

**Einfluss von NO-Donoren und NO-Donor-Prodrugs auf  
die Permeabilität eines Modells der Blut-Hirn-Schranke  
aus primären Schweinehirnendothelzellen**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2008

von Sven Winter

geboren am 18. 08. 1975 in Bautzen

1. Gutachter: Prof. Dr. Alfred Fahr, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Lehmann, Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker, Heidelberg

Datum der öffentlichen Verteidigung: 24. November 2008

### **Wissenschaft und Tapferkeit**

bauen die Größe auf. Sie machen unsterblich, weil sie es sind. Jeder ist soviel, als er weiß, und der Weise vermag alles. Ein Mensch ohne Kenntnisse – eine Welt im Finstern. Einsicht und Kraft: Augen und Hände. Ohne Mut ist das Wissen unfruchtbar!

Baltasar Gracián



# Widmung

Diese Arbeit ist meinen Eltern Christian und Martina Winter sowie meinen Großeltern Hildegard und Arno Winter gewidmet.



# Danksagung

Ich danke meinen Eltern und meinen Großeltern für ihre Unterstützung, ihren Rückhalt in allen Situationen und für ihre unendliche Geduld.

Herrn Prof. Dr. Alfred Fahr danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, der Möglichkeit, Kongresse und Seminare besuchen zu können, die mir die Möglichkeit gaben, zusätzliche Hilfe bei meiner Arbeit zu finden.

Herrn Prof. Dr. Lehmann und Herrn Prof. Dr. Fricker danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Meinen Kollegen danke ich für die schöne Zeit, die ich mit ihnen zusammen verbringen durfte, für den Spaß und die gemeinsamen Grillfeste. Außerdem danke ich ihnen für die Hilfe bei meinen Arbeiten, der Unterstützung im Zellkulturlabor und auch bei den nicht immer einfachen Extraktionen.

Isabella Klein danke ich für ihre unermüdliche Hilfe bei den Extraktionen, ohne die diese Arbeit nicht so schnell vollendet hätte werden können.

Ich danke Dr. Jörg Konter dafür, dass er mir die Substanzen zur Verfügung gestellt hat, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können und für seine Mitarbeit bei den Postern und der aus dieser Arbeit entstandenen Publikation, sowie seine stetige Kooperationsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Gert Fricker danke ich für die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf dem von ihm organisierten Blut-Hirn-Schranken-Expertentreffen in Bad Herrenalb vorstellen zu dürfen.

Der Firma biolitec AG danke ich für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.



# Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
1. Blut-Hirn-Schranke.....	1
1.1. Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke.....	1
1.2. Blut-Hirn-Schranken-Modelle.....	3
1.2.1. Verwendete Zellen.....	3
1.2.1.1. Isolierte Gehirnkapillaren.....	4
1.2.1.2. Primärzellen.....	4
1.2.1.3. Zelllinien.....	5
1.2.2. Zellkulturmodelle.....	7
1.2.2.1. Ein-Zell-Modelle.....	7
1.2.2.2. Co-Kultur-Modelle.....	8
1.2.2.3. Drei-Zell-Kultur-Modelle.....	9
1.2.3. Bestimmung der Dichtigkeit von Endothelzellmonolayern.....	9
1.2.3.1. TEER-Messung.....	9
1.2.3.2. Einsatz von Markersubstanzen.....	9
2. NO-Donoren.....	10
2.1. Wirkung.....	10
2.2. Physiologische Wirkungen von NO.....	10
2.3. Cytotoxizität.....	11
2.4. Cytoprotektion.....	11
2.5. Permeabilitätsbeeinflussung von Endothelgeweben.....	12
2.6. Anwendung.....	13
2.7. Untersuchte NO-Donoren.....	14
2.7.1. Diazeniumdiolate.....	14
2.7.2. Diazeniumdiolat-Prodrugs.....	15
2.7.3. Pentaerythryltetranitrat (PETN).....	16
2.7.4. NO-Donor-Scavenger-Substanzen.....	17
3. Zielstellung dieser Arbeit.....	18
Material und Methoden.....	19
1. Kultivierungsmedien, Pufferlösung und sonstige Lösungen .....	19
1.1. Pufferlösungen.....	19
1.2. Zellkulturmedien.....	19
1.3. Sonstige Lösungen.....	20
2. Gewinnung der Schweinehirnendothelzellen.....	21
3. Kultivierung der Primären Schweinehirnendothelzellen.....	22
4. Isolierung von Rattenschwanzkollagen.....	22
4.1. Kollagenbeschichtung von Zellkulturflaschen, Inserts und Deckgläschen.....	23
5. Färbung der Endothelzellen mittels Antikörper.....	23
6. Carboxyfluorescein-Fluß-Untersuchungen.....	24
6.1. Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstandes.....	24
6.2. Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten $P_{app}$ .....	25
6.2.1. Berechnungsmethode 1.....	25
6.2.2. Berechnungsmethode 2.....	25
6.3. Berechnung der AUC (area under the curve).....	26
6.4. Berechnung der $f_1$ - und $f_2$ -Faktoren.....	26

7. Bestimmung des Einflusses von NO-Donoren auf den Fluß von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer.....	27
8. Oxyhämoglobingewinnung.....	28
8.1. Gewinnung von Hämoglobin aus Vollblut.....	28
8.2. Gewinnung des Oxyhämoglobins aus Hämoglobin.....	28
8.3. Bestimmung des Oxyhämoglobingehaltes.....	29
9. Cytotoxizitätsuntersuchung.....	30
9.1. Prinzip des Cytotoxizitätstests.....	30
9.2. Durchführung des Cytotoxizitätstests.....	30
10. Vitalitätsuntersuchung.....	31
10.1. Prinzip der Vitalitätsuntersuchung.....	31
10.2. Durchführung der Vitalitätsuntersuchung.....	31
11. Substanzen und Geräte.....	32
11.1. Substanzen.....	32
11.2. Geräte.....	34
11.3. Verbrauchsmaterialien.....	36
Ergebnisse und Diskussion.....	37
1. Etablierung des Blut-Hirn-Schranken-Modells.....	37
2. NO-Donoren.....	38
2.1. Cytotoxizitätsuntersuchungen.....	38
2.1.1. Primäre Schweinehirnendothelzellen.....	38
2.1.2. Zelllinie HCMEC/D3.....	41
2.2. Vitalitätsuntersuchungen.....	42
2.2.1. Vitalitätsbeeinflussung der Endothelzellen durch verschiedene Kultivierungsmedien.....	42
2.2.2. Vitalitätsbeeinflussung der Endothelzellen durch verschiedene NO-Donoren....	44
2.3. Flußbeeinflussung durch NO freisetzende Substanzen.....	46
2.3.1. Spontan zerfallende NO-Donoren.....	46
2.3.1.1. PHEPIPERAZI/NO.....	46
2.3.1.2. DBA/NO.....	51
2.3.1.3. DETA/NO.....	54
2.3.1.4. SperminNONOat.....	58
2.3.2. NO-Donor-Prodrugs.....	61
2.3.2.1. Tosyl-PYRRO/NO.....	61
2.3.2.2. Et-PHEPIPERAZI/NO.....	65
2.3.2.3. Et-BUPIPERAZI/NO.....	68
2.3.2.4. PENT-BIS-PYRRO/NO.....	72
2.3.3. Nitrate.....	76
2.3.3.1. PETN.....	76
2.4. Zusammenfassung des Einflusses von NO-Donoren und NO-Donor-Prodrugs.....	80
2.5. Einfluss von Methylenblau.....	82
2.5.1. PHEPIPERAZI/NO.....	82
2.5.2. DBA/NO.....	84
2.5.3. DETA/NO.....	87
2.5.4. Tosyl-PYRRO/NO.....	89
2.5.5. Et-PHEPIPERAZI/NO.....	92
2.5.6. Et-BUPIPERAZI/NO.....	94
2.5.7. PETN.....	97
2.6. Zusammenfassung des Einflusses von Methylenblau.....	99

3. Oxyhämoglobin.....	101
3.1. Identität und Gehalt des gewonnenen Oxyhämoglobins.....	101
3.2. Einfluss von Oxyhämoglobin auf Schweinehirnendothelzellen.....	102
Zusammenfassung.....	105
1. NO-Donoren.....	105
2. NO-Donor-Prodrugs.....	105
3. Oxyhämoglobin.....	106
Ausblick.....	106
Literaturverzeichnis.....	107

# Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve, Fläche unter der Kurve
BBB	Blood Brain Barrier
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CR-3	rat cerebral capillary endothelial cell line, Rattenhirnkapillarendothelzelllinie
DIV-BBB	Dynamic in vitro blood-brain barrier model, dynamisches in vitro Modell der Blut-Hirn-Schranke
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FITC-Dextran	Fluoresceinisothiocyanat-Dextran
GP8/3.9	Rattenhirnendothelzelllinie
GPNT	Rattenhirnendothelzelllinie
GTN	Glyceroltrinitrat
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCMEC/D3	human cerebral microvessel cell line
HUVEC-304	Human umbilical vein endothelial cells, menschliche Nabelschnurendothelzellen
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbid-5-mononitrat
L-NMMA	NG-Mono-Methyl-Arginin
M199	Medium 199, Zellkulturmedium
MDCK	Madine Darbin Canine Kidney Zellen
NDIV-BBB	New dynamic in vitro blood-brain barrier model, neues dynamisches in vitro Modell der Blut-Hirn-Schranke
NO	Stickstoffmonoxid
$P_{app}$	Apparenter Permeationskoeffizient
PBMEC/C1-2	Primary bovine M... endothelial cells
PBS	Phosphate buffered solution, Phosphatpufferlösung
PETN	Pentaerythryltetranitrat
rBCEC4	Rattenhirnkapillarendothelzelllinie
RBE4	Rat cerebral microvessel endothelial cell line, Rattenendothelzellen
RBEC1	Rat brain endothelial cells, Rattenendothelzellen
RCE-T1	Rattenhirnkapillarendothelzelllinie
SIN-1	3-Morpholinosydnominin
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
SV-HCEC	Menschliche zerebrale Endothelzelllinie
TEER	Transendothelial Electrical Resistance, Transendothelialer elektrischer Widerstand
TR-BBB	Immortalized rat brain capillary endothelial cells, immortalisierte Rattenhirnkapillarendothelzellen
ZO-1	Zonula occludens

---

# Einleitung

## 1. Blut-Hirn-Schranke

### 1.1. Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn ist das empfindlichste Organ des menschlichen Körpers und muss deshalb besonders geschützt werden. Nicht alle Substanzen, die sich in der Blutbahn befinden, sind auch für die Zellen unseres Gehirns ungefährlich. Um sicher zu stellen, dass Substanzen nicht unkontrolliert in das Gehirn eindringen können, gibt es zwischen dem Blut und der Gehirnflüssigkeit eine wichtige Schranke. Diese gewährleistet, dass nur die Substanzen ins Gehirn gelangen können, die dieses auch für seine Funktion benötigt. Dazu zählen Nährstoffe wie Glukose, Aminosäuren und Lipide, die für die ordentliche Funktion des Gehirns von entscheidender Bedeutung sein können, Ionen, Hormone, Makromoleküle und Zellen des Immunsystems. Andere Substanzen müssen daran gehindert werden, frei in das Gehirn eindringen zu können, wie Toxine, die das Gehirn schädigen könnten [Reichel 2003]. Gleichzeitig muss diese Schranke gewährleisten, dass Abbauprodukte das Gehirn wieder verlassen können und Neurotransmitter aus dem Gehirn in das Blut übertreten können, um ihre Konzentration im Gehirn zu senken, wenn sie nicht schnell genug abgebaut werden.

Die Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke sind eng verknüpft mit den sie bildenden Zellen. Dazu zählen in erster Linie die Endothelzellen, die als dichte Zellschicht die Innenwand der kleinsten Gefäße des Gehirns, die Kapillaren auskleiden. Aber nur durch das Vorhandensein von Perizyten und Astrozyten (siehe Abb. 1) werden die Eigenschaften der Endothelzellen vollständig ausgebildet, die sie als Gehirnendothelzellen auszeichnen. Die Endothelzellen der Kapillaren im Gehirn weisen Eigenschaften auf, die man bei anderen Endothelzellen des Körpers nicht findet. Dazu zählen die besondere enzymatische Ausstattung dieser Zellen, die dichten Zell-Zell-Kontakte (tight junctions), der eingeschränkte parazelluläre Transport von Substanzen durch das Vorhandensein der dichten Zell-Zell-Kontakte und eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien [Nag 2003]. Die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke zeigen im Gegensatz zu peripheren Endothelzellen keine Fenestrierungen und eine eingeschränkte pinocytische Aktivität.

Vergesellschaftet mit den Endothelzellen findet man die Perizyten, die eng an den Endothelzellen anliegen. Dabei beträgt das Verhältnis von Endothelzellen zu Perizyten etwa 3 Endothelzellen pro Perizyt [Nag 2003, Pardridge 1999]. Die Perizyten sind mit den Endothelzellen verbunden, sodass auch kontraktile Funktionen für diese Zellen postuliert wurden. Diese kontraktile Funktion kann aber nur dann ausgeübt werden, wenn von den Perizyten auch tatsächlich das Protein  $\alpha$ -Actin ausgebildet wird, was in gesundem Gewebe nicht der Fall ist [Pardridge 1999]. Außerdem werden den Perizyten noch Funktionen bei der Regulierung von Endothelzellaktivitäten sowie eine Rolle bei Entzündungsgeschehen zugeschrieben [Nag 2003].

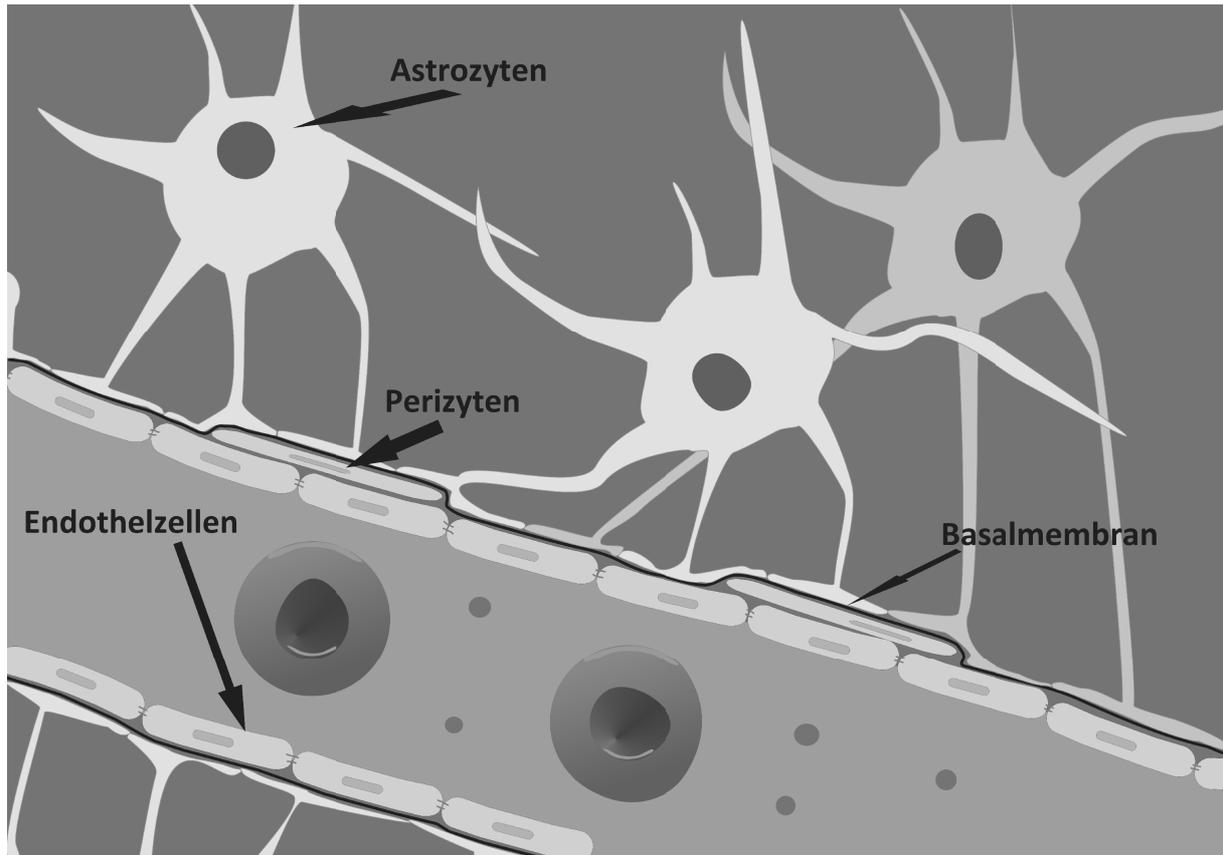


Abb. 1: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Die dritte Zellart, die für den Aufbau der biologischen Blut-Hirn-Schranke notwendig ist, stellen die Astrozyten dar. Die Astrozyten bedecken 99 % der Fläche der dem Gehirn zugewandten Seite der Kapillaren. Ein Astrozyt sendet dabei Ausläufer zu jeweils nur einer Endothelzelle. Endothelzellen könne aber im Gegensatz dazu von mehreren Astrozytenausläufer („foot processes“) bedeckt werden [Kacem 1998, Pardridge 1999]. Dabei stellen die Astrozyten anders als die Endothelzellen keinen Beitrag zur Bildung der Blut-Hirn-Schranke, auch wenn sie den Großteil der Endothelzellen bedecken. Ihre Aufgabe ist die Induktion der Bildung der endothelialen Eigenschaften im Laufe der Entwicklung des Organismus. Diese Eigenschaft wird auch ausgenutzt, wenn man den Verlust von endothelialen Eigenschaften im Verlauf der Kultivierung primärer Endothelzellen aufhalten möchte. Dazu werden die Endothelzellen mit Astrozyten, mit Astrozytenzelllinien oder Gliomazellen co-kultiviert. Die positiven Effekte auf die endothelialen Eigenschaften konnten deutlich gezeigt werden [Dehouck 1994, Rubin 1991, Sobue 1999].

Perizyten und Endothelzellen werden von einer Basalmembran umschlossen, welche die beiden Zellarten vom sie umgebenden extrazellulären Raum trennt. Wie in Abb. 1 zu erkennen ist, findet sich die Basalmembran oder auch Basallamina genannt nur auf der dem Gehirn zugewandten Seite. Sie wird gleicherweise gebildet von den Astrozyten und den Endothelzellen und erreicht eine Stärke von etwa 30-40 nm [Nag 2003]. Die Basalmembran besteht aus verschiedenen Substanzen, darunter unter anderem Laminin [Timpl 1982], Kollagen IV [Timpl 1981], Proteoglycan [Timpl 1993], Heparansulfat, Fibronectin, Nidogen sowie Entactin. Die Basallamina formt eine negativ geladene Barriere, die aufgrund dieser Ladung die Passage von großen geladenen

Molekülen reguliert. Gleichzeitig ist die Basalmembran in der Lage, Wachstumsfaktoren und verschiedene Proteasen zu speichern [Nag 2003, Timpl 1993].

## 1.2. Blut-Hirn-Schranken-Modelle

Werden neue Arzneimittel oder neue Darreichungs- oder Vehikelformen entwickelt, so ist es nötig, diese auch vor der Anwendung am Patienten zu testen. Da nicht alle Untersuchungen (pharmakologische wie auch biopharmazeutische) am Tier durchgeführt werden können, aus Kostengründen wie aus ethischen Gründen, wird versucht, in-vitro Modelle aufzubauen, die die Eigenschaften der im Körper vorhandenen Blut-Hirn-Schranke so genau wie möglich nachbilden. Diese Modelle unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten Zellen sowie in der Anzahl der unterschiedlichen Zellen, die eingesetzt werden. Die einfachsten Modelle werden durch das Züchten einer Monolayerschicht aus Endothelzellen gebildet. Um diese Modelle noch stärker an die biologische Situation anzupassen, können die Endothelzellen auch in Gesellschaft von Astrozyten oder Perizyten gezüchtet werden, den Zellen, mit denen sie auch in vivo direkt vergesellschaftet sind.

Die Vielfalt der zur Zeit verwendeten Modelle, die alle nur Teilaspekte der biologischen Blut-Hirn-Schranke widerspiegeln können, erlaubt eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungen. Blut-Hirn-Schranken-Modelle können eingesetzt werden, um die Permeabilität von neuen Substanzen zu testen, sie werden benutzt, um den Aufnahmemechanismus von Substanzen und Carriersystemen in Endothelzellen zu untersuchen, es können aktive Effluxmechanismen untersucht werden. Des Weiteren werden an diesen Modellen Untersuchungen zu Beeinflussungen von Endothelzellen durch verschiedene Einflussfaktoren (Substanzen, Zellen, Carriersysteme für Substanzen) durchgeführt. [Reichel 2003]

### 1.2.1. Verwendete Zellen

Grundsätzlich kann man die Modelle nach dem Ursprung der eingesetzten Zellen unterscheiden, um die Blut-Hirn-Schranke zu simulieren. Dabei können entweder Primärzellen oder Zellen aus Zelllinien eingesetzt werden, um ein Modell der Blut-Hirn-Schranke aufzubauen. Primärzellen werden direkt aus dem Gewebe, d. h. in diesem Fall direkt aus dem Gehirn gewonnen und anschließend direkt kultiviert und verwendet. Dabei wird darauf geachtet, dass diese Zellen so wenig wie möglich passagiert werden, da durch jedes Abtryspinieren und erneutes Aussäen der Zellen Eigenschaften der ursprünglichen Zellen verloren gehen können. Der Vorteil bei Einsatz von primären Zellen liegt in der Nähe zum lebenden Organismus. Diese Zellen weisen noch die stärkste Gemeinsamkeit zum In-vivo-Experiment auf, da sie einen Großteil der Eigenschaften der ursprünglichen Zellen beibehalten oder aber diese wieder induziert werden können [Reichel 2003]. Die Nachteile bei Verwendung direkt gewonnener Zellen liegt einerseits in der großen Variabilität durch ständig wechselndes Ausgangsmaterial, zum anderen in der recht aufwendigen und zeitintensiven Gewinnung dieser Zellen und der Schwierigkeit, alle kontaminierende Zellen (Perizyten, Astrozyten, Neurone, glatte Muskelzellen) aus der Kultur zu entfernen [Roux 2005].

Um das letzte Problem zu lösen, wurden verschiedene Lösungsansätze ausprobiert, wobei sich bei der Kultivierung von Ratten- und auch Schweinehirnendothelzellen der Zusatz von Puromycin zum Medium als eleganteste Methode erwiesen hat [Perrière 2005].

Es können im Gegensatz dazu auch Zelllinien eingesetzt werden, wobei hier die Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten etwas reduziert werden kann. Der Nachteil bei Benutzung von Zellen aus Zelllinien besteht darin, dass noch keine Zelllinie zur Verfügung steht, die alle Anforderungen an eine neuronale Endothelzelllinie erfüllt. Die bis jetzt zur Verfügung stehenden Zellen aus Zelllinien weisen nicht alle Eigenschaften einer Endothelzelle der Blut-Hirn-Schranke auf. Meist werden diese Zellen nicht als Monokultur gezüchtet, sondern als sehr aufwendige Co-Kultur mit Astrozyten oder Glioma-Zellen, um durch den Einfluss dieser Zellen eine Induktion der Ausbildung endothelzellspezifischer Eigenschaften herbeizuführen.

### 1.2.1.1. Isolierte Gehirnkapillaren

Der erste Schritt bei der Extrahierung von Gehirnendothelzellen ist die Isolierung der Kapillaren aus dem Gehirn. Der Vorteil bei Verwendung dieser Gehirnkapillaren für Transport- und andere Experimente anstelle der daraus noch zu gewinnenden Endothelzellen liegt in der metabolischen Aktivität der Kapillaren, die denen im lebenden Organismus entsprechen. Die Untersuchungen an Kapillaren beziehen sich z. B. auf den Transport von Substanzen von der abluminalen Seite hin zur luminalen Seite. Dies ermöglicht eine Untersuchung auf in der dem Blut zugewandten Seite der Endothelzellen enthaltene Effluxtransporter und deren Aktivität. Es ist natürlich auch möglich, diese Kapillaren aus erkrankten Individuen zu gewinnen, um so einen besseren Eindruck zu bekommen, den die Blut-Hirn-Schranke bei diesen Erkrankungen spielt. [Reichel 2003]

### 1.2.1.2. Primärzellen

Ausgehend vom Ursprung der Zellen sind Modelle zu unterscheiden, die mit Rattenhirn-, Rinderhirn-, Schweinehirn- oder menschlichen Hirnendothelzellen aufgebaut werden. In der Vergangenheit sind auch andere Spezies wie Schaf oder Hund benutzt worden, um aus deren Hirnkapillarendothelzellen Blut-Hirn-Schranken-Modelle zu bilden. Diese Modelle spielen heute aber keine Rolle mehr.

Die Modelle aus Rattenhirnendothelzellen ermöglichen eine gute Übertragbarkeit der mit diesem Modell gewonnenen Daten auf das Tierexperiment an Ratten. Sie gehören mit zu den ältesten etablierten Modellen. Ein großer Nachteil bei Verwendung dieser Zellen besteht in der nur geringen Dichtigkeit der gebildeten Monolayer, was sich in den relativ niedrigen Widerstandswerten widerspiegelt [Abbott 1997]. Deshalb können diese Zellkulturmodelle aus Ratten vor allem für Untersuchungen der Rezeptormodulation eingesetzt werden oder für Antikörperexperimente, wenn diese Antikörper z. B. noch nicht für andere Spezies wie Rind oder Schwein zur Verfügung stehen. Da bei Benutzung von Ratten die Ausbeute an Zellen wegen der geringeren Hirnmasse deutlich geringer ist (verglichen mit Gewinnung von Endothelzellen aus Schweine- oder Rinder-

hirn), stellen die beiden letztgenannten Spezies die meist verbreitete Quelle für den Aufbau von Blut-Hirn-Schranken-Modellen dar. [Reichel 2003]

Rinderendothelzellen können als Monokultur gezüchtet werden, von mehreren Arbeitsgruppen wird aber eine Co-Kultur mit Astrozyten bevorzugt. Durch diese Kultivierung soll dem Verlust von Blut-Hirn-Schranken-typischen Eigenschaften der Endothelzellen vorgebeugt werden. Durch diese Kultivierung ist eine Erhöhung des Widerstandes feststellbar. Dies führt aber nicht immer auch zu einer Senkung der Sucrosepermeabilität, die als zweites Merkmal für die Dichtigkeit der Monolayer herangezogen wird [Reichel 2003, Gaillard 2001].

Ein Modell, aufgebaut aus Schweinehirnendothelzellen, benötigt keine co-kultivierten Astrozyten, um eine hohe Dichtigkeit auszubilden. Um dies zu erreichen, ist es nur nötig, dem Kultivierungsmedium das Serum zu entziehen und zusätzlich noch Hydrocortison in physiologischen Konzentrationen hinzuzufügen. Damit werden deutlich höhere Widerstände und eine stark abgesenkte Sucrosepermeabilität erzielt. [Franke 2000]

Deutlich schwieriger ist es, an Material für den Aufbau eines Modells aus menschlichen Hirnendothelzellen zu gelangen. Da dieses Material häufig aus Autopsien oder Biopsien stammt, werden damit meist auch Untersuchungen in Hinsicht auf bestimmte Erkrankungen durchgeführt. Es können aber mit diesen Modellen menschlichen Ursprungs auch alle anderen Untersuchungen durchgeführt werden, wobei man nur beachten sollte, dass aufgrund der fragilen Natur der Zellen hier nur sehr geringe Widerstandswerte erzielt werden, sodass Untersuchungen zur Permeabilitätstestung von Substanzen nicht durchgeführt werden können. [Reichel 2003]

### 1.2.1.3. Zelllinien

Auch bei den heute zur Verfügung stehenden Zelllinien sind die Ursprünge unterschiedlicher Natur. Als Grundlage wurden Endothelzellen aus Ratte, Schwein, Rind, Maus sowie dem Menschen benutzt, die durch verschiedene Techniken (Transfektion mittels Plasmid DNA, Transfektion mittels Retroviren, Gewinnung aus transgenen Mäusen) immortalisiert wurden. Alle zur Verfügung stehenden Zelllinien sind leider nicht für Permeabilitätsuntersuchungen geeignet, da sie keine ausreichend hohe Dichtigkeit erreichen [Reichel 2003, Roux 2005].

Am weitesten verbreitet haben sich von Ratten gewonnene Zelllinien, da hier die Korrelation mit verfügbaren in-vivo Daten am besten gelingt [Roux 2005]. Es gibt deshalb eine Vielzahl von Zelllinien, die aus Rattenendothelzellen gewonnen wurden, darunter RBE4 [Roux 1994], GP8/3.9 [Greenwood 1996], GPNT [Regina 1999], RBEC1 [Kido 2000], TR-BBBs [Terasaki 2001], rBCEC4 [Blasig 2001], RCE-T1 [Mooradian 1991] und CR-3 [Lechardeur 1995]. Diese Zelllinien können eingesetzt werden, um Untersuchungen von Transportern an der Blut-Hirn-Schranke durchzuführen, sie werden benutzt, um den Arzneistofftransport bei Benutzung von Transportersystemen wie Nanopartikeln oder Liposomen über die Blut-Hirn-Schranke aufzuklären sowie um Studien über die Leukozyteninfiltration des Gehirns über die Blut-Hirn-Schranke durchzuführen [Roux 2005].

Mäuse sind die zweitwichtigste Nagerpopulation für Tierexperimente. Deswegen wurden Anstrengungen unternommen, auch aus Mäusehirnendothelzellen durch Immortalisierung Zelllinien zu gewinnen. Eine sehr weit verbreitete und gut untersuchte Zelllinie ist die B.end3 Zelllinie.

Auch bei dieser Zelllinie war es nicht möglich, die Permeabilität so zu senken, dass diese Modelle für Permeabilitätsuntersuchungen verwendet werden können. Diese Zelllinie eignet sich aber für die Durchführung von Transporterstudien [Omidi 2003].

Auch aus Schweinehirnendothelzellen wurde eine Zelllinie durch Immortalisierung mittels Transfektion mit dem Vektor SV 40 T-Antigen gewonnen, die Zelllinie PBMEC/C1-2 [Teifel 1996]. Mit PBMEC/C1-2 wurden anschließend Untersuchungen am Transwell-System zur Entwicklung eines Blut-Hirn-Schranken Modells durchgeführt [Lauer 2004, Neuhaus 2006/A]. Weiterführend wurde diese Zelllinie benutzt, um ein dreidimensionales Modell der Blut-Hirn-Schranke aufzubauen [Neuhaus 2006/B]. Da diese Zelllinie stabil über eine lange Zeit bleibt, eignet sie sich natürlich besonders gut zum Aufbau eines Screeningmodells. Die Stabilität der Zellen über längere Zeit konnte durch Untersuchungen auf endothelzellspezifische Faktoren, die sich nicht veränderten, gezeigt werden [Suda 2001].

Es wurden auch Versuche unternommen, eine menschliche Endothelzelllinie zu klonieren. Alle bis jetzt erzeugten Zelllinien haben den Nachteil, dass ihre Permeabilität aufgrund zu großer Undichtigkeit zu hoch ist, sodass sie für Permeabilitätsversuche nicht eingesetzt werden können [Garberg 2005]. Aber für die Untersuchung von krankheitsbedingten Änderungen der Blut-Hirn-Schranke z. B. für Transporterstudien eignen sich diese Zelllinien. Beispiele hierfür sind die Zelllinie SV-HCEC [Muruganandam 1997] und HCMEC/D3 [Weksler 2005].

Um dichte Monolayer zu erzeugen, sind verschiedene Arbeitsgruppen auch den Weg gegangen, Endothelzellen, die nicht aus dem Gehirn stammen, zu benutzen. Dazu zählen z.B. HUVEC-304-Zellen, humane Nabelschnurendothelzellen, die in Co-Kultur mit Gliomazellen gezüchtet wurden. Dabei konnten hohe Widerstände erzielt werden [Hurst 1996]. Dieses Modell kann vor allem für die Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen und deren Beeinflussung durch Substanzen oder andere Zellen, wie z. B. Immunzellen benutzt werden. Garberg et. al. konnten zeigen, dass auch der Einsatz von Zellen, die dichte Monolayer bilden, aber keine eigentlichen Endothelzellen darstellen, wie MDCK-Zellen (Nierenzellen aus dem Hund) und auch CaCO-2-Zellen (humane Coloncarcinom-Zellen) für Untersuchungen des Transports von passiv transportierten Substanzen geeignet sind [Garberg 2005].

## 1.2.2. Zellkulturmodelle

Für den Aufbau eines Modells der Blut-Hirn-Schranke sind Endothelzellen der wichtigste Bestandteil, da sie in der Lage sind, dichte Monolayer auszubilden. Diese Monolayer können im in-vitro Modell viele der Eigenschaften der biologischen Blut-Hirn-Schranke ausbilden, so z. B. die Dichtigkeit durch Ausbildung dichter Tight Junctions und auch die Polarität der Zellen, wie sie auch in den Kapillaren vorzufinden ist.

### 1.2.2.1. Ein-Zell-Modelle

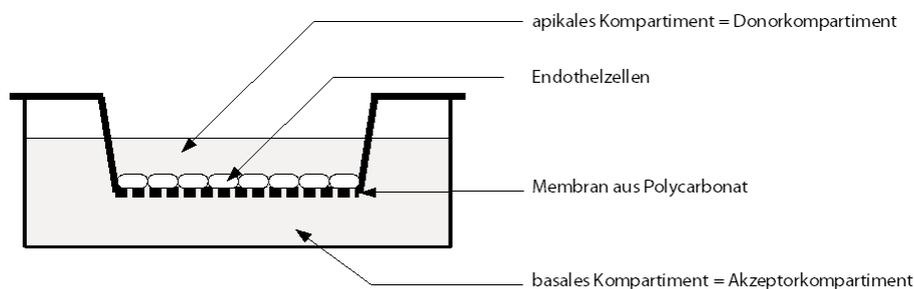


Abb. 2: Modell der Blut-Hirn-Schranke aus Primären Endothelzellen oder immortalisierten Endothelzellen

Je nach Spezies, aus der die Endothelzellen gewonnen worden sind, erhält man schon bei Züchtung eines Monolayers, der nur aus Endothelzellen besteht, eine dichte Einzellschicht, die einige der Eigenschaften der biologischen Blut-Hirn-Schranke aufweist (Abb. 2). Eingesetzt werden können hierbei Primärzellen, die direkt aus den Kapillaren gewonnen werden oder Endothelzellen aus Zelllinien, die durch Immortalisierung gewonnen worden sind.

Da bei diesem reduzierten Modell sehr schnell Eigenschaften der ursprünglichen Endothelzellen mit steigender Kultivierungsdauer verloren gehen, wurden Anstrengungen unternommen, das Modell zu verbessern. Eine Möglichkeit besteht im Einsatz von astrozytenkonditionierten Medien, die die von den Astrozyten abgegebenen Faktoren enthalten und dadurch die Entwicklung der Monolayer positiv beeinflussen [Dehouck 1990, Rubin 1991, Raub 1992, Wolburg 1994, Ramschoye 1998].

### 1.2.2.2. Co-Kultur-Modelle

Durch Kultivierung der Endothelzellen zusammen mit Zellen, mit denen sie auch in den Kapillaren eng vergesellschaftet sind, wird versucht, die in-vivo Bedingungen noch besser in einem in-vitro Modell nachzubilden. Als co-kultivierte Zellen werden hierbei vor allem Astrozyten eingesetzt, da diese gezeigt haben, dass sie in der Lage sind, Blut-Hirn-Schranken Eigenschaften bei kultivierten Gehirnendothelzellen zu induzieren [Tao-Cheng, 1987, Wolburg 1994, Beuckmann 1997, Gaillard 2000, Blasig 2001] und den Transendothelialen Elektrischen Widerstand (TEER) der Monolayer zu erhöhen [Giese 1995, Ramschoye 1998, Iwasaki 1999, Gaillard 2001]. Diese

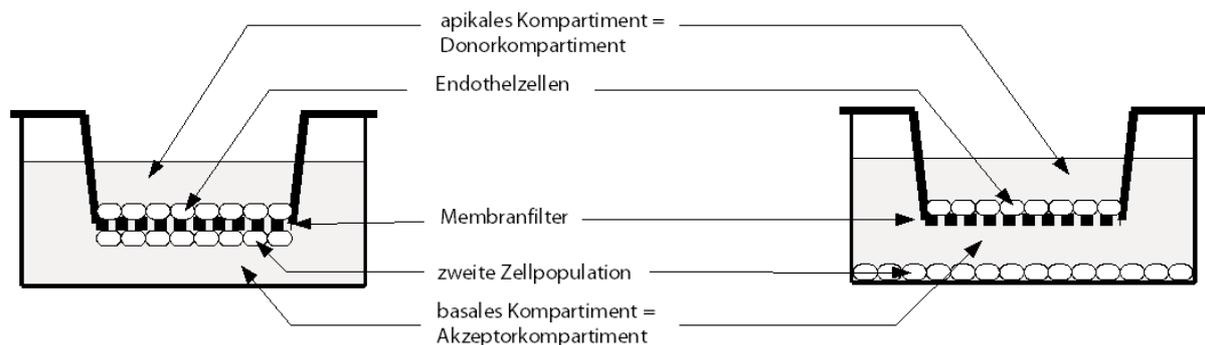


Abb. 3: Modell der Blut-Hirn-Schranke aus Primären Endothelzellen oder immortalisierten Endothelzellen, die in Co-Kultur mit einer zweiten Zellpopulation gezüchtet werden

Erhöhung des TEER-Wertes konnte auch bei Co-Kultivierung primärer Rinder- und Humangehirnendothelzellen mit Makrophagen anstelle der Astrozyten gezeigt werden [Zenker 2003].

