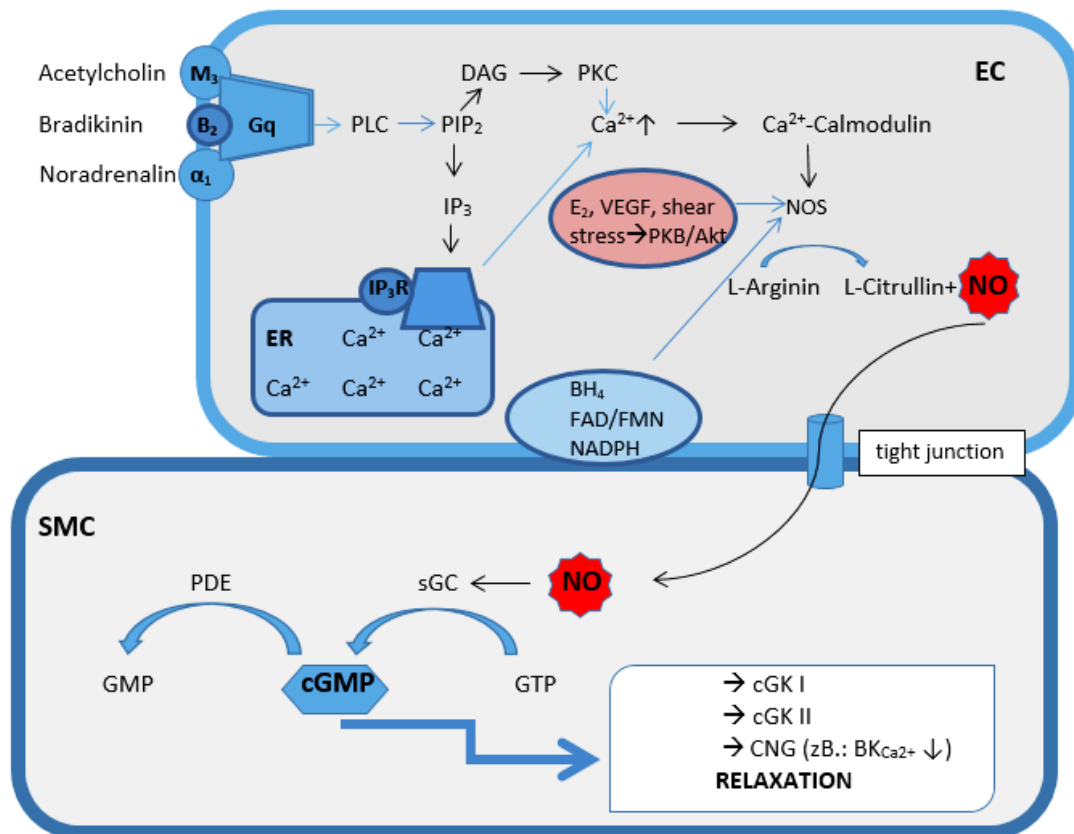


Abbildung 1 Schematische Darstellung der endogenen NO-Synthese und der NO-vermittelten Vasodilatation.

EC Endothelzelle, SMC glatte Muskelzelle, PLC Phospholipase C, PIP₂ Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, IP₃ Inositoltrisphosphat, ER Endoplasmatisches Retikulum, DAG Diacylglycerol, PKC Phosphokinase C, NOS NO-Synthase, E₂ 17β-Estradiol, VEGF vascular endothelial growth factor, PKB Phosphokinase B, BH₄ Tetrahydrobiopterin, sGC lösliche Guanylatcyclase, cGMP cyclisches Guanosinmonophosphat, PDE Phosphodiesterase, cGKI/II cGMP abhängige Proteinkinase, CNG cyclic nucleotide gated ion channels.

Als 1987 Ferid Murad und Louis Ignarro *EDRF* als NO identifizierten und gleichzeitig bestätigen konnten, dass NO einen direkten Einfluss auf den cGMP-Gehalt innerhalb einer Zelle hat, fiel der Startschuss zur Entmystifizierung der NO-Signaltransduktion.

Die NO-vermittelte Vasodilatation kann entweder durch einen hormonvermittelten Ca²⁺-Anstieg, oder Ca²⁺-unabhängig über eine Aktivierung der NOS durch die Akt-Kinase (PKB), induziert werden.

Binden Hormone wie Acetylcholin (M₃), Bradykinin (B₂), Noradrenalin (α₁, α₂) etc. (ATP-P_{2y}, Histamin-H₁, Endothelin-ET_B) an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, kommt es zu einer

Aktivierung der Phospholipase C (PLC), wodurch es zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat kommt (PI-Turnover), was wiederum zu den Produkten Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) führt.

Während IP₃ an den IP₃Rezeptor (IP₃R) bindet, aktiviert der Fettsäure-Ester DAG die Phosphokinase C (PKC). Beide Aktionen führen zu einer Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum.

Das nun frei verfügbare cytosolische Ca²⁺ bindet vermehrt an Calmodulin. Ca²⁺/CaM wiederum aktiviert die NO-Synthasen I&II mittels Elektronentransfer. [1]

Ca²⁺-unabhängig wird die humane eNOS durch Akt phosphoryliert und somit aktiviert. Bei Akt handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase (PKB), welche die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI₃-Kinase, katalysiert PIP₂→PIP₃, PIP₃ ist „Andockstelle“ für PKB/Akt) herunter regulieren kann. Die Akt reagiert auf mehrere Stimuli wie zum Beispiel 17β-Estradiol (E₂), welches die Phosphorylierung durch Akt am Serin 473 der eNOS initiiert. Daneben führt auch *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dazu, dass Akt die eNOS an Serin 1177 phosphoryliert. Letztere Phosphorylierung aktiviert die eNOS nicht nur, sondern erhöht auch die Effektivität der Aktivierung durch Ca²⁺/Calmodulin. [2]

Zusätzlich kann *shear stress* über einen PKA (Proteinkinase A)-vermittelten Mechanismus zu einer Phosphorylierung an eNOS-S¹¹⁷⁹ führen und diese somit aktivieren. [3]

Bei den NO-Synthasen handelt es sich um Homodimere, die hauptsächlich aus β sheets aufgebaut sind. Alle drei NOS-Typen weisen ähnliche katalytische Domänen auf. Grob lassen sich diese in eine N-terminale Oxygenase-Sequenz, eine CaM-Bindungsstelle und eine C-terminale Reduktase-Sequenz mit Cytochrom c Reduktase-Aktivität unterteilen. Die Oxygenase-Sequenz enthält sowohl eine Häm-bindendes Cystein (im Fall der eNOS: Cys 184), ein BH₄-bindendes Cystein und einen Arginin-bindenden Glutamatrest. Die Reduktase-Sequenz weist eine FMN-Domäne, eine FAD-Domäne sowie eine NADPH-Domäne auf.

Während die native NOS wie oben erwähnt als Homodimer auftritt, tritt das Enzym ohne gebundenes Häm als Monomer auf und besitzt keine NOS-Aktivität. Damit Häm aber binden kann, muss es sich im „*high-spin state*“ befinden. Dies trifft auch auf das Enzym-Substrat L-Arginin zu. Diese Gemeinsamkeit und die genaue Position der Bindungsstellen lassen schlussfolgern, dass für die endogene NO-Bildung eine räumliche Annäherung des Substrates und einiger Co -Faktoren nötig ist. [1]

Die aktivierte NOS oxidiert L-Arginin über das Intermediat N^G-Hydroxy-L-Arginin zu L-Citrullin und NO.

Die Diffusion von NO aus der Endothelzelle in die glatte Muskelzelle findet an *myoendothelial junctions* und *gap junctions* statt. Nur wenn die dort befindliche Cytochrom-b5-Reduktase-3 in inaktiver Form vorliegt und somit keinen Komplex mit Hämoglobin α formen kann, ist eine Diffusion von NO möglich. [4]

Das nun in der glatten Muskelzelle befindliche NO stimuliert Guanylatcyclasen. Die hier befindliche lösliche Guanylatcyclase tritt als cytosolisches heterodimeres Protein mit ca. 150 kDa [5] auf, welches sich aus 2 Untereinheiten (α , β) zusammensetzt und zusätzlich Häm und Kupfer enthält. [6]

Das Protein besteht aus zwei N-terminale H-NOX Domänen (heme-nitric oxide/oxygen binding domain), von denen eine ein Häm enthält, zwei PAS (Per-ARNT-Sim) Domänen, einer coiled-coiled-Struktur und zwei C-terminale Cyclase-Domänen.

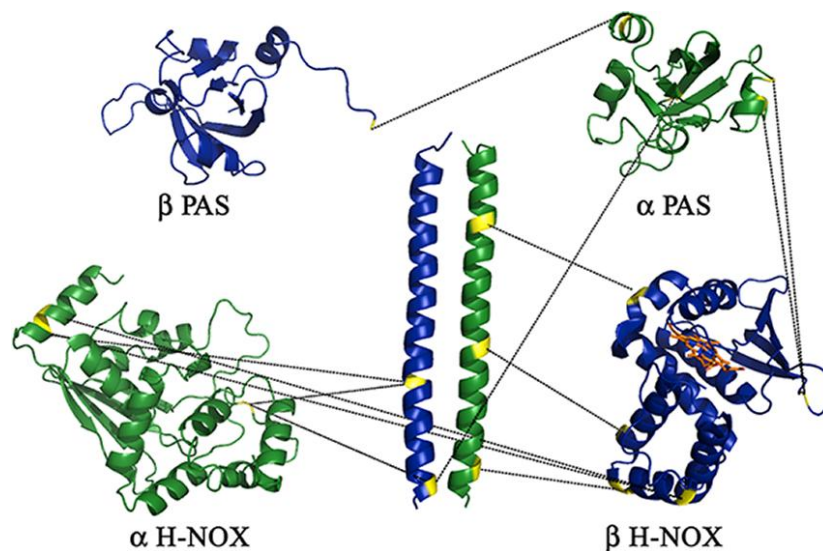


Abbildung 2 Wichtige Strukturbestandteile der löslichen Guanylatcyclase [5]

Kommt es zu einer Bindung von NO, CO oder YC-1 an das eisenhaltige Häm der H-NOX Domäne, so wird die Cyclase-Aktivität allosterisch stimuliert. [5]

Die Anwesenheit von Thiolen wie Cystein und Glutathion ist zusätzlich erforderlich, da zwei Cysteinreste nahe dem katalytischen Zentrum in reduzierter Form vorliegen müssen um eine Aktivierung der Cyclase zu ermöglichen. Diese Thiole sind in der Lage NO kurzfristig zu speichern, indem sie mit diesem S-Nitrosothiole bilden. [7]

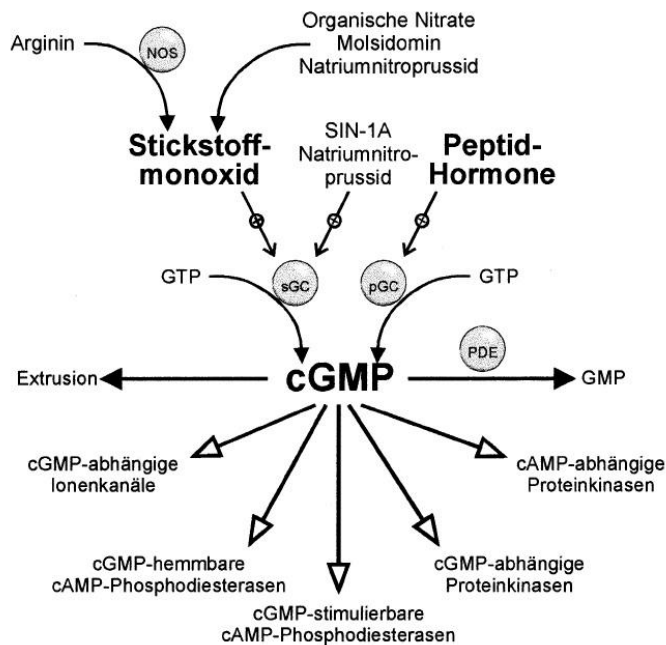


Abbildung 3 Übersicht cGMP-vermittelter Effekte [6]

Die aktivierte lösliche Guanylatcyclase katalysiert die Umwandlung von Guanosin triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). cGMP aktiviert cGK I (PKG), eine cGMP-abhängige Proteinkinase, was einerseits zu einer Senkung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in der glatten Muskelzelle führt und andererseits eine Relaxation hervorruft, indem kontraktile Elemente gegenüber Ca^{2+} desensibilisiert werden.

- ➔ Senkung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels:
- cGK I induziert eine Phosphorylierung von IRAG (ein IP_3R -assoziiertes cGK-Substrat), wodurch es zu einer Hemmung der IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum kommt.
 - cGK I phosphoryliert Ca^{2+} abhängige K^+ -Kanäle (BK_{Ca}), was deren Öffnungswahrscheinlichkeit herabsetzt und so zu einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Kanäle führt. Es kommt somit zur Hyperpolarisation der Zellmembran der glatten Muskelzelle.
 - cGK I aktiviert die SR-Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und fördert somit die Wiederaufnahme von Ca^{2+} .

- Desensibilisierung der kontraktile Elemente gegenüber Ca^{2+}
- a) cGK I aktiviert MLCP
 - b) cGK I hemmt RhoA/Rho-Kinase-abhängige Signale, die eine Kontraktion hervorrufen würden.
 - c) a)+b) führen wiederum zur Dephosphorylierung von MLC [8]

1.2 Geschichtlicher Überblick

Seit über 100 Jahren beschäftigt das Mysterium über NO und die Bioaktivierung organischer Nitrate Wissenschaftler rund um die Welt. Hypothesen werden aufgestellt und mehr oder weniger schnell wieder verworfen, um sie anschließend wieder neu aufzugreifen. Dieser Kreislauf wurde nur selten von „neuen“ Ideen unterbrochen, welche jedoch meistens aufgrund ihrer begrenzten Anwendbarkeit rasch wieder von ihren altbekannten Vorgängern ersetzt wurden. Der folgende geschichtliche Überblick, soll veranschaulichen wie komplex und teilweise voller Ironie sich die Forschung rund um ein vergleichsweise simples Molekül entwickeln kann.

- 1847 Der italienische Chemiker Ascanio Sobrero synthetisierte erstmals Nitroglycerin, und beobachtete starke Kopfschmerzen, welche bereits nach kurz nach der Einnahme auftraten.
- 1849 Constantin Hering setzt Nitroglycerin in homöopathischen Mengen gegen Kopfschmerz ein.
- 1851 Alfred Nobel erforscht Nitroglycerin und startet die industrielle Herstellung dieses Stoffes, während der die Arbeiter unter der sogenannte „Monday Disease“ litten. Ironischerweise erkrankte er in seinen letzten Jahren selbst an einer Form der Angina und erhielt daraufhin eine Nitrat-Therapie.
- 1867 Lauder Brunton verwendete erstmals Amyl-Nitrat gegen Angina, während er von den Konsequenzen einer wiederholten Nitratgabe wusste.
- 1876 William Murrell setzte erstmals Nitroglycerin gegen Angina ein, obwohl die Britische Pharmakopö GTN als Mittel zur Behandlung von Hypertonie nennt. [9]
- 1888 “Remarkable tolerance to nitroglycerin”, Stewart [10]
- 1965 “The biotransformation of nitroglycerin” [11]
- 1970 “Failure to demonstrate monoamine oxidase inhibition by glyceryl trinitrate in vivo [12]
- 1972 “Biotransformation of nitroglycerin by organic nitrate reductase” [13]

- 1977 Ferid Murad identifizierte NO als wirksame Komponente von GTN und dessen Fähigkeit Gefäße zu erweitern. [9]
- 1980 Robert Furchgott und John Zawadzki entdecken den "endothelium-derived relaxing factor". [14]
- "Inhibition of platelet function by organic nitrate vasodilators" [15]
- 1984 "Biotransformation of glyceryl trinitrate to glyceryl dinitrate by human_hemoglobin" [16]
- 1985 "Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in rabbit aorta" [17]
- "Role of hemoglobin in the differential biotransformation of glyceryl trinitrate and isosorbide dinitrate by human erythrocytes" [18]
- 1986 "Requirement for reduced, unliganded hemoprotein for the hemoglobin- and myoglobin-mediated biotransformation of glyceryl trinitrate" [19]
- 1987 Louis Ignarro und Ferid Murad identifizierten EDRF als NO. [9]
- 1989 "Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: Involvement of cytochrome P-450" [20]
- 1990 "Influence of vessel size on the sensitivity of porcine coronary microvessels to nitroglycerin" [21]
- "Cytochrome P-450 mediated bitransformation of organic nitrates" [22]
- 1991 "Interactions between nitroglycerin and thiol groups" [23]
- "Nitroglycerin relaxes coronary artery of the pig with no change in glutathione content or glutathione S-transferase activity" [24]
- 1992 "Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate" [25]
- "Conversion of nitroglycerin to nitric oxide in microsomes of the bovine coronary artery smooth muscle is not primarily mediated by glutathione-S-transferases" [26]
- "Effects of sulfobromophthalein and ethacrynic acid on glyceryl trinitrate relaxation" [27]
- "Cytochrome P-450 mediates bioactivation of organic nitrates" [28]
- 1993 "Lack of evidence for the involvement of cytochrome P-450 or other hemoproteins in metabolic activation of glyceryl trinitrate in rabbit aorta" [29]
- "Effect of inhibitors of glutathione S-transferase on glyceryl trinitrate activity in isolated rat aorta" [30]
- 1994 "Inhibition of the biotransformation of glyceryl trinitrate by the flavoprotein inhibitor, diphenyleneiodonium sulfate" [31]

- “Interaction between nitroglycerin and sulfhydryl-donating compounds in coronary microvessels” [32]
- “Effect of dexamethasone treatment on the biotransformation of glyceryl trinitrate: Cytochrome P450 3A1 mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate” [33]
- 1995 “Bioactivation of nitroglycerin in vascular smooth muscle cells is different from that in non-vascular tissue” [34]
- “Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance” [35]
- “Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries” [36]
- 1996 “Evaluation of nitric oxide formation from nitrates in pig coronary arteries” [37]
“These results indicate that in pig coronary arteries, nitrates release NO mostly through a nonenzymatic manner, although there is a slight amount of enzymatically produced NO, and glutathione S-transferase may not contribute to the enzymatic NO formation”
- “Superoxide does not inhibit glyceryl trinitrate –rabbit aortic strip-mediated relaxation of rabbit Taenia coli: Evidence against a role for nitric oxide itself as the smooth muscle active drug metabolite?” [38]
- “Isoform-specific biotransformation of glyceryl trinitrate by rat aortic glutathione S-transferase” [39]
- 1997 “Investigation of aortic CYP3A bioactivation of nitroglycerin in vivo” [40]
- “Thiol agents potentiate glyceryl trinitrate mediated relaxation of rabbit taenia coli: Evidence for thiol-dependent biotransformation“ [41]
- “Investigation of role for oxidant stress in vascular tolerance development to glyceryl trinitrate in vitro” [42]
- 1998 “Vitamin C attenuates nitrate tolerance independently of its antioxidant effect” [43]
- “Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate” [44]
- “Reaction of organic nitrate esters and S-nitrosothiols with reduced flavins: A possible mechanism of bioactivation” [45]
- 2002 Chen identifiziert ALDH2 als Hauptenzym der GTN-Bioaktivierung.
 “Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation” [46]
- “Dexamethasone inhibits the inducible bioconversion of glyceryl trinitrate to nitric oxide” [47]
- “Effects of glutathione S-transferase inhibitors on nitroglycerin action in pig isolated coronary arteries” [48]

- 2003 "Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin?" [49]
- 2004 "Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin-induced vasodilation of coronary and systemic vessels: An intact canine model" [50]
- 2005 "Contribution of aldehyde dehydrogenase to mitochondrial bioactivation of nitroglycerin: Evidence for the activation of purified guanylate cyclase through direct formation of nitric oxide" [51]
- 2006 "Biotransformation of glyceryl trinitrate by rat hepatic microsomal glutathione S-transferase1" [52]
- 2007 "Increased superoxide production in nitrate tolerance is associated with NAD(P)H oxidase and aldehyde dehydrogenase 2 downregulation" [53]
- "Cytochrome P450 is responsible for nitric oxide generation from NO-aspirin and other organic nitrates" [54]
- "Bioactivation of nitroglycerin by ascorbate" [55]
- 2008 "Bioactivation of nitroglycerin by purified mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenase" [56]
- 2009 "Mitochondrial nitrite reduction coupled to soluble guanylate cyclase activation: Lack of evidence for a role in the bioactivation of nitroglycerin" [57]
- "Comparing the role of glutathione-S-transferase and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation and the correlation with calcitonin receptor-related peptide" [58]
- 2012 "Vascular bioactivation of nitroglycerin is catalyzed by cytosolic aldehyde dehydrogenase-2" [59]
- 2013 "Potent inhibition of aldehyde dehydrogenase-2 by diphenyliodonium: Focus on nitroglycerin bioactivation" [60]
- "Catalysis of nitrite generation from nitroglycerin by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)" [61]
- "In vitro organic nitrate bioactivation to nitric oxide by recombinant aldehyde dehydrogenase 3A1" [62]
- 2014 "Aldehyde dehydrogenase-independent bioactivation of nitroglycerin in porcine and bovine blood vessels" [63]

1.3 Bioaktivierung von Nitroglycerin

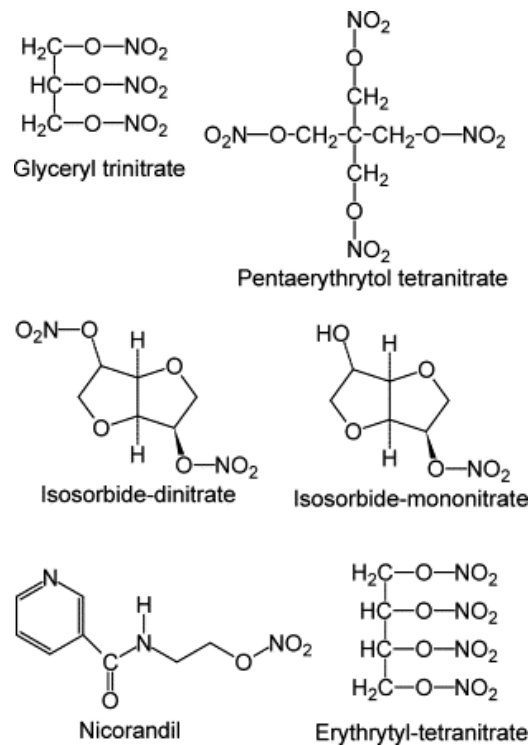


Abbildung 4 Chemische Strukturen klinisch relevanter organischer Nitrate [64]

Organische Nitrate sind Ester der Salpetersäure (-C-O-NO₂), die entweder vollständig nitriert und lipophil oder nur teilweise nitriert und somit hydrophil sind [64]. Außerdem lassen sie sich in hochpotente (3-4 Nitrat-Reste) und niederpotente (1-2 Nitrat-Reste) Gruppen unterteilen [65].

Therapeutisch wirksam ist aber nicht das organische Nitrat an sich sondern das nach Bioaktivierung entstehende NO. Stoffe wie Nitroprussid-Natrium (SNP) oder Diethylamin NONOate (DEA/NO) setzen NO nicht-enzymatisch frei.

Nach dieser endothelunabhängigen [66] Bioaktivierung ist das so entstandene NO auf die gleiche Weise wirksam wie endogenes. Es führt zu einer potenten Dilatation von großen Gefäßen (>200 µm im Durchmesser, z.B.: Koronarien, Venöse Kapazitätsgefäße) und einer leichten Dilatation von kleineren Gefäßen (<100 µm Durchmesser) [32]. Diese Gefäßspezifität ist aber auch von der Konzentration des applizierten Nitrates abhängig. So werden bei niedrigeren (therapeutischen Konzentrationen) hauptsächlich Venen und Arterien dilatiert und erst ab höheren Konzentrationen kommt es zu einer Erweiterung der Arteriolen [66]. Die Vasodilatation führt nun zu erhöhtem Koronardurchfluss, gesenkter Wandspannung, Vorlast [66] und Nachlast [64]. Die Summe dieser Wirkungen führt

schlussendlich zu einer Wiederherstellung der Balance zwischen kardialen Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffangebot.

Dieser antiischämische Effekt bestimmt das Einsatzgebiet therapeutisch wirksamer Nitrate: kardiovaskuläre Erkrankungen, stabile und instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz [67].

1.3.1 ALDH2

2002 postulierten Chen et al [46], dass die Bioaktivierung von Nitroglycerin durch die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase-2 (ALDH2) katalysiert wird. Später zeigte sich, dass die ALDH2 zwar an der Bioaktivierung von GTN beteiligt ist, das Enzym vaskulär aber hauptsächlich cytosolisch exprimiert wird [59].

Untermauert wurde die ALDH2-Hypothese durch Organbad-Studien. Diese führten zu dem Ergebnis, dass die biphasische GTN-Relaxation in Nagetieren sowohl durch Zugabe des klassischen ALDH2-Substrates Acetaldehyd [46], wie auch durch die Zugabe von ALDH2-Inhibitoren wie Cyanamid [46] oder DPI [60] gehemmt wird. Außerdem wurde beobachtet, dass in GTN-toleranten Gefäßen eine Hemmung durch DPI ohne Effekt bleibt [60].

Organbad-Studien mit Schweine- und Rinderkoronarien [68], zeigten bei Zugabe von DPI keine Hemmung des NO-Effekts. Bei Zugabe höherer DPI-Konzentrationen (1-3 μM) wurde sogar eine Potenzierung der NO-vermittelten Relaxation beobachtet. Versuche von Neubauer et al [63] ergaben, dass ALDH2 in Blutgefäßen von Schweinen und Rindern bei weitem geringer exprimiert wird als in Nagern. Die Bioaktivierung von Nitroglycerin in Schweine- und Rinderkoronarien scheint somit nicht ALDH2-abhängig zu sein.

1.3.2 Cytochrom P450

Bei den Enzymen der Cytochrom P450-Familie handelt es sich um membransassoziierte Monooxygenasen, welche an einer Vielzahl von Metabolismen beteiligt sind. [69]

1989 untersuchten Servent et al erstmals die CYP450-abhängige Denitrierung von GTN in den Lebermikrosomen der Ratte [70]. Mc Donald und Bennett identifizierten daraufhin CYP-3A und CYP-2C11 als Schlüsselenzyme der GTN-Biotransformation in Ratten indem sie spezifische Cytochrom P450-Inhibitoren (Proadifen, Cimetidin [71], 7-Ethoxyresorufin [72])

auf Zell-Ebene [73] und in Organbad-Versuchen [72] testeten [33]. Yuan et al bestätigten Bennett, da sie in Ratten auch *in vivo* eine Senkung des GTN-induzierten cGMP-Levels, nach Behandlung mit Ketoconazol, einem CYP3A-Inhibitor, nachweisen konnte [40].

Weitere Versuche an Ratten ergaben, dass CYP1A2 die Denitrierung von ISDN katalysiert, und ein Zusammenhang zwischen Nitratoleranz und verminderter CYP450-Expression bzw. -Aktivität besteht [74]. In anderen Spezies wie Hase [29], Rind oder Schwein [34] scheinen jedoch andere Enzyme für die Bioaktivierung von GTN und anderen organischen Nitraten [75] verantwortlich zu sein.

Versuche an humanen Zellen zeigten, dass die NO-Freisetzung von ISDN vor allem durch CYP3A4 und, in geringerem Ausmaß, von CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP1A2 und CYP4A11 abhängig ist [76].

1.3.3 Glutathion S-Transferase

Bei den Glutathion S-Transferasen handelt es sich um eine ubiquitär exprissionierte Enzymfamilie. Sie katalysieren die Konjugation von reduziertem Glutathion mit den elektrophilen Zentren endogener und exogener Stoffe [77].

1989 veröffentlichten Lau und Benet [78] ihre Forschungsergebnisse bezüglich einer Involvierung der Glutathion S-Transferasen in die Bioaktivierung von GTN. Spätere Versuche an Hasen-Leber [79] und Rinderkoronarien [80] stützten ihre Hypothese. Auch Organbad-Studien in denen GST-Inhibitoren wie Bromosulphophthalein und Etacrynsäure an Hasenaorten getestet wurden zeigten eine Hemmung der GTN-vermittelten Vasodilatation [27]. Kenkare und Benet stellten zudem fest, dass in Aorten von GTN-toleranten Hasen die Aktivität der mu-GST signifikant erniedrigt ist. [81].

Laut Tsuchida et al ist die GTN Bioaktivierung in humanen Aorten und Herzen vor allem von der mu-GST abhängig [82]. Diese Hypothese wurde jedoch durch eine klinische Studie, in der mu-GST-Polymorphismen und deren Auswirkung auf GTN-assoziierte Effekte untersucht wurden, widerlegt [83].

Eine weitere Hypothese beschreibt, dass GTN in Anwesenheit von GST hauptsächlich zur Bildung von NO_2^- führt. Wird zusätzlich ein GST-Inhibitor verabreicht, so sinkt zwar der NO_2^- -Level, die Menge an freigesetztem NO wird jedoch nicht beeinflusst. Kurz et al schließen aus diesen Daten, dass zwischen GST-Aktivität und NO kein Zusammenhang besteht, die GST aber am Abbau von GTN beteiligt ist [84].

1.3.4 Glutathion-Synthase

Glutathion (GSH) selbst, und als Cofaktor von Enzymen wie Glutathionperoxidase oder Glutathion S-Transferase schützt den menschlichen Körper gegen Oxidantien, Xenobiotika und andere cytotoxischen Einflüssen. [85]

Wie bereits erwähnt, wirken organische Nitrate auf Gefäße unterschiedlicher Durchmesser unterschiedlich stark. So werden Koronarien mit einem Durchmesser von <100 µm durch GTN kaum erweitert. Durch eine Zugabe von Glutathion-Quellen (z.B.: L-Cystein oder N-Acetylcystein) wird die gefäßerweiternde Wirkung der Nitrate jedoch signifikant verstärkt. Unter Einfluss eines Glutathion-Synthase-Inhibitors wie Buthioninsulfoximin (BSO) kommt es zu einer Aufhebung dieses Effektes. Vasodilatierende Effekte von SNP werden von BSO jedoch nicht beeinflusst. [32]

Man beobachtete außerdem, dass es bei BSO-behandelten Ratten zu einer Hyperrelaxation durch GTN kommt. Dieser Effekt ist von der Anwesenheit des Endothels und der eNOS-Aktivität abhängig. In den behandelten Rattenaorten konnte eine erhöhte Proteinexpression der eNOS, SOD1 und SOD2 gemessen werden. Trotz gesteigerter eNOS-Levels, sank aber der Plasma NO_x-Gehalt, was auf eine Entkopplung der eNOS hindeutet. [86]

1.3.5 Xanthinoxidoreduktase

Die Xanthinoxidoreduktase ist ein homodimeres Metalloenzym, welches eine Schlüsselrolle im Purin-Stoffwechsel spielt. Im humanen Organismus sind zwei Isoenzyme der XOR vertreten. Einerseits die an extrazelluläre Membranen gebundene Xanthinoxidase und andererseits die intrazellulär vorkommende Xanthindehydrogenase. Während die XOR im Rahmen des Purin-Stoffwechsels Hyperxanthin zu Xanthin und zu Harnsäure oxidiert, reduziert sie im vaskulären System Nitrit zu NO und Sauerstoff zu ROS (zB. Wasserstoffperoxid, Superoxid, etc.).

Anorganisches Nitrit gilt als die größte Quelle von Stickstoffmonoxid. Etwa 30% davon werden über die Nahrung aufgenommen, während Hauptteil durch die Oxidation von endogen produzierten NO entsteht [87]. Zirkulierendes Nitrit und Nitrat kann bei Bedarf durch Azidifikation, Häm-assoziierte Globuline oder verschiedene Enzyme (mitochondriale Enzyme, Molybden-Metalloenzyme, Cytochrom P450) wieder zu NO reduziert werden. Bedarf besteht dann, wenn es im menschlichen Organismus zu einem Abfall des Sauerstoffgehalts (endotheliale Dysfunktion, Myokardinfarkt, etc.) und/oder des pH-Wertes

(Ischämie, Fasten) kommt. Ist dies der Fall, kommt es neben einer Steigerung der XOR-Expression und -Aktivität auch zu einer vermehrten Freisetzung des Enzyms aus den Endothelzellen [87] [88]. Die XOR-abhängige NO-Bildung ist somit von pH-Wert, Nitrit- und Sauerstoffkonzentration abhängig. [89]

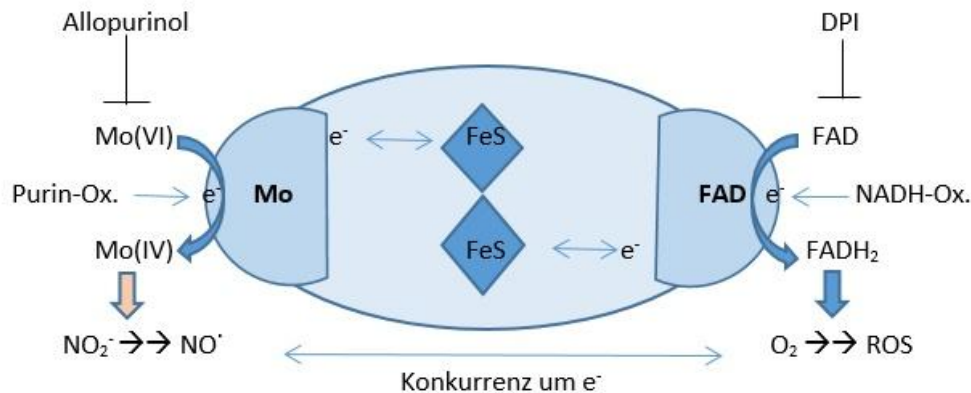


Abbildung 5 Aufbau der Xanthinoxidoreduktase. Im Zentrum des Enzyms befinden sich zwei Eisen-Schwefel-Cluster, die von einer Molybden-bindenden Seite und einer FAD-bindenden Seite umgeben sind. Die Oxidation von Purinen und NADH liefert die nötigen Elektronen um die jeweiligen Seiten zu reduzieren.