Bei Co-Kultivierungsmodellen gibt es die Möglichkeit, die zweite Zellart direkt auf der Unterseite der Inserts wachsen zu lassen, sodass sie die Möglichkeit erhalten, Kontakt zu den Endothelzellen auszubilden [Gaillard 2000, Gaillard 2001, Megard 2002]. Eine zweite Art der Co-Kultivierung besteht darin, die zweite Zellart auf dem Boden der Multiwellschale wachsen zu lassen, so wie dies in Abb. 3 dargestellt ist [Raub 1992]. Bei diesem Modell wirken die co-kultivierten Zellen nur indirekt über in das sie umgebende Medium abgegebene Substanzen auf die Endothelzellen, da sie keinen direkten Kontakt zu den Endothelzellen herstellen können.

Alle bisher gezeigten Modelle stellen statische Systeme dar. Um den Einfluss des Blutflusses auf die Entwicklung der Endothelzellen mit einbeziehen zu können, wurden dreidimensionale dynamische in vitro Modelle (DIV-BBB, NDIV-BBB) entwickelt. Bei diesem Ansatz wachsen die Endothelzellen im Inneren einer Hohlfaser, außen wachsen die co-kultivierten Astrozyten oder C6-Glioma-Zellen [Stanness 1996, 1997, 1999, Cucullo 2002, Parkinson 2003, Neuhaus 2006/B, Santaguida 2006]. Die Nährlösung fließt im Inneren der Hohlfasern an den Endothelzellen vorbei und erzeugt dadurch einen dem physiologischen vergleichbaren Stress für die Endothelzellen, der stimulierend auf die Entwicklung dieser Zellen wirkt.

### 1.2.2.3. Drei-Zell-Kultur-Modelle

Stannes et al. entwickelten nicht nur ein dynamisches Modell der Blut-Hirn-Schranke, bestehend aus Hohlfasern, in deren Innerem sich die Endothelzellen ansiedelten und einen dichten Monolayer bildeten, und an deren Äußeren sich eine Schicht aus Astrozyten befand [Stannes 1996, 1997]. In einem weiteren Ansatz wurden zu den Astrozyten noch Neuronen hinzugefügt, um so das Modell noch weiter zu komplettieren und den Einfluss von Neuronen auf die Entwicklung von Endothelzellen untersuchen zu können. Alle drei Zellarten stammten dabei von der Ratte, sodass dieses Modell die in vivo Gegebenheiten in den Kapillaren sehr gut widerspiegeln kann [Stannes 1999].

### 1.2.3. Bestimmung der Dichtigkeit von Endothelzellmonolayern

#### 1.2.3.1. TEER-Messung

Der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER = TransEndothelial Electrical Resistance) wird als Maß für die parazelluläre Dichtigkeit von Endothelzellmonolayern herangezogen [Török 1999, Bauer 2000].

Bei Blut-Hirn-Schranken-Modellen ist der elektrische Widerstand sehr stark abhängig von der Spezies, aus der die Zellen für den Aufbau des Modells gewonnen werden. So erreichen Monolayer aus Ratten- oder Mäusehirnendothelzellen nicht so hohe Widerstände, wie dies mit Endothelzellen aus Schweinehirnen oder Rinderhirnen möglich ist. Auch das gewählte Modell hat einen Einfluss auf die zu erreichenden Widerstände, wie oben gezeigt. Der Einsatz von Zelllinien beim Aufbau eines Modells der Blut-Hirn-Schranke führt meist dazu, dass Monolayer, die aus ihnen gebildet werden, eine höhere parazelluläre Durchlässigkeit haben, verglichen mit Monolayern aus primären Endothelzellen.

#### 1.2.3.2. Einsatz von Markersubstanzen

Als Marker für die Dichtigkeit der Monolayer kann einerseits der elektrische Widerstand verwendet werden, eine andere Möglichkeit ist der Einsatz einer Markersubstanz. Diese kann radioaktiv markiert werden, ein Beispiel hierfür ist die häufig verwendete radioaktiv markierte Sucrose. Wenn keine Möglichkeit besteht, mit radioaktiven Substanzen zu arbeiten oder diese zu bestimmen, dann bietet sich der Einsatz von fluoreszierenden Substanzen an, da diese auch bei niedrigen Konzentrationen noch hinreichend genau bestimmt werden können. Substanzen, die für diesen Zweck eingesetzt werden, sind Carboxyfluorescein und Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran). Bei Einsatz von FITC-Dextran hängt die Durchlässigkeit der Tight Junctions für diese Substanz sehr stark von ihrem Molekulargewicht ab. Je größer das Molekulargewicht der eingesetzten Dextrane ist, desto langsamer überwinden sie die Monolayerschicht und desto weniger kommt insgesamt im Akzeptorkompartiment an.

## 2. NO-Donoren

### 2.1. Wirkung

NO-Donoren wirken über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und haben deshalb eine Vielzahl von Ansatzpunkten im Körper, über die sie ihre Wirkung entfalten können.

NO bindet besonders an Häm-Proteine, die Bestandteile vieler im Körper vorkommender Enzyme sind, u. a. Cytochrome, Cyclooxygenasen und speziell auch die lösliche Guanylatcyclase (Tsai 1994). NO führt als eine reaktive Stickstoffspezies zu Nitrosylierungen cysteinhaltiger Proteine. Lipide bilden auch einen Angriffspunkt für Stickstoffmonoxid, wobei die prooxidative oder antioxidative Wirkung von NO von der Konzentration von NO und dessen Gegenspieler reaktive Sauerstoffspezies abhängt.

### 2.2. Physiologische Wirkungen von NO

NO selber zeigt im Körper eine Vielzahl an Wirkungen. Stickstoffmonoxid wirkt u. a. als Vasodilatator, hemmt die Plättchenaggregation, dient als Neurotransmitter und als Regulator für andere Neurotransmitter, spielt eine Rolle bei Entzündungsprozessen und bei Immunreaktionen. NO zeigt außerdem antimikrobielle Eigenschaften durch Einbindung in die unspezifische Abwehrreaktionen von Makrophagen.

In glatten Muskelzellen führt NO zu einer Aktivierung der zyklischen Guanylatcyclase und dadurch zu einer Erhöhung der Konzentration an cGMP. Diese Erhöhung bedingt eine Vasodilatation der Gefäße durch Relaxation der glatten Muskelzellen. [Blasini 1997, Williams 2003]

Stickstoffmonoxid hemmt die Plättchenaggregation im Blut und übt damit eine antithrombotische Wirkung aus. Um diese Wirkung zu erzielen, greift NO an vielen Punkten an den Blutplättchen an. Darunter zählen die Inhibition der Adhäsion der Plättchen an den Gefäßwänden [Radomski 1987-1], die Verstärkung der Aggregationshemmung [Radomski 1987-2, Radomski 1990] und eine positive Wirkung auf die Disaggregation [Radomski 1987-3, Yao 1992]. Ein weiterer Effekt ist die Aktivierung der Cyclooxygenase, was zu einer erhöhten Bildung von Prostacyclin führt, was wiederum zu einer verringerten Blutplättchenaggregation führt [Yamamoto 2000].

Stickstoffmonoxid wirkt im peripheren Nervensystem an den nichtadrenergen-nichtcholinergen Nerven als Neurotransmitter. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Relaxation der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes, des Urogenitaltraktes, der Atemwege und in der Regulation der Blutzirkulation des Gehirns. Im Skelettmuskel könnte Stickstoffmonoxid als Gegenspieler der Kontraktion fungieren. Aber auch im Zentralnervensystem fungiert NO als Neurotransmitter, und während der Entwicklung des Nervensystems scheint NO als retrograder Messenger zu fungieren, der fehlgeschaltete Nervenverbindungen wieder löst. Bei verschiedenen Erkrankungen kann Stickstoffmonoxid aber auch Neurodegeneration auslösen. Dazu zählen Schlaganfall, die Huntingtonkrankheit und Amyotrophe Lateralsklerose. [Brennan 1996]

## 2.3. Cytotoxizität

Damit NO zellschädigende Wirkungen zeigt, muss es in entsprechend hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Diese liegen für das Molekül NO bei Gleichgewichtskonzentrationen von 4 – 5  $\mu\text{M}$ . Um diese Konzentrationen durch den Einsatz von NO-Donor-Substanzen zu erreichen, müssen deren Konzentrationen mindestens 0,5 – 1 mM betragen [Kröncke 1993].

Bei Untersuchungen zur Cytotoxizität verschiedener NO-Donoren auf unterschiedliche Säugtierzellen konnte eine je nach Zellart unterschiedliche Empfindlichkeit von Zellen auf NO-Donoren festgestellt werden. Dies wurde auf Unterschiede der Zellen hinsichtlich ihres zellulären antioxidativen Systems zurückgeführt. Unterschiedliche grundlegende oder induzierbare „Verteidigungssysteme“ der Zellen je nach Zellart bedingen eine verschieden starke Neutralisierung der schädigenden Effekte von Stickstoffmonoxid. [Kröncke 1997]

Die Art des Zelltodes, der durch den schädigenden Effekt von NO ausgelöst wird, ist abhängig von der Zellart, bei der die Untersuchung durchgeführt wird. Makrophagen, glatte Muskelzellen, dendritische Zellen, Chondrozyten und Thymozyten zeigten nach Beeinflussung durch NO-Donoren oder nach zellulär induzierter NO-Synthese Apoptose. Dabei sterben die Zellen kontrolliert durch ein in den Zellen aktiviertes Zelltodprogramm, man könnte diesen Vorgang auch als Selbstmordprogramm der Zellen bezeichnen. Der Gegensatz dazu ist der pathologische Untergang von Zellen, der bei Inselzellen und Oligodendrozyten beobachtet worden ist. Eine Besonderheit stellen hierbei Neuronen dar, bei ihnen sind beide Arten des Zelltodes beobachtet worden. [Kröncke 1997]

## 2.4. Cytoprotektion

Viele Untersuchungen zeigen nicht nur einen schädigenden Einfluss von NO auf Zellen. Vor allem bei oxidativem Stress ist der positive Effekt von Stickstoffmonoxid auf Zellen und Gewebe zu beobachten. NO kann auf unterschiedliche Weise die Lipidperoxidation hemmen [Kanner 1991, Rubbo 1994, Hayashi 1995, Rauhala 1996], ebenso wird auch die Lipidperoxidation von LDL durch aktivierte Makrophagen [Yates 1992] gehemmt. Niedrige Konzentrationen an Stickstoffmonoxid können Zellen vor Schädigung durch Wasserstoffperoxid oder Alkylperoxide schützen [Wink 1993, Wink 1995, Wink 1996]. NO zeigte auch positive Effekte bei cerebraler und myokardialer Ischämie und/oder Reperfusion.

Es wurden auch positive Effekte verschiedener NO-Donoren auf die NMDA-induzierte Schädigung neuronaler Zellen gezeigt [Vidwans 1999].

## 2.5. Permeabilitätsbeeinflussung von Endothelgeweben

Untersuchungen, welche den Effekt von Stickstoffmonoxid auf die Permeabilität von kleinen Blutgefäßen unterschiedlicher Herkunft klären sollten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Mayhan zeigte in seinen Untersuchungen, dass Stickstoffmonoxid die Permeabilität des Endothels für FITC-Dextran-10k (Fluoresceinisothiocyanatdextran, Molekulargewicht 10 000 Da) erhöht [Mayhan 1992, Mayhan 1994, Mayhan 1995, Mayhan 1996, Mayhan 1999]. Diese Untersuchungen wurden nicht mit nativem NO oder NO-Donoren durchgeführt. Um den Effekt zu zeigen, wurden Hemmstoffe der Guanylatcyclase eingesetzt, die den Effekt von Stickstoffmonoxid blockieren, sowie Substanzen, die die Synthese von NO in den Zellen unterdrückten. Die Untersuchung von Mayhan mit den NO-Donoren S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) und 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) zeigte, dass diese die Permeabilität der Arteriolen für FITC-Dextran-10k erhöhen konnten [Mayhan 2000]. Durch den Einsatz von L-NMMA (NG-Monomethyl-L-Arginin), einem NO-Synthase-Inhibitor, konnte die durch höhere Fließgeschwindigkeiten erzielte Permeabilitätssteigerung gesenkt werden [Yuan 1992]. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Permeabilitätssteigerung durch höhere Fließgeschwindigkeiten des Blutes und Stickstoffmonoxid-Produktion im Endothel.

Knepler et al. zeigten den Effekt von Peroxynitrit, welches sich aus Stickstoffmonoxid und Superoxid bildet [Knepler 2001]. SIN-1 als NO-Donor bildet im Körper gleichzeitig Stickstoffmonoxid und Superoxid und übt damit seine permeabilitätssteigernde Wirkung über diesen Weg aus.

Gonzales et al. beschäftigten sich in ihrer Untersuchung mit der Einwirkung von NO auf den Gefäßendothel-Cadherin-Komplex. Sie zeigten, dass es zu einer Spaltung dieses Komplexes kommt, was dann zu einer erhöhten Permeabilität *in vitro* und *in vivo* führt. [González 2003]

Andere Untersuchungen zeigen einen gegenteiligen Effekt von Stickstoffmonoxid auf die Permeabilität von Gefäßen. Gupta et al. konnten zeigen, dass durch den Einsatz des NO-Donors SNAP eine Abschwächung der permeabilitätssteigernden Wirkung von Wasserstoffperoxid erzielt werden konnte [Gupta 2001]. Einen ähnlichen Effekt erzielten Arnold et al. in ihrem Experiment, bei dem die Permeabilität des Endothels nach Bradykinin-Behandlung und unbehandeltem Endothel verglichen wurden. Auch hier konnte gezeigt werden, dass NO einen positiven Effekt hatte und die Permeabilität für den eingesetzten Marker (FITC-Dextran 70k) senkte. [Arnold 1999]

Die Erhöhung der intrazellulären cGMP- und cAMP-Spiegel durch verschiedene Substanzen, u. a. durch den NO-Donor Nitroprussid-Na, führte zu höheren elektrischen Widerstandswerten und verringertem Albumin-Transfer über Endothelzellmonolayer aus HUVEC-Zellen [Yamada 1990]. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Ergebnissen aus einer Untersuchung von Shukla et al., die gezeigt haben, dass bei Ratten nach Verabreichung von SIN-1 oder Nitroprussid-Na eine Erhöhung der Permeabilität für Natriumfluorescein zu beobachten war [Shukla 1996].

Olivier kommt in seiner Untersuchung zum Schluss, dass Stickstoffmonoxid zu einer Abdichtung der Tight junctions und damit zu der in seiner Studie beobachteten Verringerung der Permeabilität für <sup>14</sup>C-Sucrose führt [Olivier 1992]. Durch die normale Funktion der NO-Synthasen

gebildetes NO ist wichtig für die Aufrechterhaltung der geringen basalen Permeabilität des Endothels, wie Predescu et al. in ihrer Studie nachwiesen [Predescu 2005].

In ihrer in vitro Studie konnten Wong et al. durch Einsatz der NO-Donoren DETA-NONOat und Nitroprussid-Na den Widerstand ihrer Endothelzellmonolayer signifikant steigern. Gleichzeitig waren diese beiden NO-Donoren auch in der Lage, die Permeabilitätssteigerung durch Lipopolysaccharide, Interferon- $\gamma$  und Interleukin-1 $\beta$  aufzuheben. [Wong 2004]

Die Untersuchungen zeigen ein uneinheitliches Bild, was den Effekt von Stickstoffmonoxid und auch was den Effekt von NO-Donoren auf die Permeabilität von Blutgefäßen oder Endothelzellmonolayern betrifft. Es gibt noch immer keine befriedigende Erklärung für diese Unterschiede. Boje et al. fanden heraus, dass je größer die Anzahl an verschiedenen Spezies von Stickstoffmonoxid ist, die eine Substanz freisetzen kann, desto größer ist auch das Potential dieser Substanz, die Permeabilität des Endothels zu erhöhen. Dies könnte einige der kontroversen Ergebnisse betreffend der NO-Donoren erklären. Es ist aber nur ein erster Ansatz, der noch keine umfassende Erklärung des beschriebenen unterschiedlichen Effektes von endogenem NO erklärt.

## 2.6. Anwendung

Eingesetzt werden zur Zeit in der Praxis unterschiedliche Nitrate wie Glyceroltrinitrat (GTN), Pentaerythryltetranitrat (PETN), Nitroprussid-Natrium, Isosorbiddinitrat (ISDN) und Isosorbid-5-mononitrat (ISMN). Weiterhin wird zur Behandlung von Angina pectoris die Substanz Molsidomin eingesetzt.

Bisher werden NO-Donoren therapeutisch bei Angina pectoris zur Anfallsprophylaxe sowie zur Kuppierung eines akuten Anfalls eingesetzt. Ein anderes Einsatzgebiet ist die Behandlung einer Gallenkolik mit Glyceroltrinitrat [Lüllmann 2006]. Weiterhin können NO-Donoren wie Glyceroltrinitrat zur kontrollierten Blutdruckeinstellung verwendet werden. [Fachinformation Trinitro-san, Merck Pharma GmbH, Darmstadt]

Nitroprussid-Natrium hat als NO-Donor ein anderes Einsatzgebiet. Es wird hauptsächlich zur Behandlung von akuten Bluthochdruckkrisen sowie zur Akutbehandlung bei postoperativen Hochdruckkrisen zur steuerbaren Hypotension eingesetzt [Mutschler 2001]. Diese Substanz wird außerdem zur kurzfristigen Entlastung eines insuffizienten Herzens bei akutem Herzversagen verwendet [Lüllmann 2006].

Aufgrund neuerer Erkenntnisse über die unterschiedlichen Wirkungen von NO-Donoren ergeben sich weitere Einsatzgebiete für NO-Donoren, vor allem für neue Klassen von Stickstoffmonoxid liberierenden Substanzen.

## 2.7. Untersuchte NO-Donoren

### 2.7.1. Diazeniumdiolate

Diazeniumdiolate sind recht stabile 1:1 Komplexe aus Stickstoffmonoxid und Aminen, die durch Einleiten von NO in eine Aminlösung gewonnen werden können. Als Salz liegen sie in der Form  $R_2N^+H_2R_2NN_2O_2^-$  vor, dargestellt in Abb. 4.

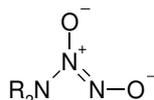


Abb. 4: Allgemeine chemische Struktur der NONOate

Werden diese Substanzen in Wasser gelöst, so zerfallen sie spontan in das Amin und NO. Da die Wirkungen dieser Lösungen denen entsprechen, wie sie Stickstoffmonoxid ausübt, werden diese Substanzen bevorzugt in in vitro und in vivo Experimenten als NO-Donoren eingesetzt [Williams 2003]. Damit diese Substanzen für Untersuchungen eingesetzt werden können, müssen sie in einem stark basischen Lösungsmittel gelöst werden. Bei hohen pH-Werten findet kein spontaner Zerfall statt, der NO-Donor bleibt stabil bis zum Einsatz in den Experimenten.

Die von mir untersuchten Substanzen dieser Gruppe sind in Tab. 1 aufgeführt. Alle Substanzen wurden kurz vor der eigentlichen Untersuchung in 0,01 molarer Natriumhydroxid-Lösung gelöst. Die Konzentration der Stammlösung betrug für alle Substanzen 100 mmol/l. Diese Lösungen wurden vor der Anwendung noch 1:10 mit hydrocortisonhaltigem Kultivierungsmedium verdünnt und dann für die eigentliche Untersuchung eingesetzt.

Tab. 1: Bezeichnung, chemische Struktur und Löslichkeitseigenschaften der benutzten Diazeniumdiolate

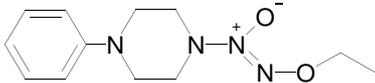
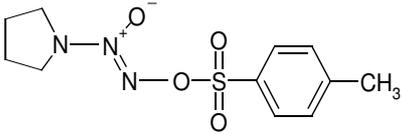
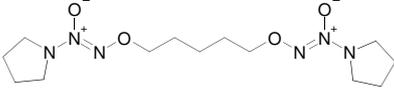
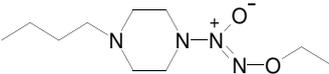
Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Strukturformel	Halbwertszeit
DBA/NO	Natrium-1-(N, N-dibutylamino)-diazon-1-ium-1,2-diolat		Einige Minuten
PHEPIPERAZI/NO	Natrium-1-(N-phenylpiperazin)-diazon-1-ium-1,2-diolat		ca. 1 Minute
DETA/NO	1-(N-Ethylamin-N-ethylammoniumamino)-diazon-1-ium-1,2-diolat		10 – 20 Stunden
SperminNONOat	1-[N,N'-Bis-(3-amino-propyl)-4-ium-1,4-diaminobutan]-diazon-1-ium-1,2-diolat		40 Minuten

## 2.7.2. Diazeniumdiolat-Prodrugs

Die zweite Gruppe an Diazeniumdiolaten (aufgeführt in Tab. 2), die in dieser Arbeit untersucht worden sind, waren Substanzen, die erst einer Bioaktivierung bedürfen, bevor sie NO freisetzen können. Solche Substanzen bezeichnet man als Prodrugs, da sie selbst keine Wirkung ausüben.

Diese Substanzen zeichnen sich durch eine deutlich höhere Lipophilie aus, verglichen mit den daraus entstehenden wirksamen Substanzen. Dies führt dazu, dass sich diese Substanzen nicht in Natriumhydroxid-Lösung lösen lassen wie dies bei den untersuchten NO-Donoren der Klasse der Diazeniumdiolate der Fall ist. Die hier untersuchten Prodrugs müssen erst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden, bevor sie appliziert werden können. Bei Einsatz dieser Substanzen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mol/Liter hergestellt, aus denen dann durch Verdünnung die endgültig einsetzbaren Lösungen hergestellt wurden. Das Lösen der Substanzen und das anschließende Verdünnen geschahen unmittelbar vor Einsatz der Substanzen im eigentlichen Experiment.

Tab. 2: Bezeichnung und chemische Struktur der benutzten Diazeniumdiolat-Prodrgs, Halbwertszeit gilt für die nach enzymatischer Spaltung gebildeten Produkte

Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Strukturformel	Halbwertszeit (nach enzymatischer Spaltung)
Et-PHEPIPERAZI/NO	O <sup>2</sup> -Ethyl-1-(N-phenylpiperazin)-diazen-1-ium-1,2-diolat		ca. 1 Minute
Tosyl-PYRRO/NO	O <sup>2</sup> -Toluen-4-sulfonyl-1-(pyrrolidin)-diazen-1-ium-1,2-diolat		3 Sekunden
PENT-BIS-PYRRO/NO	O <sup>2</sup> -Pentyl-1,5-(pyrrolidin)-diazen-1-ium-1,2-diolat		3 Sekunden
Et-BUPIPERAZI/NO	O <sup>2</sup> -Ethyl-1-(N-butylpiperazin)-diazen-1-ium-1,2-diolat		197 Sekunden

### 2.7.3. Pentaerythryltetranitrat (PETN)

Pentaerythryltetranitrat ist eine Substanz, die als Arzneimittel zur Behandlung der Angina pectoris eingesetzt wird. PETN wurde in dieser Untersuchung als Kontrolle eingesetzt, da auch diese Substanz erst nach enzymatischer Umwandlung in Zellen NO freisetzt. Der Unterschied besteht dabei in der Art der enzymatischen Umsetzung, um die NO-Freisetzung zu ermöglichen. Es wird aber auch angenommen, dass die Freisetzung von NO aus PETN auch auf einem nichtenzymatischen, redoxgeförderten Weg geschehen kann. (Heyn 2003)

Da auch PETN wasserunlöslich ist, wurde diese Substanz analog den Diazeniumdiolat-Prodrgs in DMSO gelöst (1 M) und diese Stammlösung kurz vor der Anwendung an den Endothelzellen auf die benötigten Konzentrationen verdünnt.

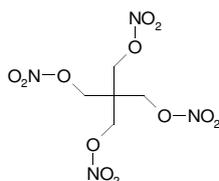


Abb. 5: Strukturformel von Pentaerythryltetranitrat (PETN)

Einer der Vorteile bei Einsatz von PETN in der Therapie ist die geringere Tendenz, Nitratkopfschmerz auszulösen und die Umgehung der Nitrattoleranz, die bei Einsatz der bisher benutzten Substanzen auftritt. Ein weiterer Vorteil von PETN ist die wahrscheinliche Senkung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, im Gegensatz zu den anderen eingesetzten NO-Donoren (ISDN, ISMN), welche zu einer Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies führen.

#### 2.7.4. NO-Donor-Scavenger-Substanzen

Um zu untersuchen, ob die eingesetzten Substanzen ihre Wirkung durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid erzielen, wurden zwei Substanzen eingesetzt, die auf unterschiedliche Weise die Wirkung von Stickstoffmonoxid unterbinden.

Hämoglobin ist in der Lage, Stickstoffmonoxid direkt zu binden und es somit dem System zu entziehen, so dass es keine Wirkung auf die Zellen ausüben kann. Hämoglobin ist ein Protein aus den roten Blutkörperchen, welches im Körper dem Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid dient.

Methylenblau wirkt einerseits über Inhibition der Guanylatzyklase-Aktivität [Mayer 1993, Martin 1985]. Dadurch ist es Stickstoffmonoxid nicht möglich, seine Wirkung über diesen Weg auszuüben. Gleichzeitig wirkt Methylenblau auch über Freisetzung des Superoxid-Anions [Marczin 1992, Miclescu 2006]. Durch Verbindung des Superoxid-Anions mit NO wird dieses blockiert und kann seine Wirkung auf die Zellen nicht direkt ausüben.

### **3. Zielstellung dieser Arbeit**

Im Rahmen des Projektes "Entdeckung und Entwicklung von neuartigen Wirkstoffen und Trägersystemen für die Pharmakotherapie der Alzheimer-Demenz" der pharmazeutischen Institute der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurde ein Modell benötigt, dass die Blut-Hirn-Schranke simuliert, so dass daran neue Substanzen auf ihre Eigenschaften getestet werden können. Dieses Modell soll Aussagen zur Penetrationsfähigkeit von Substanzen ermöglichen. Des Weiteren ist mit einem Modell aus Endothelzellen die Untersuchung von Einflüssen neuer Substanzen auf die Dichtigkeit der Monolayer möglich. An diesem Modell sollen die Einflüsse der unterschiedlichen NO-Donoren und NO-Donor-Prodrugs auf die Dichtigkeit der Endothelzellmonolayer untersucht werden.

# Material und Methoden

## 1. Kultivierungsmedien, Pufferlösung und sonstige Lösungen

### 1.1. Pufferlösungen

Tab. 3: Zusammensetzung der Phosphatpufferlösung pH 7,4 (PBS 7,4)

Substanz	Menge
Dinatriumhydrogenphosphat 2 Wasser	2,92 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,4 g
Natriumchlorid	16,0 g
Kaliumchlorid	0,4 g
Gereinigtes Wasser ad.	2000,0 g

Tab. 4: Zusammensetzung der Transportpufferlösung

Substanz	Menge
Penicillin / Streptomycin (10.000 Units / 10 mg / ml)	10 ml
PBS 7,4	500 ml

### 1.2. Zellkulturmedien

Tab. 5: Zusammensetzung des Präparationsmediums

Substanz	Menge
Penicillin / Streptomycin (10000 Units / 10 mg / ml)	10 ml
M199	500 ml

Tab. 6: Zusammensetzung des Puromycinhaltigen Kultivierungsmediums

Substanz	Menge
Penicillin / Streptomycin (10000 Units / 10 mg / ml)	10 ml
Puromycin	1 mg
Pferdeserum	50 ml
M199	500 ml

Tab. 7: Zusammensetzung des Puromycinfreies Kultivierungsmediums

Substanz	Menge
Penicillin / Streptomycin (10000 Units / 10 mg / ml)	10 ml
Pferdeserum	50 ml
M199	500 ml

Tab. 8: Zusammensetzung des Hydrocortisonhaltigen Kultivierungsmediums

Substanz	Menge
Penicillin / Streptomycin (10000 Units / 10 mg / ml)	10 ml
Hydrocortison	550 nM
DMEM/Ham's F12	500 ml

### 1.3. Sonstige Lösungen

Tab. 9: Zusammensetzung der Dextranlösung

Substanz	Menge
Dextran 70000	54,0 g
M199	300 ml

Tab. 10: Zusammensetzung der BSA-Lösung-1%

Substanz	Menge
Bovines Serum Albumin	1 g
PBS 7,4	100 ml

Tab. 11: Zusammensetzung der Fixierlösung

Substanz	Menge
Paraformaldehyd	3,0 g
Glutardialdehyd 50 %	0,2 ml
Saccharose	3,4 g
PBS	ad 100 ml

Tab. 12: Zusammensetzung der Primärantikörperlösung

Substanz	Menge
Primärantikörperlösung	54,0 g
BSA-Blockierlösung	300 ml

Tab. 13: Zusammensetzung der Sekundärantikörperlösung

Substanz	Menge
Dextran 70000	54,0 g
M199	300 ml

Tab. 14: Zusammensetzung der Triton-X-100-Lösung 0,1 %

Substanz	Menge
Triton-X-100	0,1 g
PBS	ad 100 ml

## 2. Gewinnung der Schweinehirnendothelzellen

Am Tag der Extraktion werden aus dem Schlachthof drei frische Schweinehirne aus soeben geschlachteten Schweinen entnommen. Die Schweine haben ein Alter von 4 bis 7 Monate, wenn sie geschlachtet werden. Sofort nach der Entnahme der Schweinehirne aus dem Tierkörper werden diese in eisgekühltes 70%iges Ethanol überführt. Nach Sammlung der 6 Hirnhälften werden diese mit Ethanol gespült, um Blut und Hirnflüssigkeit möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend wird einmal mit Transportpufferlösung gespült, um das Ethanol zu entfernen. Für den Transport vom Schlachthof zum Labor werden die Gehirne in eisgekühlter Transportpufferlösung aufbewahrt.

Anschließend werden das Kleinhirn, der Hirnstamm, die Hirnhäute und die größeren, außen sichtbaren Gefäße entfernt. Nach der mechanischen Reinigung der Gehirne werden diese bis zum folgenden Schritt in eisgekühltem PBS 7,4 gelagert. Mit einem sterilisierten Gemüsezerkleinerer [Württembergische Metallwarenfabrik AG, Geislingen/Steige, Deutschland] werden die gesäuberten Hirnhälften zerkleinert. Die entstandene zerkleinerte Hirnmasse wird mit Präparationsmedium auf 300 ml aufgefüllt, mit 1,5 g Dispase versetzt und bei 37 °C für zwei Stunden gerührt. Durch Zugabe von 360 ml 4 °C kalter Dextranlösung wird eine Dichteeinstellung vorgenommen, die es ermöglicht, die Kapillaren durch Zentrifugation abzutrennen. Die erhaltene Mischung wird bei 4 °C für 12 Minuten bei 6500 g zentrifugiert und nach Abgießen des Überstandes werden die Kapillaren in 15 ml 37 °C warmem Präparationsmedium aufgenommen. Nach Homogenisieren durch Auf- und Abpipettieren werden die Kapillaren durch ein Nylonnetz (180 µm Porengröße) filtriert, um eine Abtrennung großer Kapillarbündel zu erzielen. Das Filtrat wird fünfmal trituriert (durch Aufdrücken der Pipette auf den Boden einer Glaspetrischale und Herausdrücken des Kapillaren enthaltenden Präparationsmediums unter Druck wird durch Scherung eine Vereinzelung der Kapillaren sichergestellt). Die entstandene Kapillarsuspension wird mit einer Mischung aus 30 mg Collagenase und 30 mg Dispase versetzt und anschließend bei 37 °C für 30 Minuten langsam geschüttelt. Alle 10 Minuten wird kontrolliert, ob Endothelzellen aus den Kapillaren freigesetzt werden. Treten Endothelzellen aus den Kapillaren aus, so wird diese Lösung sofort bei 300 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 20 ml Präpa-

rationsmedium aufgenommen und diese Mischung wird auf einen Percoll-Gradienten aufgetragen. Dieser Gradient wird bei 1250 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die sich in der Grenzschicht zwischen den beiden Dichtelösungen angesammelten Endothelzellen werden abgenommen und nach mehrmaligem Spülen in Kultivierungsmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausplattiert. [Franke 2000, Bauer 2002]

### **3. Kultivierung der Primären Schweinehirnendothelzellen**

Nach der Isolation aus den Kapillaren werden die Endothelzellen 24 Stunden in kollagenbeschichteten Zellkulturflaschen gezüchtet. Die ersten zwei Tage wachsen die Zellen in puromycinhaltigem Kultivierungsmedium, wobei bereits nach 24 Stunden ein erster Medienwechsel erfolgt, um tote Zellen und Fremdzellen wie z. B. rote Blutkörperchen zu entfernen. 1 bis 2 Tage später erfolgt das Umsetzen der Endothelzellen aus den Zellkulturflaschen in die Transwell-Inserts. Die Zellen werden durch Behandlung mit 0,05 %igem Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, zum Inaktivieren des Enzyms Trypsin werden sofort nachdem sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst haben 1 ml Pferdeserum je 10 ml Trypsin zugegeben. Anschließend wird die so erhaltene Zellsuspension zentrifugiert (300g, 10 Minuten, Raumtemperatur), um die Endothelzellen von der Trypsinlösung zu trennen und nach Aufnehmen in etwa 2 ml puromycinfreiem Kultivierungsmedium je T175-Flasche werden die Zellen gezählt. In jedes Insert werden 250 000 Zellen ausgesät um sicherzustellen, dass die Zellen sich nicht weiter teilen. Die Kultivierung in den Inserts erfolgt die ersten zwei Tage mit puromycinfreiem Kultivierungsmedium. Nach zwei Tagen wird dieses Medium ausgetauscht gegen ein hydrocortisonhaltiges Medium vom Typ DMEM/Ham's F12. Der Zusatz an Hydrocortison erhöht die Dichtigkeit der Endothelzellmonolayer, so dass diese als Modell für die Blut-Hirn-Schranke benutzt werden können. [Franke 2000, Bauer 2002]

### **4. Isolierung von Rattenschwanzkollagen**

Die vom Körper abgetrennten Rattenschwänze werden mit einer Seifenlösung gewaschen, abgetrocknet und dann bei -20°C gelagert. Zur Gewinnung des Kollagens werden die Sehnen aus den Rattenschwänzen präpariert und in steriler 0,1%iger Essigsäure bei 4°C aufgelöst. Dabei wird ein Gehalt von 4 mg Kollagen je Milliliter eingestellt. Nach 24 Stunden wird diese Lösung von ungelösten Bestandteilen durch Zentrifugation befreit. Die gesamte Isolierung von Rattenschwanzkollagen erfolgt unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Airflow Box. [Bornstein 1958, Franke 2000]

Vor der Anwendung wird die Kollagenlösung auf die benötigte Konzentration durch Verdünnen mit sterilem Wasser eingestellt.

## 4.1. Kollagenbeschichtung von Zellkulturflaschen, Inserts und Deckgläsern

Bei der Beschichtung von Zellkulturflaschen wird eine 0,1 mg/ml-Kollagenlösung eingesetzt, bei der Beschichtung von Inserts wird eine 0,04 mg/ml-Kollagenlösung verwendet. Dafür wird die KollagenstammLösung mit sterilfiltriertem Wasser auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Zur Beschichtung der T75-Flaschen werden 10 ml Kollagenlösung 0,1 mg/ml in die Flasche pipettiert, die Flüssigkeit in der Flasche umgeschwenkt, so dass der Boden komplett mit Flüssigkeit bedeckt ist. Anschließend werden 9 ml aus der Flasche abgesaugt, so dass 1 ml Kollagenlösung in der Flasche verbleiben. Bei Kultivierung der Zellen in T175-Flaschen werden 3 ml Kollagenlösung 1 mg/ml je T175 Flasche für die Beschichtung eingesetzt. Anschließend lässt man die Kollagenlösung im Trockenschrank bei 37 °C eintrocknen.

Die Zellkulturinserts werden mit 100 µl Kollagenlösung 0,04 mg/ml je Insert beschickt. Die Insertplatte wird in Alufolie eingepackt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation trocknet die Platte im Luftstrom der Laminar-Air-Flow-Bank. Die so beschichteten Inserts werden sofort verwendet oder für die spätere Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Bei der Beschichtung von Deckgläsern werden 100 µl einer Kollagenlösung 0,04 mg/ml als Tropfen auf das Deckgläsern aufgebracht. Dieser Tropfen darf nicht zerlaufen. Nach Inkubierung über Nacht im Brutschrank wird die Kollagenlösung unter der Laminar-Air-Flow-Bank eingetrocknet.

## 5. Färbung der Endothelzellen mittels Antikörper

Zur Anfärbung der Endothelzellen mit dem Antikörper gegen den von Willebrand-Faktor wurden die Zellen auf Deckgläsern gezüchtet, die vorher mit einer Kollagenbeschichtung versehen wurden. Dies geschah auch für die Anfärbung der Endothelzellen mittels eines Antikörpers gegen Occludin, einen Bestandteil der Tight junctions.

Die Zellen wurden drei Mal mit PBS 7,4 gewaschen, und dann für 10 Minuten in Formalinlösung 3,7 % fixiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS 7,4, der dreimal wiederholt wurde, bevor die Zellen mittels 10%iger Triton-X-100-Lösung permeabilisiert wurden. Der folgende Waschschrift wurde dreimal durchgeführt und anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit einer 1%igen BSA-Lösung behandelt. Direkt auf diesen Schritt folgte die Zugabe des Primäantikörpers für 60 Minuten. Um ungebundenen Antikörper komplett zu entfernen wurde fünfmal mit PBS 7,4 gewaschen. An diesen Waschschrift schließt sich die Behandlung mit dem Sekundäantikörper für 60 Minuten an. [Bauer 2002]

Nach fünfmaligem Waschen mit PBS 7,4 werden die Deckgläsern dann in Moviol eingebettet und für 48 Stunden im Kühlschrank die Aushärtung des Moviol abgewartet, bevor eine mikroskopische Untersuchung durchgeführt wurde. Die Untersuchungen wurden mit einem Leica-Mikroskop durchgeführt.

## 6. Carboxyfluorescein-Fluß-Untersuchungen

Die Bestimmung der Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment dient als Maß für die Dichtigkeit des Monolayers [Franke 2000, Bauer 2002]. Zu Beginn des Experimentes wird Carboxyfluorescein in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in das Donorkompartiment zugegeben.

Über 120 Minuten werden aus dem Akzeptorkompartiment alle 10 Minuten 100  $\mu\text{l}$  Probe gezogen und durch 100  $\mu\text{l}$  37 °C warme Pufferlösung wieder ergänzt. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität erfolgte in einem Fluoreszenzplattenleser (BMG FLUOstar Optima, Offenburg). Die ermittelte Fluoreszenzintensität wurde durch Benutzung einer Kalibriergerade in eine Konzentration an Carboxyfluorescein umgerechnet. Die Kalibriergerade wurde aus Lösungen mit unterschiedlichem Gehalt an Carboxyfluorescein im Bereich zwischen 0,0001  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  erstellt. Diese Kalibriergerade wurde bei jeder Bestimmung neu erstellt, da durch die Konstruktion des Gerätes eine Übertragung der Kalibriergerade eines Versuches auf einen anderen Versuch nicht möglich ist.

### 6.1. Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstandes

Die Messung des elektrischen Widerstandes, der durch den Monolayer erzeugt wird, dient als Maß für die Dichtigkeit der Endothelzellschicht. Um diesen zu messen, wurde ein Millipore ERS-Widerstandsmessgerät mit Chopstick-Elektroden benutzt. Als erstes wurde der Widerstand von leeren, keine Zellen enthaltenden Inserts bestimmt. Dieser Widerstand muss bei den Bestimmungen des Widerstandes eines Zellmonolayers abgezogen werden, um so den elektrischen Widerstand des Monolayers zu erhalten. Damit der Wert des Widerstandes unabhängig von der verwendeten Insertgröße ist, wird der erhaltene Wert für den transendothelialen elektrischen Widerstand mit der Fläche des Inserts multipliziert.

$$R_{\text{Monolayer}} = (R_{\text{Insert mit Zellen}} - R_{\text{Insert ohne Zellen}}) * \text{Fläche des Inserts} \quad [\Omega * \text{cm}^2] \quad (1)$$

$R_{\text{Monolayer}}$  ist der berechnete Wert für den elektrischen Widerstand des Endothelzellmonolayers, der sich nach obiger Formel berechnet.  $R_{\text{Insert mit Zellen}}$  ist der gemessene Widerstand der Inserts in denen sich der Monolayer befindet und  $R_{\text{Insert ohne Zellen}}$  ist der gemessene Widerstand in Ohm eines Inserts ohne Endothelzellen. Die Fläche des Inserts betrug bei allen Untersuchungen 1,13  $\text{cm}^2$ , da bei allen Untersuchungen die gleichen Inserts der Firma Corning eingesetzt wurden.

## 6.2. Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten $P_{app}$

Für die Ermittlung des apparenten Permeationskoeffizienten werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten genannt. Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode wird in den Arbeiten von Björn Bauer und Michael Török beschrieben [Bauer 2002, Török 2003]. Sie ermöglicht es, direkt aus den ermittelten Konzentrationen für die Markersubstanz den apparenten Permeationskoeffizienten zu errechnen.

Der Anstieg im Konzentrations-Zeit-Diagramm wird ermittelt und in die folgende Gleichung als Permeationsrate  $dA/dt$  [%/s] eingesetzt.

$$P_{app} = \frac{dA}{dt} * \frac{V_{Akzeptor}}{A} * \frac{1}{c} * \frac{1}{x} \quad [cm/s] \quad (2)$$

Das Volumen des Akzeptorkompartiments  $V_{Akzeptor}$  ist bei den hier benutzten Inserts 1,5 ml, die Fläche  $A$  des Inserts betrug 1,13 cm<sup>2</sup>, die Ausgangskonzentration  $c$  war 100 % und der Volumenkorrekturfaktor  $x$  betrug 3. Der Volumenkorrekturfaktor berechnet sich aus dem Verhältnis von Akzeptorvolumen zu Donorvolumen.

### 6.2.1. Berechnungsmethode 1

Für die Berechnung von  $P_{app}$  werden sämtliche Konzentrationswerte, die innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 120 Minuten gewonnen werden, benutzt. Dafür wurde der Anstieg der Ausgleichsgeraden im Konzentrations-Zeit-Diagramm zwischen dem ersten Wert (0 Minuten) und dem letzten Wert (120 Minuten) ermittelt. Die so erzielte Permeationsrate  $dA/dt$  wurde in die Gleichung 2 eingesetzt, und der apparante Permeationskoeffizient errechnet.

### 6.2.2. Berechnungsmethode 2

Da bei den Untersuchungen nicht in allen Fällen ein linearer Anstieg der Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment über die gesamte Dauer von 120 Minuten stattfand, wurde eine zweite Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten durchgeführt. Hierbei wurde eine Ausgleichsgerade nur für die Werte zu Beginn der Untersuchung errechnet. Es wurden die Werte von 0 bis 20 Minuten für die Berechnung der Permeationsrate  $dA/dt$  benutzt.

### 6.3. Berechnung der AUC (area under the curve)

Eine weitere Möglichkeit einen qualitativen Vergleich der einzelnen Konzentrations-Zeit-Kurven besteht in der Bestimmung des insgesamt in das Akzeptorkompartiment transportierten Carboxyfluoresceins. Dies erfolgt mittels Bestimmung der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve. Die AUC wurde mittels der Trapezoidregel bestimmt. Die dafür verwendete Formel lautet:

$$AUC = \sum_0^{n+1} \frac{(c_{n+1} + c_n) * (t_{n+1} - t_n)}{2} \quad [\% * s] \quad (3)$$

### 6.4. Berechnung der $f_1$ - und $f_2$ -Faktoren

Die Bestimmung des Differenzfaktors  $f_1$  sowie des Gleichheitsfaktors  $f_2$  dient der Bewertung der erhaltenen Graphen. Mit diesen Faktoren kann eine Aussage darüber getroffen werden, wie stark zwei Graphen übereinstimmen, oder ob es einen Unterschied zwischen beiden gibt.

Diese Methode wurde für die Bewertung von Freisetzungsuntersuchungen entwickelt. Auch bei diesen Untersuchungen gibt es unterschiedliche mathematische Funktionen, die die Graphen für die freigesetzte Menge an Arzneistoff beschreiben. Deswegen wurde nach einer Methode des Vergleichs von Graphen gesucht, die modellunabhängig ist. Bei Einsatz solch einer Methode ist es nicht nötig, die Funktion zu bestimmen, die den Graphen mathematisch am besten beschreibt. Mit Hilfe dieser Faktoren  $f_1$  und  $f_2$  ist ein solch modellunabhängiger direkter Vergleich von Kurven möglich.

Einer der Hauptnachteile bei Einsatz dieser Faktoren ist ihre unzureichende statistische Aussagekraft. Auch basiert dieses Kriterium nicht auf wissenschaftlichen Fakten. Es sind Konventionsfaktoren, bei denen eine Übereinkunft über die Aussagekraft getroffen wurde. So legt die FDA in ihren Richtlinien fest das ein Unterschied zwischen zwei Kurven postuliert werden kann, wenn der  $f_1$ -Faktor zwischen 50 und 100 liegt und der  $f_2$ -Faktor zwischen 0 und 50 liegt (FDA-Guideline). Trotz dieser Einschränkungen eignen sich diese Faktoren, um eine Einschätzung der Unterschiedlichkeit der Kurven festzustellen.

Der  $f_1$ -Faktor, auch als Differenzfaktor bezeichnet, wird nach folgender Formel berechnet:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \times 100 \quad (4)$$

Mit Hilfe dieses Faktors bestimmt man den prozentualen Fehler zwischen den beiden zu vergleichenden Kurven.  $n$  ist dabei die Anzahl an Messpunkten,  $R_j$  und  $T_j$  sind die Prozentwerte im Akzeptorkompartiment von der Kontrolluntersuchung ( $R_j$ ) und der Testuntersuchung ( $T_j$ ) zum Zeitpunkt  $j$ .  $f_1$  ist Null, wenn beide Kurven identisch sind und steigt proportional mit der Unterschiedlichkeit der Kurven.

Der  $f_2$ -Faktor, auch als Gleichheitsfaktor bezeichnet, wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + (1/n) \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (5)$$

Der Gleichheitsfaktor  $f_2$  ist die logarithmische Umwandlung der aufsummierten quadrierten Fehler der Unterschiede zwischen der Test- ( $T_i$ ) und der Kontrolluntersuchung ( $R_i$ ).

Um diese Faktoren in dieser Untersuchung einsetzen zu können, wurden nur die Unterschiede zwischen den Mittelwerten berechnet.

Als Grenzen werden für den  $f_1$ -Faktor ein Mindestgröße von 70 und für den  $f_2$ -Faktor eine Maximalgröße von 40 festgelegt. Nur wenn beide Faktoren diese Größen überschreiten ( $f_1$ -Faktor) bzw. darunter liegen ( $f_2$ -Faktor), werden die beiden betrachteten Kurven als unterschiedlich deklariert.

## 7. Bestimmung des Einflusses von NO-Donoren auf den Fluß von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer

Zu Beginn des Experiments wird der transendotheliale Widerstand (TEER) mittels Millipore Chopstick-Elektroden gemessen. Der gemessene transendotheliale Widerstand gibt einen Hinweis auf die Dichtigkeit des Monolayers. Ist dieser Widerstand größer als  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$  hat der Monolayer eine ausreichende Dichtigkeit erreicht und die Flußuntersuchungen, mit oder ohne Beeinflussung durch NO-Donoren oder NO-Donor-Prodrugs, können mit diesem Monolayer durchgeführt werden.

Aus dem Akzeptorkompartiment wird das hydrocortisonfreie Kultivierungsmedium vorsichtig entfernt und durch Hank's „balanced salt solution“ ersetzt. Dann werden in das Donorkompartiment die zu untersuchenden NO-Donoren oder NO-Donor-Prodrugs in den zu untersuchenden unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Damit sich die Substanz im Donorkompartiment verteilen kann, wird die Multiwellschale mit den darin befindlichen Inserts im Brutschrank für 5 Minuten geschüttelt (500 Umdrehungen pro Minute). Als Marker für die Dichtigkeit der Monolayer wird die Konzentration des fluoreszierenden Markers Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment bestimmt. Es werden alle 10 Minuten 100  $\mu\text{l}$  Probe aus dem Akzeptorkompartiment entnommen und durch Pufferlösung ersetzt.

## 8. Oxyhämoglobingewinnung

### 8.1. Gewinnung von Hämoglobin aus Vollblut

450 ml frisches Schweineblut werden im Schlachthof direkt zu 50 ml einer 3,2 %igen Trinatriumcitratlösung gegeben. Diese Lösung wird bei 4 °C und 3000 g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand (dieser entspricht dem Plasma) verworfen. Die so erhaltene Zellsuspension wird mit Hank`s Balanced Salt Solution gewaschen und bei 4 °C und 3000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt.

Um das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin freizusetzen, werden die Zellen mit einer hypotonen Lösung lysiert. Dafür wurde reines Wasser benutzt. Daraufhin werden die Zellreste bei 3000 g, 4 °C und 10 Minuten Dauer abzentrifugiert. Der Überstand wird gegen Wasser für 72 Stunden dialysiert. Anschließend erfolgt eine Gefriertrocknung. Dieses gefriergetrocknete Hämoglobin wird bei 4 °C aufbewahrt. [Mottaleb 2004, Perutz 1968]

### 8.2. Gewinnung des Oxyhämoglobins aus Hämoglobin

Zur Überführung des gewonnenen Hämoglobins in Oxyhämoglobin wird dieses in PBS 7,4 gelöst (Konzentration 1 mM) und reiner Sauerstoff wird für 120 Sekunden in diese Lösung eingeleitet. Anschließend wird eine Reduktion durch Zugabe von Natriumdithionit (0,2 g je 10 ml Hämoglobinlösung) durchgeführt. Um die so entstandene Lösung zu entsalzen wird sie über eine Sephadex G-25 Säule gegeben. Dazu wird Sephadex G-25 medium in PBS 7,4 suspendiert, über Nacht quellen gelassen und am nächsten Tag auf eine Säule gegeben. Es folgt eine Spülung mit PBS 7,4, die wiederholt wird. Danach wird die Oxyhämoglobinlösung auf die Säule aufgegeben und mittels Phosphatpuffer eluiert. Die dunkelrote Fraktion wird eisgekühlt aufgefangen und für weitere Untersuchungen, z. B. zur Bestimmung des Oxyhämoglobingehaltes, tiefgekühlt bei -20 °C aufbewahrt. [Hüsgen 2003]

### 8.3. Bestimmung des Oxyhämoglobingehaltes

Zur Vermessung wird eine 1:500 Verdünnung der erhaltenen Oxyhämoglobinlösung in Wasser benutzt. Vermessen wird die Absorption bei 415 nm.

Zur Berechnung wird Formel 6 benutzt:

$$E = \epsilon * c \quad (6)$$

$E$  steht für die gemessene Extinktion,  $\epsilon$  für den molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{415} = 131 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $c$  für die Konzentration in mM. [Hüsgen 2003]

Um aus der gemessenen Extinktion die Konzentration an Oxyhämoglobin ermitteln zu können, muss Formel 6 in Formel 7 überführt werden.

$$c = \frac{E}{131} * 500 [mM] \quad (7)$$

## 9. Cytotoxizitätsuntersuchung

### 9.1. Prinzip des Cytotoxizitätstests

Zur Untersuchung auf Cytotoxizität verschiedener Substanzen wurde ein Test (ToxiLight<sup>®</sup> Cytotoxicity Assay, Cambrex Bio Science Inc., USA) eingesetzt, der die Menge an freigesetztem Enzym Adenylatkinase aus toten oder sterbenden Zellen bestimmt. Nur bei Zellen, bei denen die Membranintegrität gestört ist, wie dies bei toten oder sterbenden Zellen der Fall ist, und dadurch in das umgebende Medium Enzyme wie auch die Adenylatkinase gelangen können, wird eine hohe Konzentration an Enzym feststellbar sein.

Der Test besteht aus zwei Reaktionsschritten. Durch Zugabe von Adenosindiphosphat zum zu untersuchenden Medium wird durch das Enzym Adenylatkinase Adenosintriphosphat (ATP) gebildet, dargestellt in Abb. 6 a. Im zweiten Reaktionsschritt, gezeigt in Abb. 6 b, wird aus ATP und Luciferin durch das Enzym Luciferase Licht erzeugt, welches in einem Luminometer vermessen werden kann. Die dabei entstehende Menge an Licht ist proportional der aus den Zellen freigesetzten Menge an Adenylatkinase. [Crouch 1993]

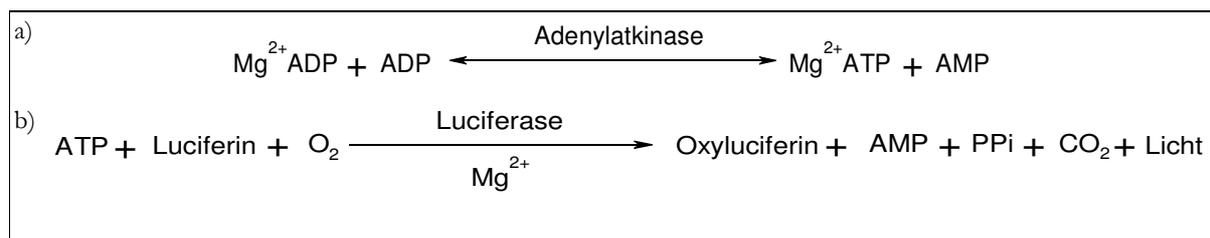


Abb. 6: a) Erzeugung von Adenosintriphosphat durch das Enzym Adenylatkinase  
b) Umwandlung von Luciferin durch das Enzym Luciferase und Erzeugung von Licht

### 9.2. Durchführung des Cytotoxizitätstests

85 000 Zellen pro well werden in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen werden bis zur Konfluenz kultiviert. In das Kultivierungsmedium wird die zu testende Substanz zugegeben. Nach 60 bzw. 120 Minuten werden aus jedem well 20 µl Kultivierungslösung entnommen und in eine weiße 96-Multiwell-Platte überführt. Zu diesen 20 µl werden 20 µl Adenylatkinase Detection Reagent und 100 µl HBSS hinzugefügt. Anschließend wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Bestimmung der Lichtintensität erfolgt im Plattenlesegerät bmg Fluostar Optima (BMG Labtech GmbH, Deutschland). Alle Untersuchungen werden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

## 10. Vitalitätsuntersuchung

### 10.1. Prinzip der Vitalitätsuntersuchung

Die Bestimmung der Vitalität der primären Schweinehirnendothelzellen wurde mit dem Cell-Titer-Blue™ Cell Viability Assay (Promega GmbH, Deutschland) durchgeführt. Dieser Test bestimmt die metabolische Aktivität von Zellen über deren Fähigkeit, den Farbstoff Resazurin durch Reduktion in den fluoreszierenden Farbstoff Resorufin umzuwandeln. Die Konzentration an fluoreszierendem Edukt kann dann mittels eines Fluoreszenzspektrophotometers bestimmt werden. [Ahmed 1994, Squatrito 1995]

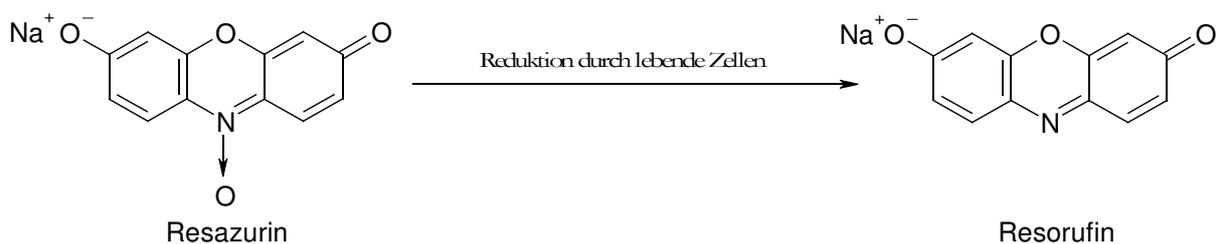


Abb. 7: Umwandlung von Resazurin in die fluoreszierende Substanz Resorufin

### 10.2. Durchführung der Vitalitätsuntersuchung

Die Endothelzellen werden in 96-well-Platten in einer Konzentration von 85 000 Zellen je well ausgesät. Alle Bestimmungen werden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Einen Tag vor der Untersuchung wird das Medium das letzte Mal gewechselt, um einen Einfluss des Medienwechsels auszuschliessen. Pro Well werden 200  $\mu\text{l}$  Medium eingefüllt. Am Tag der Untersuchung wird in das Medium die zu untersuchende Substanz (NO-Donor, NO-Donor-Prodrug) zugegeben. Anschließend werden 20  $\mu\text{l}$  Cell Titer Blue Reagenz je well zupipettiert. Die Vermessung der Fluoreszenz erfolgt nach einem vorher festgelegten Zeitintervall in einem Fluoreszenzplattenleser.

## 11. Substanzen und Geräte

### 11.1. Substanzen

In Tab. 15 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und Chemikalien aufgeführt.

Tab. 15: Substanzen und Chemikalien, ihre Hersteller und ihr Einsatzzweck

Bezeichnung	Hersteller	Einsatzzweck
Anti-human von Willebrand Factor developed in Rabbit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Primärantikörperlösung zur Anfärbung von Endothelzellen
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-FITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Sekundärantikörperlösung
Anti-Rat IgG (whole molecule)-FITC-conjugate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Sekundärantikörperlösung
4(5)-Carboxyfluorescein	Fluka Chemie AG, Mün, Deutschland	Markersubstanz für die Durchlässigkeit der Endothellmonolayer
CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland	Bestimmung der Zellvitalität
Collagenase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Enzym zum Herauslösen der Endothelzellen aus den Kapillaren
Dextran 70	Appllichem GmbH, Darmstadt, Deutschland	Einstellen einer gewünschten Dichte für die Zentrifugation der freigesetzten Kapillaren nach der ersten enzymatischen Verdauung der Gehirne
Dinatriumphosphat 2 Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Bestandteil der Pufferlösung
Dispase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Enzym zum Herauslösen der Kapillaren aus dem Gewebe und zum Herauslösen der Endothelzellen aus den Kapillaren
Glutaraldehyd 50% Lösung	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil der Fixierlösung
DMEM high glucose	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Nährlösung für die Endothelzellkultur
DMEM high glucose/Ham's F12	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Nährlösung für die Endothelzellkultur
HBSS (Hank's balanced salt solution) 10fold	Biowest S.A.S, Nuaille, Frankreich	Salzlösung 10fach konzentriert zur Herstellung der HBS-Lösung, HBSS wird als Akzeptorlösung bei Transportuntersuchungen eingesetzt
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Erhöhung der Dichtigkeit der Endothellmonolayer
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Bestandteil der Pufferlösung
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Bestandteil der Pufferlösung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Einsatzzweck</b>
M199	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Nährlösung für die Endothelzellkultur
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	Bestandteil der Pufferlösung
Natriumdithionit	Fluka Chemie AG, Mün, Deutschland	Reduktionsmittel für die Oxyhämoglobingewinnung
Paraformaldehyd	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil der Fixierlösung
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Antibiotikum und Antimykotikum Lösung für die Zellkultur
Percoll®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der Primären Schweinehirnendothelzellen
Pferdeserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Bestandteil der Nährlösung für die Zellkultur, Abstoppen von Trypsin
Puromycindihydrochlorid	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	Abtöten von Fremdzellen, um reine Endothelzellkulturen zu erhalten
Rattenschwanzkollagen	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Beschichtung von Zellkulturinserts zur Anzucht von Endothelzellen
Rat X ZO-1 (MAB 1520)	CHEMICON International, Inc., Hampshire, Großbritannien	Primärantikörperlösung zur Markierung des Tight-junction Proteins ZO-1 (Zonula occludens 1)
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Bestandteil der Fixierlösung
Sephadex®G25	Pharmacia, Uppsala, Schweden	Binden von Ionen bei der Aufreinigung des Oxyhämoglobins
ToxiLight® Cytotoxicity Assay	Cambrex Bio Science Inc., Rockland, USA	Bestimmung der Cytotoxizität von Substanzen
Trinatriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Blutgerinnungshemmer für die Oxyhämoglobingewinnung
Triton X-100	Ferak, Berlin, Deutschland	Durchlässigkeit der Zellmembranen für Antikörper erhöhen, Abtöten der Zellen als Positivkontrolle bei Cytotoxizitätsuntersuchungen
Trypanblau-Lösung 0,1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Anfärben toter Zellen bei der Zellzählung
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Enzymlösung zur Ablösung der Zellen aus den Zellkulturflaschen

## 11.2. Geräte

Tab. 16: Geräte, deren Hersteller und der Verwendungszweck der eingesetzten Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Einsatzzweck
Autoklav H+P Varioklav b5T	H+P Labortechnik AG, Ober-schleißheim, Deutschland	Sterilisation von Geräten für die Extraktion und Glasflaschen für die Zellkulturmedien und die Pufferlösungen, Autoklavierung der Zellkulturabfälle
bmg FLUOstar OPTIMA	BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland	Mikrotiterplatten-Spektrophotometer für die Fluoreszenzmessung für Flußbestimmungen und Vitalitätsuntersuchungen
Brutschrank Heraeus® BBD 6220	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland	Schaffung der Umgebung für die Züchtung der Endothelzellen durch Einstellen der Temperatur auf 37 °C, Luftfeuchtigkeit 95% und 5 % CO <sub>2</sub>
Endohm-12	World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA	Widerstandsmessung
Eppendorf Centrifuge 5804 R mit Rotor A-4-44	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Zentrifugationsschritte bei der Extraktion sowie nach dem Abtrypsinieren der Zellen
Eppendorf Centrifuge 8403	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Zentrifugationsschritte bei der Oxyhämoglobingewinnung
Gemüsezerkleinerer	WMF Württembergische Metallwarenfabrik AG, Geislingen/Steige, Deutschland	Zerkleinerung des gereinigten Gehirns
Gefriertrocknungsanlage Lyovac® GT2	Niro GmbH, Müllheim, Deutschland	Trocknen der Oxyhämoglobinlösung, Stabilisierung für die Aufbewahrung
HERAsafe KS	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland	Laminar-Air-Flow-Bank für die Zellkultur
IKA®-MS1 Minishake	IKA®Works do Brasil Ltda, Taquara, Brasilien	Mischen der Standardlösungen für die Carboxyfluorescein-Gehaltsbestimmung
MC1 Research RC 210 P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	Waage für alle anfallenden Wägeschritte
Mikroskop Leica DMRXP mit Kamera Spot Insight QE, mit Software Spot Advanced	Mikroskop: Leica Mikroskope & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland Kamera: Diagnostic instruments, inc., Sterling Heights, USA	Fluoreszenzaufnahmen der antikörpergefärbten Zellen
Millicell®-ERS mit Chopstik-Elektrode	Millipore, Bedford, USA	Widerstandsmessung
Neubauer-improved Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland	Bestimmen der Zellzahl
pH-Meter 1140	Mettler-Toledo GmbH Process, Urdorf, Schweiz	pH-Messung der Pufferlösungen und der Medien
Teleshake mit Shakemodul	H+P Labortechnik AG, Ober-schleißheim, Deutschland	Plattenschüttler zum Mischen der Kapillaren bei der zweiten Verdauung und Schütteln der Platten mit den Inserts bei den Flußuntersuchungen

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Einsatzzweck</b>
Trockenschrank Binder FD115	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland	Sterilisation von Glas- und Metallgeräten für die Extraktion, Eintrocknen der Kollagenlösungen zur Beschichtung der Zellkulturflaschen
Vacusafer Comfort	IBS Integra Bioscience AG, Chur, Schweiz	Absaugen der Flüssigkeitsreste, überschüssiger Zellsuspension
Variomag Magnetrührer	H+P Labortechnik AG, Ober- schleißheim, Deutschland	Magnetrührer zum Mischen der Hirnmasse bei der ersten enzymatischen Verdauung
Wasserbad Julabo 7A mit Jula- bo Heizung MP-PA/KUA	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland	Aufwärmen der Medien und Pufferlösungen vor der Anwendung in der Zellkultur

### 11.3. Verbrauchsmaterialien

Tab. 17: Verbrauchsmaterialien, deren Hersteller und der Verwendungszweck der eingesetzten Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Einsatzzweck</b>
Deckgläschen und Objektträger	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	Mikroskopische Untersuchungen, Antikörperfärbungen
Dialyseschlauch	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Abtrennung der gelösten Salze bei der Oxyhämoglobingewinnung
Einmalpipetten	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Deutschland	Transfer von Lösungen
Monodur MON PA 200 N	Verseidag Techfab GmbH, Walbeck, Deutschland	Vereinzelung der Gehirnkapillaren während der Extraktionsprozedur
Multi-well-Zellkulturschalen	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Deutschland	Anzüchten von Zellen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Deutschland	Transfer von Lösungen
Reaktionsgefäße 2 ml	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Deutschland	Aufbewahren von Lösungen, Zentrifugieren von Zellen
Sterile Flaschen (wiederverwendbar)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	Aufbewahren von Lösungen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Deutschland	Anzüchten der Zellen nach der Extraktion
Zellkulturröhrchen, 12 und 50 ml	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Deutschland	Zentrifugieren von Zellen, Aufbewahren von Lösungen
6-well-Zellkulturschalen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	Durchführung von Transportuntersuchungen

# Ergebnisse und Diskussion

## 1. Etablierung des Blut-Hirn-Schranken-Modells

Bei der Etablierung des Modells war es vor allem wichtig, sicherzustellen, dass eine größtmögliche Reinheit der Endothelzellen erzielt werden kann. Dies kann einerseits durch das Extraktionsverfahren geschehen, andererseits auch durch spezielle Züchtungsverfahren erzielt werden. Bei dem hier verwendeten Modell kamen beide Methoden zum Einsatz.

Es wurde einerseits durch den Einsatz von Enzymen und Filtern die Menge an Fremdzellen während der Extraktion begrenzt. Im Anschluss an die Gewinnung der Endothelzellen aus den Schweinehirnen wurde durch Einsatz des Antibiotikums Puromycin sichergestellt, dass sich in den nachfolgenden zwei Tagen der Kultivierung vor allem die Endothelzellen vermehren können. Andere Zellen, wie Perizyten, glatte Muskelzellen oder Astrozyten, die als Verunreinigung in den Kulturen auftreten können, können in einem puromycinhaltigen Medium nur sehr schwer wachsen, da sie keine p-Glycoprotein-Expression aufweisen. Dieses Enzym ermöglicht es, dass in die Zellen eingedrungenes, zytotoxisches Puromycin wieder aus den Zellen heraustransportiert wird [Perrière 2005].

In Abb. 8 sind mikroskopische Aufnahmen der Endothelzellen im Phasenkontrast und Fluoreszenz-Aufnahmen nach Anfärbung gegen das Tight-junction-Protein ZO-1 dargestellt.

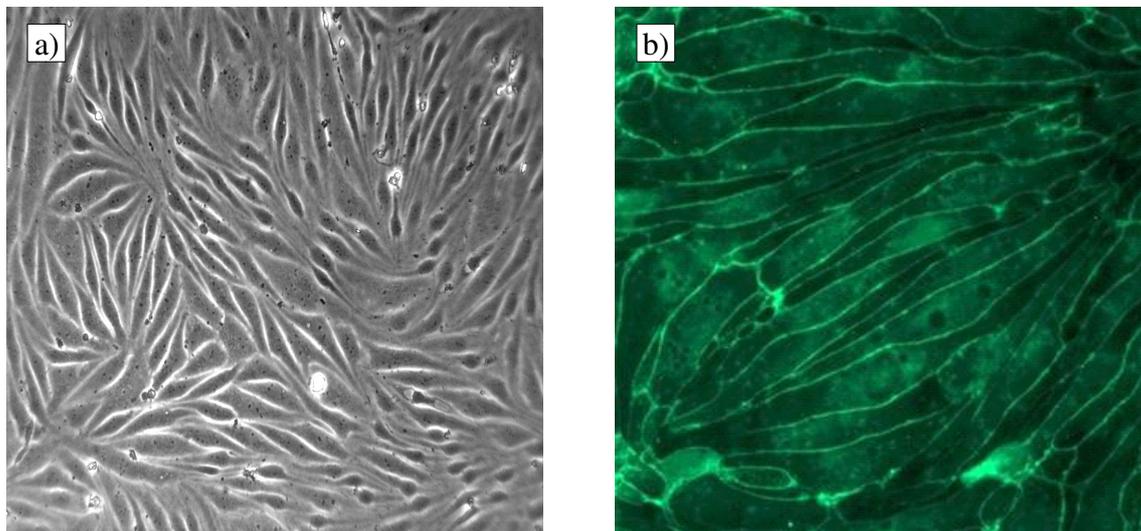


Abb. 8: a) Primäre Schweinehirnendothelzellen nach 6 Tagen in Kultur, gezüchtet in kollagenbeschichteten 24well-Platten, Vergrößerung 200x, Phasenkontrast-Mikroskopie  
b) Primäre Schweinehirnendothelzellen nach 6 Tagen in Kultur, gezüchtet auf kollagenbeschichteten Deckgläschen, Vergrößerung 200x, Antikörper gegen ZO-1-Protein

## 2. NO-Donoren

### 2.1. Cytotoxizitätsuntersuchungen

#### 2.1.1. Primäre Schweinehirnendothelzellen

Im Vorfeld der Untersuchungen zum Einfluss von verschiedenen Diazeniumdiolaten auf den Fluß von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer wurden Cytotoxizitätsuntersuchungen mit den vier vielversprechendsten Kandidaten durchgeführt. Diese Kandidaten waren PHE-PIPERAZI/NO und DBA/NO als sofortfreisetzende NO-Donoren und Tosyl-PYRRO/NO und Et-PHEPIPERAZI/NO für die Gruppe der NO-Donor-Prodrugs. Alle vier Substanzen wurden in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf bestehende Cytotoxizität für primäre Schweinehirnendothelzellen untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 9 dargestellt.

Bei diesem Test wurde die Menge an Adenylatkinase gemessen, die sich im extracellulären Raum befindet. Adenylatkinase ist ein intrazelluläres Enzym, welches nur bei Schädigung der Zellmembran in den Extrazellulärraum gelangen kann. Wird die Zellmembran durch Substanzen direkt oder indirekt durch deren Wirkung in der Zelle geschädigt, so steigt die Konzentration im Extrazellulärraum an. Diese erhöhte Konzentration kann dann mittels einer Lumineszenzmessung quantifiziert werden. Eine erhöhte Menge an Adenylatkinase kann als Marker für eine Zellschädigung und damit als ein Indikator für den einsetzenden Zelltod dienen.

Als Kontrolle werden unbehandelte Zellen eingesetzt. Damit kann festgestellt werden, wie groß die Menge an Adenylatkinase im Normalzustand ist. Parallel dazu werden die Zellmembranen von Zellen aufgelöst und dadurch die Gesamtmenge an Adenylatkinase, welche sich in den Zellen befindet, freigesetzt. Dadurch erhält man die beiden Extremwerte, zwischen denen sich der Wert für die mit der Testsubstanz behandelten Zellen befinden muss. Je höher dieser Wert ist, desto stärker ist die Membranschädigung durch die untersuchte Substanz.

Alle Untersuchungen wurden mit konfluent gewachsenen Endothelzellen durchgeführt, damit die gleichen Bedingungen herrschen, wie sie auch bei den Permeabilitätsuntersuchungen gegeben sind.

Keine der vier untersuchten Substanzen bewirkte eine deutlich erhöhte Membrandurchlässigkeit für das Enzym Adenylatkinase nach Einwirkung auf die Endothelzellen und zeigte damit in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine Cytotoxizität auf die Endothelzellen. Dies ist in Hinsicht auf die folgenden Untersuchungen wichtig, da sichergestellt sein sollte, dass eventuelle Effekte auf die Monolayer durch die NO-Donoren oder durch die NO-Donor-Prodrugs nicht durch cytotoxische Effekte bewirkt werden.

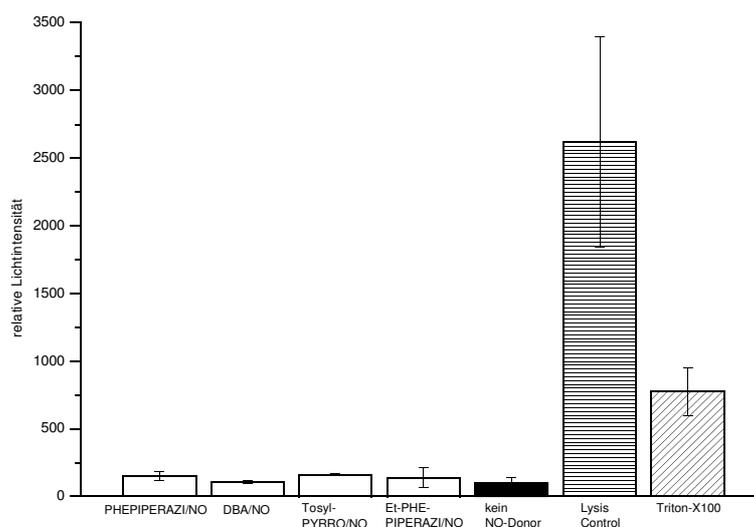


Abb. 9: Cytotoxizitätsuntersuchung primärer Schweinehirndothelzellen mittels ToxiLight® Cytotoxicity Assay, Substanzen wurden in der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, mittels Lysis Control abgetötete Zellen und mit Triton-X100 abgetötete Zellen (n=3)

In einem zweiten Experiment wurden drei verschiedene Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) von fünf verschiedenen NO-Donoren (PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, PYRRO/NO, DETA/NO und SperminNONOat), drei verschiedenen NO-Donor-Prodrugs (Et-PHEPIPERAZI/NO, Tosyl-PYRRO/NO, PENT-BIS-PYRRO/NO) und dem NO-Donor PETN, der nicht zur Gruppe der Diazoniumdiolate gehört, auf cytotoxische Effekte auf primäre Schweinehirndothelzellen untersucht (Abb. 10).

PHEPIPERAZI/NO führt nur in der Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  in diesem Experiment zu einer deutlich höheren Durchlässigkeit der Zellmembran für das Enzym Adenylatkinase, in den beiden niedrigeren Konzentrationen an NO-Donor war die Menge an Adenylatkinase im Extrazellulärraum vergleichbar der Kontrolle.

DBA/NO, PYRRO/NO, DETA/NO und SperminNONOat führen zu keiner erhöhten Durchlässigkeit für Adenylatkinase bei Schweinehirndothelzellen in allen drei untersuchten Konzentrationen. Damit zeigt sich, dass diese vier Substanzen keine cytotoxischen Eigenschaften in den untersuchten Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  aufweisen.

Das NO-Donor Prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO erhöhte die Konzentration von Adenylatkinase im Extrazellulärraum nur leicht bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$ . Der Effekt ist nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Die höchste untersuchte Konzentration erzielte keinen Effekt auf die Permeabilität von Adenylatkinase verglichen mit der Kontrolle (unbehandelte Zellen). Tosyl-PYRRO/NO erhöhte die Konzentration von Adenylatkinase leicht aber nicht signifikant in den Konzentrationen 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ . Pent-bis-PYRRO/NO senkte die Konzentration an Adenylatkinase verglichen mit der Kontrolle (unbehandelte Zellen) in den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen.