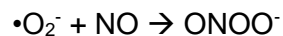
Die Relevanz des Sauerstoffgehaltes erklärt sich durch strukturellen Aufbau der XOR. Während die Molybden-Seite Nitritreduktase-Aktivität besitzt, katalysiert die FAD-Seite die Reduktion von Sauerstoff zu ROS. Für beide Reaktionen ist die Anwesenheit freier Elektronen essentiell, was zu einer Konkurrenz zwischen Nitrit und Sauerstoff um führt. Experimente an Ratten [87]- und humanen [89] Myokardhomogenaten zeigten, dass bei anaeroben Bedingungen ca. 560 pM/s NO aus Nitrit stammen (unter normalen Bedingungen produzieren NOS ca. 1000 pM/s). Blockiert man die Mo-Seite durch Inhibitoren wie Allopurinol, so sinkt die NO-Ausbeute pH-abhängig um 50% [89]. Hemmt man aber mit DPI die FAD-Seite, so steigt auch in Anwesenheit von Sauerstoff der NO-Gehalt [90] und es werden ca. 70% der anaeroben NO-Produktion erreicht [91].

Ob die XOR unter physiologischen Bedingungen eine Rolle in der Bioaktivierung organischer Nitrate spielt ist fraglich, jedoch aufgrund des geringen Sauerstoffgehalts in Koronargefäßen (<5% [92]) nicht gänzlich auszuschließen. Millar et al [93] stellte zwar die Hypothese auf, dass GTN durch XOR direkt zu Nitrit reduziert wird, an Rattenaorten konnte aber kein signifikanter Effekt von Allopurinol auf die GTN- oder SNP-vermittelte Relaxation beobachtet werden [94].

1.4 Nitrattoleranz - Tachyphylaxie

Das Phänomen der Nitrattoleranz ist bereits seit dem letzten Jahrhundert („*Monday Disease*“) und somit fast so lange wie die therapeutischen Eigenschaften von Nitroglycerin bekannt. Allgemein versteht man unter Nitrattoleranz den raschen Wirkungsverlust von NO-Pharmaka nach mehrmaliger Applikation (1-3 Tage) [95]. Außerdem kommt es während der Nitrattoleranz zu einer verminderten Bioaktivierung organischer Nitrate [66]. Die Toleranzentwicklung beschränkt den therapeutischen Einsatz von Nitraten immens.

Im Fokus der Nitrattoleranz steht Peroxynitrit (ROS=*Reactive oxygen species*), welches aus Superoxid und NO entsteht.



ROS führen zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO, hemmen die lösliche Guanylatcyclase und PKG, und inaktivieren in die Bioaktivierung involvierte Enzyme, wie die mtALDH [95].

Um die eigentliche Nitrattoleranz besser von deren Nebeneffekten unterscheiden zu können, kam es im Laufe der Zeit zu einer Aufteilung der beobachteten Symptome in verschiedene Gruppen

a) „*pseudo tolerance*“

Durch sinken des Blutdrucks kommt es zur Stimulation von Barorezeptoren, was zu einer vermehrten Ausschüttung neurohormonaler Vasokonstriktoren (Katecholamine, Vasopressin, Renin, Aldosteron, etc.) führt [10]. Warum dieser Effekt nur bei NO-Pharmaka und nicht bei anderen Vasodilatoren auftritt, bzw. warum PETN keine solche Gegenregulation hervorruft, ist nicht bekannt.

b) „*vascular tolerance*“

Bei der „*vascular tolerance*“ kommt es zu einer erhöhten Sensitivität von Rezeptoren gegenüber Vasokonstriktoren. Laut Münzel et al kommt es während der Nitrattoleranz zu einer vermehrten ROS-Produktion woraufhin oxidativer Stress die ET-1-Expression anregt. Diese „Hyperkontraktile Antwort“ kann durch ACE-Hemmer und PKC-Hemmer abgeschwächt werden [10].

c) „cross-tolerance“ - Endotheliale Dysfunktion

Lande et al [96] erklären die *cross-tolerance* durch den Anstieg des Superoxid-Levels. Als Superoxid-Quellen kann unter anderem die NADH/NADPH-Oxidase dienen. Durch Superoxid wird GTN über den stabilen Metaboliten Nitrotyrosin zu Peroxynitrit. Peroxynitrit oxidiert den eNOS-Co-Faktor BH₄ über BH₃ zu BH₂, was wiederum zu einer Fehlfunktion der Synthase führt. Die „falsch“ funktionierende Synthase ist zwar noch in der Lage einen Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff zu vollziehen, kann die L-Arginin Reaktion aber nicht mehr katalysieren. Die NOS gilt jetzt als entkoppelt und produziert selbstständig Superoxid statt NO, was zu einem erheblichen Anstieg von oxidativem Stress führt.

d) „rebound effect“

Ein vermehrtes Auftreten ischämischer Ereignisse in Nitrat-freien Intervallen. Die Ursache des „rebound effects“ ist noch nicht geklärt [97].

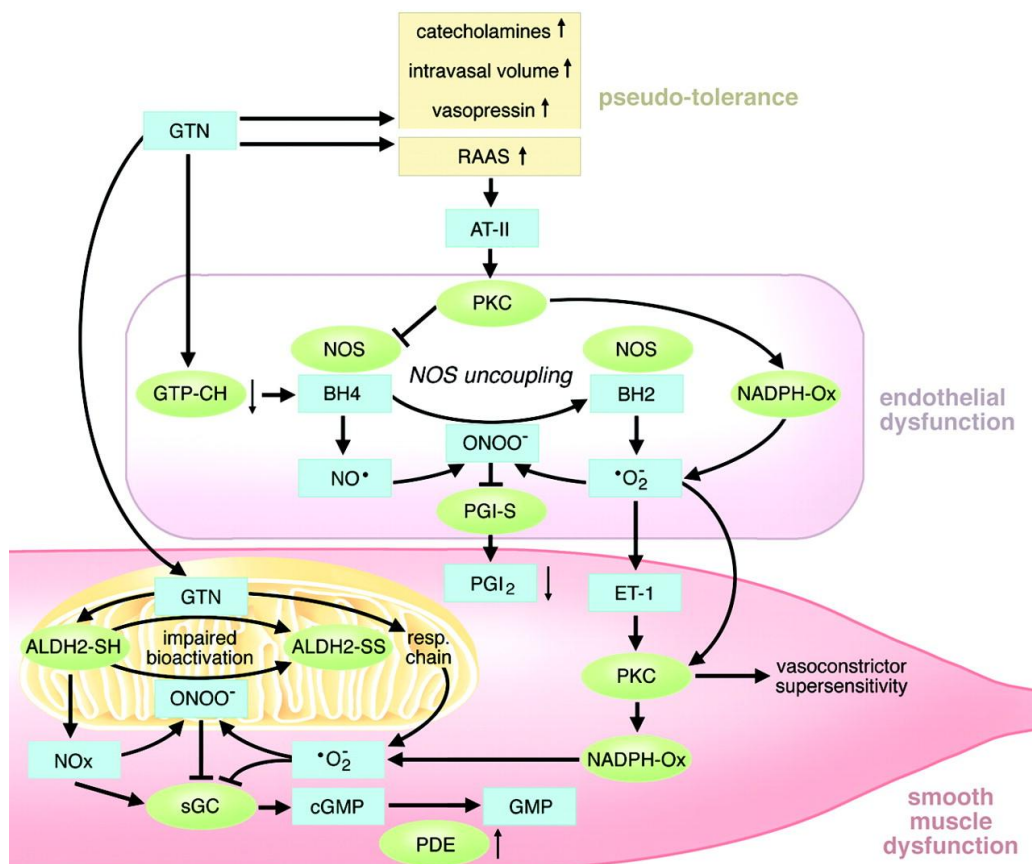


Abbildung 6 Schema über den möglichen Hintergrund der Toleranzentwicklung [10]
 RAAS Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, AT-II Angiotensin II, PKC Phosphokinase C, BH₂ Biopterin, BH₄ Tetrahydrobiopterin, PGI-S Prostaglandin Synthase, PGI Prostaglandin I₂, ET-1 Endothelin, GTP-CH GTP-Cyclohydrolase

Die Umgehung der Toleranz, bzw. ein Entgegenwirken, ist durch Änderung der Applikationsart (z.B.: TTS), Medikamente (ACE-Hemmer, PKC-Hemmer, Ascorbinsäure [10]) und durch die Anwendung anderer organischer Nitrate statt GTN (z.B.: PETN) möglich.

1.5 Ziele & Hypothesen

Aufklärung, der an der Bioaktivierung von Nitroglycerin beteiligten Enzyme. Nach ausgiebiger Literaturrecherche wurden Inhibitoren der in Frage kommenden Enzyme mittels Organbad-Studien getestet.

2 Methodik

2.1 Chemikalien

Name	Hersteller/Lieferant	Information
Nitroglycerin (Nitro POHL ampules®)	G.Pohl-Boskamp GmbH & CO, Hohenlockstedt Germany	4.4mM GTN-Lösung (250mM Glukose) in Ampullen.
DEA NONOate (2-(N,N-diethylamino)diazenolate-2-oxide)diethylamonium salt)	Enzo Life Sciences	
ISDN (Isosorbide 2,5-dinitrate)		80%/20% Lactose/ISDN-Mischung
L-NNA (Nω-Nitro-L-arginine)	Sigma-Aldrich	Irreversibler NOS Inhibitor ¹
D-NNA (Nω-Nitro-D-arginine)	Enzo Life Sciences	
DPI (Diphenyleneiodonium chloride)	Sigma-Aldrich	
Chloralhydrat (Trichloroacetaldehyde hydrate)	Sigma-Aldrich	
U-46619 (9,11-Dideoxy-11α,9α-epoxymethanprostaglandin F _{2α})	Sigma-Aldrich	Thromboxan-Rezeptor Agonist ¹
Resorufin (7-Ethoxy-3H-phenoxazin-3-one)	Sigma-Aldrich	Cytochrom P450-Substrat und Inhibitor (CYP 1A Isoformen). Kann nNOS nicht-kompetitiv hemmen und entkoppeln ²
Etacrynsäure (2,3-Dichloro-4-[2-methylenebutyryl]phenoxy) acetic acid)	Sigma-Aldrich	
Bromosulfophthalein (Sulfobromophthalein sodium salt)	Sigma-Aldrich	GST-Inhibitor ¹
Buthioninsulfoximin (DL-Buthionine-(S,R)-Sulfoximine)	Sigma-Aldrich	Hemmstoff der Glutathion-Synthase ²
Ketoconazol (Ketoconazole)	Sigma-Aldrich	Hemmstoff von Cyotchrom P450 (CYP17A1, CYP 3A4, CYP 3A5), Thromboxan-Synthase und 5-Lipoxygenase ²
Proadifen (α-Phenyl-α-	HCl Sigma-Aldrich	SKF-525A, Inhibitor der nNOS und Cytochrom

propylbenzeneaceticacid 2-[diethylamino]ethylester.HCl)		P450 ²
2,4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	Sigma-Aldrich	GST-Substrat
Allopurinol (4-Hydroxypyrazolo(3,4-d)pyrimidine)	Sigma-Aldrich	XOR-Hemmstoff

...¹Sigma-Aldrich Data Sheet

...²Santa Cruz Biotechnology Produkt Block Information

2.2 Puffer & Lösungen

Krebs-Henseleit-Puffer

Die drei Lösungen (20-fach Stock) wurden separat bei 4°C gelagert und erst vor Gebrauch gemischt. Anschließend wurden Glukose und Natriumhydrogencarbonat zugefügt und mit destillierten Wasser auf 1L verdünnt.

Lösung I		Endkonzentration
<i>NaCl</i>	138,4 g/L	118,4 mM
<i>KCl</i>	7,46 g/L	5,01 mM
<i>KH₂PO₄</i>	3,24 g/L	1,20 mM
Lösung II		
<i>CaCl₂</i>	7,35 g/L	2,5 mM
Lösung III		
<i>MgCl₂</i>	4,88 g/L	1,2 mM
Feststoffe		
<i>D(+)-Glukose-Monohydrat</i>	2,0 g/L	10 mM
<i>NaHCO₃</i>	2,1 g/L	25 mM

Depolarisations-Puffer 100mM K⁺

Die Feststoffe wurden in 1L destilliertem Wasser gelöst und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde Glukose frisch zugefügt.

Feststoffe		Endkonzentration
<i>NaCl</i>	1,37 g/L	23,4 mM
<i>KCl</i>	7,5 g/L	100 m
<i>KH₂PO₄</i>	0,16 g/L	1,2 mM
<i>CaCl₂</i>	0,37 g/L	2,5 mM
<i>MgCl₂</i>	0,24 g/L	1,2 mM
<i>NaHCO₃</i>	2,1 g/L	25 mM
<i>D(+)-Glukose-Monohydrat</i>	2,0 g/L	10 mM

GTN

Stamm-Lösung: 4,4 mM

Verdünnt in Krebs-Henseleit-Puffer

Bad-Volumen: 5 ml

<i>M [mol/L]</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
10^{-10}	0,1 nM	50 nM	10 μ L
$3 \cdot 10^{-10}$	0,3 nM		20 μ L
10^{-9}	1 nM	500 nM	7 μ L
$3 \cdot 10^{-9}$	3 nM		20 μ L
10^{-8}	10 nM	5 μ M	7 μ L
$3 \cdot 10^{-8}$	30 nM		20 μ L
10^{-7}	100 nM	50 μ M	7 μ L
$3 \cdot 10^{-7}$	300 nM		20 μ L
10^{-6}	1 μ M	500 μ M	7 μ L
$3 \cdot 10^{-6}$	3 μ M		20 μ L
10^{-5}	10 μ M	4,4 mM	8 μ L
$3 \cdot 10^{-5}$	30 μ M		22,7 μ L
10^{-4}	100 μ M		80 μ L
$3 \cdot 10^{-4}$	300 μ M		227 μ L

DEA/NO

Stamm-Lösung: 10 mM

Verdünnt in 10 mM NaOH

Bad-Volumen: 5 ml

<i>M [mol/L]</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
10^{-10}	0,1 nM (BCA)	50 nM	10 μ L
$3 \cdot 10^{-10}$	0,3nM (BCA)		20 μ L
10^{-9}	1 nM	500 nM	7 μ L
$3 \cdot 10^{-9}$	3 nM		20 μ L
10^{-8}	10 nM	5 μ M	7 μ L
$3 \cdot 10^{-8}$	30 nM		20 μ L
10^{-7}	100 nM	50 μ M	7 μ L
$3 \cdot 10^{-7}$	300 nM		20 μ L
10^{-6}	1 μ M	500 μ M	7 μ L
$3 \cdot 10^{-6}$	3 μ M		20 μ L
10^{-5}	10 μ M	5 mM	7 μ L

ISDN-Verdünnung

Stamm-Lösung: 2,32 mM

Verdünnt in destilliertem Wasser

Bad-Volumen: 5 ml

Die Stammlösung wurde entsprechend einer Wasserlöslichkeit von 550 mg/L (25°C) laut Literatur [98] hergestellt.

<i>M [mol/L]</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
10^{-9}	1 nM	500 nM	10 μ L
$3 \cdot 10^{-9}$	3 nM		20 μ L
10^{-8}	10 nM	5 μ M	7 μ L
$3 \cdot 10^{-8}$	30 nM		20 μ L
10^{-7}	100 nM	50 μ M	7 μ L
$3 \cdot 10^{-7}$	300 nM		20 μ L
10^{-6}	1 μ M	500 μ M	7 μ L
$3 \cdot 10^{-6}$	3 μ M		20 μ L
10^{-5}	10 μ M	2,32 mM	15 μ L
$3 \cdot 10^{-5}$	30 μ M		43 μ L
10^{-4}	100 μ M		150 μ L
$3 \cdot 10^{-4}$	300 μ M		430 μ L

U-46619

Feststoff in EtOH gelöst

Bad-Volumen: 5 ml

<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
50 nM	100 μ M	2,5 μ L

2.3 Blutgefäße

2.3.1 Ratten Aorten

Weibliche Sprague-Dawley Ratten (bezogen von Charles River, Sulzfeld, Deutschland), mit einem Gewicht von 200-300g wurden im hauseigenen Tier-Laboratorium in geeigneten Käfigen und unter Berücksichtigung eines 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten.

Die Tiere wurden in einer luftdichten Box mittels CO₂ betäubt und euthanasiert. Anschließend wurden die Tiere mit einer Guillotine geköpft, der Brustkorb geöffnet, die Aorta entnommen und sofort in eiskalten KH-Puffer gegeben. Nachdem Fett und Bindegewebe um die Aorta vorsichtig entfernt wurden, wurde diese in circa 3-4 mm breite Ringe geschnitten die für die Organbad-Studien verwendet wurden.

2.3.2 Rinder- & Schweinekoronarien

Rinder- und Schweineherzen wurden vom örtlichen Schlachthof bezogen. Die frischen Herzen wurden nach Erhalt unverzüglich präpariert. Dazu wurde die rechte Koronarie entfernt, in eiskalten KH-Puffer gegeben und von Fett- und Bindegewebe befreit. Danach wurde das Blutgefäß in 3-4 mm breite Ringe geschnitten und in die Organ-Bad Apparatur eingespannt.

2.4 Organbad-Versuche

Die Apparatur besteht aus 4 Wasserbad-ummantelten Gefäßen (je 15 mL), die konstant auf 37°C gehalten werden. Durch eine Porzellan-Fritte am unteren Teil wird eine Gasmischung, in diesem Falle bestehend aus 95% O₂ und 5% CO₂ zugeführt. Der hohe Sauerstoffgehalt ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass der verwendete KH-Puffer zwar alle physiologischen Komponenten des Blutes ersetzt, aber keine Sauerstoff-transportierende Struktur (Hämoglobin) enthält, was durch vermehrte Sauerstoffzufuhr ausgeglichen werden muss.

Mittels eines stabilen und eines zweiten, beweglichen, Hakens, wurden die Gefäß-Ringe im begasten Puffer positioniert. Der mit dem bewegliche Haken verbundene Brücken-Verstärker leitet das elektrische Signal, das durch die Kontraktion/Dilatation des Gefäßes entsteht zu Schreiber, der dieses optisch wiedergibt.

Nachdem Temperatur, pH-Wert und Begasung stabil sind und die Apparatur geeicht ist, wurde auf die Gefäßringe eine bestimmte Grundspannung ausgeübt (je nach Spezies, Rind und Schwein: 2g, Ratte: 1g). Diese Equilibrierung benötigte ungefähr 60 Minuten. Während dieser Zeit wurde der KH-Puffer solange alle 15 Minuten gewechselt, bis in allen Bädern die basale Spannung konstant war.

Anschließend wurde 100 mM K⁺-KH-Puffer zugegeben. Erfolgte daraufhin eine Kontraktion der Gefäße, galten diese als „intakt“. Nach Erreichen der maximalen Kontraktion wurde der Kalium-haltige Puffer ausgewaschen und wieder durch normalen KH-Puffer ersetzt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Nach erneutem Erreichen der basalen Spannung wurde der jeweilige Inhibitor zugegeben und, je nach Protokoll, für eine bestimmte Zeit inkubiert. Danach wurde das Gefäß mittels einer definierten Menge U-46619 oder 30 mM K⁺-KH-Puffer vorkontrahiert. Sobald der Tonus stabil war, wurde mit der Zugabe von GTN, DEA/NO oder ISDN begonnen.

2.5 Statistische Analyse

Die Daten entsprechen dem \pm S.E.M. von „n“. „n“ entspricht der Anzahl einzelner Tiere, aus deren Koronarien jeweils 8 Ringsegmente entnommen wurden. Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels KalaidaGraph sigmoidal gefittet. Einzelne Versuche wurden mittels ANOVA (post hoc Bonferroni-Dunn Test (StatView 5.0)) bezüglich ihrer statistischen Varianz überprüft. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

2.6 Inhibitoren

Inhibitor	Konzentration	Vorkontraktion	Eigeneffekt
SKF-525 A (Proadifen.HCl)	500 μ M 100 μ M 10 μ M	30 mM KCl	Sehr starke Relaxation \rightarrow instabiler Tonus
CDNB	400 μ M	30 mM KCl	Sehr starke Relaxation \rightarrow instabiler Tonus
Bromosulphothalein	1 mM	50 nM U-46619 70 nM U-46619 100 nM U-46619	Keine Kontraktion durch U-46619
		30 mM KCl	Relaxation \rightarrow Kontraktion \rightarrow stabiler Tonus
Etacrynsäure	100 μ M	50 nM U-46619	Relaxation \rightarrow instabiler Tonus
		70 nM U-46619	Relaxation \rightarrow Kontraktion \rightarrow leicht instabiler Tonus
		30 mM KCl	Relaxation \rightarrow Kontraktion \rightarrow stabiler Tonus aber Gefäß reagiert sehr langsam auf GTN- bzw. DEA/NO- Gabe
7- ER	2 μ M	50 nM U-46619	Kein Eigeneffekt
Ketoconazol	10 μ M	30 mM KCl	Sehr schwache Relaxation \rightarrow stabiler Tonus
BSO	10 μ M	30 mM KCl	Kein Eigeneffekt
Allopurinol	100 μ M	30 mM KCl	Leichte Kontraktion, gefolgt von Rückkehr auf ursprünglichen Tonus \rightarrow stabiler Tonus

2.6.1 CYP450 Inhibitoren

2.6.1.1 7-Ethoxyresorufin

Spezies:	Schwein
Gefäßbett:	Rechte Koronarie
Inhibitor:	7-Ethoxyresorufin
Bad-Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	50 nM U-46619
Basale Spannung:	2 g
GTN-Konzentration:	10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M
DEA/NO-Konzentration:	10^{-9} - 10^{-5} M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>7-Ethoxyresorufin</i>	2 μ M [99]	500 μ M	20 μ L

Die mit DMSO hergestellte 10 mM Stamm-Lösung wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

2.6.1.2 Ketoconazol

Spezies:	Schwein
Gefäßbett:	Rechte Koronarie
Inhibitor:	Ketoconazol [40]
Bad-Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	30 mM KCl
Basale Spannung:	2 g
GTN-Konzentration:	10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M
DEA/NO-Konzentration:	10^{-9} - 10^{-5} M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>Ketoconazol</i>	10 μ M	10 mM	5 μ L

Der Feststoff wurde in MeOH gelöst. Das Pipettier-Volumen wurde daraufhin so berechnet, dass die finale MeOH-Konzentration im Organbad nicht höher als 0,1-0,15% ist.

2.6.2 Glutathion S-Transferase Inhibitoren

2.6.2.1 Etacrynsäure

Spezies:	Schwein
Gefäßbett:	Rechte Koronarie
Inhibitor:	Etacrynsäure
Bad-Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	70 nM U-46619 bzw. 30mM KCl
Basale Spannung:	2 g
GTN-Konzentration:	10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M
DEA/NO-Konzentration:	10^{-9} - 10^{-5} M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>Etacrynsäure</i>	0,1 mM [48]	100 mM	5 μ L

Der Feststoff wurde in EtOH gelöst. Das Pipettier-Volumen wurde daraufhin so berechnet, dass die finale EtOH-Konzentration im Organbad nicht höher als 0,1-0,15% liegt. Aufgrund der schwerwiegenden Eigeneffekte der GST-Inhibitoren, wurde die Vorkontraktion statt mit U-46619, mit 30 mM KCl durchgeführt.

2.6.2.2 Bromosulphthalein

Spezies:	Schwein
Gefäßbett:	Rechte Koronarie
Inhibitor:	Bromosulphthalein (Sulfobromophthalein)
Bad-Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	30 mM KCl
Basale Spannung:	2 g
GTN-Konzentration:	10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M
DEA/NO-Konzentration:	10^{-9} - 10^{-5} M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>Bromosulphthalein</i>	1 mM [48]	100 mM	50 μ L

Der Feststoff wurde in Wasser gelöst. Aufgrund der schwerwiegenden Eigeneffekte der GST-Inhibitoren, wurde die Vorkontraktion statt mit U-46619, mit 30 mM KCl durchgeführt.

2.6.3 Hemmstoff der Glutathionsynthese

Spezies:	Schwein
Gefäßbett:	Rechte Koronarie
Inhibitor:	Buthioninsulfoximin [32]
Bad-Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	30 mM KCl
Basale Spannung:	2 g
GTN-Konzentration:	10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M
DEA/NO-Konzentration:	10^{-9} - 10^{-5} M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>Buthioninsulfoximin</i>	10 μ M [100]	10 mM	25 μ L

Der Feststoff wurde in Wasser gelöst.

2.6.4 Xanthinoxidoreduktase-Inhibitor

Spezies:	Schwein
Gefäßbett:	Rechte Koronarie
Inhibitor:	Allopurinol
Bad-Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	30 mM KCl
Basale Spannung:	2 g
GTN-Konzentration:	10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M
DEA/NO-Konzentration:	10^{-9} - 10^{-5} M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>Allopurinol</i>	100 μ M [94]	100 mM	5 μ L

Der Feststoff wurde in DMSO gelöst. Das Pipettier-Volumen wurde daraufhin so berechnet, dass die finale DMSO-Konzentration im Organbad nicht mehr als 0,1% beträgt.

2.6.5 ALDH2

2.6.5.1 Rind –DPI

Spezies:	Rind
Gefäßbett:	Rechte Koronarie
Inhibitor:	Diphenyleneiodonium
Bad Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	50 nM U-46619
Basale Spannung:	2 g
GTN-Konzentration:	10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M
DEA/NO-Konzentration:	10^{-10} - 10^{-5} M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>Diphenyleneiodonium</i>	1 μ M	10 mM	5 μ L
<i>Diphenyleneiodonium</i>	0,3 μ M [68]	1 mM	15 μ L

Eine 10 mM Stamm-Lösung in DMSO wurde mit destilliertem Wasser weiterverdünnt. Aufgrund der hohen Sensitivität von Rinderkoronarien gegenüber DEA/NO wurden zusätzlich die Konzentrationen 10^{-10} und $3 \cdot 10^{-10}$ M untersucht.

2.6.5.2 ISDN

2.6.5.2.1 Schweinekoronarie

Spezies:	Schwein
Gefäßbett:	Rechte Koronarie
Inhibitor A:	Chloralhydrat
Inhibitor B:	Diphenyleneiodonium
Bad-Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	50 nM U-46619
Basale Spannung:	2 g
ISDN- Konzentration:	10^{-9} - $3 \cdot 10^{-4}$ M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>Chloralhydrat</i>	1 mM	1 M	5 µL
<i>Diphenyliodonium</i>	1 µM	10 mM	5 µL
	0,3 µM	1 mM	15 µL

Während Chloralhydrat in destilliertem Wasser gelöst wurde, wurden die DPI-Lösungen wie in Punkt 4.1.1 hergestellt. Aufgrund der Instabilität der ersten Kurven, wurden die ISDN-Konzentrationen 10^{-10} und $3 \cdot 10^{-10}$ M, welche keinen Effekt auf die Relaxation des Gefäßes hatten, weggelassen um die Versuchszeit zu verkürzen.

2.6.5.2.2 Ratten Aorta

Spezies:	Ratte
Gefäßbett:	Aorta
Inhibitor A:	Chloralhydrat
Inhibitor B:	Diphenyliodonium
Bad-Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	50 nM U-46619
Basale Spannung:	1 g
ISDN- Konzentration:	10^{-9} - $3 \cdot 10^{-4}$ M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Initiale Konzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>Chloralhydrat</i>	1 mM	1 M	5 µL
<i>Diphenyliodonium</i>	1 µM	10 mM	5 µL
	0,3 µM	1 mM	15 µL

2.6.6 L-NNA/D-NNA

Spezies:	Schwein
Gefäßbett:	Rechte Koronarie
Inhibitor A:	N ω -Nitro-L-Arginin
Inhibitor B:	N ω -Nitro-D-Arginin
Bad-Volumen:	5 mL
Vorkontraktion:	50 nM U-46619
Basale Spannung:	2 g
GTN-Konzentration:	10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M
DEA/NO-Konzentration:	10^{-9} - 10^{-5} M

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Pipettier-Volumen</i>
<i>Nω-Nitro-L-Arginin</i>	1 mM	10 mM	500 μ L
<i>Nω-Nitro-D-Arginin</i>	1 mM	10 mM	500 μ L

Die Feststoffe wurden in destilliertem Wasser und aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit, mithilfe des Ultraschall-Bades gelöst.

Den Kontroll-Bädern ohne Hemmstoff wurden zusätzlich 500 μ L KH-Puffer zugefügt, um eventuelle Konzentrations-Unterschiede, die durch das relativ hohe Pipettier-Volumens des Inhibitors auftreten könnten, auszugleichen.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Vorkontraktion

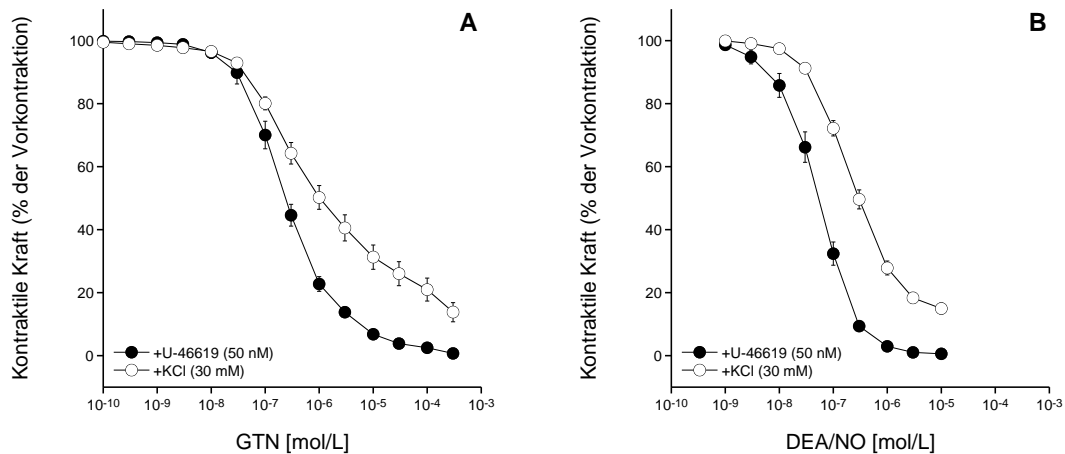


Abbildung 7 Vergleich verschiedener Vorkontraktionsarten.

Alle Kontrollkurven von A) GTN- bzw. B) DEA/NO-induzierter Relaxationen wurden gemittelt und \pm S.E.M. angegeben. Die Relaxation wird als % der Vorkontraktion dargestellt; n= 12-16.

Abbildung 7 zeigt den Einfluss der Vorkontraktionsart auf die GTN- und DEA/NO-vermittelte Relaxation von Schweinekoronarien. Bei der Vorkontraktion mit Kalium zeigte sich sowohl bei der GTN-vermittelten (Abb. 7A), wie auch bei der DEA/NO-vermittelten Relaxation (Abb. 7B) eine signifikante Rechts-Verschiebung der Kurve. Die berechneten EC_{50} -Werte der GTN-vermittelten Relaxation liegen bei $0,85 \pm 0,32 \mu\text{M}$ wenn mit Kalium vorkontrahiert wurde, bzw. bei $0,24 \pm 0,05 \mu\text{M}$ wenn mit U-46619 vorkontrahiert wurde (Abb. 7A). Die DEA/NO-vermittelte Relaxation erfolgte bei Kalium-vorkontrahierten Gefäßen mit EC_{50} -Werten von $0,23 \pm 0,03 \mu\text{M}$ und bei Vorkontraktion mit U-46619 mit EC_{50} -Werten von $54,07 \pm 7,95 \text{ nM}$ (Abb. 7B).

	<i>% der max. Vorkontraktion</i>	<i>S.E.M</i>
<i>U-46619 Vorkontraktion</i>	64,08	2,41
<i>KCl Vorkontraktion</i>	72,88	3,91

Die Tabelle zeigt, dass bei einer Vorkontraktion mit U-46619 $64,08 \pm 2,41\%$ bzw. bei Vorkontraktion mit KCl $72,88 \pm 3,91\%$ der maximalen Kontraktion (+100 mM K⁺-KH-Puffer) erreicht wurden.

3.2 CYP450 Inhibitoren

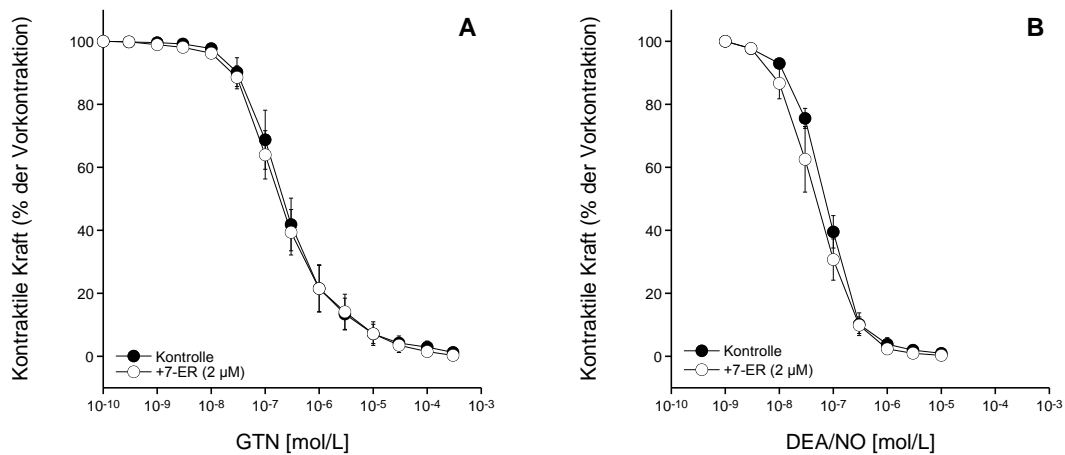


Abbildung 8 Effekt von 2 µM 7-Ethoxyresorufin auf die A) GTN- und B) DEA/NO-induzierte Relaxation an Schweinekoronarien. Nach Vorkontraktion mit 50 nM U-46619 erfolgte eine kumulative GTN- bzw. DEA/NO-Zugabe von 10^{-10} - 10^{-4} bzw. 10^{-9} - 10^{-5} M. Die Relaxation wurde in An- oder Abwesenheit des Inhibitors als % der Vorkontraktion angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm S.E.M von jeweils 5 Tieren.

Abbildung 8 zeigt den Effekt von 2 µM 7-ER auf die GTN- und die DEA/NO-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien. Sowohl die GTN-vermittelte (Abb. 8A), wie auch die DEA/NO-vermittelte Relaxation (Abb. 8B) wurde durch den Inhibitor nicht beeinflusst. Die errechneten EC_{50} -Werte der GTN-vermittelten Relaxation sind $0,31 \pm 0,14$ µM in Ab- und $0,33 \pm 0,15$ µM in Anwesenheit von 7-ER. DEA/NO relaxierte die Gefäße mit EC_{50} -Werten von $0,08 \pm 0,02$ µM in Ab- und $0,05 \pm 0,02$ µM in Anwesenheit von 7-ER.