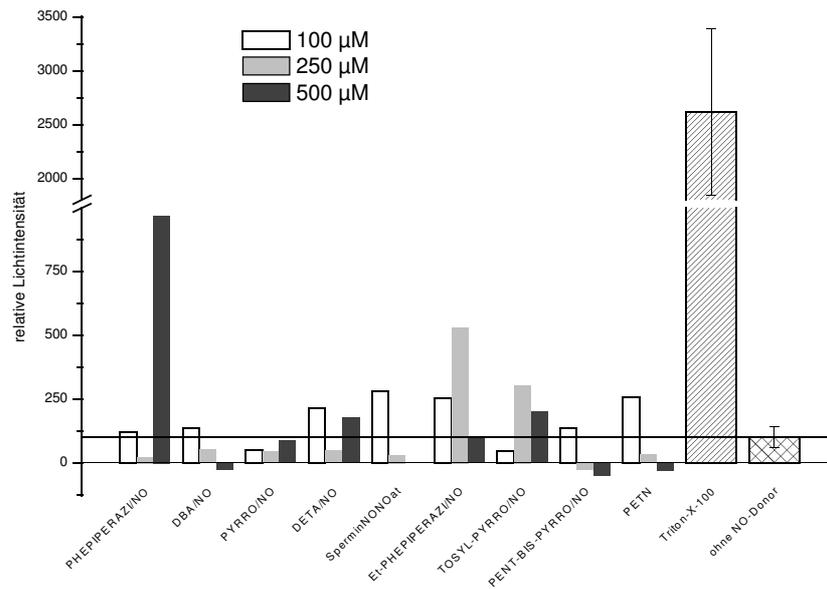


Abb. 10: Cytotoxizitätsuntersuchung primärer Schweinehirnendothelzellen mittels ToxiLight® Cytotoxicity Assay, Substanzen wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und mit Triton-X100 abgetötete Zellen (n=1, Kontrolluntersuchungen n=3)

Zusammenfassend zeigt diese Untersuchung, dass die hier untersuchten Substanzen teilweise zu einer erhöhten Durchlässigkeit für Adenylatkinase führten, diese Konzentrationen aber im Vergleich mit der Lysis-Kontrolle sehr niedrig sind. Es wird durch diese Substanzen, NO-Donoren wie auch NO-Donor-Prodrugs keine cytotoxischer Effekt auf die Endothelzellen ausgeübt.

### 2.1.2. Zelllinie HCMEC/D3

Die Untersuchung auf Cytotoxizität wurde noch mit einer weiteren Zellart durchgeführt. Dazu wurden immortalisierte menschliche Gehirndothelzellen (HCMEC/D3) verwendet. Diese Zellen bieten den Vorteil, noch näher an der menschlichen Physiologie zu sein und damit besser übertragbarere Ergebnisse zu liefern. Auch hier konnte bei allen untersuchten Substanzen keine erhöhte Cytotoxizität festgestellt werden.

Besonders niedrige Werte nach Zusatz der entsprechenden NO-Donor-Prodrugs waren bei den Substanzen PENT-BIS-PYRRO/NO und PENT-PIPERAZI/NO zu erkennen (Abb. 11). Alle anderen Substanzen zeigten keine Änderung gegenüber der Kontrolle, den unbehandelten Zellen.

Damit ist gewährleistet, dass bei Einsatz der NO-Donoren in den von uns untersuchten Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$  keine cytotoxischen Effekte für die Resultate verantwortlich sind.

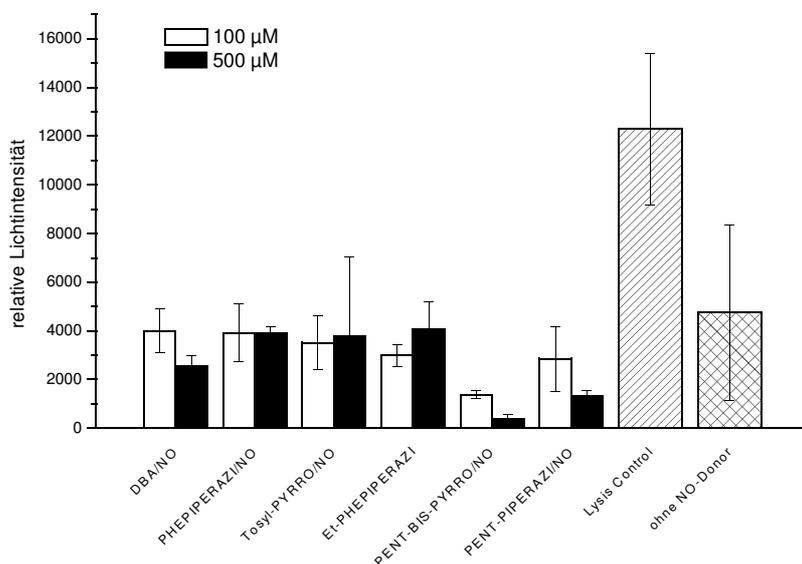


Abb. 11: Cytotoxizitätsuntersuchung von HCMEC/D3-Zellen mittels ToxiLight<sup>®</sup> Cytotoxicity Assay, NO-Donoren und NO-Donor-Prodrugs wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen und mit Triton-X100 abgetötete Zellen (n=3)

## 2.2. Vitalitätsuntersuchungen

### 2.2.1. Vitalitätsbeeinflussung der Endothelzellen durch verschiedene Kultivierungsmedien

Der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsmedien auf die Vitalität von Endothelzellen wurde mit den in Tab. 18 aufgeführten Kultivierungsmedien in unterschiedlicher Zusammensetzung durchgeführt.

Tab. 18: Zusammensetzung der in der Vitalitätsuntersuchung verwendeten Zellkulturmedien

Medium	Abkürzung	Penicillin/Streptomycin - 10.000 Units / 10mg/ml	L-Glutamin [mM]	Serum 10 %	Hydrocortison	Puromycin
M199	M1	—	0,68	—	—	—
M199 mit Hydrocortison	M2	—	0,68	—	550 nM	—
M199-Kultivierungsmedium	M3	2 %	0,68	Pferdeserum	—	—
M199-Kultivierungsmedium mit Puromycin	M4	2 %	0,68	Pferdeserum	—	2 µg/ml
DMEM/hg	D1	—	4	—	—	—
DMEM/lg thermostabil	D2	—	2	—	—	—
DMEM/hg-Kultivierungsmedium	D3	2 %	4	fötale Kälberserum	—	—
DMEM/Ham's F12	D4	—	2,5	—	—	—
Ham's F12	H	—	0,5	—	—	—
RPMI	R	2 %	2	fötale Kälberserum	—	—
Endothel Basal Medium	E	—	—	—	—	—
MCDB131 (Gibco)	MC	—	10	—	—	—

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 12 dargestellt. Als Standard wird das Medium M199-Kultivierungsmedium verwendet, da dieses Medium für die standardmäßige Kultivierung der Primären Schweinehirnendothelzellen benutzt wird. Keinen Unterschied in der Vitalität der untersuchten Zellen gibt es zwischen dem Kontrollmedium und Medium M199 mit Hydrocortison, Medium M199-Kultivierungsmedium mit Puromycin und Medium DMEM/hg nach 2 Stunden Kontakt mit dem Reagenz. Medium M199 ohne Zusatz von Serum und Antibiotika führt innerhalb von zwei Stunden zu einer deutlich höheren Vitalität der Zellen, vergleichbar mit den Vitalitätsdaten von DMEM/hg-Kultivierungsmedium und RPMI. Die stärksten Erhöhungen der Zellvitalität sind bei den Medien Endothel Basal Medium, MCDB131, DMEM/Ham's F12 und Ham's F12 zu beobachten. Bei Einsatz des Mediums DMEM/lg thermostabil kam es zu einer verringerten Zellvitalität. Dieser Effekt verstärkte sich nach 4 Stunden Behandlung mit Resazu-

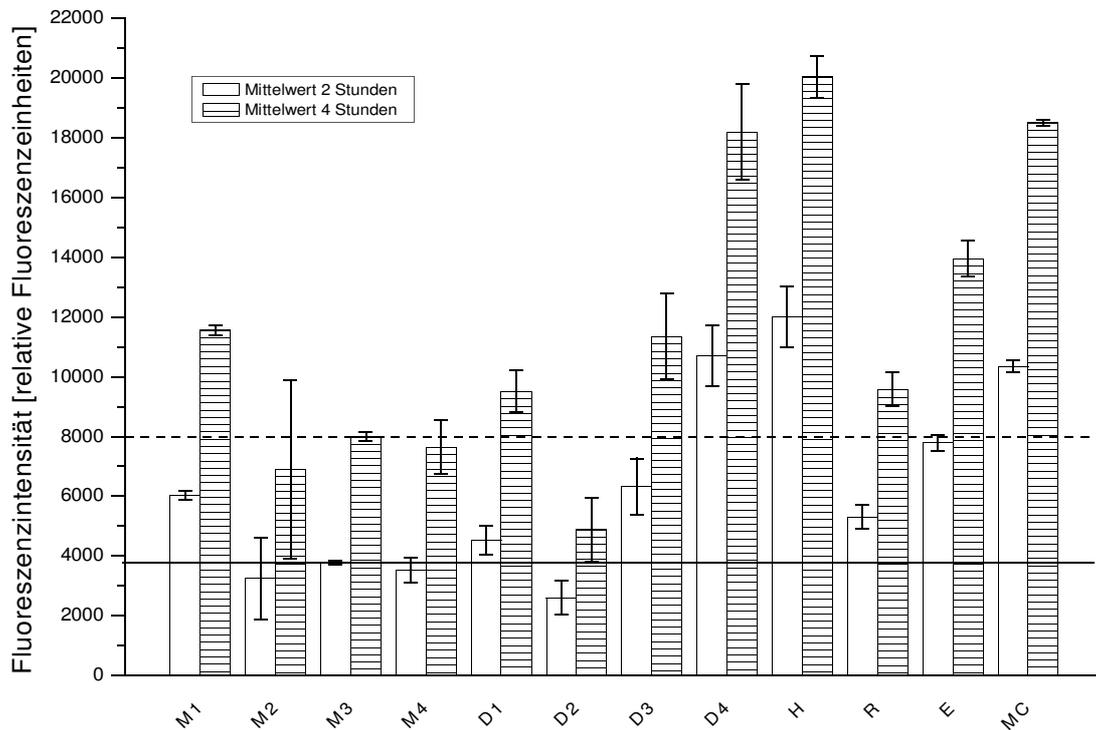


Abb. 12: Vitalitätsbeeinflussung bei Einsatz unterschiedlicher Zellkulturmedien auf Primäre Schweinehirnendothelzellen, die verschiedenen Medien M1 – M4, D1 – D2, H, R, E und MC entsprechen den Zellkulturmedien aus Tab. 18, Untersuchung wurde mittels des CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay durchgeführt (Mittelwert  $\pm$   $\sigma$ , n=3)

rin. Dieses Medium führte eindeutig zu weniger vitalen Zellen und ist deshalb für die Kultivierung primärer Schweinehirnendothelzellen nicht geeignet.

4 Stunden nach Zugabe des Reagenz ist nur noch zwischen der Kontrolle und M199 mit Hydrocortison sowie M199 Kultivierungsmedium mit Puromycin eine gleich starke Vitalität der Zellen zu erkennen. Medium DMEM/hg zeigt nach 4 Stunden eine leicht stärkere Vitalität der behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Alle anderen Medien führten bei den damit behandelten Zellen nach 4 Stunden Resazurin-Einwirkung zu einer höheren Zellvitalität im Vergleich zum M199-Kultivierungsmedium.

Aufgrund dieser Untersuchung kann man schließen, dass es entscheidend für Untersuchungen von Transportvorgängen am aus primären Schweinehirnendothelzellen gebildeten Monolayer ist, in welchem Medium die Zellen kultiviert werden und in welchem Medium die Transportuntersuchung durchgeführt wird. Vor allem für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Laboren spielt dies eine wichtige Rolle.

## 2.2.2. Vitalitätsbeeinflussung der Endothelzellen durch verschiedene NO-Donoren

Untersuchungen auf Vitalitätsbeeinflussung von Schweinehirnendothelzellen wurden mit den verschiedenen NO-Donoren PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, SperminNONOat, DETA/NO und PYRRO/NO sowie den NO-Donor-Prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO und TOSYL-PYRRO/NO durchgeführt (siehe Abb. 13 und Abb. 14). Dabei zeigte sich, dass die NO-Liberatoren, die Stickstoffmonoxid bei Lösen in physiologischen, wässrigen Medien sofort freisetzen, ein anderes Verhalten im Vergleich zu den Substanzen zeigen, die einer Bioaktivierung unterworfen werden müssen.

Die beiden in wässrigem Milieu sofort NO freisetzenden Substanzen PHEPIPERAZI/NO und DBA/NO zeigten mit steigender Konzentration an NO-Donor eine steigende Vitalität, wie aus Abb. 13 ersichtlich ist. Bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  zeigt sich eine deutlich höhere Vitalität wie die Kontrolle ohne NO-Donor. Das NO-Donor-Prodrug Tosyl-PYRRO/NO führt mit steigenden Konzentrationen zu einer abnehmenden Vitalität der Endothelzellen. Bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  ist die Vitalität signifikant niedriger verglichen mit den Zellen die nicht mit NO-Donoren behandelt worden sind. Bei der Substanz Et-PHEPIPERAZI/NO zeigt sich ein differenzierteres Bild. Bei Einsatz einer 10  $\mu\text{M}$ -NO-Donor-Lösung von Et-PHEPIPERAZI/NO kann kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Dies entspricht auch der Beobachtung bei Einsatz von Tosyl-PYRRO/NO in der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Im Unterschied zu Tosyl-PYRRO/NO wird allerdings bei einer 10fach höheren Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) von Et-PHEPIPERAZI/NO eine deutliche Steigerung der Vitalität beobachtet. Erst bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  fällt die Vitalität der untersuchten Endothelzellen ab.

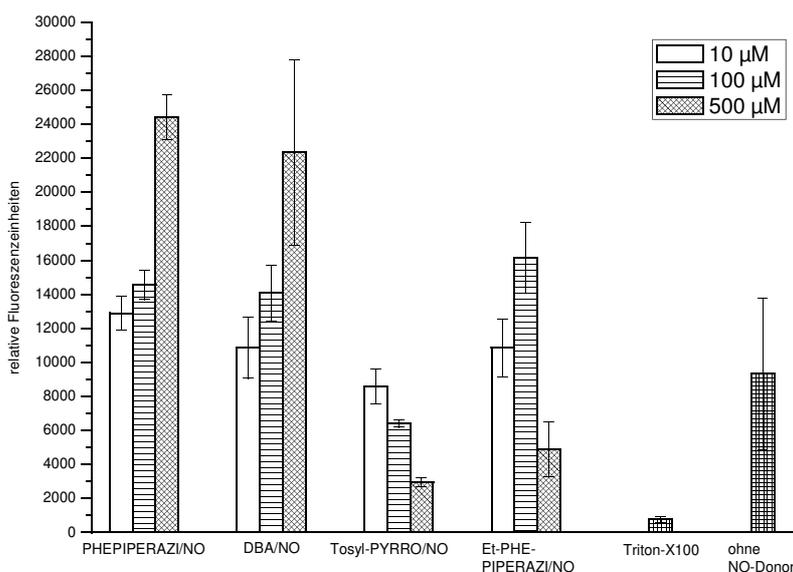


Abb. 13: Vitalitätsuntersuchung primärer Schweinehirnendothelzellen mit dem CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay, Substanzen wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und mit Triton-X100 abgetötete Zellen (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3)

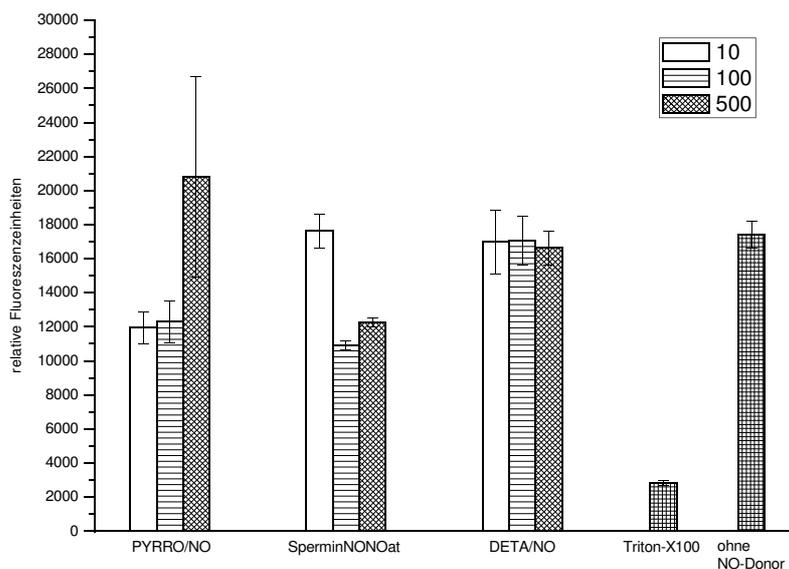


Abb. 14: Vitalitätsuntersuchung primärer Schweinehirnendothelzellen mit dem CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay, Substanzen wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und mit Triton-X100 abgetötete Zellen (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

Pyrro/NO hatte in allen drei untersuchten Konzentrationen keinen Effekt auf die Zellvitalität von primären Schweinehirnendothelzellen. Pyrro/NO senkte in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  die Zellvitalität etwas im Vergleich zum Kontrollexperiment. In einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  war kein Unterschied zur Kontrolle mehr zu erkennen. Bei dem NO-Donor SperminNONOat sank die Zellvitalität bei Behandlung der Zellen mit 100 und 500  $\mu\text{M}$  an SperminNONOat im Vergleich zur Kontrolle.

Alle mit NO-Donor oder mit NO-Donor-Prodrug behandelten Zellen zeigten eine deutlich höhere Vitalität verglichen mit den Triton-X-100 abgetöteten Zellen. Der Einsatz dieser Substanzen führt damit nicht zu einem vermehrten Zelltod, sodass eine Beeinflussung des im folgenden untersuchten Carboxyfluoresceintransports auf diesem Wege durch die NO liberierenden Substanzen ausgeschlossen werden kann. Da bei diesem Test die Fähigkeit der Zellen mittels Mitochondrien die eingesetzte Testsubstanz umzuwandeln gemessen wurde, kann geschlossen werden, dass durch den Zusatz der Substanzen zu den Endothelzellen die mitochondriale Tätigkeit erhöht wurde.

## 2.3. Flußbeeinflussung durch NO freisetzende Substanzen

### 2.3.1. Spontan zerfallende NO-Donoren

Diese Substanzen haben den Vorteil, dass sie in basischen Medium gelöst stabil sind und erst zerfallen, wenn der pH-Wert auf physiologische Werte (pH 7,4) abgesenkt wird. Damit ist es möglich, mit Stammlösungen zu arbeiten. Man führt auch keine weiteren Substanzen in das Experiment mit ein, die eine Veränderung des Milieus herbeiführen könnten.

#### 2.3.1.1. PHEPIPERAZI/NO

PHEPIPERAZI/NO ist die Substanz, die bei relativ undichten Monolayern den größten Effekt hinsichtlich der abdichtenden Wirkung zeigte. Dies wird in Abb. 15 deutlich. Die bei diesen Experimenten eingesetzten, unbehandelten Monolayer zeigten niedrigere TEER-Werte verglichen mit den standardmäßig eingesetzten Monolayern, was auf nicht so dichte Monolayer hinweist und dadurch auch verglichen mit dichten Monolayern sehr hohe  $P_{app}$ -Werte erzielt werden. Diese  $P_{app}$ -Werte konnten durch Behandlung der Monolayer mit dem NO-Donor PHEPIPERAZI/NO deutlich gesenkt werden, wobei die stärksten Effekte mit der höchsten untersuchten Konzentration (500  $\mu\text{M}$ ) erzielt wurden. Bereits mit der geringsten Konzentration an PHEPIPERAZI/NO wurde eine deutliche Absenkung des apparenten Permeationskoeffizienten erzielt. Der Unterschied zwischen 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO war nicht signifikant, es war nur eine sehr minimale Steigerung der Dichtigkeit des Monolayers bei Einsatz der höchsten Konzentration verglichen mit der halb so großen Konzentration zu erzielen.

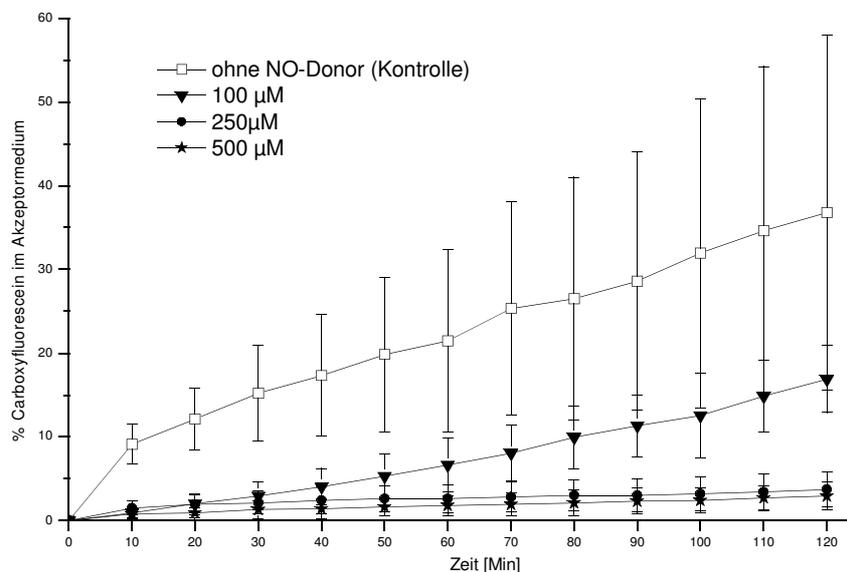


Abb. 15: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, nach Behandlung der Monolayer mit unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) an NO-Donor PHEPIPERAZI/NO, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3)

Um den Effekt der NO-Donoren auf den Fluß von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer besser quantifizieren zu können, wurden aus den ermittelten Konzentrationen die apparenten Permeationskoeffizienten  $P_{app}$  berechnet. Diese Werte ermöglichen einen Vergleich des Einflusses von NO-Donoren auf den Fluß der Markersubstanz. Dabei wurden zwei Methoden der Berechnung herangezogen.

In der Berechnungsmethode 1 wurden alle vorliegenden Werten für das 120 Minuten-Experiment in die Ermittlung des  $P_{app}$ -Wertes mit einbezogen (Abb. 16 a; Tab. 19, Spalte 2). Bei der Berechnung nach Methode 2 wurden nur die Werte zu Beginn der Messung des Flusses für 0, 10 und 20 Minuten benutzt (Abb. 16 b; Tab. 19, Spalte 3).

In Abb. 16 a ist eine stetige Abnahme der  $P_{app}$ -Werte bei steigenden Konzentrationen an eingesetztem NO-Donor zu erkennen. Die Permeationskoeffizienten  $P_{app}$  wurden nach Methode 1 berechnet. Der  $P_{app}$ -Wert für die Konzentration 500  $\mu\text{M}$  an NO-Donor unterscheidet sich dabei nicht deutlich von dem  $P_{app}$ -Wert der bei Einsatz von 250  $\mu\text{M}$  an NO-Donor erzielt wird, wie aus Tab. 19 ersichtlich ist.

Bei Berechnung der apparenten Permeationskoeffizienten nach Methode 2 (Abb. 16 b) ist eine deutliche Abnahme der Permeationskoeffizienten im Vergleich zu den unbehandelten Monolayern zu erkennen, verglichen mit den Werten, welche man nach Berechnungsmethode 1 erhält. Zwischen den drei untersuchten unterschiedlichen Konzentrationen an PHEPIPERAZI/NO (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) gibt es im Vergleich zur Berechnung nach Methode 1 keinen deutlichen und signifikanten Unterschied.

Zu Beginn des Experimentes gibt es keinen Unterschied im Fluß von Carboxyfluorescein über die mit unterschiedlichen Konzentrationen an PHEPIPERAZI/NO behandelten Endothelzellmonolayer. Dieser Unterschied zeigt sich erst deutlich nach 60 Minuten Behandlungsdauer mit dem NO-Donor, unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Dadurch erhält man die bei

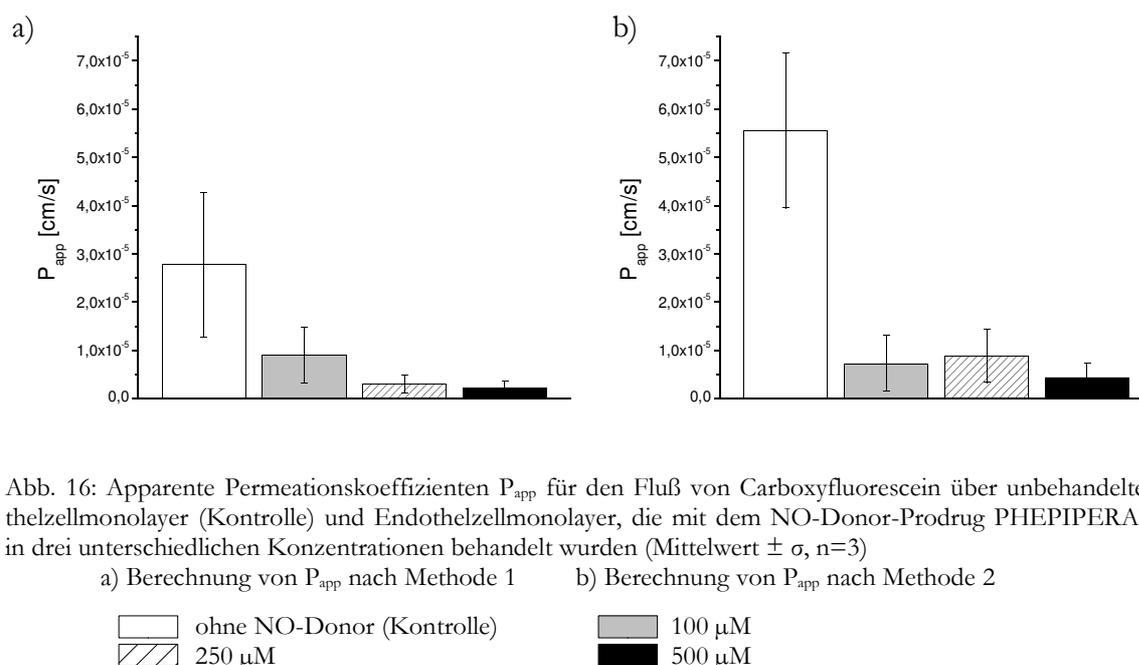


Abb. 16: Apparente Permeationskoeffizienten  $P_{app}$  für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer (Kontrolle) und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor-Prodrug PHEPIPERAZI/NO in drei unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

dieser Untersuchung sich ergebenden Unterschiede für die  $P_{app}$ -Werte bei Benutzung der unterschiedlichen Berechnungsmethoden (Abb. 16, Tab. 19).

Eine weitere Möglichkeit, um einen qualitativen und quantitativen Vergleich des Einflusses unterschiedlicher Konzentrationen an NO-Donoren oder NO-Donor-Prodrugs auf den Fluß von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer durchzuführen, bietet die Berechnung der Menge an Carboxyfluorescein, die sich über die Zeit des Experimentes im Akzeptorkompartiment anreichert. Dazu wird die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve = AUC) berechnet. Diese Fläche ist ein Ausdruck für die Menge an Carboxyfluorescein, die sich im betrachteten Kompartiment befindet. Die Fläche unter der Kurve ist unabhängig von der Form der Kurve, da die Gesamtfläche aus den Einzelflächen zwischen den einzelnen Zeitpunkten berechnet wird und eignet sich damit auch für den Vergleich von Kurven, die keinen linearen Anstieg der Konzentration über die Zeit aufweisen.

Der Vergleich der Ergebnisse der AUC-Berechnung (dargestellt in Abb. 17 und Tab. 19) mit den Ergebnissen der Berechnung der apparenten Permeabilitätskoeffizienten (Abb. 16 a und b, sowie Tab. 19) zeigt eine bessere Übereinstimmung der AUC-Werte mit denen der Berechnung der apparenten Permeationskoeffizienten nach Methode 1.

Um eine bessere Vergleichbarkeit dieser beiden unterschiedlichen Berechnungsmethoden ( $P_{app}$  und AUC) zu ermöglichen, wurde die prozentuale Änderung der  $P_{app}$ -Werte im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Ebenso wurde die prozentuale Änderung der AUC-Werte im Vergleich zur Kontrolle berechnet. Aus den erhaltenen Werten wurden die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen errechnet.

Bei Berechnung der  $P_{app}$ -Werte nach Methode 1 ergibt sich für die  $P_{app}$ -Werte des Flusses von Carboxyfluorescein nach Behandlung der Monolayer mit 100  $\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO eine Abnahme auf  $38,0 \pm 26,0$  % der Kontrolle. Die  $P_{app}$ -Werte für das Experiment mit 250  $\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO betragen  $12,7 \pm 8,5$  % der Kontrolle und bei Behandlung der Endothelzellen mit 500  $\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO ergibt sich eine Reduktion des  $P_{app}$ -Wertes auf  $9,2 \pm 6,3$  % der Kontrolle. Bei Berechnung der Abnahme der apparenten Permeationskoeffizienten, welche nach Methode 2 berechnet wurden, werden die folgenden Werte erzielt: Reduktion auf  $13,9 \pm 10,4$  %

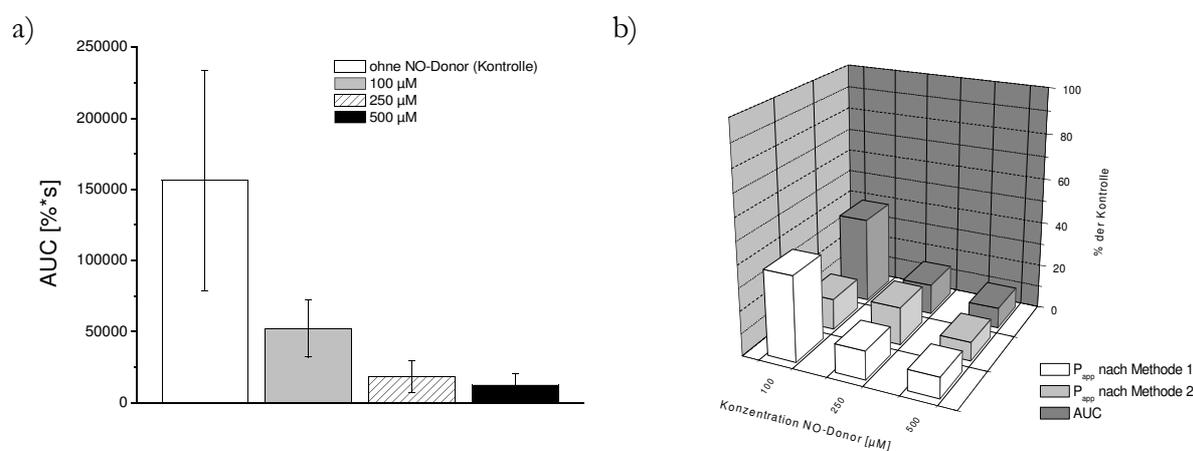


Abb. 17: a) AUC-Werte für die Fluß-Experimente nach Beeinflussung der Permeabilität für Carboxyfluorescein durch drei unterschiedliche Konzentrationen an NO-Donor PHEPIPERAZI/NO, als Kontrolle unbehandelte Monolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )  
 b) Vergleich der beiden Berechnungsmethoden für  $P_{app}$  und der AUC-Werte, Darstellung der prozentualen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert,  $n=3$ )

der Kontrolle,  $16,8 \pm 10,2$  % der Kontrolle und  $8,3 \pm 5,5$  % des Kontrollexperimentes bei Einsatz von Konzentrationen von  $100 \mu\text{M}$ ,  $250 \mu\text{M}$  und  $500 \mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO zur Behandlung der Endothelzellmonolayer.

Die AUC-Werte reduzieren sich bei Einsatz von  $100 \mu\text{M}$  an NO-Donor auf  $38,3 \pm 18,4$  % der Kontrolle, bei Benutzung von  $250 \mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO reduziert sich der AUC-Wert auf  $13,4 \pm 8,8$  % der Kontrolle und bei Einsatz der höchsten untersuchten Konzentration von  $500 \mu\text{M}$  sinkt der AUC-Wert auf  $9,1 \pm 6,3$  % der Kontrolle.

Bei Betrachtung der Absenkung der Werte für die  $P_{\text{app}}$ -Werte bei unterschiedlichen Berechnungsmethoden und der Absenkung der AUC-Werte so ist die größte Übereinstimmung zwischen den Werten für  $P_{\text{app}}$  welche nach Methode 1 berechnet wurden und den AUC-Werten zu erkennen. Die Absenkung erfolgt auf fast identische Werte, im Gegensatz zu der Berechnung der  $P_{\text{app}}$ -Werte nach Methode 2.

Die AUC-Bestimmung stellt also eine adäquate Vergleichsmöglichkeit für Flußuntersuchungen dar, vor allem wenn der Anstieg der Konzentrationen nicht linear erfolgt. Eine einfache Möglichkeit, um einen Hinweis auf Linearität des Anstieges ist die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes. Dieser Wert ist nicht ohne Einschränkung einzusetzen, da er nur die Abweichung der Einzelwerte von der berechneten Ausgleichsgeraden berechnet. Wenn diese nach allen Seiten gleichstark schwanken, kann trotz Nichtvorhandenseins einer Linearität ein gutes Bestimmtheitsmaß errechnet werden. Deshalb ist immer die Kontrolle mit dem Kurvenverlauf wichtig, um die Aussage dieses Wertes einordnen zu können. Betrachtet man sich die Bestimmtheitsmaße in Tab. 19 für die einzelnen Experimente, so fällt auf, dass besonders bei Einsatz von  $250 \mu\text{M}$  an NO-Donor keine gute Linearität des Anstieges mehr gewährleistet ist.

Tab. 19:  $P_{\text{app}}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor PHEPIPERAZI/NO, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	<b><math>P_{\text{app}}</math>-Werte (<math>\times 10^{-5}</math>) [cm/s]</b>		<b>AUC [%*s]</b>	<b>Bestimmtheitsmaß <math>r^2</math></b>	<b><math>f_1</math>-Faktor</b>	<b><math>f_2</math>-Faktor</b>
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor (Kontrolle)	$2,77 \pm 1,49$	$5,56 \pm 1,60$	$156210 \pm 77449$	0,970		
100 $\mu\text{M}$	$0,90 \pm 0,57$	$0,73 \pm 0,58$	$52140 \pm 19971$	0,986	65,79	41,01
250 $\mu\text{M}$	$0,30 \pm 0,19$	$0,88 \pm 0,55$	$18210 \pm 11371$	0,830	88,45	33,71
500 $\mu\text{M}$	$0,22 \pm 0,14$	$0,43 \pm 0,30$	$12390 \pm 8337$	0,959	92,07	32,96

Die Faktoren  $f_1$  und  $f_2$  sollen helfen, eine Entscheidung zu treffen, ob sich der Fluß von Carboxyfluorescein über mit NO-Donor behandelte Endothelzellmonolayer vom Fluß über unbehandelte Endothelzellmonolayer unterscheidet. Der Differenzfaktor  $f_1$  sollte dabei einen Wert über 70 annehmen, der Gleichheitsfaktor  $f_2$  sollte nahe Null liegen, maximal einen Wert von 40 annehmen, um Unterschiedlichkeit zwischen der betrachteten Kurve und der Kontrolle postulieren zu können.

Der NO-Donor PHEPIPERAZI/NO führt in Konzentrationen von 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  zu einem zur Kontrolle deutlich unterschiedlichen Kurvenverlauf der Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment. Für den Fluß über die Monolayer, die mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO behandelt wurden, kann kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden, wenn die  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktoren betrachtet werden.

### 2.3.1.2. DBA/NO

DBA/NO zeichnet sich durch eine etwas längere Halbwertszeit aus, verglichen mit dem NO-Donor PHEPIPERAZI/NO. Dies bedeutet, das Stickstoffmonoxid langsamer freigesetzt wird und dadurch länger auf die Endothelzellen einwirken kann.

Betrachtet man Abb. 18, in der die zeitabhängige Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment für die drei untersuchten Konzentrationen an NO-Donor (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) dargestellt ist, so erkennt man hier die höhere Dichtigkeit des Monolayers, verglichen mit der Untersuchung der Beeinflussung des Monolayers durch PHEPIPERAZI/NO. Dies wird verdeutlicht durch den langsameren Anstieg der Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment, was auf deutlich dichtere Zell-Zell-Verbindungen hinweist. Dies führt im Vergleich mit der vorhergehenden Untersuchung zu geringeren  $P_{\text{app}}$ -Werten (siehe Tab. 19 und Tab. 20).

Bei Behandlung der Endothelzellen mit dem NO-Donor DBA/NO kommt es zu einer deutlichen Verlangsamung des Flusses an Carboxyfluorescein vom Donor- in das Akzeptorkompartiment. Aufgrund der bei diesem Experiment schon vorhandenen hohen Dichtigkeit des Monolayers ohne Behandlung mit NO-Donoren ist die Absenkung des Flusses nach Behandlung der Monolayer mit dem NO-Donor DBA/NO deutlich im Vergleich zur Kontrolle, aber es gibt keine Unterschiede im Fluß von Carboxyfluorescein zwischen den drei untersuchten Konzentrationen an DBA/NO.