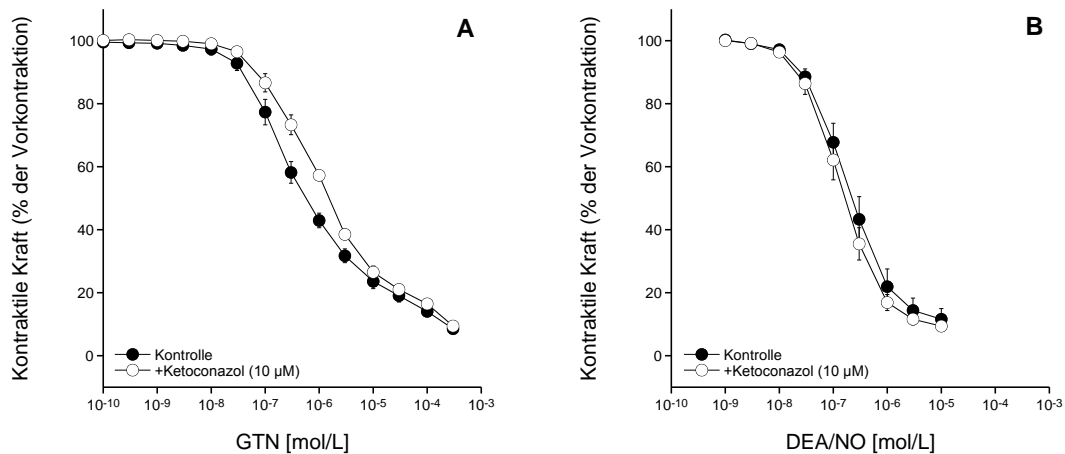


Abbildung 9 Effekt von 10 µM Ketoconazol auf die A) GTN- und B) DEA/NO-induzierte Relaxation an Schweinekoronarien.

Nach Vorkontraktion mit 30 mM KCl erfolgte eine kumulative GTN- bzw. DEA/NO-Zugabe von 10⁻¹⁰-10⁻⁴ bzw. 10⁻⁹-10⁻⁵ M. Die Relaxation wurde in An- oder Abwesenheit des Inhibitors als % der Vorkontraktion angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert ± S.E.M von jeweils 5 Tieren. Die GTN-vermittelte Relaxation (A) wurde in Anwesenheit von 10 µM Ketoconazol signifikant gehemmt (p<0,05; ANOVA).

Abbildung 9 zeigt den Effekt von 10 µM Ketoconazol auf die GTN- und die DEA/NO-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien. Die GTN-vermittelte Relaxation (Abb. 9A) wurde in Anwesenheit des Inhibitors signifikant nach rechts verschoben. Die DEA/NO-vermittelte Relaxation (Abb. 9B) wurde durch den Inhibitor nicht beeinflusst. Die errechneten EC₅₀-Werte der GTN-vermittelten Relaxation sind 0,54 ± 0,11 µM in Ab- und 1,06 ± 0,11 µM in Anwesenheit von Ketoconazol. DEA/NO relaxierte die Gefäße mit EC₅₀-Werten von 0,21 ± 0,05 µM in Ab- und 0,15 ± 0,03 µM in Anwesenheit von Ketoconazol.

3.3 GST Inhibitoren

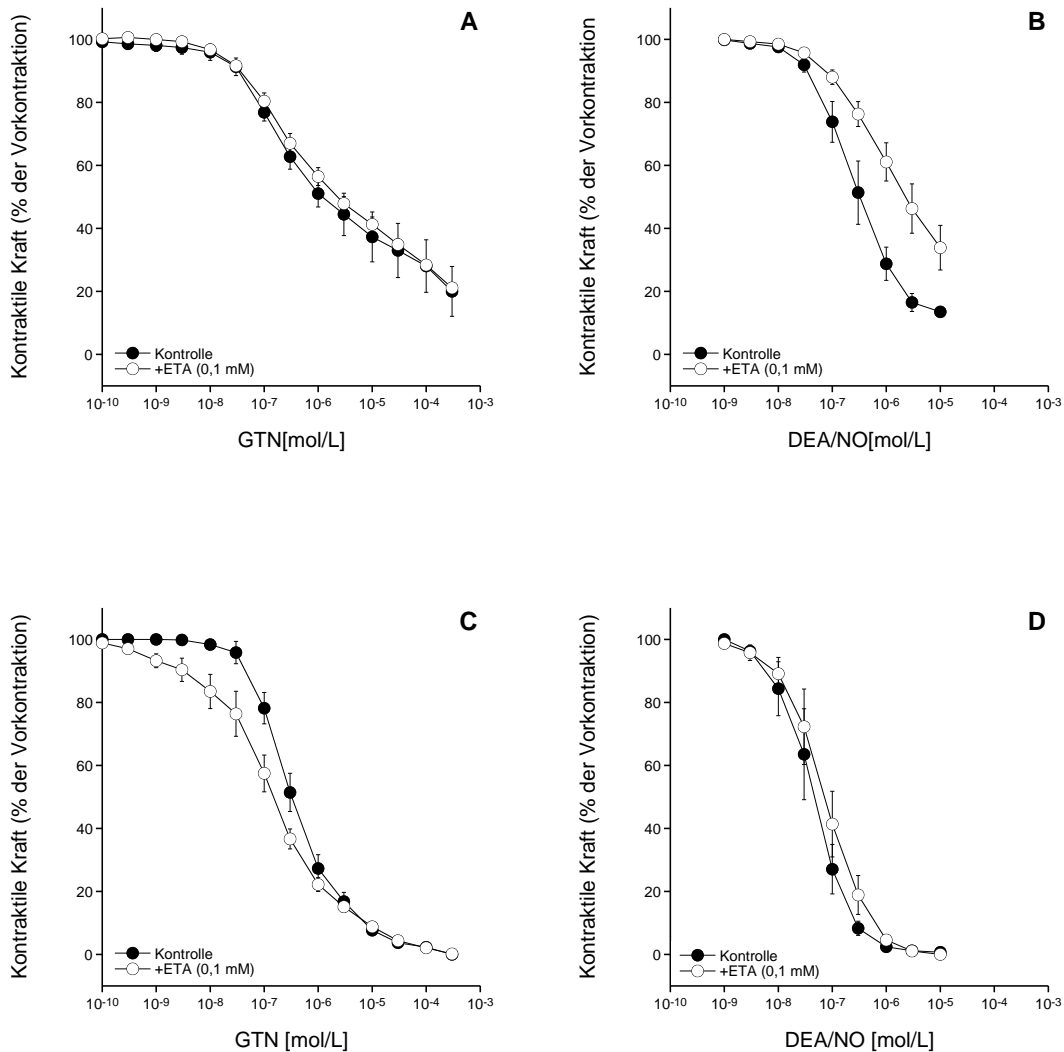


Abbildung 10 Effekt von 0,1 mM Etacrynsäure auf A) und C) GTN-induzierte bzw. B) und D) DEA/NO-induzierte Relaxation auf Schweinekoronarien.

Nach Vorkontraktion mit 70 nM U-46619 (C, D) bzw. 30 mM KCl (A, B) erfolgte eine kumulative GTN- bzw. DEA/NO-Zugabe von 10⁻¹⁰-10⁻⁴ bzw. 10⁻⁹-10⁻⁵ M. Die Relaxation wurde in An- oder Abwesenheit des Inhibitors als % der Vorkontraktion angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert ± S.E.M von jeweils 3 Tieren. Die GTN-vermittelte Relaxation (C) wurde in Anwesenheit von 0,1 mM Etacrynsäure signifikant potenziert ($p < 0,05$; ANOVA).

Abbildung 10 zeigt den Effekt von 0,1 mM ETA auf die GTN- und die DEA/NO-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien. Die Gefäße wurden entweder mit Kalium (Abb. 10A/B) oder mit 70 nM U-46619 (Abb. 10C/D) vorkontrahiert. Bei Vorkontraktion mit Kalium wurde die GTN-vermittelte Relaxation (Abb. 10A) durch Zugabe von ETA nicht beeinflusst. Bei der DEA/NO-vermittelte Relaxation (Abb. 10B) kam es durch Zugabe von ETA zu einer Rechtsverschiebung der Kurve. Die errechneten EC₅₀-Werte der GTN-vermittelten Relaxation sind 0,49 ± 0,01 μM in Ab- und 0,63 ± 0,14 μM in Anwesenheit von ETA. DEA/NO relaxierte die

Gefäße mit EC_{50} -Werten von $0,30 \pm 0,11 \mu\text{M}$ in Ab- und $2,06 \pm 1,32 \mu\text{M}$ in Anwesenheit von ETA. Bei Vorkontraktion mit U-46619 wurde nur die GTN-vermittelte (Abb. 10C) Relaxation (Abb. 10D) durch den Inhibitor beeinflusst. Die errechneten EC_{50} -Werte der GTN-vermittelten Relaxation sind $0,38 \pm 0,08 \mu\text{M}$ in Ab- und $0,17 \pm 0,05 \mu\text{M}$ in Anwesenheit von ETA. DEA/NO relaxierte die Gefäße mit EC_{50} -Werten von $0,05 \pm 0,02 \mu\text{M}$ in Ab- und $0,09 \pm 0,04 \mu\text{M}$ in Anwesenheit von ETA.

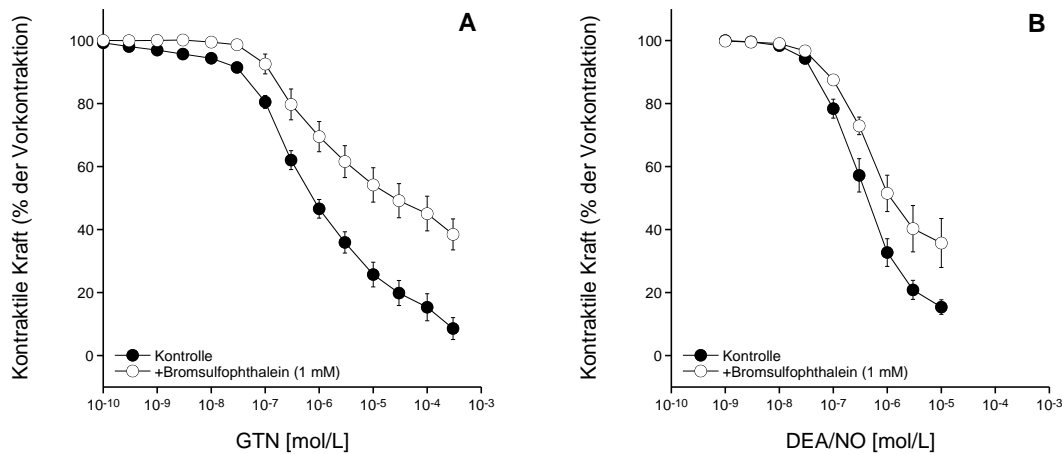


Abbildung 11 Effekt von 1 mM Bromosulphthalein auf A) GTN- und B) DEA/NO-induzierte Relaxation von Schweinekoronarien. Nach Vorkontraktion mit 30 mM KCl erfolgte eine kumulative GTN- bzw. DEA/NO-Zugabe von 10^{-10} - 10^{-4} bzw. 10^{-9} - 10^{-5} M. Die Relaxation wurde in An- oder Abwesenheit des Inhibitors als % der Vorkontraktion angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm S.E.M von jeweils 5 Tieren.

Abbildung 11 zeigt den Effekt von 1 mM Bromosulphthalein auf die GTN- und die DEA/NO-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien. Sowohl die GTN-vermittelte Relaxation (Abb. 11A), wie auch die DEA/NO-vermittelte Relaxation (Abb. 11B) zeigte in Anwesenheit des Inhibitors eine signifikante Rechts-Verschiebung der Kurve, was einer Hemmung der Relaxation entspricht. Die errechneten EC_{50} -Werte der GTN-vermittelten Relaxation sind $0,67 \pm 0,11 \mu\text{M}$ in Ab- und $1,77 \pm 0,75 \mu\text{M}$ in Anwesenheit von BSP. DEA/NO relaxierte die Gefäße mit EC_{50} -Werten von $0,34 \pm 0,09 \mu\text{M}$ in Ab- und $0,41 \pm 0,04 \mu\text{M}$ in Anwesenheit von BSP.

3.4 Hemmstoff der Glutathionsynthese

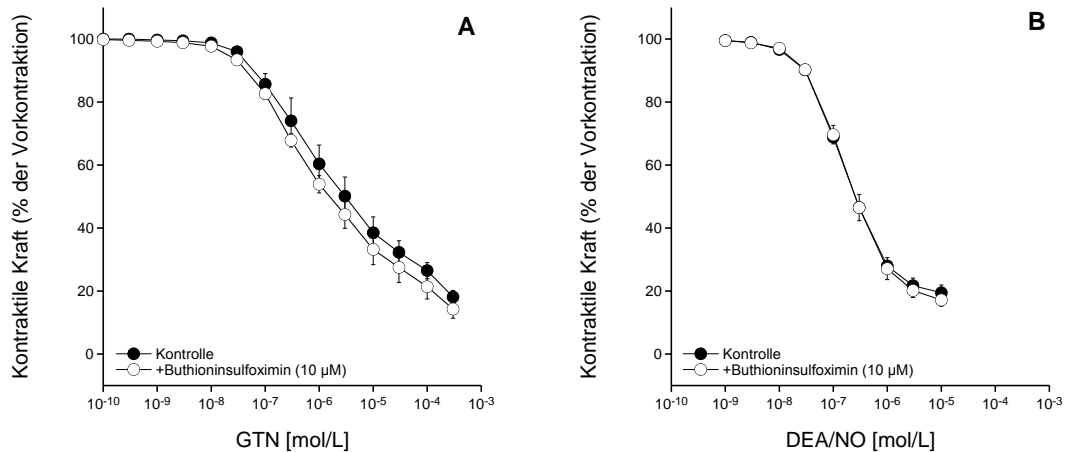


Abbildung 12 Effekt von 10 µM Buthioninsulfoximin auf A) GTN- bzw. B) DEA/NO-induzierte Relaxation von Schweinekoronarien. Nach Vorkontraktion mit 30 mM KCl erfolgte eine kumulative GTN- bzw. DEA/NO-Zugabe von 10⁻¹⁰-10⁻⁴ bzw. 10⁻⁹-10⁻⁵ M. Die Relaxation wurde in An- oder Abwesenheit des Inhibitors als % der Vorkontraktion angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert ± S.E.M von jeweils 3 Tieren.

Abbildung 12 zeigt den Effekt von 10 µM Buthioninsulfoximin auf die GTN- und die DEA/NO-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien. Sowohl die GTN-vermittelte (Abb. 12A), wie auch die DEA/NO-vermittelte Relaxation (Abb. 12B) wurde durch den Inhibitor nicht beeinflusst. Die errechneten EC₅₀-Werte der GTN-vermittelten Relaxation sind 1,82 ± 1,05 µM in Ab- und 1,00 ± 0,18 µM in Anwesenheit von BSO. DEA/NO relaxierte die Gefäße mit EC₅₀-Werten von 0,16 ± 0,02 µM in Ab- und 0,18 ± 0,02 µM in Anwesenheit von BSO.

3.5 Xanthinoxidoreduktase-Inhibitor

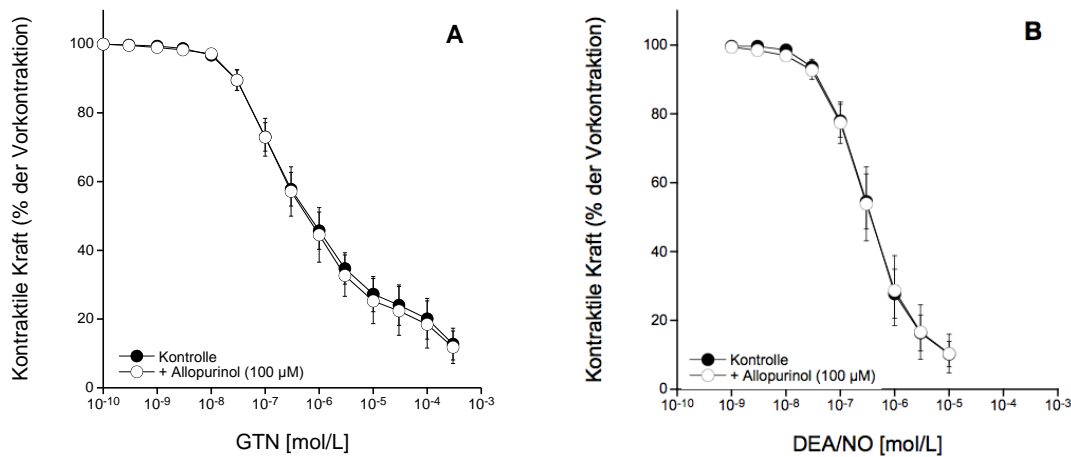


Abbildung 13 Effekt von 100 µM Allopurinol auf die A) GTN- bzw. B) DEA/NO-induzierte Relaxation von Schweinekoronarien. Nach Vorkontraktion mit 30 mM KCl erfolgte eine kumulative GTN- bzw. DEA/NO-Zugabe von 10⁻¹⁰-10⁻⁴ bzw. 10⁻⁹-10⁻⁵ M. Die Relaxation wurde in An- oder Abwesenheit des Inhibitors als % der Vorkontraktion angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert ± S.E.M von jeweils 3 Tieren.