Die Auswertung der Flußänderung erfolgte auch bei diesem Experiment über die Berechnung der apparenten Permeationskoeffizienten, auch wenn der Anstieg der Konzentrationen nicht bei

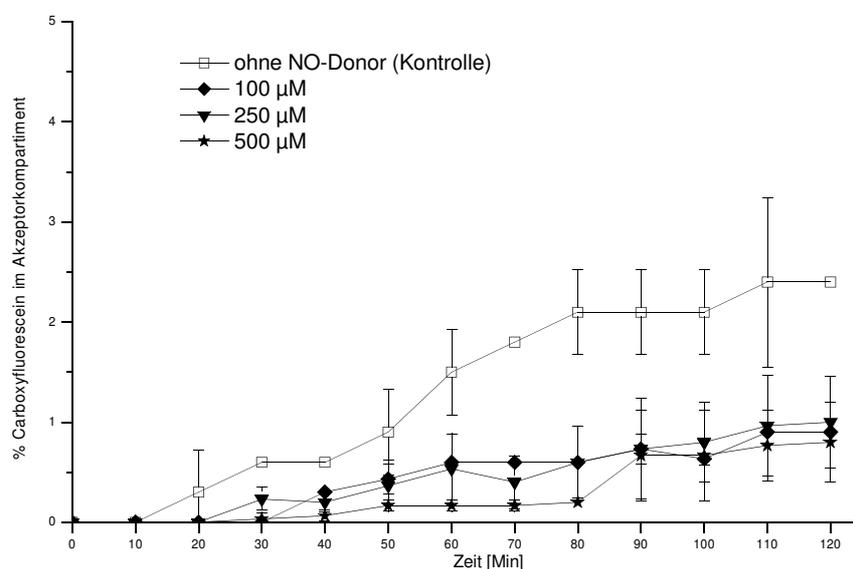


Abb. 18: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, nach Behandlung der Monolayer mit unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) an NO-Donor DBA/NO, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm$   $\sigma$ , n=3)

allen drei untersuchten Konzentrationen exakt linear erfolgt, wie sich aus Berechnung des Bestimmtheitsmaßes ablesen lässt (Tab. 20, Spalte 5).

Bei Vergleich der beiden unterschiedlichen Berechnungsarten für den apparenten Permeationskoeffizienten fällt auf, dass bei beiden kein Unterschied in den errechneten  $P_{app}$ -Werten zwischen den drei eingesetzten Konzentrationen an DBA/NO besteht (Abb. 19 a und b, Tab. 20). Da zu Beginn des Experimentes kurz nach der Zugabe des NO-Donors noch kein Carboxyfluorescein in das Akzeptorkompartiment gelangt ist, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, wird als Wert für den apparenten Permeationskoeffizienten bei allen drei untersuchten Konzentrationen an DBA/NO bei Berechnung nach Methode 2 Null erhalten.

Für den Vergleich zwischen den berechneten AUC-Werten und den beiden Berechnungsmethoden für den apparenten Permeationskoeffizienten eignet sich deswegen nur die Methode, bei der alle Werte der 120 Minuten-Bestimmung für die  $P_{app}$ -Ermittlung herangezogen werden (Methode 1). Die AUC-Werte zeigen ein vergleichbares Bild zu den  $P_{app}$ -Werten, welche nach Methode 1 berechnet wurden.

Die  $P_{app}$ -Werte für die Flußbestimmung von Carboxyfluorescein sinken nach Behandlung der Endothelzellen mit 100  $\mu\text{M}$  DBA/NO auf  $35,0 \pm 3,8$  % der Kontrolle, bei Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  DBA/NO auf  $36,4 \pm 23,0$  % der Kontrolle und bei Einsatz von 500  $\mu\text{M}$  DBA/NO auf  $25,0 \pm 15,4$  % der Kontrolle.

Für die AUC-Bestimmung liegen die Werte für die unterschiedlichen Konzentrationen an NO-Donor bei  $34,1 \pm 4,5$  % der Kontrolle nach Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  DBA/NO, bei  $34,4 \pm 22,8$  % der Kontrolle für die Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  DBA/NO und bei  $21,6 \pm 13,2$  % der Kontrolle bei Beeinflussung der Endothelzelldichtigkeit mit 500  $\mu\text{M}$  DBA/NO.

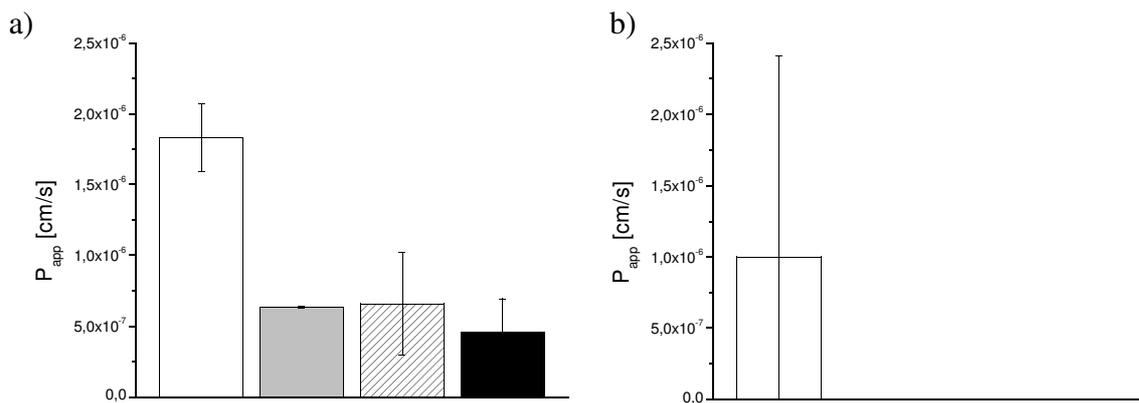


Abb. 19: Apparente Permeationskoeffizienten  $P_{app}$  für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer (Kontrolle) und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor-Prodrug DBA/NO behandelt wurden (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

a) Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1

b) Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 2

□ ohne NO-Donor (Kontrolle)  
 ▨ 250  $\mu\text{M}$

■ 100  $\mu\text{M}$   
 ■ 500  $\mu\text{M}$

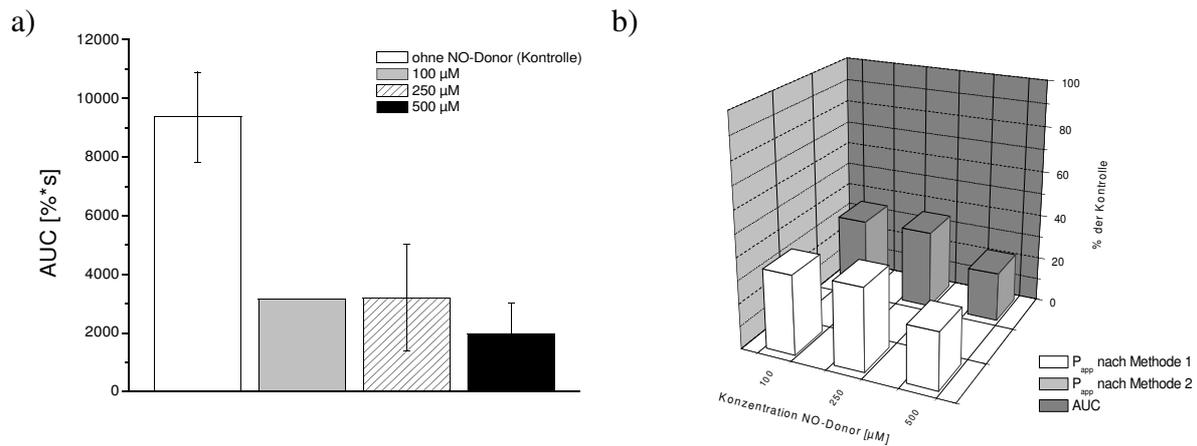


Abb. 20: a) AUC-Werte für die Fluß-Experimente nach Beeinflussung der Permeabilität für Carboxyfluorescein durch drei unterschiedliche Konzentrationen an NO-Donor DBA/NO, als Kontrolle unbehandelte Mono layer (Mittelwert  $\pm$   $\sigma$ , n=3)  
 b) Vergleich der beiden Berechnungsmethoden für  $P_{app}$  und der AUC-Werte, Darstellung der prozentualen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert, n=3)

Die Berechnung der AUC und die Berechnung der  $P_{app}$ -Werte führen bei Berechnung der Änderung gegenüber der Kontrolle zu gleichen Werten. Auch hier zeigt sich, dass bei linearem und auch bei nichtlinearem Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurve die AUC-Werte mit den  $P_{app}$ -Werten korrelieren. Die AUC-Berechnung eignet sich demzufolge gut, um einen Vergleich verschiedener Konzentrations-Zeit-Kurven durchzuführen, wenn die Bestimmung der Permeationskoeffizienten aufgrund fehlender Linearität des Anstiegs nicht sinnvoll ist.

Zieht man die Gleichheitsfaktoren und Differenzfaktoren heran, um festzustellen, ob es einen Unterschied zur Kontrolle gibt, so kann man postulieren, dass es keinen Unterschied zu der Kontrolle unabhängig von der untersuchten Konzentration an DBA/NO gibt. Diese Aussage widerspricht der Daten der AUC-Bestimmung und der  $P_{app}$ -Werte. In diesem Fall, wenn die Konzentrationen so gering sind, scheint die Berechnung der  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktoren nicht geeignet zu sein, um die Unterschiedlichkeit von Kurven zu beurteilen.

Tab. 20:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor DBA/NO, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor wurden für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor (Kontrolle)	$0,18 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,01$	$9360 \pm 1527$	0,955		
100 $\mu\text{M}$	$0,06 \pm 0,00$	0	$3150 \pm 0$	0,919	66,07	92,15
250 $\mu\text{M}$	$0,07 \pm 0,04$	0	$3200 \pm 1818$	0,963	65,28	92,31
500 $\mu\text{M}$	$0,05 \pm 0,02$	0	$1980 \pm 1025$	0,836	77,98	90,35

### 2.3.1.3. DETA/NO

DETA/NO nimmt mit einer Halbwertszeit von 10 bis 20 Stunden eine Sonderstellung bei den in dieser Untersuchung verwendeten NO-Donoren ein.

Die niedrigste untersuchte Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) zeigte noch keinen Effekt auf den Fluß von Carboxyfluorescein, es ist kein Unterschied zwischen der Kontrolle (unbehandelte Endothelzellen) und den mit DETA/NO behandelten primären Schweinehirndothelzellen hinsichtlich der Permeation von Carboxyfluorescein über den Monolayer festzustellen.

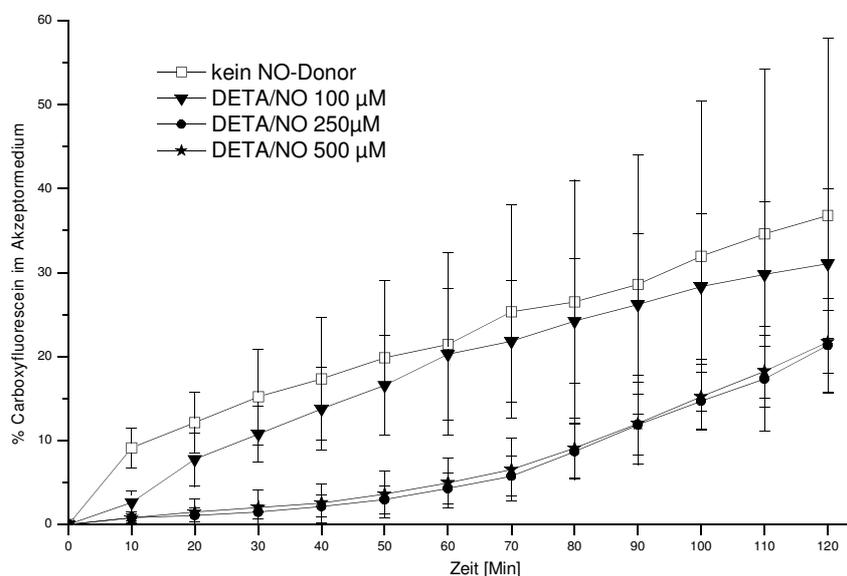


Abb. 21: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, nach Behandlung der Monolayer mit unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) an NO-Donor DETA/NO, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

Werden höhere Konzentrationen an DETA/NO eingesetzt, so kommt es zu einer deutlich verringerten Permeabilität für Carboxyfluorescein verglichen mit dem Fluß über unbehandelte Endothelzellen. Insbesondere zu Beginn der Untersuchung ist die Reduktion des Flusses an Carboxyfluorescein besonders stark. Nach 60 Minuten steigt die Konzentration im Akzeptorkompartiment deutlich schneller an wie zu Beginn der Messung. Dieses Verhalten ist beim Behandeln mit 250  $\mu\text{M}$  sowie mit 500  $\mu\text{M}$  NO-Donor identisch. Eine Linearität im Anstieg der Konzentration im Akzeptorkompartiment ist deswegen auch nur für das Kontrollexperiment und das Experiment mit 100  $\mu\text{M}$  DETA/NO gegeben. Dies spiegelt sich in den berechneten Bestimmtheitsmaßen wieder (Tab. 21).

Die Standardabweichungen des Kontrollversuches (Endothelzellen ohne Behandlung mit NO-Donor) sind bei diesem Experiment deutlich größer verglichen mit den Standardabweichungen bei den drei unterschiedlichen eingesetzten Konzentrationen an NO-Donor DETA/NO.

Der Vergleich der Graphen a und b in Abb. 22 zeigt, dass der Trend der Permeationskoeffizienten in beiden Graphen, die die Ergebnisse der unterschiedlichen Berechnungsmethoden für  $P_{\text{app}}$  zeigen, der gleiche ist. Der apparente Permeationskoeffizient sinkt im Vergleich zur Kontrolle bei 100  $\mu\text{M}$  Konzentration an DETA/NO nur geringfügig, aber nicht signifikant. Bei 250  $\mu\text{M}$  an NO-Donor und bei Einsatz von 500  $\mu\text{M}$  an NO-Donor sinkt der Permeationskoeffizient deutlicher im Vergleich zur Kontrolle, es gibt aber keinen Unterschied mehr zwischen dem Fluß von Carboxyfluorescein bei Beeinflussung der Endothelzellmonolayer mit diesen beiden Konzentrationen an DETA/NO.

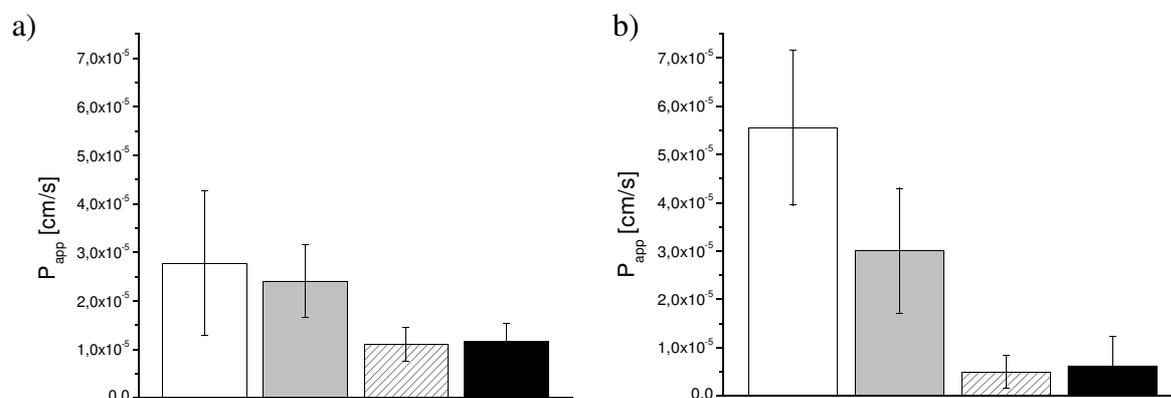


Abb. 22: Apparente Permeationskoeffizienten  $P_{\text{app}}$  für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer (Kontrolle) und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor-Prodrug DETA/NO behandelt wurden (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

a) Berechnung von  $P_{\text{app}}$  nach Methode 1

b) Berechnung von  $P_{\text{app}}$  nach Methode 2

□ ohne NO-Donor (Kontrolle)  
 ▨ 250  $\mu\text{M}$

■ 100  $\mu\text{M}$   
 ■ 500  $\mu\text{M}$

Bei Berechnung auf Grundlage der Daten für die ersten 20 Minuten (Methode 2, Abb. 22 b) ist eine deutlichere Absenkung des  $P_{app}$ -Wertes bei Zugabe einer 100 mikromolaren NO-Donorlösung im Vergleich zur Berechnung der Werte unter Zugrundelegung der Daten für 120 Minuten (Methode 1, Abb. 22 a) zu erkennen. Dies ist auch aus Abb. 21 und Tab. 21 ersichtlich. Die Konzentrationen steigen in den ersten 60 Minuten langsamer, verglichen mit dem Anstieg in der sich anschließenden Zeit. Deswegen ist bei Berechnung der Permeationskoeffizienten nach Methode 2 ein geringerer Wert für  $P_{app}$  erhalten worden, verglichen mit den  $P_{app}$ -Werten, die nach Methode 1 errechnet wurden.

Dies betrifft auch die Werte für die 250 und 500 mikromolaren Lösungen, da auch hier in den ersten 60 Minuten ein deutlich langsames Anwachsen der Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment zu verzeichnen ist. Danach steigen die Konzentrationen deutlich schneller an. Diese Unterschiede in den Permeationskoeffizienten nach den unterschiedlichen Berechnungsverfahren spiegeln damit den Kurvenverlauf der in Abb. 21 für alle drei untersuchten Konzentrationen dargestellt ist, deutlich wider.

Betrachtet man die Reduktion der  $P_{app}$ -Werte so ergibt sich für die Berechnung nach Methode 2 für 100  $\mu\text{M}$  NO-Donor-Behandlung eine Absenkung auf  $57,3 \pm 26,3$  % der Kontrolle und bei Berechnung nach Methode 1 eine Änderung auf  $101,6 \pm 46,5$  % der Kontrolle. Für die zweithöchste Konzentration (250  $\mu\text{M}$ ) wird bei der Berechnungsmethode 2 eine Absenkung auf  $9,3 \pm 6,3$  % der Kontrolle erzielt, bei der Zugrundelegung der  $P_{app}$ -Werte aus Berechnungsmethode 1 errechnet sich eine geringere Reduktion auf  $46,9 \pm 21,5$  % der Kontrolle. Der Einsatz von 500  $\mu\text{M}$  DETA/NO reduziert die Permeationskoeffizienten auf  $11,9 \pm 10,9$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 2) oder auf  $49,2 \pm 22,4$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 1).

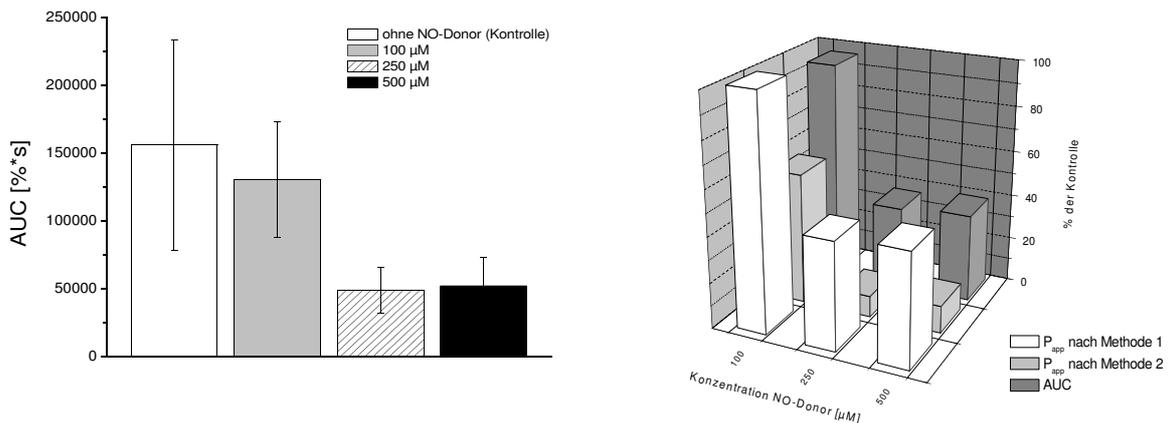


Abb. 23: a) AUC-Werte für die Fluß-Experimente nach Beeinflussung der Permeabilität für Carboxyfluorescein durch drei unterschiedliche Konzentrationen an NO-Donor DETA/NO, als Kontrolle unbehandelte Monolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )  
 b) Vergleich der beiden Berechnungsmethoden für  $P_{app}$  und der AUC-Werte, Darstellung der prozentualen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert,  $n=3$ )

Die AUC-Werte, die den Gesamtgehalt an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment widerspiegeln, sind mit den Werten aus der Berechnung der  $P_{app}$ -Werte nach Methode 1 vergleichbar (Abb. 23 und Tab. 21). Bei Berechnung der Reduktion der Permeation unter Zugrundelegung der AUC-Werte wird für eine 100 mikromolare Lösung eine Absenkung auf  $95,8 \pm 42,8$  % der Kontrolle errechnet, eine 250 mikromolare Lösung senkt die Gesamtmenge an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment auf  $35,9 \pm 16,4$  % der Kontrolle und die höchste untersuchte Konzentration senkte die AUC-Werte auf  $38,4 \pm 18,8$  % der Kontrolle ab. Diese Werte sind vergleichbar mit den Werten aus der Berechnungsmethode 1 in der alle Werte über 120 Minuten mit einfließen. Trotz schlechter Linearität der Konzentrations-Zeit-Kurven bei diesem Experiment entsprechen die Ergebnisse aus Berechnungsmethode 1 stärker den Werten aus der AUC-Berechnung. Bei der Bestimmung der AUC ist es nicht wichtig, ob die Konzentrations-Zeit-Kurven eine Linearität aufweisen oder nicht, da durch das Berechnen über das Trapezverfahren dies keinen Einfluß auf das Ergebnis hat.

Die  $f_1$ - und  $f_2$ -Werte für die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  DETA/NO zeigen deutlich, dass zwischen der Kontrolle und den behandelten Monolayern keine Unterschiede bezüglich der Permeabilität für Carboxyfluorescein bestehen. Betrachtet man die Werte für  $f_1$  und  $f_2$  für die mit 250 und 500  $\mu\text{molaren}$  Lösungen an NO-Donor behandelten Endothelzellmonolayer so ist das Ergebnis nicht so eindeutig. Die  $f_1$ -Faktoren liegen nur geringfügig unter dem festgesetzten Grenzwert von 70 und auch die  $f_2$ -Faktoren überschreiten den festgelegten Grenzwert nur knapp. Würde man die Grenzwerte der FDA für die Beurteilung von Freisetzungskurven heranziehen ( $f_1$  zwischen 50 und 100,  $f_2$  maximal 50), so würden die Werte einen Unterschied zwischen den betrachteten Kurven anzeigen. Dieses Beispiel zeigt deutlich die Schwierigkeit, mittels der Konventionsfaktoren einen Unterschied zu postulieren oder auszuschließen.

Tab. 21:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor DETA/NO, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	<b><math>P_{app}</math>-Werte (<math>\times 10^{-5}</math>) [cm/s]</b>		<b>AUC [%*s] Berechnung über 120 Minuten</b>	<b>Bestimmtheitsmaß <math>r^2</math></b>	<b><math>f_1</math>-Faktor</b>	<b><math>f_2</math>-Faktor</b>
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor (Kontrolle)	$2,77 \pm 1,49$	$5,56 \pm 1,60$	$156210 \pm 77449$	0,970		
100 $\mu\text{M}$	$2,40 \pm 0,75$	$3,01 \pm 1,29$	$130518 \pm 42658$	0,977	16,39	69,72
250 $\mu\text{M}$	$1,11 \pm 0,35$	$0,49 \pm 0,34$	$48960 \pm 16736$	0,892	66,9	40,85
500 $\mu\text{M}$	$1,16 \pm 0,36$	$0,62 \pm 0,62$	$52360 \pm 20681$	0,906	64,8	41,55

### 2.3.1.4. SperminNONOat

SperminNONOat setzt Stickstoffmonoxid im Vergleich mit den anderen untersuchten NO-Donoren relativ langsam frei, hier beträgt die Halbwertszeit etwa 40 Minuten. Damit kann diese Substanz NO über die gesamte Dauer des Experimentes freisetzen. Nur DETA/NO hat eine deutlich längere Halbwertszeit mit 10 bis 20 Stunden. Bei Untersuchung des SperminNONOat-Einflusses auf Endothelzellmonolayer wurden drei Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Im Unterschied zu den bisher betrachteten Substanzen wurde hierbei als dritte Konzentration eine deutlich höhere gewählt.

Die niedrigste eingesetzte Konzentration führt zu keiner Veränderung des Flusses von Carboxyfluorescein. Bei Steigerung der Konzentration an SperminNONOat kommt es zu einer deutlichen Absenkung des Flusses. Steigert man die Konzentration des NO-Donors auf 1000  $\mu\text{M}$  so tritt ein flußsteigernder Effekt auf. Diese Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt.

Die Permeationskoeffizienten der unbehandelten Kontrolle unterscheiden sich nicht von den Permeationskoeffizienten der mit 100  $\mu\text{M}$  SperminNONOat behandelten Monolayer. Deutlich wird dies aus Abb. 25 a und b und bei Betrachtung der Werte in Tab. 22. Auch die diesen beiden Experimenten entsprechenden AUC-Werte sind gleich.

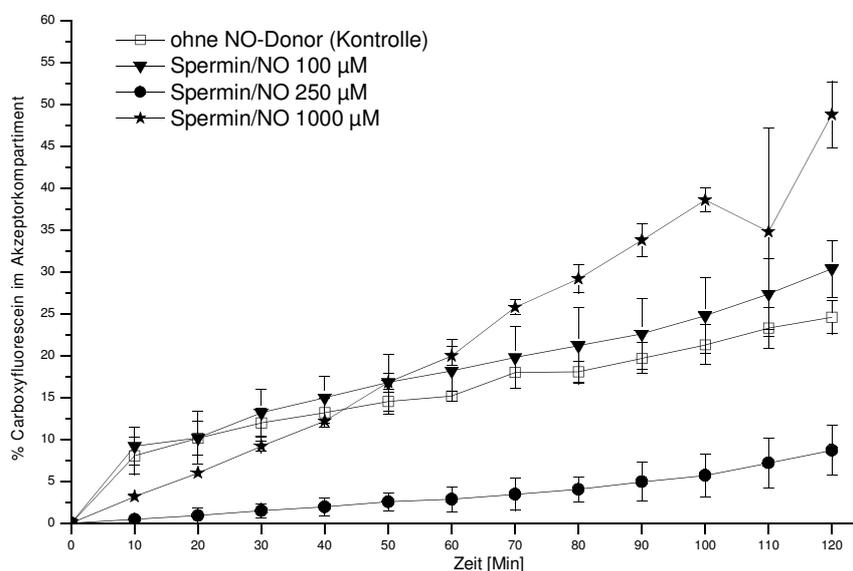


Abb. 24: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, nach Behandlung der Monolayer mit unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) an NO-Donor SperminNONOat, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

Steigt die Konzentration an NO-Donor auf 250  $\mu\text{M}$ , so sinkt nach der Behandlung der Monolayer der  $P_{\text{app}}$ -Wert für Carboxyfluorescein auf  $53,2 \pm 54,7$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 1) oder auf  $24,8 \pm 27,7$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 2). Die für dieses Experiment mit 250  $\mu\text{M}$  an SperminNONOat berechnete AUC beträgt  $47,1 \pm 49,3$  % im Vergleich zur Kontrolle und stimmt damit deutlich besser mit dem errechneten Wert für die  $P_{\text{app}}$ -Reduktion nach Methode 1 überein.

Steigt die NO-Donor-Konzentration auf 1000  $\mu\text{M}$  so steigt der entsprechende  $P_{\text{app}}$ -Wert auf  $100,7 \pm 56,9$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 1. Da zu Beginn des Experimentes in den ersten 20 Minuten die Konzentration an Carboxyfluorescein deutlich langsamer ansteigt verglichen mit der Kontrolle sinkt der  $P_{\text{app}}$ -Wert, wenn er nach Methode 2 berechnet wird, auf  $37,0 \pm 19,8$  % der Kontrolle. Der AUC-Wert sinkt auf  $87,5 \pm 48,5$  % der Kontrolle.

Deutlich wirkt sich die Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  permeabilitätshemmend aus, während eine deutliche Erhöhung der NO-Donor-Konzentration diese Erniedrigung der Permeabilität wieder aufhebt. Dies deutet auf zwei unterschiedliche Mechanismen der Wirkung von SperminNONOat hin. In den niedrigen Konzentrationen kann die geringe NO-Konzentration die Permeation von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer senken. Eine Erklärung für die Aufhebung der permeabilitätsabsenkenden Wirkung bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  SperminNONOat könnte die Aktivierung der Guanylatzyklase sein. Durch deutlich höhere Konzentration von NO in den Endothelzellen wird die Guanylatzyklase aktiviert und erhöht intrazellulär die GMP-Konzentration. Dies kann letztendlich zu einer erhöhten Permeabilität der Endothelzellmonolayer für Carboxyfluorescein führen.

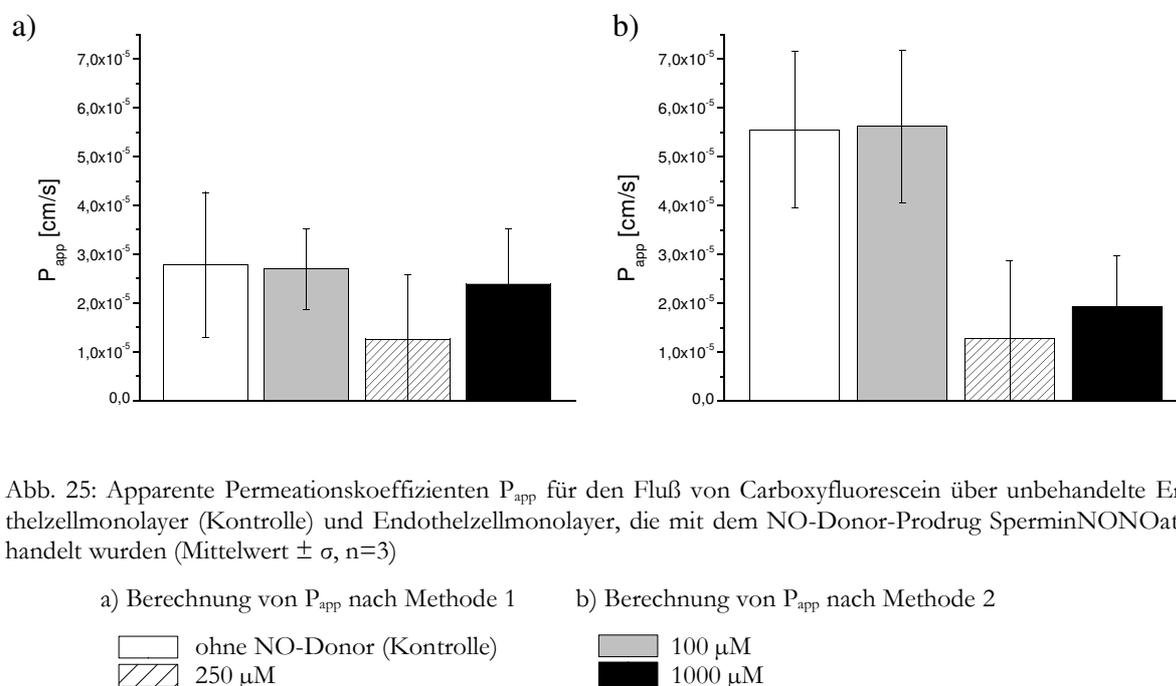


Abb. 25: Apparente Permeationskoeffizienten  $P_{\text{app}}$  für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer (Kontrolle) und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor-Prodrug SperminNONOat behandelt wurden (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

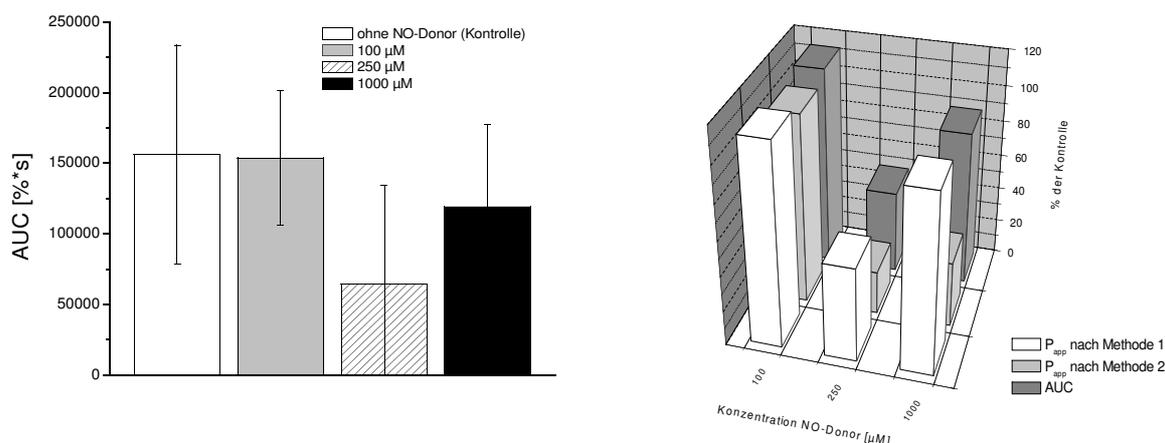


Abb. 26: a) AUC-Werte für die Fluß-Experimente nach Beeinflussung der Permeabilität für Carboxyfluorescein durch drei unterschiedliche Konzentrationen an NO-Donor SperminNONOat, als Kontrolle unbehandelte Monolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )  
 b) Vergleich der beiden Berechnungsmethoden für  $P_{app}$  und der AUC-Werte, Darstellung der prozentualen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert,  $n=3$ )

Die  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktoren weisen bei den Experimenten mit 100  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  an NO-Donor auf keinerlei Unterschiedlichkeit der betrachteten Kurven zur Kontrollkurve auf. Bei Einsatz von 250  $\mu\text{M}$  an SperminNONOat weist der Wert für den  $f_1$ -Faktor auf Unterschiedlichkeit der beiden betrachteten Kurven. Der Wert für  $f_2$  liegt mit 44,9 über der festgelegten Grenze von 40 und damit wird eine Gleichheit der Kurven postuliert. Damit widersprechen sich diese beiden Werte. Betrachtet man die errechneten  $P_{app}$ -Werte und die AUC-Werte (siehe Tab. 22) und den Konzentrationsverlauf von Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment für dieses Experiment und die Kontrolluntersuchung so wird deutlich, dass ein deutlicher, aber statistisch nicht signifikanter Unterschied besteht.

Tab. 22:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor SperminNONOat, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s] Berechnung über 120 Minuten	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor (Kontrolle)	$2,77 \pm 1,49$	$5,56 \pm 1,60$	$156210 \pm 77449$	0,928		
100 $\mu\text{M}$	$2,69 \pm 0,83$	$5,62 \pm 1,56$	$153769 \pm 47589$	0,948	15,48	76,12
250 $\mu\text{M}$	$1,26 \pm 1,33$	$1,28 \pm 1,59$	$64200 \pm 70160$	0,953	77,67	44,94
1000 $\mu\text{M}$	$2,38 \pm 1,14$	$1,94 \pm 1,03$	$119225 \pm 58054$	0,976	53,44	48,51

## 2.3.2. NO-Donor-Prodrugs

Alle Prodrugs, die in dieser Untersuchung verwendet werden, müssen durch Zellen aufgenommen werden, damit intrazelluläre Enzyme die Substanzen spalten können. Erst nach diesem Schritt sind die daraus gebildeten Produkte in der Lage, Stickstoffmonoxid freizusetzen.

NO-Donor-Prodrugs haben daher den Vorteil, dass sie NO nicht spontan freisetzen und somit ihre Stabilität deutlich erhöht ist. Der größte Nachteil bei Benutzung dieser Substanzen ist ihre hohe Lipophilie und damit ihre Unlöslichkeit in wässrigen Medien. Diese Substanzen müssen vor der Anwendung erst in DMSO gelöst werden. Diese Stammlösung kann dann direkt in das Kultivierungsmedium gegeben werden.

### 2.3.2.1. Tosyl-PYRRO/NO

Der erste Vertreter der untersuchten Substanzen, der einer Bioaktivierung bedarf, hat nach Aktivierung durch Spaltung der Ausgangssubstanz eine extrem kurze Halbwertszeit von nur 3 Sekunden. Dies bedeutet, daß diese Substanz, ist sie erst einmal in Zellen eingedrungen und anschließend gespalten worden, ihre Wirkung nur für kurze Zeit aufrechterhalten kann.

In Abb. 27 kann man erkennen, dass Tosyl-PYRRO/NO seine Wirkung auf die Endothelzellen sehr schnell ausübt. Der Effekt, der zu einem höheren Fluß an Carboxyfluorescein durch den Monolayer führt, tritt bereits kurz nach Zugabe des NO-Donor-Prodrugs ein. Bereits nach 20 Minuten sind deutliche Unterschiede im Fluß von Carboxyfluorescein zwischen den drei Mono-

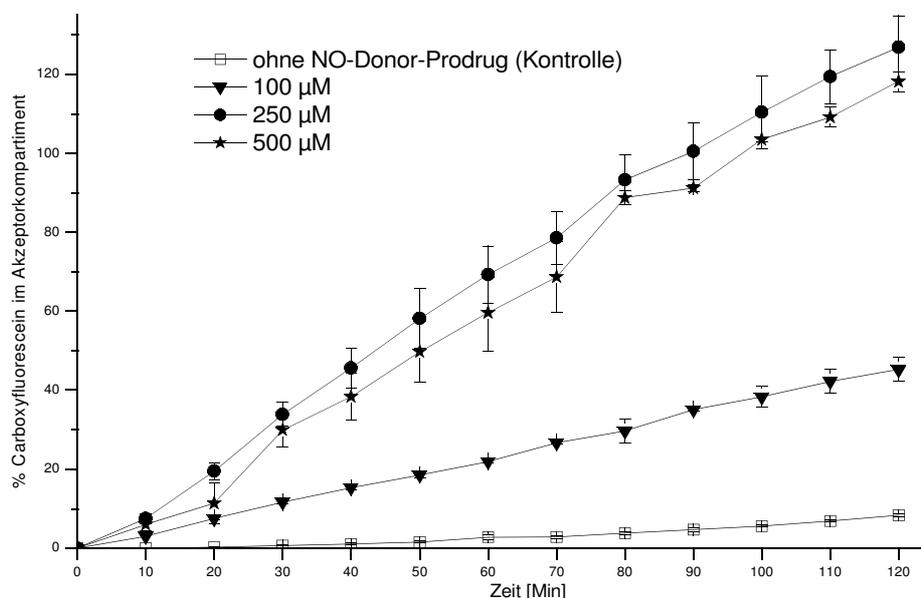


Abb. 27: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, nach Behandlung der Monolayer mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an NO-Donor-Prodrug Tosyl-PYRRO/NO, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm$   $\sigma$ , n=3)

layern die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tosyl-PYRRO/NO behandelt wurden und den unbehandelten Zellen (Kontrolle) zu erkennen. Der beobachtete Effekt ist bei der höchsten untersuchten Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  am größten. Aber schon bei Einsatz der niedrigsten untersuchten Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) kommt es zu einer deutlichen Flußsteigerung, d. h. die Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment steigt schneller an im Vergleich zu unbehandelten Monolayern.

Bei dieser Untersuchung kann kein Unterschied in der Permeabilitätsänderung zwischen dem Einsatz von 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  an NO-Donor-Prodrug festgestellt werden. Es kommt schon bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  zu einer maximalen Schädigung des Endothelzellmonolayers und dadurch zu einem maximalen Fluß von Carboxyfluorescein.

Dass bei diesem NO-Donor-Prodrug der Fluß signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigert werden konnte, zeigt sich auch an den errechneten  $f_1$ - und  $f_2$ -Werten. Die errechneten Differenzfaktoren  $f_1$  überschreiten deutlich den Grenzwert von 100, ebenso unterschreiten die für die unterschiedlichen Konzentrationen an NO-Donor-Prodrug berechneten Gleichheitsfaktoren  $f_2$  den festgelegten Grenzwert von 40. Damit weisen beide Faktoren bei allen drei untersuchten Konzentrationen auf einen deutlichen Unterschied zum Kontrollexperiment hin.

Der lineare Anstieg der Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment für die Monolayer, die mit dem NO-Donor Prodrug Tosyl-PYRRO/NO behandelt wurden, bleibt konstant über den gesamten untersuchten Zeitraum von 120 Minuten. Dies zeigt sich deutlich bei Betrachtung der errechneten Bestimmtheitsmaße (Tab. 23, Abb. 27). Bei dem Kontrollexperiment kam es zu Beginn zu einem sehr langsamen Anstieg der Konzentration an Carboxyfluore-

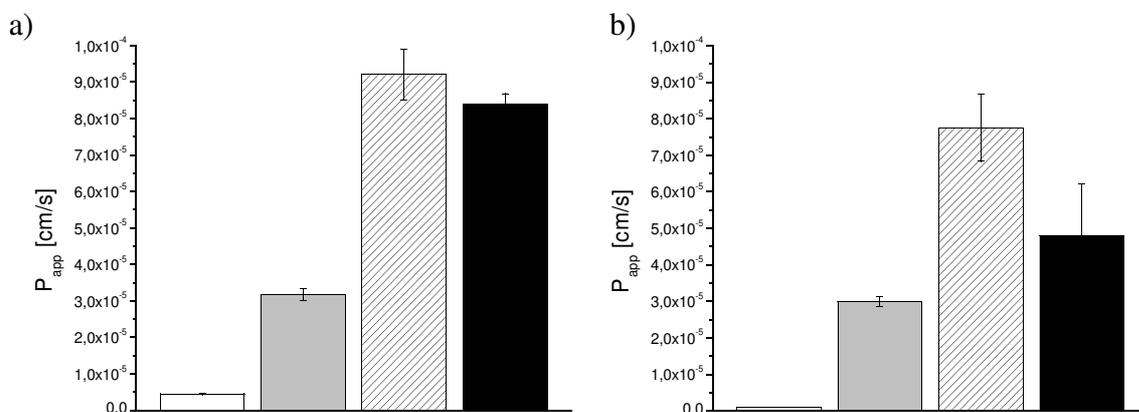


Abb. 28: Apparente Permeationskoeffizienten für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer (Kontrolle) und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor-Prodrug Tosyl-PYRRO/NO behandelt wurden (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

a) Berechnung von  $P_{\text{app}}$  nach Methode 1

□ ohne NO-Donor-Prodrug (Kontrolle)  
 ▨ 250  $\mu\text{M}$

b) Berechnung von  $P_{\text{app}}$  nach Methode 2

■ 100  $\mu\text{M}$   
 ■ 500  $\mu\text{M}$

scein im Akzeptorkompartiment, der sich nach 20 Minuten beschleunigte. Dies führte zu dem geringen Bestimmungsmaß von 0,944.

Die Linearität im Anstieg der Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment führt dazu, dass die Unterschiede zwischen den errechneten  $P_{app}$ -Werten bei den beiden unterschiedlichen Bestimmungsmethoden (Methode 1 und Methode 2) nur gering ausfallen. Ein deutlicher Unterschied zwischen dem  $P_{app}$ -Wert nach Berechnungsmethode 1 und dem Wert nach Berechnungsmethode 2 ergibt sich nur bei der Untersuchung mit der 500  $\mu\text{molaren}$  Lösung. Dies liegt daran, dass die Konzentrationen an Carboxyfluorescein bei Behandlung mit einer 500 mikromolaren Lösung von Tosyl-PYRRO/NO in den ersten 20 Minuten langsamer ansteigen, verglichen mit den restlichen 100 Minuten. Nach den ersten 20 Minuten erhöht sich die Permeabilität, so dass der Fluß von Carboxyfluorescein aus dem Donorkompartiment in das Akzeptorkompartiment erhöht wird, was zu einem schnelleren Ansteigen der Konzentration an Markersubstanz im Akzeptorkompartiment führt.

Bei Berechnung der  $P_{app}$ -Werte nach Methode 1 erhöht sich der Permeabilitätskoeffizienten gegenüber der Kontrolle bei Einsatz einer 100  $\mu\text{molaren}$  Konzentration an Tosyl-PYRRO/NO auf  $708,9 \pm 36,9$  % der Kontrolle, bei Zugabe von 250  $\mu\text{mol}$  an NO-Donor-Prodrug erhöht sich der Wert auf  $2019,2 \pm 162,1$  % der Kontrolle und bei Untersuchung des Einflusses der höchsten Konzentration von 500  $\mu\text{mol}$  steigt der  $P_{app}$ -Wert auf  $1841,4 \pm 112,3$  % der Kontrolle. Die Werte für  $P_{app}$  erhöhen sich bei Berechnung nach Methode 2 auf  $3000,0 \pm 109,5$  % der Kontrolle bei Einsatz von 100  $\mu\text{M}$  an NO-Donor-Prodrug, bei Einsatz von 250  $\mu\text{M}$  an Tosyl-PYRRO/NO erhöht sich der Permeationskoeffizient auf  $7750,0 \pm 712,0$  % der Kontrolle und bei Behandlung der Monolayer mit der höchsten untersuchten Konzentration erhöhte sich der  $P_{app}$ -Wert auf  $4800 \pm 1095,4$  % der Kontrolle.

Betrachtet man die Gegenüberstellung der Werte der beiden Berechnungsverfahren in Abb. 28 so zeigt sich ein qualitativ gleichwertiges Bild der Permeabilitätsänderung für Carboxyfluorescein bei Einsatz steigender Konzentrationen an Tosyl-PYRRO/NO. Die höchste Permeabilität ist mit dem Einsatz von 250  $\mu\text{M}$  Tosyl-PYRRO/NO zu erzielen, bei einer Steigerung der Konzentration auf 500  $\mu\text{M}$  NO-Donor-Prodrug ist eine Reduktion des Permeationskoeffizienten zur zweithöchsten untersuchten Konzentration zu erkennen. Dabei ist der Unterschied zwischen dem Effekt bei Einwirkung einer 250 mikromolaren Lösung und der Einwirkung einer 500 mikromolaren Lösung besonders deutlich bei Betrachtung der Ergebnisse nach Berechnungsmethode 2 (Abb. 28 b).

Dieser deutlicher ausgeprägte Unterschied zwischen den beiden nach Methode 1 oder Methode 2 berechneten Permeationskoeffizienten kommt dabei tatsächlich dadurch zustande, daß der Fluß von Carboxyfluorescein über die Monolayer, die mit 500  $\mu\text{M}$  an NO-Donor-Prodrug behandelt wurden, in den ersten zwanzig Minuten deutlich langsamer ansteigt verglichen mit der Flußuntersuchung bei Benutzung der zweithöchsten untersuchten Konzentration. Dieses Verhalten zu Beginn der Untersuchung setzt sich allerdings nicht über den gesamten betrachteten Zeitraum fort. Deswegen unterscheiden sich diese beiden Permeabilitätskoeffizienten deutlicher bei Berechnung nach Methode 2.

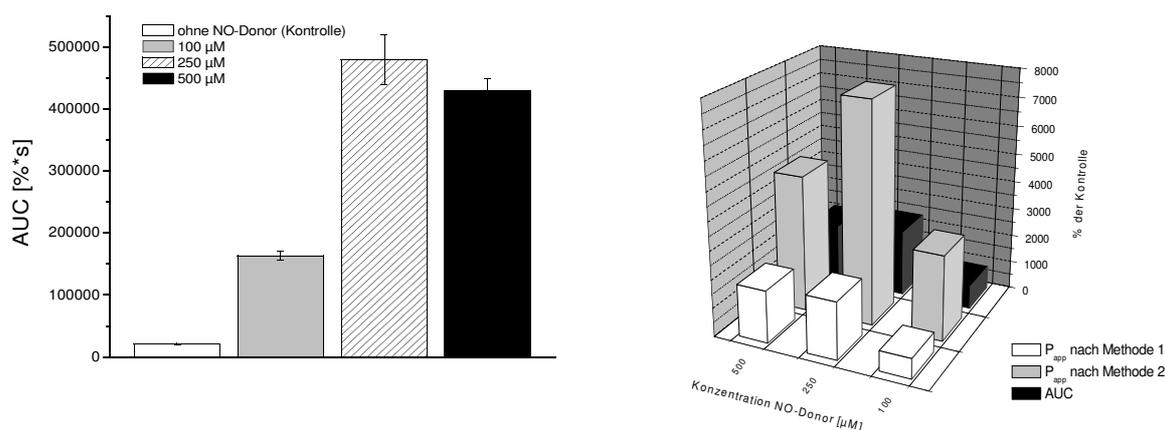


Abb. 29: a) AUC-Werte für die Fluß-Experimente nach Beeinflussung der Permeabilität für Carboxyfluorescein durch drei unterschiedliche Konzentrationen an NO-Donor Tosyl-PYRRO/NO, unbehandelte Monolayer als Kontrolle (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )  
 b) Vergleich der beiden Berechnungsmethoden für  $P_{app}$  und der AUC-Werte, Darstellung der prozentualen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert,  $n=3$ )

In Abb. 29 a sind die Werte für die AUC-Berechnung des Flusses von Carboxyfluorescein über behandelte und unbehandelte Monolayer dargestellt. Die errechneten AUC-Werte für die Monolayer, die mit steigenden Konzentrationen an Tosyl-PYRRO-NO behandelt wurden, korrelieren deutlich besser mit den  $P_{app}$ -Werten, die bei Berechnung nach Methode 1 erhalten werden, dargestellt in Abb. 28 a. Auch die prozentuale Erhöhung der AUC-Werte kann dies bestätigen.

Bei Behandlung der Monolayer mit einer 100  $\mu\text{molaren}$  Lösung an Tosyl-PYRRO/NO erhöht sich im Vergleich zum Kontrolllexperiment die AUC auf  $808,0 \pm 37,6$  % der Kontrolle, bei Untersuchung des Einflusses einer 250  $\mu\text{molaren}$  Lösung erhöht sich der AUC-Wert auf  $2320,6 \pm 199,2$  % der Kontrolle und bei Einsatz einer 500  $\mu\text{molaren}$  Lösung des NO-Donor-Prodrugs erhöht sich der AUC-Wert im Vergleich zur Kontrolle auf  $2077,3 \pm 140,8$  % der Kontrolle.

Tab. 23:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor Tosyl-PYRRO/NO, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor (Kontrolle)	$0,46 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0$	$20730 \pm 1305$	0,944		
100 $\mu\text{M}$	$3,17 \pm 0,17$	$3,00 \pm 0,14$	$163710 \pm 7000$	0,999	663,57	31,86
250 $\mu\text{M}$	$9,20 \pm 0,70$	$7,75 \pm 0,92$	$479790 \pm 40093$	0,995	2130,23	6,45
500 $\mu\text{M}$	$8,39 \pm 0,29$	$4,80 \pm 1,41$	$429480 \pm 20874$	0,992	1902,33	8,55

### 2.3.2.2. Et-PHEPIPERAZI/NO

Et-PHEPIPERAZI/NO ist eine Substanz, die nach der biochemisch induzierten Spaltung eine Halbwertszeit von etwa einer Minute aufweist. Dies ist deutlich länger, verglichen mit den NO-Donoren Tosyl-PYRRO/NO und PENT-BIS-PYRRO/NO. Trotz dieses Unterschiedes in der Halbwertszeit der untersuchten Substanzen Tosyl-PYRRO/NO, PENT-BIS-PYRRO/NO und Et-PHEPIPERAZI/NO ist der Effekt auf die Änderung der Permeabilität von Carboxyfluorescein nach Zugabe von Et-PHEPIPERAZI/NO in den drei untersuchten Konzentrationen vergleichbar mit dem Effekt, den man bei Einsatz von Tosyl-PYRRO/NO erzielt. Bei den drei untersuchten Konzentrationen an Et-PHEPIPERAZI/NO (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) konnte ein konzentrationsabhängiger, permeabilitätssteigernder Effekt festgestellt werden. Je größer die Konzentration an NO-Donor-Prodrug wird, desto größer ist der Fluß von Carboxyfluorescein über den Endothelzellmonolayer. Dieser Effekt setzt schnell ein und führt bereits nach 10 Minuten zu einer signifikant erhöhten Permeabilität der Endothelzellmonolayer für Carboxyfluorescein im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Endothelzellen). Dies gilt für alle drei untersuchten Konzentrationen an Et-PHEPIPERAZI/NO.

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe in Abhängigkeit von der eingesetzten NO-Donor-Prodrug-Konzentration sind in Abb. 30 dargestellt. Der Einsatz einer 100  $\mu\text{molaren}$  Lösung an NO-Donor-Prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO führt zu einer deutlichen Steigerung der Permeabilität, gekennzeichnet durch einen stärkeren Anstieg der Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment verglichen mit der Kontrolle.

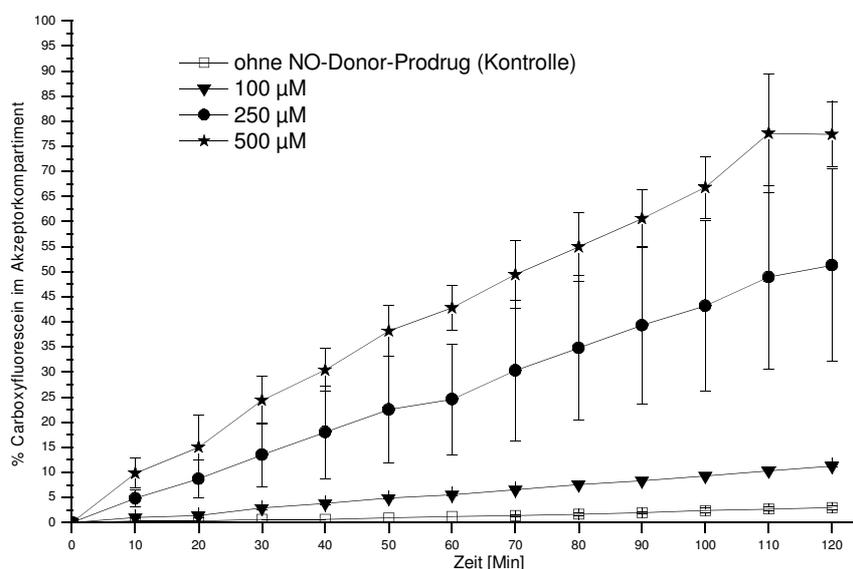


Abb. 30: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, nach Behandlung der Monolayer mit unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) an NO-Donor-Prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ , Werte für 100  $\mu\text{M}$   $n=2$ )

Noch stärker ist dieser Effekt bei Einsatz einer 250  $\mu\text{M}$  Lösung, die Permeabilitätserhöhung konnte bei Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  an Et-PHEPIPERAZI/NO noch gesteigert werden.

Aufgrund der Linearität des Anstiegs der Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment sind die Werte der Permeationskoeffizienten für die beiden Berechnungsmethoden 1 und 2 fast identisch (Abb. 31, Fehler: Referenz nicht gefunden). Der Anstieg ist in den ersten 20 Minuten identisch mit dem Anstieg über die gesamte Dauer des Experimentes (Abb. 30).

Die  $P_{\text{app}}$ -Werte erhöhen sich bei Einsatz einer 100  $\mu\text{M}$  Lösung von Et-PHEPIPERAZI/NO bei Berechnung nach Methode 1 auf  $416,8 \pm 44,3$  % der Kontrolle und bei Berechnung nach Methode 2 auf  $420,0 \pm 84,7$  % der Kontrolle. Bei Untersuchung des Einflusses von 250  $\mu\text{M}$  an Et-PHEPIPERAZI/NO erhöht sich der Permeationskoeffizient auf  $2086,4 \pm 585,0$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 1 und auf  $2400,0 \pm 664,0$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 2. Die höchste Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  an NO-Donor-Prodrug erhöht den  $P_{\text{app}}$ -Wert auf  $3068,9 \pm 428,4$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 1) und auf  $4422,2 \pm 1515,9$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 2).

Nur die  $P_{\text{app}}$ -Werte für den Einfluß der höchsten untersuchten Konzentration (500  $\mu\text{M}$ ) unterscheiden sich deutlich voneinander (Fehler: Referenz nicht gefunden). Dies wird besonders deutlich bei Betrachtung der prozentualen Erhöhung, die bei Berechnung der  $P_{\text{app}}$ -Werte nach Methode 2 deutlich höher ist wie die prozentuale Erhöhung der  $P_{\text{app}}$ -Werte bei Berechnung nach Methode 1.

Betrachtet man die prozentuale Änderung der AUC-Werte bei Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen an Et-PHEPIPERAZI/NO, so sind diese Werte für die Konzentrationen 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  mit beiden Berechnungsmethoden vergleichbar. Bei einer 100  $\mu\text{M}$  Lösung des NO-Donor-Prodrugs erhöht sich der AUC-Wert auf  $436,2 \pm 39,2$  % der Kontrolle und bei einer 250  $\mu\text{M}$  Lösung von Et-PHEPIPERAZI/NO wird die AUC auf  $2197,1 \pm 621,2$  % der

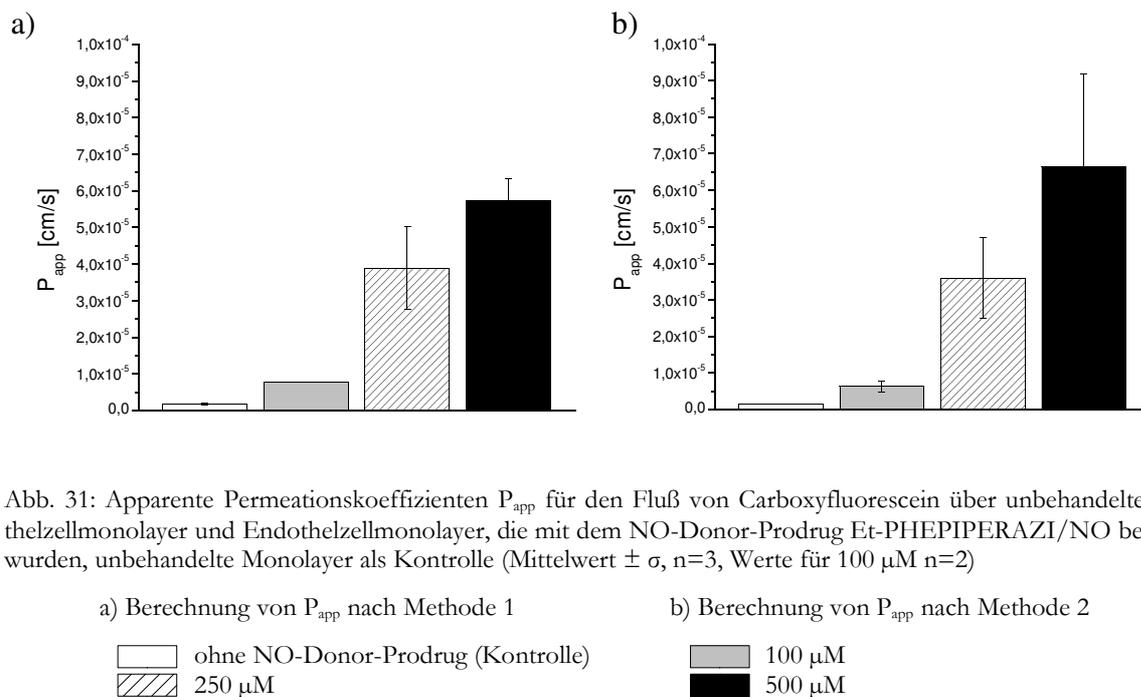


Abb. 31: Apparente Permeationskoeffizienten  $P_{\text{app}}$  für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor-Prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO behandelt wurden, unbehandelte Monolayer als Kontrolle (Mittelwert  $\pm$   $\sigma$ ,  $n=3$ , Werte für 100  $\mu\text{M}$   $n=2$ )

Kontrolle erhöht. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  an NO-Donor-Prodrug wird die Menge an in das Akzeptormedium transportierten Carboxyfluorescein noch weiter erhöht. Der resultierende AUC-Wert erreicht  $3312,5 \pm 451,0$  % der Kontrolle.

Der Vergleich der Abbildungen 31 a und b mit Abb. 35 zeigt, dass der Anstieg der apparenten Permeationskoeffizienten vergleichbar dem Anstieg der AUC ist. Die deutliche Übereinstimmung dieser Werte ermöglicht es, den apparenten Permeationskoeffizienten auch durch Berechnung der AUC zu ersetzen. Die Übertragbarkeit und Vergleichbarkeit der AUC zwischen unterschiedlichen Laboratorien ist noch nicht gegeben, da dieser Wert noch nicht standardmäßig berechnet wird. Es hat sich heute der apparente Permeationskoeffizient als Standard etabliert. Für Kurvenverläufe, die nicht linear verlaufen ist es aber besser, die AUC heranzuziehen, da diese unabhängig vom Kurvenverlauf bestimmt werden kann. Die Berechnung der Permeationskoeffizienten basiert auf der Berechnung der Ausgleichsgeraden, welche umso ungenauer wird, je stärker der Konzentrations-Zeit-Verlauf von der Linearität abweicht.

Tab. 24:  $P_{\text{app}}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor Et-PHEPIPERAZI/NO, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ,  $*n=2$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{\text{app}}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor (Kontrolle)	$0,19 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,00$	$9270 \pm 1018$	0,972		
100 $\mu\text{M}^*$	$0,78 \pm 0,00$	$0,63 \pm 0,16$	$40194 \pm 280$	0,998	328,32	64,60
250 $\mu\text{M}$	$3,89 \pm 1,13$	$3,60 \pm 1,11$	$202440 \pm 60848$	0,998	2052,21	25,12
500 $\mu\text{M}$	$5,72 \pm 0,62$	$6,63 \pm 2,54$	$305220 \pm 36157$	0,994	3129,50	16,37

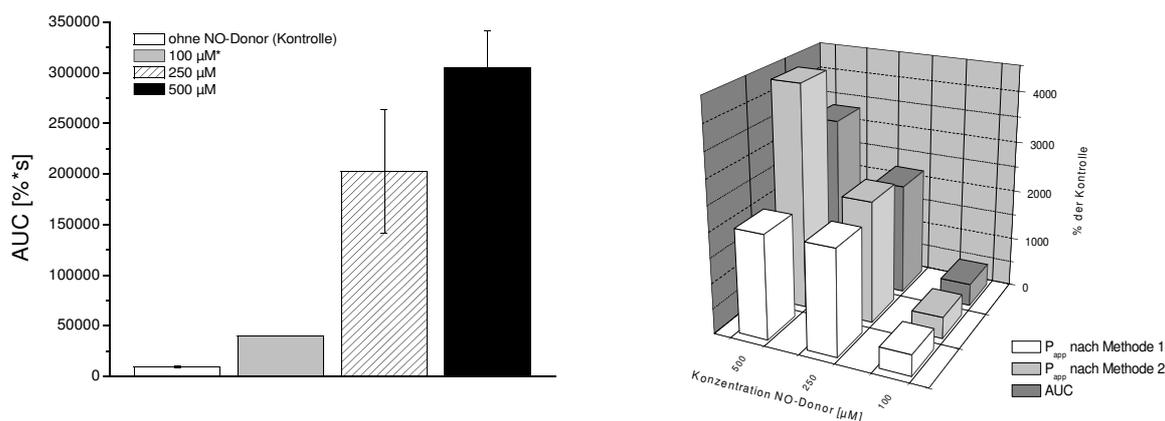


Abb. 32: a) AUC-Werte für die Fluß-Experimente nach Beeinflussung der Permeabilität für Carboxyfluorescein durch drei unterschiedliche Konzentrationen an NO-Donor Et-PHEPIPERAZI/NO, unbehandelte Monolayer als Kontrolle (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ,  $*n=2$ )  
 b) Vergleich der beiden Berechnungsmethoden für  $P_{app}$  und der AUC-Werte, Darstellung der prozentualen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert,  $n=3$ , Werte für 100 µM  $n=2$ )

### 2.3.2.3. Et-BUPIPERAZI/NO

Et-BUPIPERAZI/NO hat nach enzymatischer Spaltung mit einer Halbwertszeit von ca. 3 Minuten für das Spaltprodukt die längste Halbwertszeit für alle untersuchten Prodrugs. Damit wird im gleichen Zeitraum NO langsamer freigesetzt und die Konzentration an NO kann intrazellulär keine solch hohen Konzentrationen erreichen, wie dies bei Einsatz von Tosyl-PYRRO/NO oder Et-PHEPIPERAZI/NO möglich ist.

Bei einer Konzentration von 100 µM an Et-BUPIPERAZI/NO und bei der Kontrolle steigt die Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment in den ersten 20 Minuten deutlich langsamer an wie in den sich anschließenden 100 Minuten. Innerhalb der ersten 20 Minuten des Experiments gibt es keinen Unterschied im Fluß von Carboxyfluorescein über behandelte und unbehandelte Monolayer (Abb. 34 b). Im Unterschied dazu erfolgt der Konzentrationsanstieg für Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment bei den mit 250 und 500 µM NO-Donor-Prodrug behandelten Monolayern linear, erkennbar am Bestimmtheitsmaß (Tab. 25).

Bei Betrachtung der Wirkung einer 100  $\mu\text{mol}$ aren Lösung an NO-Donor-Prodrug auf den Carboxyfluoresceinfluß über Endothelzellmonolayer kann in den ersten 80 Minuten kein Unterschied zur Kontrolle (unbehandelte Endothelzellmonolayer) festgestellt werden (Abb. 33, Tab. 25). Erst ab 80 Minuten steigt die Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment der mit 100  $\mu\text{mol}$  Et-BUPIPERAZI/NO behandelten Endothelzellen langsamer an wie im Akzeptorkompartiment der unbehandelten Monolayer. Bei Behandlung der Monolayer mit einer Konzentration von 250  $\mu\text{mol}$  an NO-Donor-Prodrug steigt die Permeabilität für Carboxyfluorescein im Vergleich zur Kontrolle, der Unterschied zur Kontrolle ist signifikant (Abb. 33). Die höchste Konzentration an Et-BUPIPERAZI/NO führt zu einer weiteren signifikanten Steigerung der Permeabilität gegenüber dem Einsatz der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$ . Dies lässt sich auch an den Permeationskoeffizienten, wie sie in Tab. 30 aufgeführt sind, erkennen.

Die graphische Darstellung der Permeationskoeffizienten in Abb. 34 zeigt einen Unterschied zwischen den Ergebnissen für  $P_{\text{app}}$  nach Berechnungsmethode 1 und nach Berechnungsmethode 2 nur für die Monolayer, die mit 100  $\mu\text{M}$  Et-BUPIPERAZI/NO behandelt wurden und die Kontrolle. Der berechnete Wert für  $P_{\text{app}}$  beträgt hierbei für die Kontrolle nach Methode 2 nur ein Viertel des Wertes für  $P_{\text{app}}$ , wenn Berechnungsmethode 1 benutzt wird. Dieser Unterschied in den ermittelten  $P_{\text{app}}$ -Werten resultiert aus dem Kurvenverlauf. Die Konzentration im Kontrollexperiment und im Experiment mit Endothelzellen, die mit 100  $\mu\text{M}$  Et-BUPIPERAZI/NO behandelt wurden, steigt nicht linear an, dadurch werden die unterschiedlichen Permeationskoeffizienten für die beiden Berechnungsmethoden erzielt (Tab. 25).

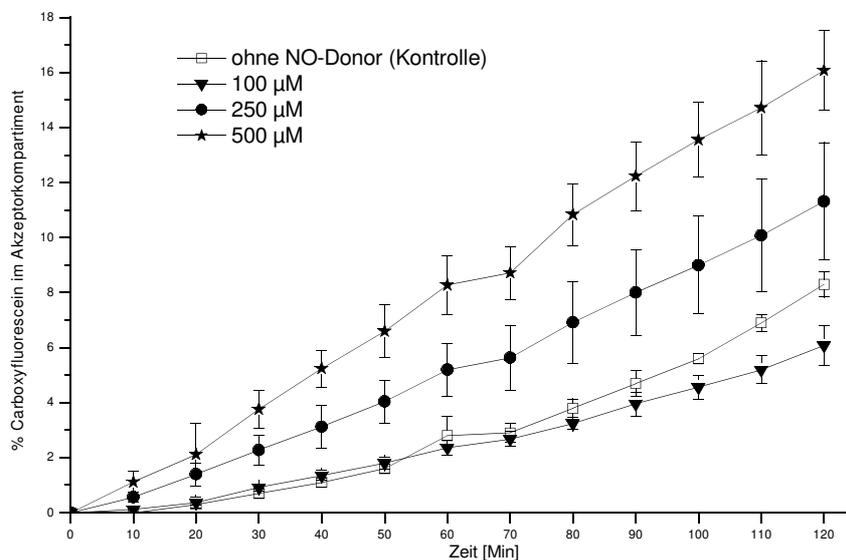


Abb. 33: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment ausgedrückt als Prozentsatz der eingesetzten Carboxyfluoresceindosis ( $1\mu\text{M}$ ), nach Behandlung der Monolayer mit unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) an NO-Donor-Prodrug Et-BUPIPERAZI/NO, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

Der  $P_{app}$ -Wert für die Behandlung mit einer 100  $\mu\text{molaren}$  Lösung an Et-BUPIPERAZI/NO sinkt bei Berechnung nach Methode 1 auf  $81,1 \pm 8,2 \%$  der Kontrolle und bei Berechnung nach Methode 2 steigt der  $P_{app}$ -Wert auf  $140,0 \pm 60,0 \%$  der Kontrolle. Der entsprechende AUC-Wert sinkt bei Behandlung der Monolayer mit 100  $\mu\text{mol}$  an NO-Donor-Prodrug auf  $85,9 \pm 8,3 \%$  der Kontrolle.

Werden die Endothelzellmonolayer mit einer 250  $\mu\text{molaren}$  Lösung an Et-BUPIPERAZI/NO behandelt, so steigt der Permeationskoeffizient auf  $162,5 \pm 29,3 \%$  der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 1 und auf  $560,0 \pm 148,0 \%$  der Kontrolle. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve für das Experiment mit 250  $\mu\text{mol}$  an NO-Donor-Prodrug steigt auf  $179,6 \pm 33,5 \%$  der Kontrolle.

Bei Einsatz der höchsten untersuchten Konzentration von 500  $\mu\text{mol}$  kommt es zu einer noch stärkeren Anhebung der  $P_{app}$ -Werte. Bei Berechnung nach Methode 1 steigt der Wert auf  $244,3 \pm 26,5 \%$  der Kontrolle und bei Berechnung nach Methode 2 auf  $893,0 \pm 373,2 \%$  der Kontrolle. Der AUC-Wert für das Experiment mit der höchsten untersuchten Konzentration erhöht sich auf  $276,4 \pm 33,3 \%$  der Kontrolle.

Vergleicht man die prozentuale Veränderung der Werte für die AUC zur Kontrolle mit der prozentualen Änderung der Werte für  $P_{app}$  nach den unterschiedlichen Berechnungsmethoden, so ist eine Übereinstimmung zwischen der Veränderung der AUC-Werte und der Veränderung der  $P_{app}$ -Werten nach Berechnungsmethode 1 zu erkennen. Dies ist auch bei Betrachtung der Balkendiagramme für die Permeationskoeffizienten in Abb. 34 und dem Balkendiagramm für die AUC in Abb. 38 ersichtlich. Die prozentualen Änderungen sind fast identisch.

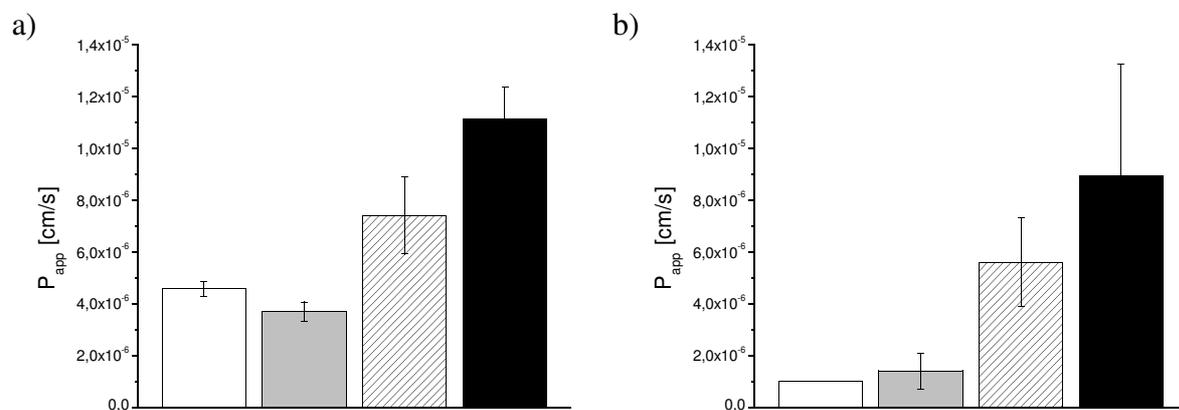


Abb. 34: Apparente Permeationskoeffizienten  $P_{app}$  für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor-Prodrug Et-BUPIPERAZI/NO behandelt wurden, unbehandelte Monolayer als Kontrolle (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

a) Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1

□ ohne NO-Donor-Prodrug (Kontrolle)  
 ▨ 250  $\mu\text{M}$

b) Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 2

■ 100  $\mu\text{M}$   
 ■ 500  $\mu\text{M}$

In diesem Experiment gibt die Berechnung der AUC eine ebenso gute Möglichkeit, den Effekt der unterschiedlichen Konzentrationen des NO-Donor-Prodrugs Et-BUPIPERAZI/NO zu bewerten, wie es die Berechnung der apparenten Permeationskoeffizienten bisher ermöglichte.

Die  $f_1$ - und  $f_2$ -Werte eignen sich nicht zur Beurteilung der Kurvenverläufe. Für die Behandlung mit einer 100  $\mu\text{M}$  Lösung NO-Donor-Prodrug resultiert aus der Berechnung der beiden Faktoren eine Übereinstimmung zwischen der Permeabilität für Kontrolle und behandelte Monolayer. Im Gegensatz zu dieser Aussage widersprechen sich die Differenz- und Gleichheitsfaktoren für die mit 250  $\mu\text{M}$  oder 500  $\mu\text{M}$  behandelten Monolayer. Die Differenzfaktoren  $f_1$  haben Werte deutlich über 70, lassen also auf eine Differenz zwischen den behandelten Monolayern und der Kontrolle schließen. Für die Gleichheitsfaktoren  $f_2$  errechnen sich Werte, die über 40 liegen, sie deuten demzufolge eine Übereinstimmung der Kurvenverläufe für behandelte Monolayer und Kontrolle an. Der signifikante Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten Monolayern wird durch die  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktoren nicht gezeigt.