Abbildung 13 zeigt den Effekt von 100 µM Allopurinol auf die GTN- und die DEA/NO-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien. Sowohl die GTN-vermittelte (Abb. 13A), wie auch die DEA/NO-vermittelte Relaxation (Abb. 13B) wurde durch den Inhibitor nicht beeinflusst. Die errechneten EC₅₀-Werte der GTN-vermittelten Relaxation sind 0,42 ± 0,13 µM in Ab- und 0,51 ± 0,25 µM in Anwesenheit von Allopurinol. DEA/NO relaxierte die Gefäße mit EC₅₀-Werten von 0,34 ± 0,11 µM in Ab- und 0,39 ± 0,16 µM in Anwesenheit von Allopurinol.

3.6 ALDH2

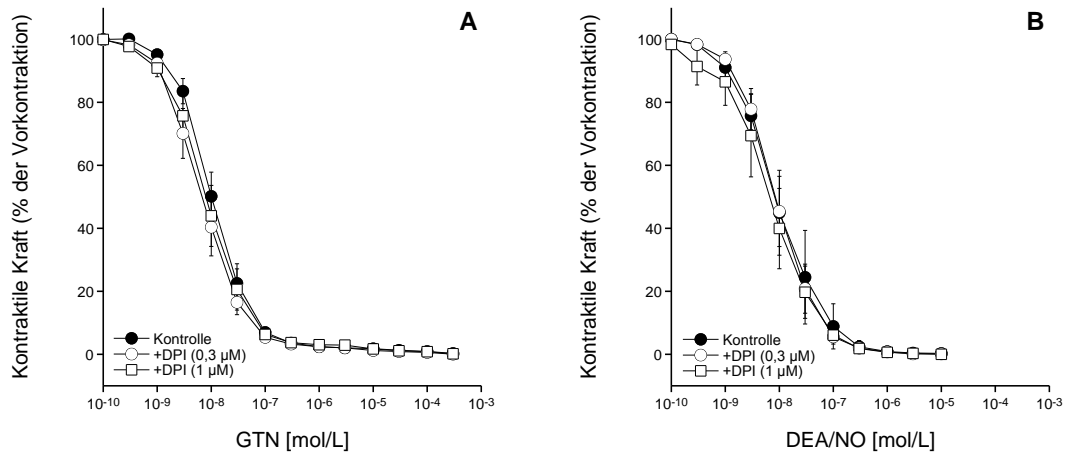


Abbildung 14 Effekt von DPI (0,3 µM und 1 µM) auf A) GTN- und B) DEA/NO-induzierte Relaxation auf Rinderkoronarien. Nach Vorkontraktion mit 50 nM U-46619 wurden GTN bzw. DEA/NO-Konzentration von 10⁻¹⁰-10⁻⁴ bzw. 10⁻¹⁰-10⁻⁵ M kumulativ zugegeben. Die Relaxation wird als % der Vorkontraktion angegeben. Die Werte von 5-8 Tieren wurden gemittelt und ± S.E.M angegeben.

Abbildung 14 zeigt den Effekt von 0,3 und 1 µM DPI auf die GTN- und die DEA/NO-vermittelte Relaxation an Rinderkoronarien. Sowohl die GTN-vermittelte (Abb. 14A), wie auch die DEA/NO-vermittelte Relaxation (Abb. 14B) wurde durch den Inhibitor nicht beeinflusst. Die errechneten EC₅₀-Werte der GTN-vermittelten Relaxation sind 12,7 ± 3,58 nM in Abwesenheit eines Inhibitors und 8,49 ± 2,49 nM bzw. 10,55 ± 3,72 nM in Anwesenheit von 0,3 bzw. 1 µM DPI. DEA/NO relaxierte die Gefäße mit EC₅₀-Werten von 17,93 ± 13,84 nM in Abwesenheit eines Inhibitors und 11,86 ± 4,04 nM bzw. 11,52 ± 4,25 nM in Anwesenheit von 0,3 bzw. 1 µM DPI.

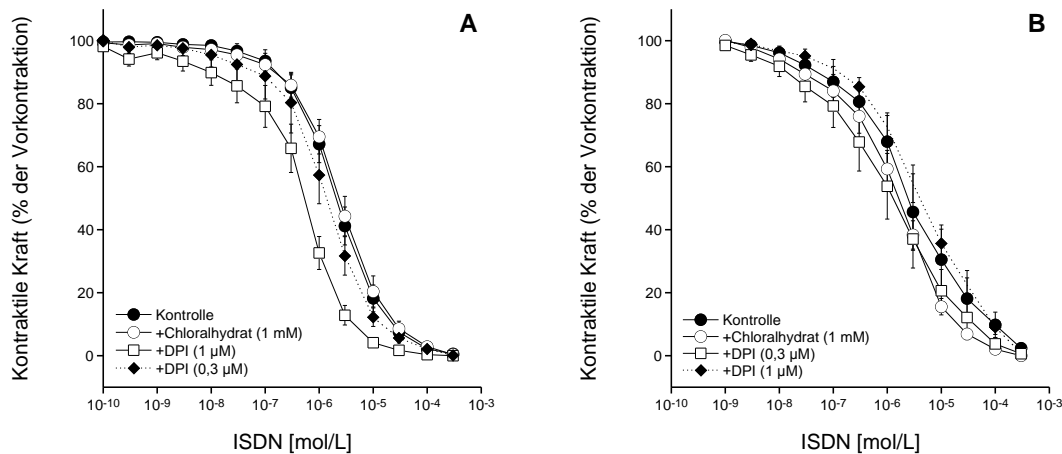


Abbildung 15 Effekt von Chloralhydrat (1 mM) und DPI (0,3 µM, 1 µM) auf die ISDN-induzierte Relaxation an A) Schweinekoronarien und B) Rattenaorten. Nach Vorkontraktion mit 50 nM U-46619 erfolgte eine kumulative ISDN-Zugabe von 10^{-9} - 10^{-4} M. Die Relaxation in An- oder Abwesenheit eines Inhibitors wurde als % der Vorkontraktion angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm S.E.M von $n=7$ (Schwein) bzw. $n=5$ (Ratte).

Abbildung 15 zeigt den Effekt von 1 mM Chloralhydrat und 0,3 bzw. 1 µM DPI auf die ISDN-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien und Rattenaorten. Die ISDN-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien (Abb. 15A) wurde in Anwesenheit von 1 µM DPI signifikant potenziert, während Chloralhydrat und 0,3 µM DPI keinen Einfluss zeigten. Die errechneten EC_{50} -Werte der ISDN-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien sind $2,87 \pm 0,70$ µM in Abwesenheit eines Inhibitors, $3,42 \pm 0,96$ µM in Anwesenheit von Chloralhydrat und $1,68 \pm 0,35$ µM bzw. $0,70 \pm 0,15$ µM in Anwesenheit von 0,3 bzw. 1 µM DPI. Die ISDN-vermittelte Relaxation an Rattenaorten (Abb. 15B) wurde in Anwesenheit der Inhibitoren nicht beeinflusst. Die errechneten EC_{50} -Werte der ISDN-vermittelte Relaxation an Rattenaorten sind $8,98 \pm 3,77$ µM in Abwesenheit eines Inhibitors, $2,07 \pm 0,54$ µM in Anwesenheit von Chloralhydrat und $5,23 \pm 2,31$ µM bzw. $8,76 \pm 3,18$ µM in Anwesenheit von 0,3 bzw. 1 µM DPI.

3.7 L-NNA/D-NNA

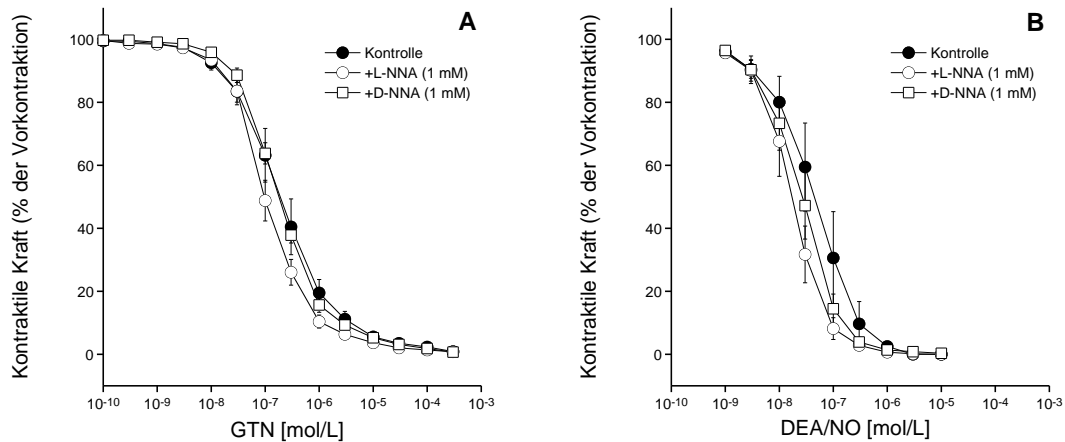


Abbildung 16 Effekt von 1mM L-NNA und 1 mM D-NNA auf die A) GTN- bzw. B) DEA/NO-induzierte Relaxation an Schweinekoronarien. Nach Vorkontraktion mit 70 nM U-46619 erfolgte eine kumulative GTN- bzw. DEA/NO-Zugabe von 10^{-10} - 10^{-4} bzw. 10^{-9} - 10^{-5} M. Die Relaxation wurde in An- oder Abwesenheit des Inhibitors als % der Vorkontraktion angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm S.E.M von A) 7 bzw. B) 4 Tieren. Die GTN- und DEA/NO-vermittelte Relaxation (A, B) wurde in Anwesenheit von 1 mM L-NNA signifikant potenziert ($p < 0,05$; ANOVA).

Abbildung 16 zeigt den Effekt von 1 mM L- und D-NNA auf die GTN- und die DEA/NO-vermittelte Relaxation an Schweinekoronarien. Die GTN-vermittelte Relaxation (Abb. 16A), wie auch die DEA/NO (Abb. 16B) vermittelte Relaxation wurden in Anwesenheit von L-NNA signifikant potenziert, während sie von D-NNA nicht beeinflusst wurden. Die errechneten EC_{50} -Werte der GTN-vermittelten Relaxation sind $0,25 \pm 0,08 \mu\text{M}$ in Abwesenheit eines Inhibitors und $0,12 \pm 0,02 \mu\text{M}$ bzw. $0,19 \pm 0,02 \mu\text{M}$ in Anwesenheit von L- bzw. D-NNA. DEA/NO relaxierte die GefäÙe mit EC_{50} -Werten von $72,28 \pm 38,54 \text{ nM}$ in Abwesenheit eines Inhibitors und $20,57 \pm 4,76 \text{ nM}$ bzw. $31,25 \pm 8,29 \text{ nM}$ in Anwesenheit von L- bzw. D-NNA.

4 Diskussion

Aufgrund der häufigen Eigeneffekte der Inhibitoren, war eine Vorkontraktion mit U-46619 nicht immer möglich. In einigen Organbad-Studien wurden Schweinekoronarien deshalb mit 30 mM KCl vorkontrahiert. Die gemittelten Werte der Kontrollen ergaben, dass es bei einer Vorkontraktion mit KCl, sowohl bei den GTN- wie auch bei der DEA/NO-vermittelten Relaxation, zu einer Rechtsverschiebung der Kurve kommt (Abb. 7). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Beeinflussung potentialabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zurückzuführen. Durch den erhöhten Kaliumgehalt außerhalb der Zelle, kommt es zu einer Abnahme des chemischen Konzentrationsgradienten, während der elektrische Gradient gleich bleibt. Potentialabhängige Ca^{2+} -Kanäle öffnen sich und es kommt zu einem Ca^{2+} -Anstieg im Zellinneren, was zu einer Kontraktion der Gefäße führt [101]. Die GTN- bzw. DEA/NO vermittelte Relaxation konkurriert somit mit der eben beschriebenen Kontraktion, wodurch es zu einem Anstieg der EC_{50} -Werte kommt. Die Resultate zeigen, dass Ergebnisse aus Organbad-Studien mit unterschiedlicher Vorkontraktionsart nicht ohne weiteres verglichen werden können.

Der selektive CYP 1A Inhibitor 7-Ethoxyresorufin (Abb. 8) zeigte keinen Effekt auf die GTN- und die DEA/NO- vermittelte Relaxation. Sowohl Li et al [99], wie auch Bennett et al [72] beschrieben eine Hemmung der GTN- und der SNP-induzierten Relaxation in Rattenaorten durch 7-ER, was auf eine direkte Beeinflussung der sGC hindeutet. Da 7-ER keinen Effekt auf die DEA/NO- vermittelte Relaxation in Schweinekoronarien hat zeigt, dass die Beeinflussung der sGC Spezies-spezifisch ist. Die Bioaktivierung von GTN in Schweinekoronarien ist nicht von CYP 1A abhängig.

Ketoconazol, ebenfalls ein Cytochrom P450 (hauptsächlich 3A4 und 3A5) Inhibitor zeigte einen signifikanten Effekt auf die GTN-vermittelte Relaxation in Schweinekoronarien (Abb. 9). Die beobachtete Hemmung der Relaxation korreliert mit den in vivo Versuchen von Yuan & Benet an Ratten [40]. Yuan und Benet zeigten, dass es durch die Gabe von Ketoconazol 50 mg/kg i.p, 1 Stunde vor GTN-Gabe zu einer Senkung des cGMP-Levels um 20-30% kommt, während SNP-induzierte Effekte nicht beeinflusst wurden. Außerdem ergab ihr Versuch, dass durch gleichzeitige Gabe von Dexamethason (CYP450 Induktor) cGMP-Level erreicht werden, die denen der Kontrolltiere entsprechen. 2 Jahre später zeigten Minamiyama et al das Ketoconazol die ISDN-Bioaktivierung in Rattenherz-Mikrosomen hemmt. Ketoconazol hemmte die Bioaktivierung in gleichem Ausmaß wie CYP3A-Antikörper [76]. Ich schliesse mich, gestützt von meinen Ergebnissen und denen anderer Forscher der Meinung von

McDonald et al an, dass CYP450, vor allem Isoenzyme der CYP3A Familie, zumindest für 20% der Bioaktivierung von GTN verantwortlich sind [33].

Die Versuche mit dem GST-Inhibitor Etacrynsäure (Abb. 10), gestalteten sich aufgrund des starken Eigeneffekts von ETA äußerst problematisch. Die Zugabe von ETA führte auch in Abwesenheit von NO-Donoren zu einer Relaxation weshalb nicht nur mit erhöhter Menge (70 nM statt 50 nM) U-46619, sondern auch mit KCl vorkontrahiert wurde. In der Versuchsreihe die mit KCl vorkontrahiert wurde, hatte ETA keinen Effekt auf die GTN-vermittelte Relaxation (Abb. 10A). Die DEA/NO-vermittelte Relaxation wurde aber in Anwesenheit des Inhibitors gehemmt (Abb. 10B). Bei Vorkontraktion mit U-46619 kam es zu einer Potenzierung der GTN-vermittelten Relaxation (Abb. 10C), was auf die erhöhte Versuchsdauer und die Instabilität des Tonus zurückzuführen ist. Die DEA/NO-vermittelte Relaxation wurde nicht beeinflusst (Abb. 10D). Laut Matsuzaki et al hemmt ETA nicht die GTN-Bioaktivierung sondern beeinflusst direkt die sGC [48]. Diese Hypothese bestätigen auch Grütter et al, die eine Hemmung der GTN- wie auch der SNP-vermittelten Relaxation durch ETA in Organbad-Studien an Rinderkoronarien beschrieben [102]. ETA scheint die Bioaktivierung von GTN nicht zu beeinflussen. Eine eventuelle Beeinflussung der sGC ist in den von mir durchgeführten Organbad-Studien nicht zu beobachten gewesen, was aber an der bereits erwähnten Instabilität des Tonus liegen kann.

Bromosulphophthalein (Abb. 11) hemmte sowohl die GTN- wie auch die DEA/NO-vermittelte Relaxation nicht-kompetitiv. Es ist wahrscheinlich, dass Bromosulphophthalein, wie bereits von Matsuzaki et al beschrieben [48], die sGC direkt beeinflusst.

Neben GST-Inhibitoren wurde auch ein Inhibitor der Glutathionsynthese (Buthioninsulfoximin) untersucht. Auch dieser Inhibitor zeigte keinen Einfluss auf die GTN- bzw. DEA/NO-vermittelte Relaxation (Abb. 12)

Allopurinol, ein Hemmstoff der Xanthinoxidoreduktase, zeigte keinen Effekt auf die NO-vermittelte Relaxation (Abb. 13). Die in der Literatur beschriebene NO-Generierung der XOR unter aeroben Bedingungen [91] konnte in Organbad-Studien nicht beobachtet werden.