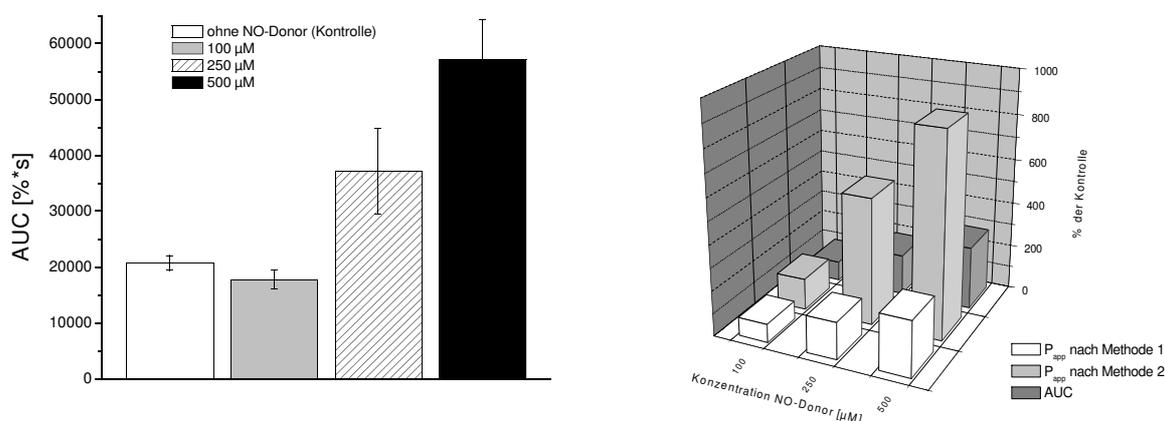


Abb. 35: a) AUC-Werte für die Fluß-Experimente nach Beeinflussung der Permeabilität für Carboxyfluorescein durch drei unterschiedliche Konzentrationen an NO-Donor-Prodrug Et-BUPIPERAZI/NO, unbehandelte Monolayer als Kontrolle (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )  
 b) Vergleich der beiden Berechnungsmethoden für  $P_{app}$  und der AUC-Werte, Darstellung der prozentualen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert,  $n=3$ )

Tab. 25:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor Et-BUPIPERAZI/NO, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor (Kontrolle)	0,46 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0	20730 $\pm$ 1305	0,944		
100 $\mu$ M	0,37 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,07	17760 $\pm$ 1640	0,981	20,10	93,72
250 $\mu$ M	0,74 $\pm$ 0,15	0,56 $\pm$ 0,17	37140 $\pm$ 7633	0,995	74,57	78,78
500 $\mu$ M	1,11 $\pm$ 0,12	0,89 $\pm$ 0,43	57144 $\pm$ 7073	0,998	166,87	62,15

#### 2.3.2.4. PENT-BIS-PYRRO/NO

Auch die Substanz PENT-BIS-PYRRO/NO muss enzymatisch gespalten werden, damit die entstehenden Spaltprodukte Stickstoffmonoxid freisetzen können. Dabei ist die Halbwertszeit nach der enzymatischen Spaltung mit 3 Sekunden sehr kurz, vergleichbar mit der Substanzen Tosyl-PYRRO/NO, da aus beiden Substanzen das gleiche Spaltprodukt PYRRO/NO entsteht. Der Einsatz des Spaltproduktes selber für die Untersuchung scheiterte an der extrem kurzen Halbwertszeit, so dass kein Vergleich mit PYRRO/NO möglich ist.

Im Vergleich mit Tosyl-PYRRO/NO führt PENT-BIS-PYRRO/NO zu einem langsameren Anstieg der Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment. Der Effekt auf die Endothelzellen durch den Einsatz von PENT-BIS-PYRRO/NO ist nicht so ausgeprägt (geringerer Fluß bei PENT-BIS-PYRRO/NO) und setzt erst später ein, verglichen mit Tosyl-PYRRO/NO.

Abb. 36 zeigt den zeitlichen Verlauf der Konzentration im Akzeptorkompartiment an Carboxyfluorescein. Es ist zu erkennen, dass die Kurven für die Untersuchung des unbehandelten Monolayers (Kontrollexperiment) sowie der Monolayer, die mit 100  $\mu$ M NO-Donor-Prodrug sowie mit 500  $\mu$ M NO-Donor-Prodrug behandelt wurden, einen linearen Verlauf des Konzentrationsanstiegs zeigen. Dies ist ein deutlicher Unterschied verglichen mit der zweit höchsten Konzentration. Bei Einsatz von 250  $\mu$ M PENT-BIS-PYRRO/NO steigt die Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment innerhalb der ersten 50 Minuten sehr langsam an, danach beschleunigt sich der Fluß deutlich.

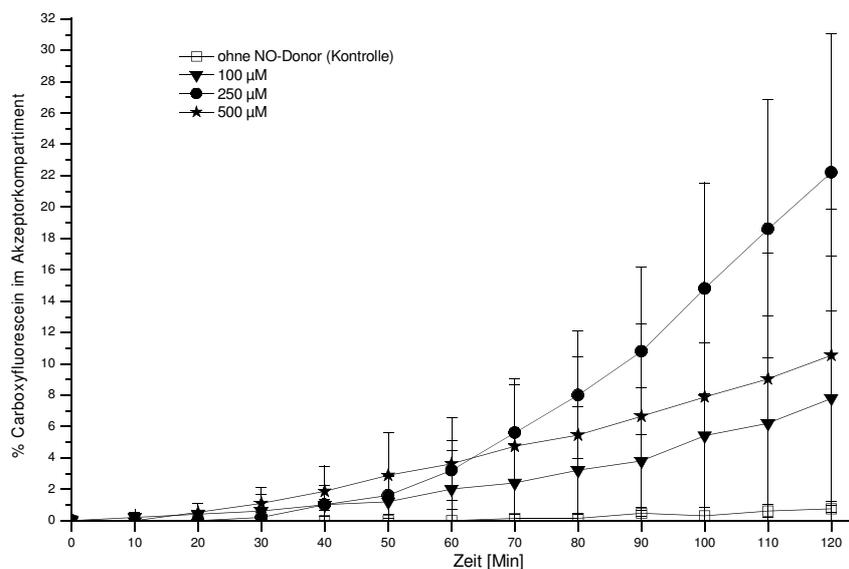


Abb. 36: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, nach Behandlung der Monolayer mit unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) an NO-Donor-Prodrug PENT-BIS-PYRRO/NO, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3)

Dies zeigt sich auch in den  $P_{\text{app}}$ -Werten (Tab. 26), besonders deutlich zu erkennen in der graphischen Darstellung der  $P_{\text{app}}$ -Werte, berechnet nach Methode 1 (Abb. 37 a) oder nach Methode 2 (Abb. 37 b). Es kommt zu einem deutlich erhöhten apparenten Permeationskoeffizienten bei Untersuchung des Einflusses einer 250  $\mu\text{molaren}$  Lösung an PENT-BIS-PYRRO/NO verglichen mit den zwei anderen untersuchten NO-Donor-Prodrug-Konzentrationen. Alle 3 Konzentrationen führen aber zu einer deutlichen Steigerung des Carboxyfluoresceinflusses im Vergleich zur Kontrolle. Die  $P_{\text{app}}$ -Werte, die nach Methode 2 berechnet werden und denen nur die Werte der ersten 20 Minuten zugrunde liegen, zeigen dagegen eine nur leichte aber nicht signifikante Erhöhung der Werte für die Untersuchung mit 100  $\mu\text{M}$  und mit 500  $\mu\text{M}$  an PENT-BIS-PYRRO/NO.

Die Permeationserhöhung beträgt bei der 100  $\mu\text{molaren}$  PENT-BIS-PYRRO/NO-Lösung  $1469,5 \pm 1737,3$  % der Kontrolle, bei Einsatz einer 250  $\mu\text{molaren}$  Lösung  $3942,5 \pm 2295,7$  % der Kontrolle und bei der höchsten untersuchten Konzentration  $2266,7 \pm 1983,5$  % der Kontrolle, legt man die Werte nach Berechnungsmethode 1 zugrunde. Die Veränderung der  $P_{\text{app}}$ -Werte bei Berechnung nach Methode 2 beträgt  $1020,0 \pm 1337,3$  % der Kontrolle bei Einsatz einer 100  $\mu\text{molaren}$  Lösung, bei Einsatz einer 250  $\mu\text{molaren}$  Lösung von PENT-BIS-PYRRO/NO beträgt die Änderung  $-200,0 \pm 400,0$  % der Kontrolle und bei einer Behandlung mit 500  $\mu\text{molaren}$  Lösung an NO-Donor-Prodrug ändert sich der  $P_{\text{app}}$ -Wert auf  $1000,0 \pm 2000,0$  % der Kontrolle.

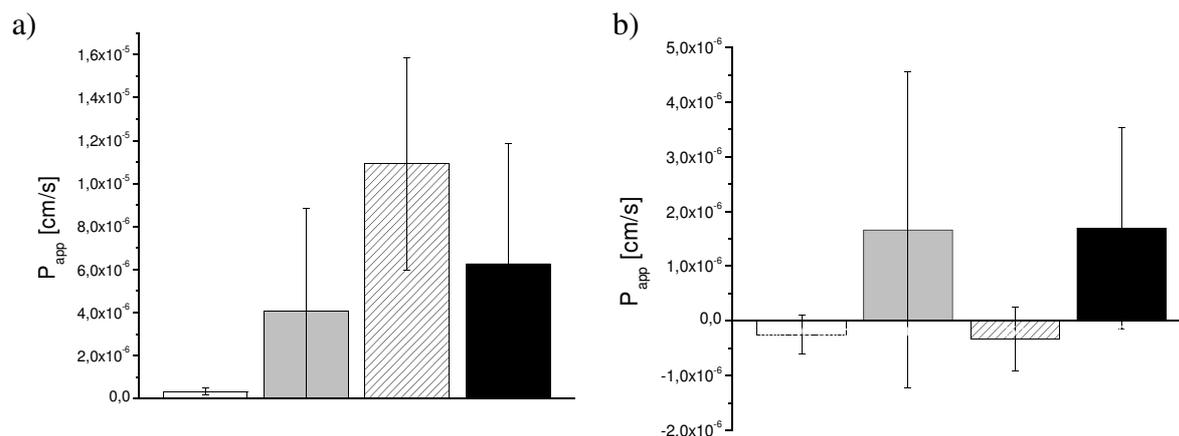


Abb. 37: Apparente Permeationskoeffizienten  $P_{app}$  für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer (Kontrolle) und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor-Prodrug PENT-BIS-PYRRO/NO behandelt wurden (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3)

a) Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1

□ ohne NO-Donor-Prodrug (Kontrolle)  
 ▨ 250  $\mu$ M

b) Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 2

■ 100  $\mu$ M  
 ■ 500  $\mu$ M

Bei Untersuchung des Einflusses einer 100  $\mu$ molaren Lösung an PENT-BIS-PYRRO/NO steigert sich der AUC-Wert auf  $2214,9 \pm 2973,5$  % der Kontrolle, bei Einsatz einer 250  $\mu$ molaren Lösung erhöht sich der AUC-Wert auf  $5460,5 \pm 4081,8$  % der Kontrolle. Wird die höchste Konzentration an PENT-BIS-PYRRO/NO eingesetzt, so steigt der AUC-Wert auf  $3582,2 \pm 3646,1$  % der Kontrolle.

Tab. 26:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor-Prodrug PENT-BIS-PYRRO/NO, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor (Kontrolle)	$0,03 \pm 0,02$	$-0,03 \pm 0,04$	$750 \pm 874$	0,779		
100 $\mu$ M	$0,41 \pm 0,48$	$0,17 \pm 0,29$	$18180 \pm 21922$	0,908	1420,00	73,25
250 $\mu$ M	$1,09 \pm 0,49$	$-0,03 \pm 0,06$	$44820 \pm 21520$	0,866	3717,78	50,69
500 $\mu$ M	$0,63 \pm 0,56$	$0,17 \pm 0,18$	$19602 \pm 25158$	0,974	2312,00	64,20

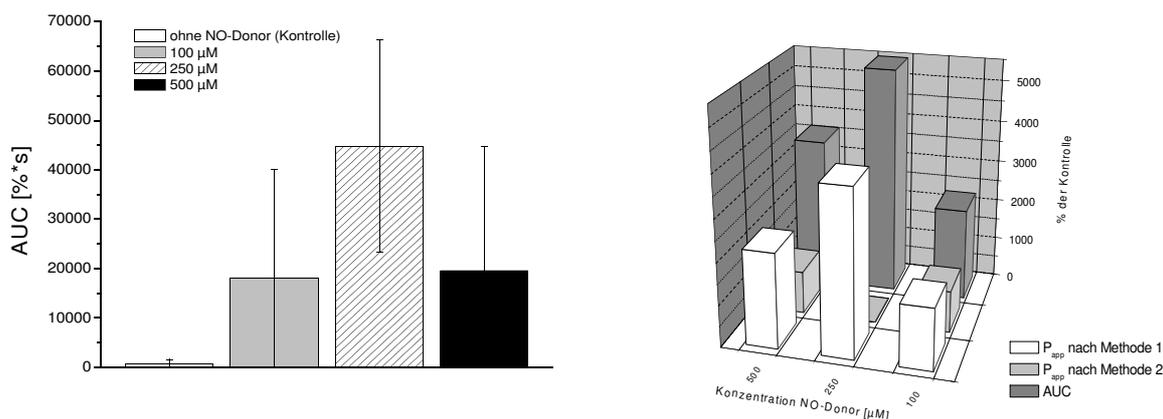


Abb. 38: a) AUC-Werte für die Fluß-Experimente nach Beeinflussung der Permeabilität für Carboxyfluorescein durch drei unterschiedliche Konzentrationen an NO-Donor-Prodrug PENT-BIS-PYRRO/NO, unbehandelte Monolayer als Kontrolle (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3)  
 b) Vergleich der beiden Berechnungsmethoden für  $P_{app}$  und der AUC-Werte, Darstellung der prozentualen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert, n=3)

Auch wenn bei dieser Untersuchung keine Linearität im Anstieg der Konzentration an CF im Akzeptorkompartiment vorhanden ist, so bietet die Betrachtung der apparenten Permeationskoeffizienten doch eine gute Möglichkeit, um die Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen an NO-Donor-Prodrug auf die Permeabilität der Endothelzellmonolayer einschätzen und untereinander vergleichen zu können. Dies wird besonders deutlich, wenn man die AUC und die  $P_{app}$ -Werte bei Berechnung nach Methode 1 vergleicht (Abb. 36a, Tab. 26). Die prozentuale Erhöhung dieser Werte im Vergleich zur Kontrolle sind vergleichbar.

Eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung zweier Kurven auf Unterschiedlichkeit ist die Berechnung der  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktoren. Alle  $f_1$ -Faktoren haben Werte deutlich über 100, so dass eine Unterschiedlichkeit der Kurven für alle 3 untersuchten Konzentrationen gegenüber der Kontrolle postuliert werden kann. Im Gegensatz dazu stehen allerdings die berechneten  $f_2$ -Werte, die alle über der von mir festgelegten Grenze von 40 liegen. Dies deutet wiederum auf keine deutliche Unterschiedlichkeit zwischen den betrachteten Kurven. Auch bei diesem Experiment führt die Betrachtung dieser beiden Faktoren nicht zu einem eindeutigen Ergebnis. Die für Freisetzungsforschung entwickelte Methodik der Differenz- und Gleichheitsfaktoren eignet sich damit nicht als objektive Methode zur Einschätzung, ob Unterschiede zwischen Kurven vorhanden sind, wenn die Kurven nicht den gleichen Verlauf zeigen wie Freisetzungskurven von Tabletten.

### 2.3.3. Nitrate

Nitrate werden als Therapeutikum für koronare Herzerkrankungen sowie bei Angina pectoris eingesetzt. Damit Nitrate ihre Wirkung entfalten können, müssen sie Stickstoffmonoxid freisetzen. Zur Freisetzung von NO muss das Nitrat in Zellen biochemisch umgewandelt werden.

Da die Eigenschaften der Nitrate wie PETN schon gut untersucht sind und auch ihre pharmakologische Wirkung belegt ist, eignet sich diese Substanz gut als Referenzsubstanz.

#### 2.3.3.1. PETN

PETN setzt NO erst nach einer redoxgeförderten, nichtenzymatischen Umsetzung frei. Anders als die bisher untersuchten NO-Donoren setzt PETN also nicht spontan NO frei, es werden wie bei Einsatz von NO-Donor-Prodrugs Zellen benötigt. Die Wirkung, die unterschiedliche Konzentrationen an PETN auf primäre Schweinehirndothelzellen haben, gleichen denen der NO-Donoren Et-PHEPIPERAZI/NO, Tosyl-PYRRO/NO und PENT-BIS-PYRRO/NO.

Schon bei Einsatz der geringsten untersuchten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  an PETN kommt es zu einer deutlichen Permeationssteigerung für Carboxyfluorescein (Abb. 39). Wird die Konzentration an NO-Donor weiter gesteigert, so steigert sich auch die Permeabilität der Endothelzellmonolayer für die Markersubstanz Carboxyfluorescein. Der stärkste Effekt ist bei der höchsten untersuchten Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  PETN zu beobachten.

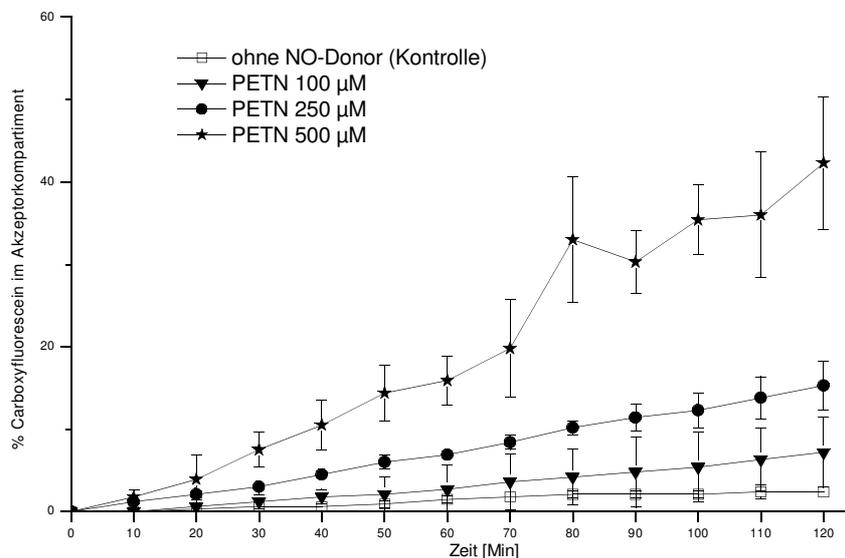


Abb. 39: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment ausgedrückt als Prozentsatz der eingesetzten Carboxyfluoresceindosis (1  $\mu\text{M}$ ), nach Behandlung der Monolayer mit unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) an PETN, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm$   $\sigma$ , n=2)

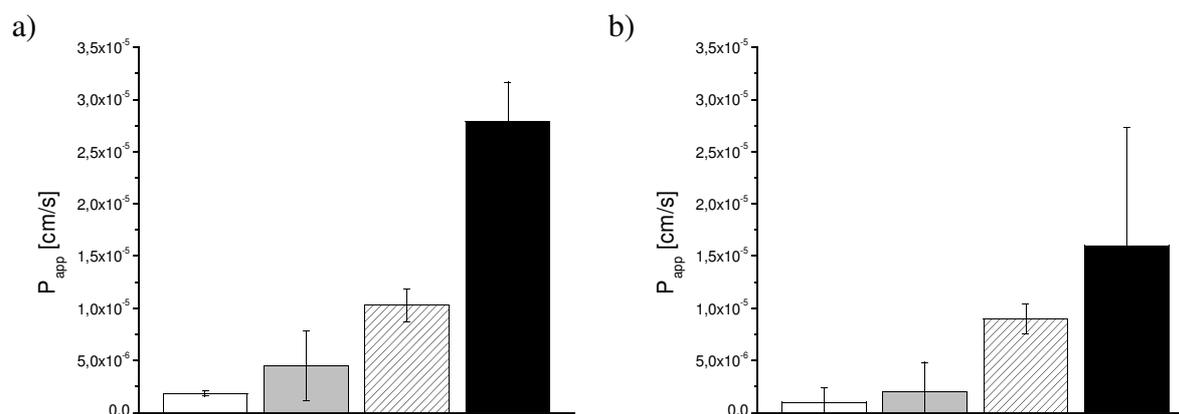


Abb. 40: Apparente Permeationskoeffizienten für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor PETN behandelt wurden (Mittelwert  $\pm$   $\sigma$ , n=2)

a) Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1      b) Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 2

 ohne NO-Donor (Kontrolle)	 100 $\mu$ M
 250 $\mu$ M	 500 $\mu$ M

Um den Effekt quantifizieren zu können, wurden die apparenten Permeationskoeffizienten berechnet (Tab. 31). Diese verdeutlichen, dass ein deutlicher und signifikanter Effekt erst bei Konzentrationen von PETN ab 250  $\mu$ M auftritt (Abb. 40 a und b, Tab. 31). Die Linearität des Anstiegs der Konzentration von Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment ist bei diesem Experiment für alle untersuchten Konzentrationen an NO-Donor und für das Kontrollexperiment gewährleistet, wie aus den Bestimmtheitsmaßen aus Tab. 31 ersichtlich ist.

Die stärksten Unterschiede in den  $P_{app}$ -Werten beim Vergleich der beiden Berechnungsmethoden sind beim Experiment mit der Konzentration von 500  $\mu$ M an NO-Donor zu erkennen. Die anderen  $P_{app}$ -Werte stimmen gut überein, da sich der Kurvenanstieg bei den einzelnen Experimenten innerhalb der ersten 20 Minuten nicht von dem Kurvenanstieg über die Gesamtdauer unterscheidet, da die Linearität des Konzentrationsanstiegs über die gesamte Dauer des Experimentes gewährleistet ist.

Nach Behandlung der Endothelzellmonolayer mit PETN in einer Konzentration von 100  $\mu$ M steigt der  $P_{app}$ -Wert bei Berechnung nach Methode 1 auf  $247,5 \pm 153,2$  % der Kontrolle und bei Berechnung nach Methode 2 auf  $150,0 \pm 191,9$  % der Kontrolle. Der AUC-Wert für das Experiment mit 100  $\mu$ M an PETN steigt auf  $235,8 \pm 157,2$  % der Kontrolle. Der  $f_2$ -Faktor für diese Konzentration liegt deutlich über 100, was auf einen deutlichen Unterschied zwischen dem Fluß für die Kontrolle und dem Fluß von Carboxyfluorescein über Monolayer, die mit 100  $\mu$ M PETN behandelt wurden, hindeutet. Der  $f_1$ -Faktor kann dieses Ergebnis allerdings nicht stützen, da er deutlich über der von mir festgelegten Grenze von 40 für diesen Faktor liegt.

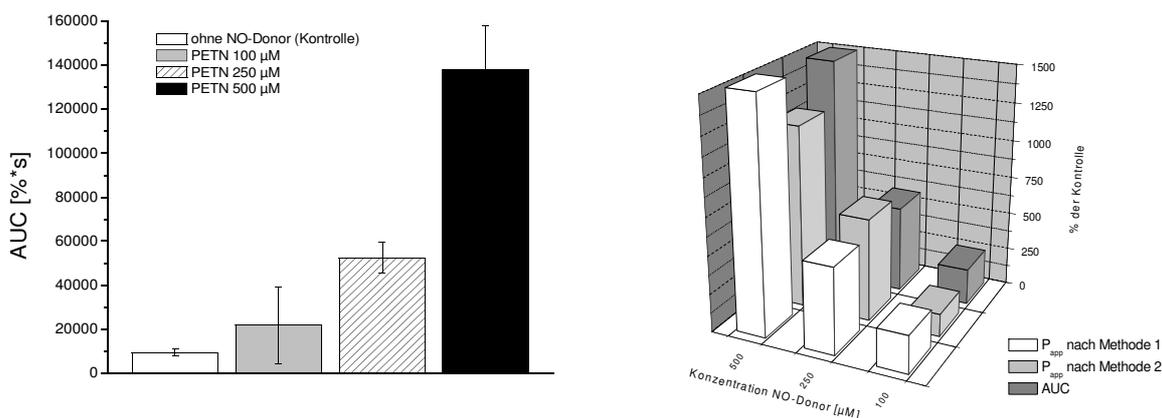


Abb. 41: a) AUC-Werte für die Fluß-Experimente nach Beeinflussung der Permeabilität für Carboxyfluorescein durch drei unterschiedliche Konzentrationen an NO-Donor PETN, unbehandelte Monolayer als Kontrolle (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=2$ )  
 b) Vergleich der beiden Berechnungsmethoden für  $P_{app}$  und der AUC-Werte, Darstellung der prozentualen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert,  $n=2$ )

Deshalb kann bei diesem Experiment mit 100 µM an NO-Donor bei Betrachtung der  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktoren keine eindeutige Entscheidung über einen Unterschied zwischen beiden Kurven (Kontrolle und Behandlung mit 100 µM PETN) getroffen werden. Das kein eindeutiger Unterschied zwischen dem Fluß über mit 100 µM PETN behandelte und unbehandelte Monolayer besteht, ist auch deutlich aus dem Konzentrationsverlauf für Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment aus Abb. 39 ersichtlich.

Erhöht sich die Konzentration von PETN, das auf die Zellen einwirkt, von 100 µM auf 250 µM, so steigt auch die Permeabilität für Carboxyfluorescein weiter an. Dies führt zu einem Anstieg der  $P_{app}$ -Werte auf  $568,7 \pm 93,2$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 1 und auf  $675,0 \pm 275,4$  % der Kontrolle bei Berechnung der Werte nach Methode 2. Der entsprechende AUC-Wert erhöht sich auf  $568,1 \pm 98,0$  % der Kontrolle. Der Wert für den  $f_1$ -Faktor ist für die Untersuchung mit 250 µM an PETN deutlich höher wie der Grenzwert von 70, was für eine Unterschiedlichkeit der beiden betrachteten Kurven spricht. Der  $f_2$ -Faktor liegt zwar deutlich niedriger, verglichen mit dem Wert für die Monolayer, die mit 100 µM an NO-Donor behandelt wurden, aber immer noch höher wie 40, dem festgelegten Grenzwert.

Ein Wert über 40 aber deutet laut Definition auf keinen Unterschied zwischen den betrachteten Kurven, in diesem Fall die Kurve für die Behandlung mit 250 µM an PETN und die Kurve für die Kontrolle. Trotz dieser sich widersprechenden Ergebnisse kann ein Unterschied zwischen diesen beiden Kurven diskutiert werden.

Bei Beeinflussung der Endothelzellmonolayer mit der höchsten untersuchten Konzentration (500 µM) an NO-Donor erhöht sich der  $P_{app}$ -Wert und der AUC-Wert gegenüber der Kontrolle noch einmal deutlich im Vergleich zur Beeinflussung mit 250 µM an PETN. Der  $P_{app}$ -Wert steigt auf  $1535,8 \pm 238,0$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 1 und auf  $1200,0 \pm 864,1$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 2. Der AUC-Wert erhöht sich auf  $1492,0 \pm 266,7$  % der Kontrolle. Auch bei dieser Konzentration ist die Übereinstimmung der Erhöhung der  $P_{app}$ -Werte und des AUC-Wertes bei Berechnungsmethode 1 deutlich besser wie bei Ver-

gleich der Erhöhung mit Berechnungsmethode 2. Die dieser Behandlung entsprechenden  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktoren zeigen einen deutlichen Unterschied im Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Monolayer und den Monolayern, die mit der höchsten Konzentration an PETN behandelt wurden.

Auch bei diesem Experiment zeigt sich, dass die AUC-Werte besser mit den Werten nach Berechnungsmethode 1 für den  $P_{app}$ -Wert korrelieren wie mit den Werten für  $P_{app}$ , die nach Methode 2 berechnet wurden. Diese gute Übereinstimmung betrifft alle untersuchten Konzentrationen.

Tab. 27:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor PETN, Berechnung der apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=2$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor wurden für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor (Kontrolle)	$0,18 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,14$	$9360 \pm 1527$	0,955		
100 $\mu$ M	$0,45 \pm 0,33$	$0,20 \pm 0,28$	$21780 \pm 17310$	0,987	137,50	80,02
250 $\mu$ M	$1,03 \pm 0,16$	$0,90 \pm 0,14$	$52470 \pm 7000$	0,997	466,07	56,88
500 $\mu$ M	$2,79 \pm 0,38$	$1,60 \pm 1,13$	$137790 \pm 19983$	0,968	1392,86	32,58

## 2.4. Zusammenfassung des Einflusses von NO-Donoren und NO-Donor-Prodrugs

Alle untersuchten NO-Donoren (PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, DETA/NO und SperminNONOat) führten konzentrationsabhängig zu einer Senkung der Permeabilität für die betrachtete Markersubstanz Carboxyfluorescein. Der deutlichste Effekt und damit die stärkste Permeabilitätsverringerng im Vergleich zu unbehandelten Endothelzellmonolayern war mit dem NO-Donor DBA/NO zu beobachten.

Der Effekt, der durch PHEPIPERAZI/NO und durch DETA/NO erzielt wurde, war nicht so ausgeprägt konzentrationsabhängig verglichen mit DBA/NO, da die Permeabilitätsabsenkung für Carboxyfluorescein bei Konzentrationen an NO-Donor über 250  $\mu\text{M}$  nicht weiter gesteigert werden konnte. Bei SperminNONOat zeigte sich ein paradoxer Effekt, da bei Erhöhung der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  auf 1000  $\mu\text{M}$  der abdichtende Effekt auf die Monolayer wieder aufgehoben wurde. Die Permeabilität von Carboxyfluorescein stieg bei Einsatz von 1000  $\mu\text{M}$  NO-Donor wieder an.

In der Untersuchung von Wong et al. [Wong 2004] wurde durch den Einsatz von 100  $\mu\text{M}$  DETA/NO eine Reduktion der Permeabilität für Meerettichperoxidase um 50 % und gleichzeitig eine Erhöhung des transendothelialen elektrischen Widerstandes um 20 % nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden in einem Modell der Blut-Hirn-Schranke erzielt, das aus humanen Hirnendothelzellen gebildet wurde. Diese Resultate stimmen gut mit den in dieser Untersuchung gefundenen Ergebnissen für die Behandlung von primären Schweinehirnendothelzellen mit DETA/NO überein. In diesem Experiment war allerdings zur Erzielung einer 50 %igen Reduktion für die Markersubstanz im Vergleich zur Kontrolle eine Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  DETA/NO nötig.

Im Gegensatz zur Untersuchung von Wong et. al. fanden Boje und Lakhman [Boje 2000] durch den Einsatz von DETA/NO keine Verringerung der Permeabilität für  $^{14}\text{C}$ -Sucrose im in vivo Experiment an Ratten verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren. Die anderen untersuchten NONOate in der Untersuchung von Boje und Lakhman (MAHMANONOat, SperminNONOat und DiethylaminNONOat) führten zu einer geringen Erhöhung der Permeabilität für  $^{14}\text{C}$ -Sucrose.

Die in vitro Ergebnisse aus der Arbeit von Wong et al. und die Ergebnisse aus dieser Arbeit stehen im Widerspruch zu den Erkenntnissen von Boje und Lakhman. In den in vitro Experimenten konnte eine deutliche Reduktion der Permeabilität gezeigt werden, welche sich in den in vivo Untersuchungen nicht zeigte. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die gezeigten in vitro Effekte nicht stark genug sind, um im in vivo Experiment nachgewiesen zu werden.

NO-Donor-Prodrugs aus der Gruppe der Diazeniumdiolate wurden bisher noch nicht auf ihren Effekt auf Endothelzellen untersucht. Dies geschah in dieser Arbeit zum ersten Mal. Es wurden verschiedene neuartige Diazeniumdiolat-Prodrugs in der Arbeitsgruppe von Prof. Lehmann in der Pharmazeutischen Chemie synthetisiert. Aufgrund höherer Stabilität in wässrigen Medien und ihrer erhöhten Lipophilie verglichen mit den sofort NO freisetzenden NO-Donoren wird vermutet, dass intrazellulär höhere NO-Mengen freigesetzt werden. Da diese Substanzen zur Freisetzung von NO einer enzymatischen Spaltung unterzogen werden müssen, die durch intrazellulär vorliegende Enzyme geschehen kann, ist es wahrscheinlich, dass NO durch NO-Donor-

Prodrugs nur intracellulär und nicht extrazellulär gebildet werden kann. Daraus lässt sich schließen, dass die erzielten Effekte der NO-Donor-Prodrugs auf ihrer Fähigkeit beruhen, intrazellulär große Mengen an NO freizusetzen.

Vier dieser Substanzen wurden am Modell der Blut-Hirn-Schranke aus primären Schweinehirnendothelzellen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass drei der untersuchten NO-Donor-Prodrugs in allen untersuchten Konzentrationen die Permeabilität für Carboxyfluorescein deutlich erhöhten. Dies trifft auf die Prodrugs Tosyl-PYRRO/NO, Et-PHEPIPERAZI/NO und PENT-BIS-PYRRO/NO zu. Die vierte untersuchte Substanz zeigte einen abweichenden Effekt auf die Permeabilität von Carboxyfluorescein, durch den Einsatz von Et-BUPIPERAZI/NO wurde die Permeabilität von Carboxyfluorescein nur bei einer 250  $\mu$ molaren und einer 500  $\mu$ molaren Konzentration erhöht. Die Behandlung mit einer 100  $\mu$ molaren Lösung Et-BUPIPERAZI/NO führte zu keiner Änderung der Permeabilität verglichen mit der Kontrolle.

Eine mögliche Erklärung für die Erhöhung der Permeabilität durch NO-Donor-Prodrugs liegt in der Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration durch die Freisetzung von NO aus den gespaltenen NO-Donor-Prodrugs. NO aktiviert die cyclische Guanylatzyklase, wodurch vermehrt cGMP gebildet wird. Dieses führt zu einer Erhöhung der Permeabilität. Chi et al. zeigten, dass konzentrationsabhängig cGMP die Permeabilität von Gehirnkapillaren erhöht [Chi 1999].

Dass die Erhöhung des  $P_{app}$ -Wertes nicht durch eine zytotoxische Reaktion auf die NO-Donor-Prodrug-Behandlung der Endothelzellen herbeigeführt wird, zeigt einerseits die Tatsache, dass Et-BUPIPERAZI/NO keinen permeabilitätssteigernden Einfluss auf Schweinehirnendothelzellmonolayer hat und andererseits die Ergebnisse aus der Zytotoxizitätsuntersuchung (Kap. 2.1.) und der Vitalitätsuntersuchung (Kap. 2.2.) dieser Arbeit (Abb. 9-11, Abb. 13 und Abb. 14).

Die hier durchgeführten Untersuchungen auf den Einfluss von NO-Donoren auf die Zellvitalität konnten zeigen, dass durch die NO-Donoren ein positiver Einfluss auf die Mitochondrien erzielt wird. Diese Resultate der Vitalitätsuntersuchung stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der Untersuchung von Stamler et al (Stamler 1992). Damit ist für unsere Ergebnisse eine Senkung der ATP-Konzentration nicht als verantwortlich anzusehen, da durch die hier untersuchten NO-Donoren eher eine Erhöhung der ATP-Konzentration resultiert.

## 2.5. Einfluss von Methylenblau

### 2.5.1. PHEPIPERAZI/NO

Um herauszufinden, ob die Änderung der Dichtigkeit der Monolayer und damit die Änderung der Permeabilität für Carboxyfluorescein über die Wirkung des freigesetzten NO auf die zyklische Guanylatzyklase bewirkt wird, wurde Methylenblau als Hemmstoff der Guanylatcyclase eingesetzt. Bei diesem Experiment war der Monolayer allerdings auch ohne Zusatz von anderen Substanzen schon sehr dicht. Trotz der hohen Dichtigkeit konnte eine Absenkung der Permeabilität bei Einsatz des NO-Donors beobachtet werden. (siehe Abb. 42 und Tab. 28). Keiner der Versuchsansätze (Behandlung mit NO-Donor, Behandlung mit Methylenblau oder Behandlung mit einer Kombination aus Methylenblau und NO-Donor) führte bei diesem Experiment zu einer deutlichen Änderung des Flusses von Carboxyfluorescein über den Endothelzellmonolayer ( $f_1$ - und  $f_2$ -Werte in Tab. 28) verglichen mit der Kontrolle (unbehandelte Endothelzellmonolayer).

Bei einer Behandlung der Monolayer mit 250  $\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO sinkt der  $P_{\text{app}}$ -Wert auf  $5,6 \pm 0,8$  % der Kontrolle, werden die Monolayer mit einer Kombination aus NO-Donor und Methylenblau behandelt, so sinkt der  $P_{\text{app}}$ -Wert auf  $71,6 \pm 6,3$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 1). Eine Behandlung mit Methylenblau führt zu einer Erhöhung der apparenten Permeationskoeffizienten auf  $229,0 \pm 30,7$  % der Kontrolle. Die Berechnung nach Methode 2 führte bei diesem Experiment zu vergleichbaren Werten für  $P_{\text{app}}$  (Tab. 28). Die AUC-Werte zeigen für PHEPIPERAZI/NO allein eine Absenkung auf  $6,3 \pm 0,9$  % der Kontrolle, bei Behandlung der Endothelzellmonolayer mit Methylenblau und NO-Donor sinkt der AUC-Wert auf

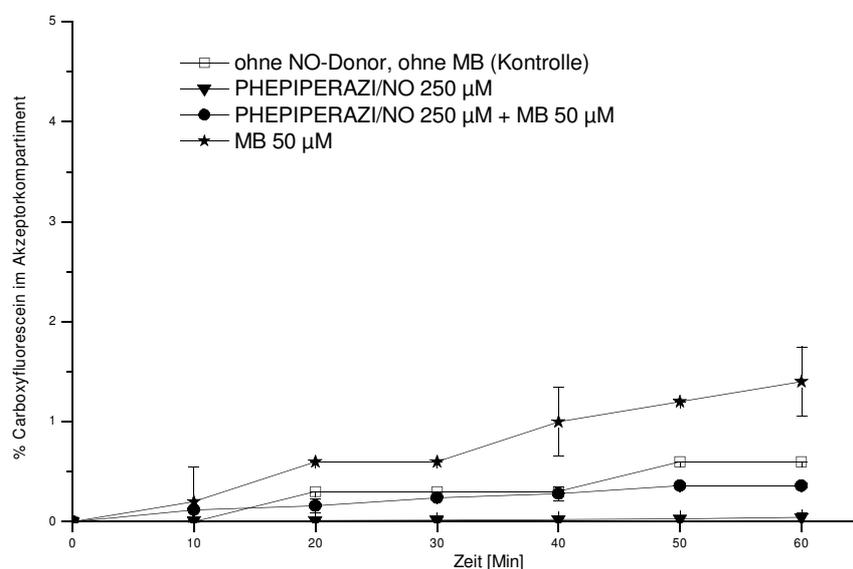


Abb. 42: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, Monolayer wurden mit Methylenblau für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde der NO-Donor PHEPIPERAZI/NO zugegeben, als Vergleich wurde ein un behandelter Monolayer herangezogen, ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor PHEPIPERAZI/NO behandelt wurde und ein Monolayer, der nur mit Methylenblau behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

74,4 ± 6,7 % der Kontrolle. Methylenblaubehandlung führt zu einer Erhöhung des AUC-Wertes auf 238,9 ± 36,3 % der Kontrolle.