Außerdem wurde untersucht, ob die Bioaktivierung von GTN im Rind, bzw. die Bioaktivierung anderer organischer Nitrate wie ISDN, ALDH2 abhängig ist. ALDH2-Inhibitoren wie DPI und Chloralhydrat zeigten keinen Einfluss auf die GTN- bzw. DEA/NO-induzierte Relaxation von Rinderkoronarien (Abb. 14). Die von De La Lande et al beschriebene endothelabhängige Potenzierung der GTN-vermittelten Relaxation bei

einer DPI-Konzentration von 0,3 μM konnte weder von mir, noch von anderen Mitarbeitern unseres Institutes beobachtet werden. Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte durchaus in der Versuchsdauer liegen. De La Lande überprüft vor der NO-vermittelten Relaxation die Anwesenheit des Endothels mittels Acetylcholin, was einen erheblichen Anstieg der Versuchsdauer zur Folge hat [68]. Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Qualität von präparierten Koronarsegmenten mit der Zeit sinkt, da trotz ständiger Begasung mit Oxymix eine Durchblutung des Gefäßes nicht ersetzt werden kann. Es wäre vorstellbar, dass es bei dem verlängerten Versuchsprotokoll von De La Landes Arbeitsgruppe zu einer vermehrten Translokation der XOR aus den Endothelzellen kommt. Ist dies der Fall, wird durch Zugabe von DPI die FAD-Seite der XOR blockiert (siehe Abb. 5). Folglich wird weniger Superoxid produziert und es stehen gleichzeitig mehr Elektronen für die Reduktion von Nitrit zu NO zu Verfügung, was in Summe zu mehr bioverfügbaren NO und einer Potenzierung des NO-Effektes führt.

Der ISDN-Versuch (Abb. 15) ergab Spezies-spezifische Ergebnisse. So hatten weder DPI noch Chloralhydrat Einfluss auf die NO-vermittelte Relaxation in Rattenaorten (Abb. 15B), während DPI in einer Konzentration von 1 μM den ISDN-Effekt am Schwein potenziert (Abb. 15A). Beide Resultate sprechen gegen eine ALDH2-abhängige Bioaktivierung von ISDN. Die Potenzierung des NO-Effektes am Schwein kann mit einer möglichen Hemmung des NO-scavenging durch hohen DPI-Konzentrationen erklärt werden. Dieser Effekt wurde auch bei der GTN-vermittelten Relaxationen an Ratten in Anwesenheit von 1 und 3 μM DPI beobachtet und ist endothelunabhängig (unveröffentlichte Daten des Institutes). Mit ISDN als NO-Donor findet keine Potenzierung der Relaxation in Anwesenheit von 1 μM DPI statt, jedoch ist eine Tendenz zur Linksverschiebung bei 0,3 μM zu beobachten. Unveröffentlichte Daten unserer Forschungsgruppe zeigen, dass die Potenzierung des GTN-induzierten NO-Effektes an Ratten (1 und 3 μM DPI) ab einer Konzentration von 10 μM DPI wieder schwächer wird. Es ist vorstellbar, dass die Bioaktivierung von ISDN in Ratten sensitiver auf DPI reagiert und deshalb die Potenzierung bereits bei 0,3 μM auftritt, wohingegen sich +1 μM DPI wieder wie die Kontrolle verhält. Die Bioaktivierung von ISDN in der Ratte scheint vom selben Mechanismus abhängig zu sein wie deren *low affinity pathway* (>3 μM GTN [60]) in der GTN-induzierten Relaxation und ist durch Chloralhydrat bzw. DPI nicht hemmbar. Weiter Untersuchungen zur Bioaktivierung von ISDN in unterschiedlichen Spezies sind nötig.

Vorhergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass L-NNA in einer Konzentration von 1mM die GTN-vermittelte Relaxation potenziert. Der Versuch mit L-

im Vergleich zu D-Arginin soll aufklären, warum es zu dieser Verstärkung des NO-Effektes kommt. Lass et al zeigten, dass Arginine in hoher Konzentration in der Lage sind Superoxid-Radikale zu binden und so unschädlich zu machen [103]. Außerdem hemmt L-NNA (nicht aber D-NNA [104]) die NOS, welche in ihrer entkoppelten Form Superoxid generiert. Da in dem Versuch (Abb. 16) D-NNA keinen Einfluss auf die GTN- oder DEA/NO-induzierte Relaxation hatte, ist es wahrscheinlich, dass die Hemmung der entkoppelten NOS der Grund für die Potenzierung des NO-Effekts ist.

5 Zusammenfassung

Obwohl im Laufe der Zeit eine Vielzahl an Hypothesen über die Schlüsselenzyme in der Bioaktivierung organischer Nitrate, insbesondere Nitroglycerin (GTN), diskutiert wurden, wurden ungewöhnlich wenige Enzyme mit Hilfe von Inhibitoren in Organbad-Studien getestet. Vor allem Herzkranzgefäße von Schweinen und Rindern wurden nur selten untersucht, obwohl in den letzten Jahren bekannt wurde, dass das vermeintliche Hauptenzym der GTN-Bioaktivierung, die Aldehyd Dehydrogenase-2 (ALDH2), nur in Nagern, und auch dort nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich für die Bioaktivierung von GTN verantwortlich ist. Das Ziel dieser Arbeit liegt deshalb in der Aufklärung der ALDH2-unabhängigen Bioaktivierung von GTN in Schweinekoronarien.

Der selektive Cytochrom 1A Inhibitor 7-Ethoxyresorufin, sowie der GSH-Synthese Inhibitor Buthioninsulfoximin und der Xanthinoxidoreduktase-Hemmstoff Allopurinol zeigten weder einen Effekt auf die GTN- noch auf die DEA/NO-induzierte Relaxation von Schweinekoronarien. Die Glutathion S-Transferase Inhibitoren Bromosulphophthalein und Etacrynsäure hemmten sowohl die GTN- wie auch die DEA/NO-induzierte Relaxation.

Ketoconazol, ein Inhibitor der Cytochrom 3A-Isoenzyme hemmte als einziges die GTN-vermittelte Relaxation von Schweinekoronarien ohne die DEA/NO-vermittelte Relaxation zu beeinflussen. Im Vergleich zur Kontrolle verdoppelte sich in Anwesenheit von Ketoconazol die errechnete EC_{50} der GTN-induzierten Relaxation. Es ist wahrscheinlich, dass Isoenzyme der Cytochrom 3A-Familie für einen Teil der Bioaktivierung von GTN in Schweinekoronarien verantwortlich sind.

6 Summary

The vascular bioactivation of the antianginal drug nitroglycerin (GTN), yielding 1,2-glycerol dinitrate and nitric oxide or a related activator of soluble guanylate cyclase, is catalyzed by aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) in rodent and human blood vessels. The essential role of ALDH2 has been confirmed in many studies and is considered as general principle of GTN-induced vasodilation in mammals. However, this view is challenged by recent results from our group, showing that established inhibitors of ALDH2 have no effect on GTN-induced relaxation of porcine and bovine coronary arteries. To tentatively identify the pathway involved, selected enzyme inhibitor were tested for their effects on relaxation of these blood vessels to GTN.

The selective cytochrome 1A inhibitor 7-ethoxyresorufin, buthionine sulfoximine, an inhibitor of glutathione-synthesis and allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidoreductase had no effect the on GTN- or DEA/NO-induced relaxation of porcine coronary arteries. The glutathione S-transferase inhibitors ethacrynic acid and bromosulfophthalein inhibited relaxation effect both, GTN- and DEA/NO-induced relaxation to both GTN and DEA/NO.

Only Ketoconazole, an selective inhibitor of cytochrome 3A-isoenzymes, caused a significant 2-fold rightward shift of the GTN response without affecting relaxation to DEA/NO. The results provide strong evidence for an involvement of cytochrome 3A-isoenzymes in GTN-bioactivation in porcine coronary arteries.

7 Abkürzungen

ALDH2	Aldehydehydrogenase 2
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
BCA	Bovine Coronary Artery
BSP	Bromosulfophthalein
BSO	Buthioninsulfoximin
BH ₂	Dihydrobiopterin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
CaM	Calmoduin
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CYP450	Cytochrom P450
cALDH ₂	cytosolische ALDH2
DBA	2,3-Dihydroxybnzaldehyd
DEA/NO	(2-(N,N-diethylamino)diazenolate-2-oxide)diethylamonium salt
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-NNA	N ω -Nitro-D-arginin
DPI	Diphenyleniodonium
7-ER	7-Ethoxyresorufin
ETA	Etacrynsäure
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GSH	Glutathion
GST	Glutsthion-S-Transferase
GTN	Nitroglycerin
GTP	Guanosintriposphat
IP ₃	Inositoltrisphosphat
ISDN	Isosorbiddinitrat
KH-Puffer	Krebs-Henseleit Puffer
L-NNA	N ω -Nitro-L-arginin
MeOH	Methanol
mtALDH ₂	mitochondriale ALDH2
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid

NOS	NO-Synthase
PETN	Nitropenta
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Phosphokinase B
PKC	Phosphokinase C
PKG	Phosphokinase G
PLC	Phospholipase C
ROS	Reactive oxygen species
sGC	lösliche Guanylatcyclase
S.E.M	Standardfehler
SNP	Natrium-Nitroprussid
SOD	Superoxiddismutase
TTS	Transdermales Therapeutisches System
U-46619	9,11-Dideoxy-11 α ,9 α epoxymethanprostaglandin F _{2α}
XOR	Xanthinoxidoreduktase

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei O.Univ.Prof.Dr. Bernhard-Michael Mayer und Gerald Wölkart für Ihre Unterstützung während meiner Arbeit am Institut bedanken.

Besonderer Dank gilt vor allem meiner Familie, die es mir ermöglichte meine Ziele zu erreichen und auf deren Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte.

Zuletzt möchte ich mich bei Mag. Brigitte Baresch bedanken, ohne die ich diesen Weg wahrscheinlich niemals eingeschlagen hätte.

9 Literaturverzeichnis

- [1] B. Mayer und B. Hemmnes, „Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells,“ *TIBS*, pp. 477-481, December 1997.
- [2] M. Haynes, D. Sinha, K. Russell, M. Collinge, D. Fulton, M. Morales-Ruiz, W. Sessa und J. Bender, „Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells,“ *Circ. Res.*, pp. 667-682, 2000.
- [3] Y. Boo, G. Sorescu, N. Boyd, I. Shiojimas, K. Walsh, J. Du und H. Jo, „Shear Stress Stimulates Phosphorylation of Endothelial Nitric-oxide Synthase at Ser1179 by Akt-independent Mechanisms: Role of Protein Kinase A,“ *J. Bio. Chem.*, pp. 3388-3396, 2002.
- [4] M. Gladwin und D. Kim-Shapiro, „Nitric oxide caught in traffic,“ *Nature*, pp. 344-345, 15 November 2012.
- [5] B. Fritz, S. Roberts, A. Ahmed, L. Breci, W. Li, A. Weichsel, J. Brailey, V. Wysocki, F. Tama und M. W.R., „Molecular Model of a Soluble Guanylyl Cyclase Fragment Determined by Small-Angle X-ray Scattering and Chemical Cross-Linking,“ *Biochem.*, pp. 1568-1582, 2013.
- [6] M. Hönicka und R. Gerzer, „Lösliche Guanylylzyklen - Schlüsselenzyme im therapeutischen Einsatz des Prinzips NO,“ *Internist*, pp. 427-437, 1997.
- [7] L. Ignarro, B. Barry, D. Gruetter, J. Edwards, E. Ohlstein, C. Gruetter und W. Barcios, „Guanylatecyclase activation by nitroprusside and nitrosoguanidine is related to formation of S-nitrosothiol intermediates,“ *Biochem. Biophys. Res. Com.*, pp. 93-100, 1980.
- [8] F. Hofmann, R. Feil, T. Kleppisch und J. Schlossmann, „Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion,“ *Phys. Rev.*, pp. 1-23, 2006.
- [9] N. Marsh und A. Marsh, „A short history of nitroglycerin and nitric oxide in pharmacology and physiology,“ *Clin. Exp. Pharmacol. P.*, pp. 313-319, 2000.
- [10] T. Münzel, A. Daiber und A. Mülsch, „Explaining the Phenomenon of Nitrate Tolerance,“ *Circ. Res.*, pp. 618-628, 2005.
- [11] P. Needleman und J. Krantz, „The biotransformation of nitroglycerin,“ *Biochem. Pharmacol.*, pp. 1229-1230, 1965.
- [12] B. Waldeck, „Failure to demonstrate monoamin oxidase inhibition by glyceryl trinitrate in vivo,“ *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, pp. 406-412, 1970.
- [13] N. Lee und F. Belpaire, „Biotransformation of nitroglycerin by organic nitrate reductase,“ *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, pp. 165-196, 1972.

- [14] R. Furchgott und J. Zawadzki, „The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine,“ *Nature*, pp. 373-376, 1980.
- [15] A. Schäfer, R. Alexander und R. Handin, „Inhibition of platelet function by organic nitrate vasodilators,“ *Blood*, pp. 649-654, 1980.
- [16] B. Bennett, K. Nakatsu, J. Brien und G. Marks, „Biotransformation of glyceryl trinitrate to glyceryl dinitrate by human hemoglobin,“ *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, pp. 704-706, 1984.
- [17] W. Martin, G. Villani, D. Jothianandan und R. Furchgott, „Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta,“ *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 708-716, 1985.
- [18] B. Bennett, J. Brien, K. Nakatsu und G. Marks, „Role of hemoglobin in the differential biotransformation of glyceryl trinitrate and isosorbide dinitrate by human erythrocytes,“ *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 228-232, 1985.
- [19] B. Bennett, S. Kobus, J. Brien, K. Nakatsu und G. Marks, „Requirement for reduced, unliganded hemoprotein for the hemoglobin- and myoglobin mediated biotransformation of glyceryl trinitrate,“ *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 629-635, 1986.
- [20] D. Servent, M. Delaforge, C. Ducrocq, D. Mansuy und M. Lenfant, „Nitric oxide formation during microsomal denitration of glyceryl trinitrate: Involvement of cytochrome P450,“ *Biochem. Biophys. Res. Com.*, pp. 1210-1216, 1989.
- [21] F. Selke, P. Myers, J. Bates und D. Harrison, „Influence of vessel size on the sensitivity of porcine coronary microvessels to nitroglycerin,“ *Biochem. Biophys. Res. Com.*, pp. 1210-1216, 1989.
- [22] B. McDonald und B. Bennett, „Cytochrome P-450 mediated biotransformation of organic nitrates,“ *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, pp. 1552-1557, 1990.
- [23] J. Abrams, „Interaction between organic nitrates and thiol groups,“ *Am. J. Cardiol.*, pp. 106-112, 1991.
- [24] M. Sakanashi, T. Matsuzaki und Y. Aniya, „Nitroglycerin relaxes coronary artery of the pig with no change in glutathione content of glutathione S-transferase activity,“ *Br. J. Pharmacol.*, pp. 1905-1908, 1991.
- [25] B. Bennett, B. McDonald und M. StJames, „Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate,“ *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 716-723, 1992.
- [26] S. Chung, C. S., P. Seth, C. Jung und H. Fung, „Conversion of nitroglycerin to nitric oxide in microsomes of the bovine coronary artery smooth muscle is not primarily mediated by glutathione S-transferases,“ *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 652-659, 1992.
- [27] D. Lau und L. Benet, „Effects of sulfobromophthalein and ethacrynic acid on glyceryl trinitrate

- relaxation," *Biochem. Pharmacol.*, pp. 2247-2254, 1992.
- [28] H. Schröder, „Cytochrome P-450 mediates bioactivation of organic nitrates," *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 298-302, 1992.
- [29] Z. Liu, J. M. G. Brien, B. McLaughlin und K. Nakatsu, „Lack of evidence for the involvement of cytochrome P-450 or other hemoproteins in metabolic activation of glyceryl trinitrate in rabbit aorta," *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 1432-1439, 1993.
- [30] R. Nigam, T. Whitting und B. Bennett, „Effect of inhibitors of glutathione S-transferase on glyceryl trinitrate activity in isolated rat aorta," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, pp. 179-184, 1993.
- [31] J. McGuire, D. Anderson und B. Bennett, „Inhibition of the biotransformation and pharmacological actions of glyceryl trinitrate by the flavoprotein inhibitor, diphenyleneiodonium sulfate," *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 708-714, 1994.
- [32] R. Wheatley, S. Dockery, M. Kurz, H. Sayegh und D. Harrison, „Interactions of nitroglycerin and sulfhydryl-donating compounds in coronary microvessels," *Am. J. Physiol.*, pp. 291-297, 1994.
- [33] B. McDonald, G. Monkewich, P. Long, D. Anderson und P. B. B. Thomas, „Effect of dexamethasone treatment on the bioactivation of glyceryl trinitrate: Cytochrome P450 3A1 mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, pp. 1513-1520, 1994.
- [34] M. Braun, T. Grosser und K. Schrör, „Bioactivation of nitroglycerin in vascular smooth muscle cells is different from that in non-vascular tissue," *Eu. J. Pharmacol.*, pp. 239-245, 1995.
- [35] T. Münzel, H. Sayegh, B. Freeman, M. Tarpey und D. Harrison, „Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance," *J. Clin. Invest.*, pp. 187-194, 1995.
- [36] D. Bell, H. Rensberger, D. Koritnik und A. Koshy, „Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries," *Am. J. Physiol.*, pp. 337-383, 1995.
- [37] Y. Aniya, N. Uehara, C. Ishii, T. Suenaga, N. Wada, T. Matsuzaki und M. Sakanashi, „Evaluation of nitric oxide formation from nitrates in pig coronary arteries," *Jap. J. Pharmacol.*, pp. 101-107, 1996.
- [38] A. Hussain, J. Brien, G. Marks und K. Nakatsu, „Superoxide does not inhibit glyceryl trinitrate-rabbit aortic strip-mediated relaxation of rabbit *Taenia coli*: Evidence against a role for nitric oxide itself as the smooth muscle active drug metabolite?," *Drug Metab. Dispos.*, pp. 780-785, 1996.
- [39] R. Nigam, D. Anderson, S. Lee und B. Bennett, „Isoform-specific biotransformation of glyceryl trinitrate by rat aortic glutathione S-transferases," *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 1527-1534, 1996.

- [40] R. Yuan, M. Sumi und L. Benet, „Investigation of Aortic CYP3A Bioactivation of Nitroglycerin In Vivo,“ *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 1499-1505.
- [41] A. Hussain, T. Abu-Zahra, J. Brien, G. Marks und K. Nakatsu, „Thiol agents potentiate glyceryl trinitrate mediated relaxation of rabbit taenia coli: Evidence for thiol-dependent biotransformation,“ *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, pp. 807-811, 1997.
- [42] D. Laight, M. Carrier und E. Anggard, „Investigation of role for oxidant stress in vascular tolerance development to glyceryl trinitrate in vitro,“ *Br. J. Pharmacol.*, pp. 1477-1482, 1997.
- [43] B. Hinz und H. Schröder, „Vitamin C attenuates nitrate tolerance independently of its antioxidant effect,“ *FEBS Letters*, pp. 97-99, 1998.
- [44] J. McGuire, D. Anderson, B. McDonald, R. Narayanasami und B. Bennett, „Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenylethidium sulfate,“ *Biochem. Pharmacol.*, pp. 881-893, 1998.
- [45] P. Wong und J. Fukuto, „Reaction of organic nitrate esters and S-nitrosothiols with reduced flavins: A possible mechanism of bioactivation,“ *Drug Metab. Dispos.*, pp. 502-509, 1999.
- [46] Z. Chen, J. Zhang und J. Stamler, „Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, pp. 8306-8311, 11 Juni 2002.
- [47] V. Mollace, C. Muscoli, M. Iannone, E. Palma, D. Rotiroti, F. Romeo, R. Nistico und D. Salvemini, „Dexamethasone inhibits the inducible bioconversion of glyceryl trinitrate to nitric oxide,“ *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, pp. 544-551, 2002.
- [48] T. Matsuzaki, M. Skanashi, J. Nakasone, K. Noguchi, K. Miyagi, M. Skanashi, I. Kukita, Y. Aniya und M. Sakanashi, „Effects of Glutathione S-Transferase Inhibitors on Nitroglycerin Action in Pig Isolated Coronary Arteries,“ *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, pp. 1091-1095, 2002.
- [49] A. Kleschyov, M. Ölze, A. Daiber, Y. Huang, H. Mollnau, E. Schulz, K. Sydow, B. Fichtelscherer, A. Mülsch und T. Münzel, „Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin?,“ *Circ. Res.*, pp. 104-112, 2003.
- [50] J. Zhang, Z. Chen, F. Cobb und J. Stamler, „Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin-induced vasodilation of coronary and systemic vessels: An intact canine model,“ *Circulation*, pp. 750-755, 2004.
- [51] A. Kollau, A. Hofer, M. Russwurm, D. Kösling, W. Keung, K. Schmidt, F. Brunner und B. Mayer, „Contribution of aldehyde dehydrogenase to mitochondrial bioactivation of nitroglycerin: Evidence for the activation of purified soluble guanylate cyclase through direct formation of nitric oxide,“ *Biochem. J.*, pp. 769-777, 1 Februar 2005.
- [52] Y. Ji und B. Bennett, „Biotransformation of glyceryl trinitrate by rat hepatic microsomal glutathione S-transferase 1,“ *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 1050-1056, 2006.

- [53] K. Szöcs, B. Lassegue, P. Wenzel, M. Wendt, A. Daiber, M. Ölze, T. Meinertz, T. Münzel und S. Baldus, „Increased superoxide production in nitrate tolerance is associated with NAD(P)H oxidase and aldehyde dehydrogenase 2 downregulation,“ *J. Mol. Cell. Cardiol.*, pp. 1111-1118, 2007.
- [54] Y. Minamiyama, S. Takemura, S. Imaoka, Y. Funae und S. Okada, „Cytochrome P450 is responsible for nitric oxide generation from NO-aspirin and other organic nitrates,“ *Drug Metab. Pharmacokin.*, pp. 15-19, 2007.
- [55] A. Kollau, M. Beretta, A. Gorren, M. Russwurm, D. Kösling, K. Schmidt und B. Mayer, „Bioactivation of nitroglycerin by ascorbate,“ *Mol. Pharmacol.*, pp. 191-196, 2007.
- [56] M. Beretta, K. Gruber, A. Kollau, M. Russwurm, D. Kösling, W. Gössler, M. Wing, K. Schmidt und B. Mayer, „Bioactivation of nitroglycerin by purified mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenases,“ *J. Bio. Chem.*, pp. 17873-17880, 27 Juni 2008.
- [57] A. Kollau, M. Beretta, M. K. D. Russwurm, W. Keung, K. Schmidt und B. Mayer, „Mitochondrial nitrite reduction coupled to soluble guanylate cyclase activation: Lack of evidence for a role in the bioactivation of nitroglycerin,“ *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, pp. 53-60, 2009.
- [58] X. Zhang, L. Chang, Y. Zhang, S. Deng, Y. Li und J. Peng, „Comparing the role of glutathione-S-transferase and mitochondria aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin biotransformation and the correlation with calcitonin gene-related peptide,“ *Eu. J. Pharmacol.*, pp. 97-101, 2009.
- [59] M. Beretta, G. Wölkart, M. Scherthner, M. Griesberger, R. Neubauer, K. Schmidt, M. Sacherer, F. Heinzl, S. Kohlwein und B. Mayer, „Vascular Bioactivation of Nitroglycerin Is Catalyzed by Cytosolic Aldehyde Dehydrogenase-2,“ *Circ. Res.*, pp. 385-393, 2012.
- [60] R. Neubauer, A. Neubauer, G. Wölkart, C. Schwarzenegger, B. Lang, K. Schmidt, M. Russwurm, D. Kösling, A. Gorren, A. Schrammel und B. Mayer, „Potent Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase-2 by Diphenyliodonium: Focus on Nitroglycerin Bioactivation,“ *Mol. Pharmacol.*, pp. 407-414, September 2013.
- [61] A. Seabra, M. Ouellet, M. Antonic, M. Chretien und A. English, „Catalysis of nitrite generation from nitroglycerin by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),“ *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, pp. 116-122, 2013.
- [62] S. Lin, N. Page, S. Fung und H. Fung, „In vitro organic nitrate bioactivation to nitric oxide by recombinant aldehyde dehydrogenase 3A1,“ *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, pp. 137-143, 2013.
- [63] R. Neubauer, G. Wölkart, M. Opelt, C. Schwarzenegger, M. Hofinger, A. Neubauer, A. Kollau, K. Schmidt, A. Schrammel und B. Mayer, „Aldehyde dehydrogenase-independent bioactivation of nitroglycerin in porcine and bovine blood vessels,“ *submitted*, 2014.
- [64] T. Csont und P. Ferdinandy, „Cardioprotective effects of glyceryl trinitrate: beyond vascular

- nitrate tolerance," *Pharmacol. Therapeut.*, pp. 57-68, 2005.
- [65] N. Page und H.-L. Fung, „Organic Nitrate Metabolism and Action: Toward a Unifying Hypothesis and the Future - A Dedication to Professor Leslie Z. Benet," *J. Pharm. Sci.*, pp. 3070-3081, 2013.
- [66] A. Daiber, P. Wenzel, M. Oelze und T. Münzel, „New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance," *Clin. Res. Cardiol.*, pp. 12-20, 2008.
- [67] J. Abrams, „Beneficial action of nitrates in cardiovascular disease," *Am. J. Cardiol.*, pp. 31-37, 1996.
- [68] I. De La Lande, T. Philip, I. Stafford und J. Horowitz, „Lack of inhibition of glyceryl trinitrate by diphenyleniodonium in bovine coronary artery," *Eu. J. Pharmacol.*, pp. 347-350, 1996.
- [69] W. Müller-Esterl, U. Brandt, O. Anderka und S. Kerscher, *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 2. Hrsg., Heideberg: Springer Akademischer Verlag, 2011.
- [70] D. Servent, M. Delaforge, C. Ducrocq, D. Mansuy und M. Lenfant, „Nitric Oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: involvement of cytochrome P-450," *Biochem. Biophys. Res. Com.*, pp. 1210-1216, 1989.
- [71] B. Bennett, B. McDonad und M. St.James, „Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate," *J. Pharm. Exp. Ther.*, pp. 716-723, 1992.
- [72] B. Bennett, B. McDonald, R. Nigam, P. Long und W. Simon, „Inhibition of nitrovasodilator- and acetylcholine-induced relaxation and cyclic cGMP accumulation by cytochrome P-450 substrate, 7-ethoxyresorufin," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, pp. 1297-1303, 1992.
- [73] B. McDonald und B. Bennett, „Cytochrome P-450 mediated biotransformation of organic nitrates," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, pp. 1552-1557, 1990.
- [74] Y. Minamiyama, S. Takemura, Y. Nishino und S. Okada, „Organic nitrate tolerance is induced by degradation of some cytochrome P450 isoforms," *Redox Report*, pp. 339-342, 2002.
- [75] A. Mülsch, A. Bara, P. Mordvintcev, A. Vanin und R. Busse, „Specificity of different organic nitrates to elicit NO formation in rabbit vascular tissue and organs in vivo," *Br. J. Pharmacol.*, pp. 2743-2749, 1995.
- [76] Y. Minamiyama, S. Takemura, T. Akiyama, S. Imaoka, M. Inoue, Y. Funae und S. Okada, „Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels," *FEBS Letters*, pp. 165-169, 1999.
- [77] D. Dourado, P. Fernandes und M. Ramos, „Mammalian cytosolic glutathione transferases," *Curr. Protein Pept. Sc.*, pp. 325-337, 2008.
- [78] D. Lau und L. Benet, „Differential formation of dinitrate metabolites from glyceryl trinitrate in

- subcellular fractions of rabbit liver," *Biochem. Pharmacol.*, pp. 543-546, 1989.
- [79] D. Lau und L. Benet, „Nitroglycerin metabolism in subcellular fractions of rabbit liver. Dose dependency of glyceryl dinitrate formation and possible involvement of multiple isozymes of glutathione S-transferases," *Drug Metab. Dispos.*, pp. 292-297, 1990.
- [80] D. Lau, E. Chan und L. Benet, „Glutathione S-transferase-mediated metabolism of glyceryl trinitrate in subcellular fractions of bovine coronary arteries," *Pharm. Res.*, pp. 1460-1464, 1992.
- [81] S. Kenkare und L. Benet, „Tolerance to nitroglycerin in rabbit aorta: Investigating the involvement of the mu isozyme of glutathione S-transferases," *Biochem. Pharmacol.*, pp. 1357-1363, 1996.
- [82] S. Tsuchida, T. Maki und K. Sato, „Purification and characterization of glutathione transferases with an activity toward nitroglycerin for human aorta and heart. Multiplicity of the human class Mu forms," *J. Bio. Chem.*, pp. 7150-7151, 1990.
- [83] W. Haefeli, N. Srivastava, K. Kelsey, J. Wiencke, B. Hoffmann und T. Blaschke, „Glutathione S-transferase μ polymorphism does not explain variation in nitroglycerin responsiveness," *Clin. Pharm. Ther.*, pp. 463-468, April 1993.
- [84] M. Kurz, T. Boyer, R. Whalen, T. Peterson und D. Harrison, „Nitroglycerin metabolism in vascular tissue: role of glutathione S-transferases and relationship between NO• and NO₂-formation," *Biochem. J.*, pp. 545-550, 1993.
- [85] H. Birnboim und H. Privora, „Depletion of Intracellular Glutathione Reduces Mutations by Nitric Oxide-Donating Drugs," *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, pp. 496-504, 2000.
- [86] C. Iwata, X. Wang, K. Uchida, N. Nakanishi und Y. Hattori, „Buthionine sulfoximine causes endothelium dependent hyper-relaxation and hypoadiponectinemia," *Life Sciences*, pp. 873-878, 2007.
- [87] S. Omar und A. Webb, „Nitrite reduction and cardiovascular protection," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, pp. 57-69, 2014.
- [88] D. Kim-Shapiro und M. Gladwin, „Mechanisms of nitrite bioactivation," *Nitric Oxide*, pp. 58-68, 2014.
- [89] A. Webb, R. Bond, P. McLean, R. Uppal, N. Benjamin und A. Ahluwalia, „Reduction of nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, pp. 13683-13688, 2004.
- [90] A. Webb, A. Ahluwalia und L. Ignarro, „Mechanisms of nitrite reduction in ischemia in the cardiovascular system," *Nitric oxide: Biology and pathobiology*, 2010.

- [91] H. Li, A. Samouilov, X. Liu und J. Zweier, „Characterization of the Effects of Oxygen on Xanthin Oxidase-mediated Nitric Oxide Formation,“ *J. Bio. Chem.*, pp. 16939-16946, 2004.
- [92] S. Roy, S. Khanna, S. Bickerstaff, S. Subramanian, M. Atalay, M. Bierl, S. Pendyala, D. Levy, N. Sharma, M. Venojarvi, A. Strauch, C. Orosz und C. Sen, „Oxygen Sensing by Primary Cardiac Fibroblasts,“ *Circ. Res.*, pp. 264-271, 2003.
- [93] T. Millar, C. Stevens, N. Benjamin, R. Eisenthal, R. Harrison und D. Blake, „Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions,“ *FEBS Letters*, pp. 225-228, 1998.
- [94] Y. Azarmi, H. Babaei, F. Alizadeh, A. Gharebageri, D. Fouladi und E. Nikkhah, „Allopurinol prevents nitroglycerin-induced tolerance in rat thoracic aorta,“ *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, pp. 113-119, 2014.
- [95] E. Klemenska und A. Beresewicz, „Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance,“ *Cardiology Journal*, pp. 11-19, 2009.
- [96] I. De la Lande, T. Siebert, C. Bennett, I. Stafford und J. Horowitz, „Influence of the endothelium on ex vivo tolerance and metabolism of glyceryl trinitrate in rat aorta,“ *Eu. J. Pharmacol.*, pp. 201-207, 2004.
- [97] U. Thadani, „Nitrate tolerance, rebound, and their clinical relevance in stable angina pectoris, unstable angina, and heart failure,“ *Cardiovasc. Drugs Ther.*, pp. 735-742, 1997.
- [98] Drugbank, „Drugbank,“ 2005. [Online]. Available: <http://www.drugbank.ca/drugs/APRD00455>. [Zugriff am 13 März 2014].
- [99] C. Li und M. Rand, „Inhibition of NO-mediated responses by 7-ethoxyresorufin, a substrate and competitive inhibitor of cytochrome P450,“ *Br. J. Pharmacol.*, pp. 57-62, 1996.
- [100] H. Birnboim und H. Privora, „Depletion of Intracellular Glutathione Reduces Mutations by Nitric Oxide-Donating Drugs,“ *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, pp. 496-504, 2000.
- [101] E. Mutscher, H. Schaible und P. Vaupel, „Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen,“ 6. Hrsg., Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2007, p. 61; 73; 647.
- [102] C. Grütter und S. Lemke, „Effect of sulfhydryl reagents on nitroglycerin-induced relaxation of bovine coronary artery,“ *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, pp. 1395-1401, 1986.
- [103] A. Lass, A. Süssenbacher, G. Wölkart, B. Mayer und F. Brunner, „Functional and Analytical Evidence for Scavenging of Oxygen Radicals by L-Arginine,“ *Mol. Pharmacol.*, pp. 1081-1088, 2002.
- [104] M. Radomski, R. Palmer und S. Moncada, „Characterization of the L-arginine : nitric oxide pathway in human platelets,“ *Br. J. Pharmacol.*, pp. 325-328, 1990.

- [105] T. Philipp, „Von Nobel bis Viagra: Die Geschichte eines kleinen Moleküls mit großer Wirkung: Stickstoffmonoxyd (NO),“ *Austrian Journal of Hypertension*, Nr. 22-29, 2010.
- [106] L. Ignarro, „Regulation of Cytosolic Guanylyl Cyclase by Porphyrins and Metalloporphyrins,“ *Advances in Pharmacology*, pp. 35-65, 1994.
- [107] T. Münzel, A. Daiber und A. Mülsch, „Explaining the Phenomenon of Nitrate Tolerance,“ *Circulation Research*, pp. 618-628, 2005.
- [109] L. Wang, Y. Yang, S. Dwivedi, Y. Xu, E. Chu, J. Li, K. Fitchett und P. Boor, „Manipulating glutathione-S-transferases may prevent the development of tolerance to nitroglycerin,“ *Cardiovascular Toxicology*, pp. 131-144, June 2006.
- [110] W. Lee und H. Fung, „Mechanism-based partial inactivation of glutathione S-transferases by nitroglycerin: tyrosine nitration vs sulfhydryl oxidation,“ *Nitric Oxide*, pp. 103-110, 21 October 2003.
- [111] J. Doel, B. Godber, R. Eisenthal und R. Harrison, „Reduction of organic nitrates catalysed by xanthine oxidoreductase unter anarobic conditions,“ *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 81-87, 2001.
- [112] S. Mattapally und S. Banerjee, „Nitric Oxide: Redox Balance, Protein Modifikation and Therapeutic Potential in Cardiovascular System,“ *The IIOAB Journal*, pp. 29-38, 2011.
- [113] S. Moncada und E. Higgs, „The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology,“ *Br. J. Pharmacol.*, pp. 193-201, 2006.
- [114] S. Moncada, D. Rees, R. Schulz und R. Palmer, „Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, pp. 2166-2170, 1990.