Eine Linearität im Anstieg der Konzentration an Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment konnte nur für den Kurvenverlauf nach Behandlung mit Methylenblau allein und für die Kombination mit Methylenblau und NO-Donor PHEPIPERAZI/NO erzielt werden, der Anstieg der Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment der unbehandelten Endothelzellmonolayer erfolgt nicht linear ebenso wie der Anstieg der Konzentration an Carboxyfluorescein nach Behandlung der Endothelzellmonolayer nur mit dem NO-Donor nicht linear erfolgt (Bestimmtheitsmaß  $r^2$  in Tab. 28).

Im Gegensatz zu den  $f_1$ - und  $f_2$ -Werten zeigen die  $P_{app}$ -Werte einen Unterschied im Anstieg zwischen dem Kontrollexperiment und der mit PHEPIPERAZI/NO behandelten Monolayer sowie den mit Methylenblau behandelten Monolayern. Der  $f_1$ -Wert für die Methylenblau-behandelten Monolayer liegt zwischen 0 und 40, deutet also hier einen Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten Monolayern an. Dies wird allerdings nicht durch den  $f_2$ -Faktor gestützt. Durch PHEPIPERAZI/NO wird die Permeabilität deutlich gesenkt. Diese deutliche Permeabilitätssenkung tritt nicht auf, wenn der Endothelzellmonolayer mit einer Kombination aus NO-Donor und Methylenblau behandelt wird. Methylenblaubehandlung führte bei diesem Experiment zu einer Verdopplung der Permeabilität. Die Daten der  $P_{app}$ -Berechnung stimmen mit den Ergebnissen der AUC-Bestimmung deutlich überein (Abb. 43 a und b, Tab. 28).

Methylenblau konnte den Effekt von PHEPIPERAZI/NO aufheben, wie die  $P_{app}$ -Werte zeigen.

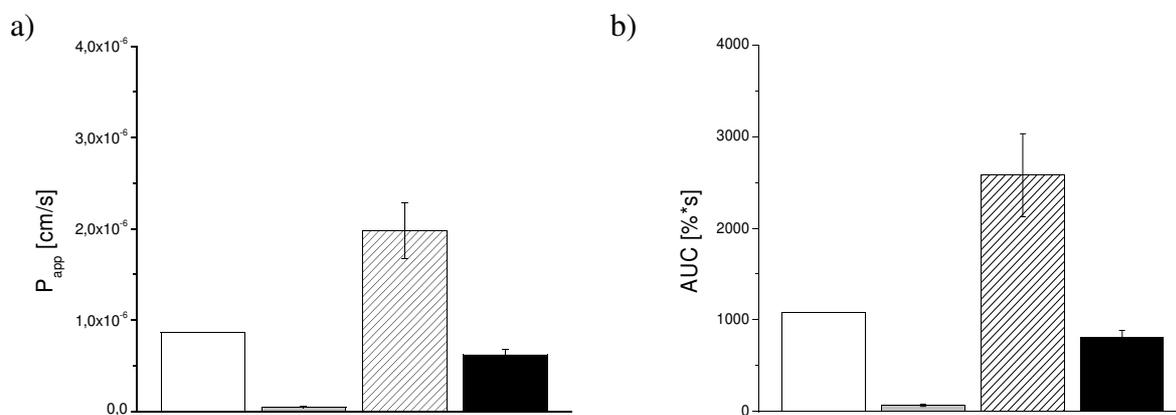


Abb. 43: a) Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ), Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1

b) AUC-Werte

Apparente Permeationskoeffizienten und AUC-Werte für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte Endothelzellmonolayer (Kontrolle) und Endothelzellmonolayer, die mit dem NO-Donor PHEPIPERAZI/NO behandelt wurden oder mit Methylenblau (MB) oder mit einer Kombination aus NO-Donor und Methylenblau (Mittelwert ±  $\sigma$ , n=3)



Tab. 28:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor PHEPIPERAZI/NO 250  $\mu\text{M}$ , für die Behandlung mit Methylenblau (MB) und für die Behandlung mit PHEPIPERAZI/NO 250  $\mu\text{M}$  und MB 50  $\mu\text{M}$ , Berechnung von  $P_{app}$  erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 60 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor wurden für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor, ohne MB (Kontrolle)	$0,09 \pm 0$	$0,10 \pm 0$	$1080 \pm 0$	0,893		
PHEPIPERAZI/NO 250 $\mu\text{M}$	$0,005 \pm 0$	$0,006 \pm 0$	$68 \pm 11$	0,924	94,67	99,29
MB 50 $\mu\text{M}$	$0,20 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,06$	$2580 \pm 453$	0,959	39,05	99,88
PHEPIPERAZI/NO 250 $\mu\text{M}$ + MB 50 $\mu\text{M}$	$0,06 \pm 0$	$0,07 \pm 0,02$	$804 \pm 83$	0,979	138,1	98,66

## 2.5.2. DBA/NO

DBA/NO in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  senkt die Permeabilität von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer. Dies konnte im vorhergehenden Experiment gezeigt werden. Gibt man einen Hemmstoff für die Guanylatcyclase zu den Endothelzellen sollte der Effekt gemindert oder sogar aufgehoben werden. Das Ergebnis der Untersuchung ist in den Abbildungen 44 und 42 dargestellt.

Die Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  an NO-Donor konnte den Fluß nur geringfügig verringern, da die in diesem Versuch eingesetzten Monolayer durch ihre hohe Dichtigkeit ohne Vorbehandlung schon eine sehr geringe Flußrate für Carboxyfluorescein aufweisen (siehe Abb. 44 und Tab. 29). Der  $P_{app}$ -Wert ändert sich bei Behandlung der Endothelzellmonolayer mit dem NO-Donor DBA/NO in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  auf  $64,9 \pm 13,7$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 1) oder auf  $75,0 \pm 28,9$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 2). Der AUC-Wert sinkt auf  $67,0 \pm 15,7$  % der Kontrolle. Damit stimmt der AUC-Wert auch bei diesem Experiment deutlich besser mit den Werten für  $P_{app}$  nach Berechnungsmethode 1 überein, die Werte nach Berechnungsmethode 2 weichen stärker von den AUC-Werten ab.

Die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Methylenblau konnte deshalb auch nur einen geringen Einfluss auf die Flußänderung durch DBA/NO erzielen. Die Kombination aus Methylenblau und DBA/NO führte zu einer Erhöhung der  $P_{app}$ -Werte im Vergleich zur Kontrolle. Die Erhöhung des  $P_{app}$ -Wertes im Vergleich zu den Monolayern, die mit dem NO-Donor DBA/NO behandelt wurden, fällt noch deutlicher aus, wie aus Tab. 29 sowie der Abb. 42 ersichtlich ist. Durch die Kombination wurde der  $P_{app}$ -Wert auf  $140,7 \pm 32,2$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 1 und auf  $262,5 \pm 170,2$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 2 erhöht. Die AUC-Werte erhöhen sich bei Behandlung der Monolayer mit einer Kombination aus Methylenblau und DBA/NO gegenüber der Kontrolle auf  $146,7 \pm 31,6$  %.

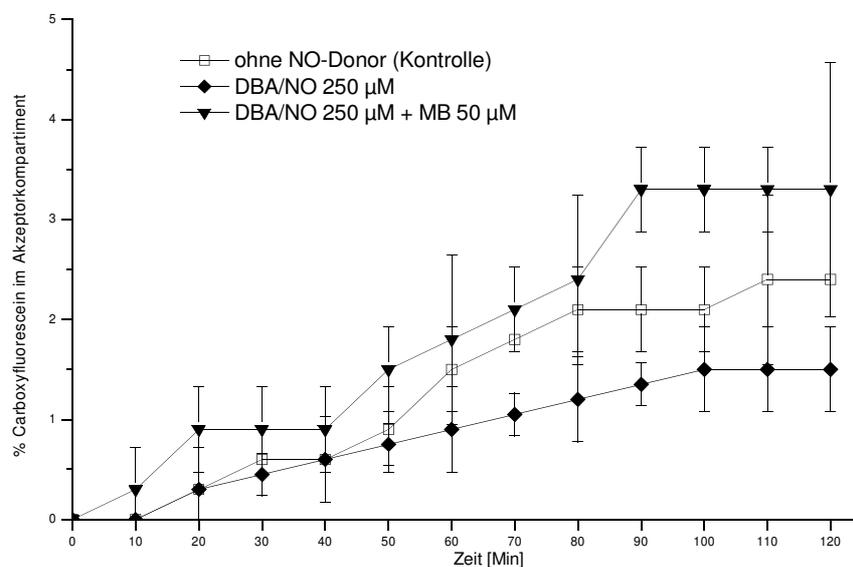


Abb. 44: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, Monolayer wurden mit Methylenblau (MB) für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde der NO-Donor DBA/NO zugegeben, als Vergleich wurden ein un behandelter Monolayer herangezogen und ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor DBA/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

Betrachtet man die Differenzfaktoren  $f_1$  und die Unterschiedlichkeitsfaktoren  $f_2$  so wird deutlich, daß sich die Kurven bei Zugabe von NO-Donor sowie bei der Zugabe von Methylenblau und NO-Donor nicht von der Kontrolle, den un behandelten Zellen, unterscheiden (Tab. 29, Spalte 6 und 7).

In diesem Experiment war es nicht möglich, mit Hilfe der Werte für  $f_1$  und  $f_2$  einen Unterschied zwischen der Kontrolle und den Effekten von DBA/NO oder einer Kombination aus DBA/NO und Methylenblau festzustellen. Dies zeigt, dass sich die Differenzfaktoren und die Unterschiedlichkeitsfaktoren nur dann einsetzen lassen, wenn es deutliche Unterschiede zwischen den betrachteten Kurven gibt. Da dies in diesem Experiment nicht der Fall ist, eignen sich diese Faktoren nur bedingt, um Unterschiedlichkeiten festzustellen.

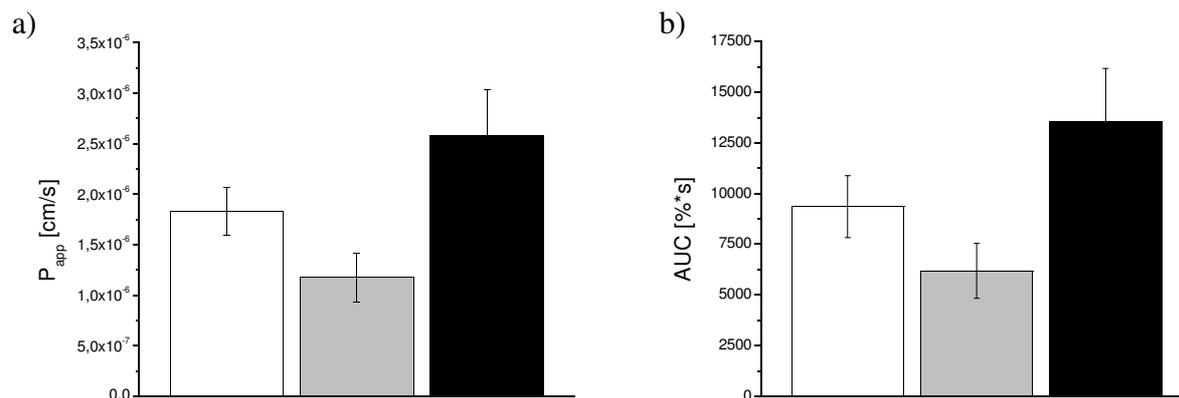


Abb. 45: a) Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ), Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1  
b) AUC-Werte

Monolayer wurden mit Methylenblau (MB) für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde der NO-Donor DBA/NO zugegeben, als Vergleich wurden ein unbehandelter Monolayer herangezogen und ein Monolayer, der nur mit NO-Donor DBA/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3)

ohne NO-Donor, ohne MB (Kontrolle)
  DBA/NO 250  $\mu$ M  
 DBA/NO 250  $\mu$ M + MB 50  $\mu$ M

Tab. 29:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor DBA/NO 250  $\mu$ M, für die Behandlung mit Methylenblau (MB) und für die Behandlung mit DBA/NO 250  $\mu$ M und MB 50  $\mu$ M, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor, ohne MB (Kontrolle)	$0,18 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,14$	$9360 \pm 1527$	0,955		
DBA/NO 250 $\mu$ M	$0,12 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,00$	$6190 \pm 1350$	0,976	34,13	96,88
DBA/NO 250 $\mu$ M und MB 50 $\mu$ M	$0,26 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,15$	$13550 \pm 2621$	0,966	44,44	95,84

### 2.5.3. DETA/NO

DETA/NO zeigt einen sehr deutlichen flußsenkenden Effekt auf primäre Schweinehirndothelzellmonolayer, wie das vorhergehende Experiment zeigen konnte. Der flußsenkende Effekt von DETA/NO trat bereits bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  an NO-Donor in seiner maximalen Stärke bei den untersuchten Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  auf. Deshalb wurde das Experiment, welches den Einfluss von Methylenblau auf diesen Effekt untersuchen sollte, auch mit dieser NO-Donor-Konzentration durchgeführt (siehe Abb. 46).

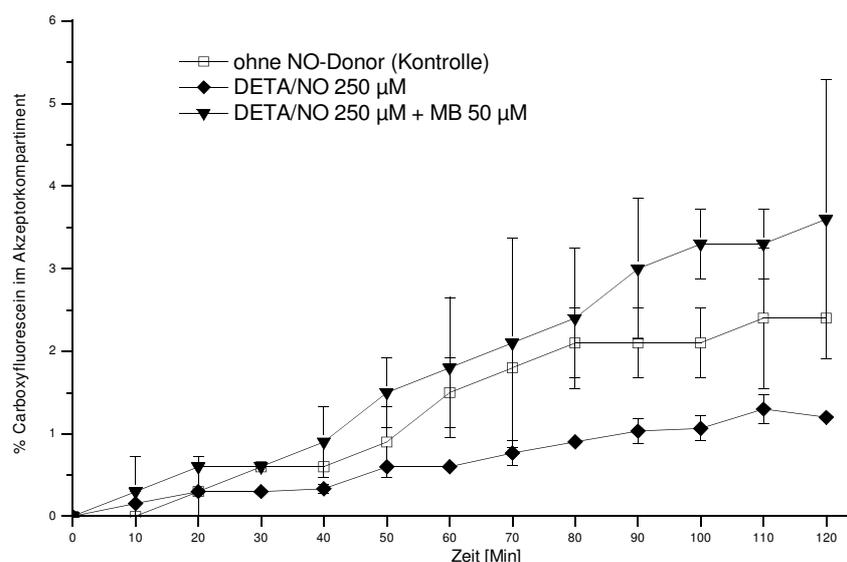


Abb. 46: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, Monolayer wurden mit Methylenblau für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde der NO-Donor DETA/NO zugegeben, als Vergleich wurde ein unbehandelter Monolayer herangezogen und ein Monolayer, der nur mit NO-Donor DETA/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3)

Auch bei dieser Untersuchung zeigt sich, dass die Zugabe von Methylenblau zu den Endothelzellen sich auf die  $P_{\text{app}}$ -Werte auswirkt, nicht aber auf die Werte für die Differenzfaktoren  $f_1$  und die Gleichheitsfaktoren  $f_2$ . Nach Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  DETA/NO zu den Endothelzellen sinkt der Permeationskoeffizient für den Fluß von Carboxyfluorescein im Vergleich zur Kontrolle auf  $50,0 \pm 5,2 \%$ , die Kombination aus 50  $\mu\text{M}$  Methylenblau und 250  $\mu\text{M}$  DETA/NO führt zu einem leichten Anstieg der  $P_{\text{app}}$ -Werte im Vergleich zur Kontrolle auf  $141,1 \pm 30,9 \%$  (Berechnung nach Methode 1). Berechnet man die Werte für  $P_{\text{app}}$  nach Methode 2, so ändert sich der  $P_{\text{app}}$ -Wert nach Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  DETA/NO auf  $125,6 \pm 25,0 \%$  der Kontrolle und bei Behandlung mit DETA/NO und Methylenblau auf  $250,0 \pm 50,0 \%$  der Kontrolle.

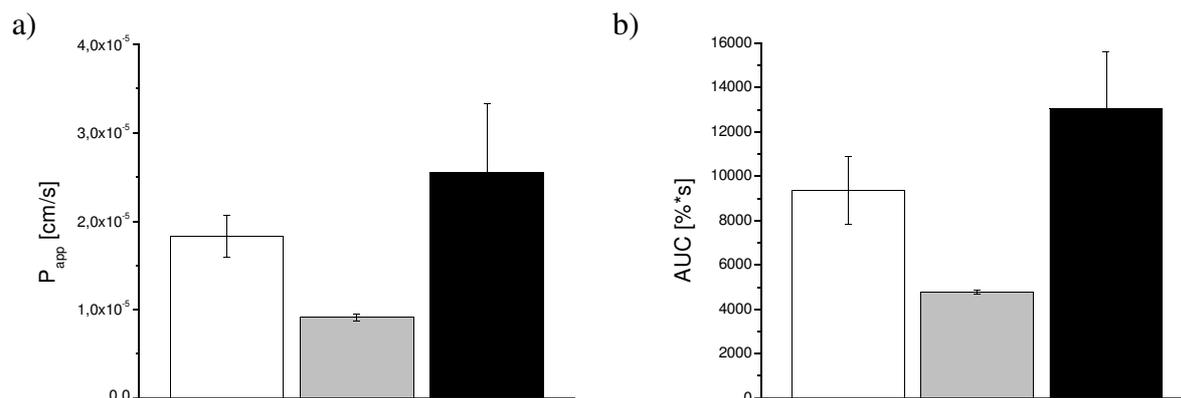


Abb. 47: a) Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ), Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1  
b) AUC-Werte

Monolayer wurden mit Methylenblau für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde der NO-Donor DETA/NO zugegeben, als Vergleich wurden ein un behandelter Monolayer herangezogen und ein Monolayer, der nur mit NO-Donor DETA/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

ohne NO-Donor, ohne MB (Kontrolle)
  DETA/NO 250  $\mu\text{M}$   
 DETA/NO 250  $\mu\text{M}$  + MB 50  $\mu\text{M}$

Die Änderung der AUC-Werte ist identisch mit den Werten für die  $P_{app}$ -Werte nach Berechnungsmethode 1. Der AUC-Wert für die Flußuntersuchung nach Behandlung mit dem NO-Donor DETA/NO sinkt auf  $51,6 \pm 7,0 \%$  der Kontrolle. Bei Berechnung des Wertes für die AUC für das Experiment nach Beeinflussung mit einer Kombination aus NO-Donor und Methylenblau steigt dieser auf  $140,3 \pm 36,8 \%$  der Kontrolle.

Die Änderung der  $P_{app}$ -Werte und auch der AUC-Werte nach Behandlung mit DETA/NO zeigt einen deutlichen Unterschied zur Kontrolle. Der Fluß wird im Vergleich zu un behandelten Monolayern deutlich gesenkt. Dieser Effekt tritt nicht auf, wenn die Monolayer mit einer Kombination aus Methylenblau und DETA/NO behandelt werden (siehe Abb. 47). Dies bedeutet, dass Methylenblau den flußsenkenden Effekt des NO-Donors DETA/NO aufheben kann.

Betrachtet man die Werte für  $f_1$  und  $f_2$  (Tab. 30), die zeigen sollen, ob es einen Unterschied zwischen den betrachteten Kurven und der Kontrolle gibt, so zeigen die Werte keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und den mit NO-Donor oder den mit Methylenblau und NO-Donor behandelten Endothelzellmonolayern an.

Die Ergebnisse der  $P_{app}$ -Bestimmung und der AUC-Bestimmung einerseits und der Berechnung der Differenzfaktoren und der Gleichheitsfaktoren widersprechen sich, was daran liegt, dass die Unterschiede in den Kurven klein sind und deshalb mit Hilfe der  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktoren nicht erfasst werden können.

Tab. 30:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor DETA/NO 250  $\mu$ M, für die Behandlung mit Methylenblau (MB) und für die Behandlung mit DETA/NO 250  $\mu$ M und MB 50  $\mu$ M, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor, ohne MB (Kontrolle)	0,18 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,14	9360 $\pm$ 1528	0,955		
DETA/NO 250 $\mu$ M	0,09 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,03	4772 $\pm$ 91	0,966	50,89	94,59
DETA/NO 250 $\mu$ M und MB 50 $\mu$ M	0,26 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,07	13060 $\pm$ 25256	0,985	39,29	96,23

#### 2.5.4. Tosyl-PYRRO/NO

Es gibt einen signifikanten Anstieg im Fluß von Carboxyfluorescein über Monolayer, die mit Tosyl-PYRRO/NO behandelt werden, verglichen mit dem Fluß über unbehandelte Endothelzellmonolayer (dargestellt in Abb. 48 und Abb. 49). Dieser Effekt ist auch zu beobachten, wenn die Endothelzellen mit dem NO-Donor-Scavenger Methylenblau vorbehandelt wurden. Es kommt zu einem deutlichen Anstieg des  $P_{app}$ -Wertes im Vergleich zur Kontrolle.

Bei Behandlung der Endothelzellmonolayer mit dem NO-Donor-Prodrug Tosyl-PYRRO/NO steigt der  $P_{app}$ -Wert auf 1539,5  $\pm$  143,9 % der Kontrolle (Berechnungsmethode 1), bei Behandlung mit dem Guanylatcyclasehemmer Methylenblau und dem NO-Donor-Prodrug steigt der  $P_{app}$ -Wert auf 1356,0  $\pm$  136,7 % der Kontrolle (Berechnungsmethode 1). Berechnet man den apparenten Permeationskoeffizienten nach Methode 2, so ergibt sich eine Steigerung auf 6533  $\pm$  650,0 % der Kontrolle bei Behandlung der Monolayer mit Tosyl-PYRRO/NO und eine Steigerung auf 4400  $\pm$  916,5 % der Kontrolle bei Behandlung mit NO-Donor-Prodrug und Methylenblau. Die entsprechenden AUC-Werte erreichen bei Behandlung der Monolayer nur mit Tosyl-PYRRO/NO 1758,3  $\pm$  172,3 % der Kontrolle und bei Behandlung der Monolayer mit einer Kombination aus Methylenblau und Tosyl-PYRRO/NO werden 1535,5  $\pm$  150,3 % der Kontrolle erreicht.

Die den Fluß von Carboxyfluorescein steigernden Effekte von Tosyl-PYRRO/NO können nicht durch den Einsatz von Methylenblau verringert werden. Es kommt bei einer Behandlung der Endothelzellmonolayer mit einer Kombination aus 50  $\mu$ M Methylenblau und 250  $\mu$ M Tosyl-PYRRO/NO nur zu einer geringen, nicht signifikanten Absenkung des  $P_{app}$ -Wertes und des AUC-Wertes im Vergleich mit den  $P_{app}$ -Werten und den AUC-Werten die bei Monolayern erzielt werden, die nur mit dem NO-Donor-Prodrug behandelt wurden. Methylenblau kann den Effekt des NO-Donors nicht aufheben.

Die Betrachtung des Differenzfaktors  $f_1$  und des Gleichheitsfaktors  $f_2$  aus Tab. 31 zeigen beide den deutlichen Unterschied der Kurven für den Konzentrationsanstieg von Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment nach Beeinflussung mit NO-Donor-Prodrug oder Beeinflussung mit einer Kombination aus Guanylatcyclaseinhibitor und NO-Donor-Prodrug. Die  $f_1$ -Faktoren haben beide einen Wert deutlich über 70 und die  $f_2$ -Faktoren erreichen Werte deutlich niedriger wie der festgelegte Grenzwert von 40. Damit werden die festgelegten Grenzwerte signifikant überschritten oder aber unterboten, was die Unterschiedlichkeit der betrachteten Kurven von der Kontrolle zeigt.

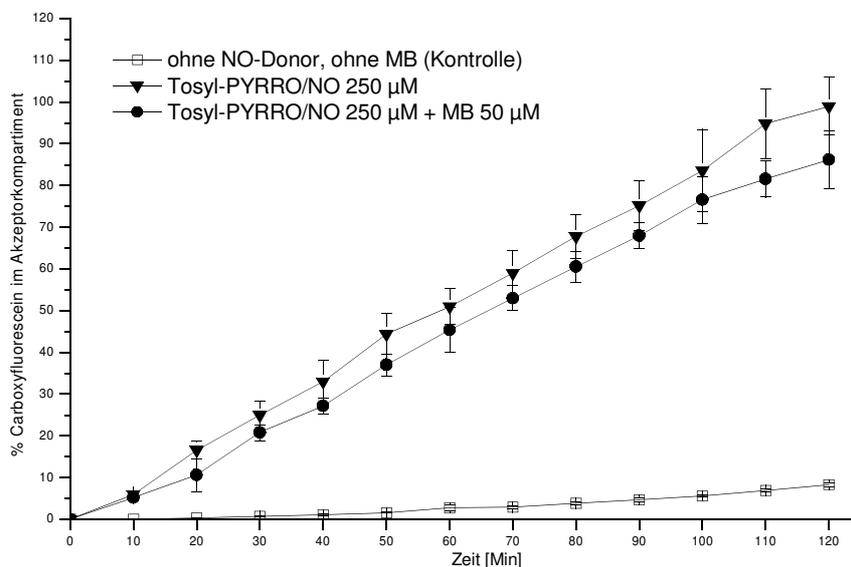


Abb. 48: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, Monolayer wurden mit Methylenblau für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde das NO-Donor-Prodrug Tosyl-PYRRO/NO zugegeben, als Vergleich dient ein unbehandelter Monolayer und ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor-Prodrug Tosyl-PYRRO/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

Tab. 31:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor-Prodrug Tosyl-PYRRO/NO 250  $\mu\text{M}$ , für die Behandlung mit Methylenblau (MB) und für die Behandlung mit Tosyl-PYRRO/NO 250  $\mu\text{M}$  und MB 50  $\mu\text{M}$ , Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor-Prodrug, ohne MB (Kontrolle)	$0,46 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,00$	$20730 \pm 1305$	0,944		
Tosyl-PYRRO/NO 250 $\mu\text{M}$	$7,02 \pm 0,62$	$6,53 \pm 0,75$	$363540 \pm 34135$	0,998	1593,54	12,71
Tosyl-PYRRO/NO 250 $\mu\text{M}$ + MB 50 $\mu\text{M}$	$6,18 \pm 0,61$	$4,40 \pm 1,06$	$317460 \pm 29769$	0,996	1378,55	15,66

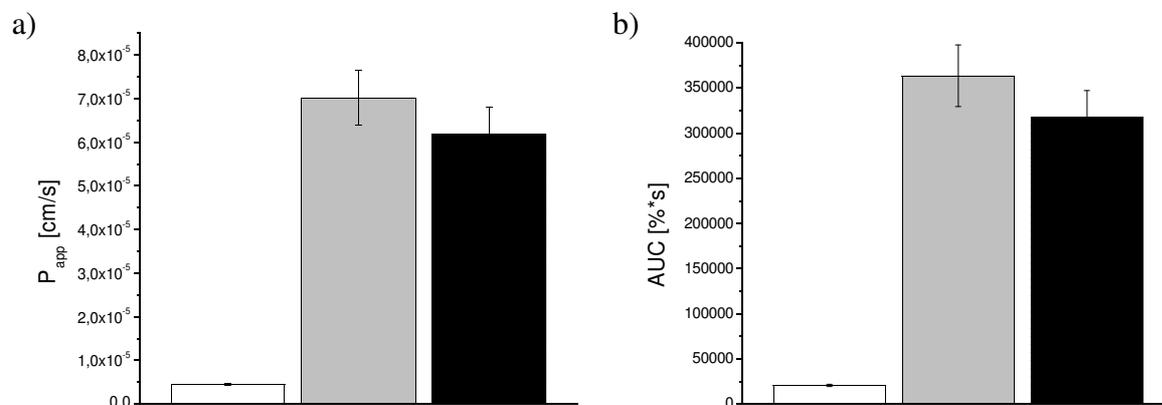


Abb. 49: a) Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ), Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1

b) AUC-Werte

Monolayer wurden mit Methylenblau (MB) für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde das NO-Donor-Prodrug Tosyl-PYRRO/NO zugegeben, als Vergleich wurden ein unbehandelter Monolayer herangezogen und ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor-Prodrug Tosyl-PYRRO/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

kein NO-Donor-Prodrug
  Tosyl-PYRRO/NO 250  $\mu\text{M}$   
 Tosyl-PYRRO/NO 250  $\mu\text{M}$  + MB 50  $\mu\text{M}$

### 2.5.5. Et-PHEPIPERAZI/NO

Der Einsatz des NO-Donor-Prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  führt zu einer deutlichen Flußsteigerung von Carboxyfluorescein über die Endothelzellmonolayer (Abb. 30 und Abb. 50).

Bei Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  an Et-PHEPIPERAZI/NO steigt der Permeationskoeffizient auf  $1210,0 \pm 554,7 \%$  der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 1 (Abb. 50, Tab. 34). Wirkt die Kombination von Metylenblau und NO-Donor-Prodrug auf den Schweinehirnendothelzellmonolayer ein, so steigt der Carboxyfluoresceinfluß noch weiter an. Der  $P_{\text{app}}$ -Wert erreicht bei dieser Behandlung  $1361,3 \pm 256,0 \%$  der Kontrolle (Abb. 51 und Tab. 34). Werden nur die Werte bis 20 Minuten für die Berechnung von  $P_{\text{app}}$  zu Grunde gelegt, so ergibt sich eine Steigerung von  $4866,7 \pm 2651,4 \%$  der Kontrolle für den Fluß von Carboxyfluorescein für NO-Donor-Prodrug-behandelte Endothelzellen. Die mit einer Kombination aus Et-PHEPIPERAZI/NO und Metylenblau behandelten Monolayer haben einen auf  $4200,0 \pm 1333,2 \%$  der Kontrolle erhöhten Fluß von Carboxyfluorescein.

Die prozentuale Steigerung der AUC nach Behandlung der Monolayer mit Et-PHEPIPERAZI/NO entspricht der Steigerung der  $P_{\text{app}}$ -Werte, die bei Berechnung der  $P_{\text{app}}$ -Werte nach Methode 1 erzielt werden. Bei Beeinflussung der Monolayer mit 250  $\mu\text{M}$  Et-PHEPIPERAZI/NO steigt der AUC-Wert auf  $1379,6 \pm 658,1 \%$  der Kontrolle. Werden Schweinehirnendothelzellmonolayer mit einem Metylenblau und Et-PHEPIPERAZI/NO behandelt, so steigt der Wert für die AUC auf  $1542,4 \pm 299,7 \%$  der Kontrolle.

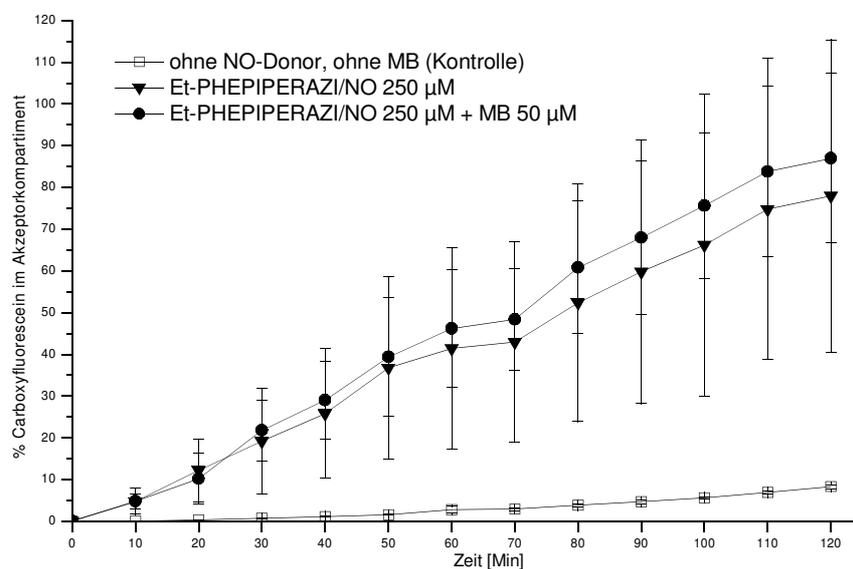


Abb. 50: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, Monolayer wurden mit Metylenblau für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde das NO-Donor-Prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO zugegeben, als Vergleich dient ein unbehandelter Monolayer und ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor-Prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

Tab. 32:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor-Prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO 250  $\mu$ M, für die Behandlung mit Methylenblau (MB) und für die Behandlung mit Et-PHEPIPERAZI/NO 250  $\mu$ M und MB 50  $\mu$ M, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	<b><math>P_{app}</math>-Werte (<math>\times 10^{-5}</math>) [cm/s]</b>		<b>AUC [%*s]</b>	<b>Bestimmtheitsmaß <math>r^2</math></b>	<b><math>f_1</math>-Faktor</b>	<b><math>f_2</math>-Faktor</b>
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor-Prodrug, ohne MB (Kontrolle)	0,46 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,00	20730 $\pm$ 1305	0,944		
Et-PHEPIPERAZI/NO 250 $\mu$ M	5,51 $\pm$ 2,90	4,87 $\pm$ 3,06	285240 $\pm$ 155868	0,995	1229,20	18,34
Et-PHEPIPERAZI/NO 250 $\mu$ M und MB 50 $\mu$ M	6,20 $\pm$ 1,29	4,20 $\pm$ 1,54	318900 $\pm$ 68578	0,995	1385,79	15,56

Zwischen den beiden unterschiedlich behandelten Endothelzellmonolayer gibt es keinen Unterschied in der Flußbeeinflussung. Der Einsatz eines Guanylatcyclasehemmstoffes führt nicht zu einer Hemmung des flußsteigernden Effektes von Et-PHEPIPERAZI/NO. Dies entspricht den Beobachtungen bei Einsatz des NO-Donor-Prodrugs Tosyl-PYRRO/NO.

Die Werte für den  $f_1$ - und den  $f_2$ -Faktor zeigen, dass sich die Kurven für den Konzentrationsanstieg von Carboxyfluorescein im Akzeptorkompartiment nach Behandlung mit dem NO-Donor-Prodrug und nach der Behandlung mit der Kombination aus Methylenblau und Et-PHEPIPERAZI/NO beide deutlich von der Kurve des Konzentrationsanstieges für die Kontrolluntersuchung unterscheiden. Diese Faktoren zeigen auch deutlich, dass sich der Effekt für die Behandlung der Endothelzellen mit Et-PHEPIPERAZI/NO nicht von der Behandlung mit Et-PHEPIPERAZI/NO und Methylenblau unterscheidet.

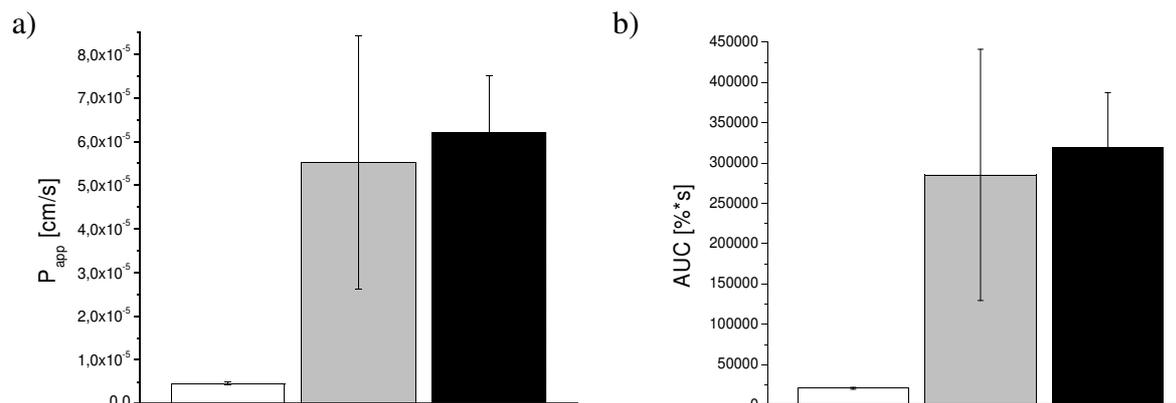


Abb. 51: a) Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ), Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1  
b) AUC-Werte

Monolayer wurden mit Methylenblau (MB) für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde das NO-Donor-Prodruk Et-PHEPIPERAZI/NO zugegeben, als Vergleich wurden ein un behandelter Monolayer herangezogen und ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor-Prodruk Et-PHEPIPERAZI/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

kein NO-Donor-Prodruk
  Et-PHEPIPERAZI/NO 250  $\mu\text{M}$   
 Et-PHEPIPERAZI/NO 250  $\mu\text{M}$  + MB 50  $\mu\text{M}$

## 2.5.6. Et-BUPIPERAZI/NO

Et-BUPIPERAZI/NO erhöht deutlich in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  den Fluß von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer verglichen mit un behandelten Monolayern.

Der Einsatz eines Guanylatcyclasehemmstoffes (Methylenblau) sollte zeigen, ob der Effekt auf die Endothelzellen gehemmt werden kann. Wie man in Abb. 52 erkennen kann, führte in diesem Experiment die Behandlung der Monolayer mit einer 250  $\mu\text{molaren}$  Lösung an NO-Donor-Prodruk Et-BUPIPERAZI/NO zu einer leichten Verstärkung des Flusses von Carboxyfluorescein. Diese Änderung des Flusses von Carboxyfluorescein konnte noch deutlich verstärkt werden, als die Endothelzellmonolayer mit einer Kombination aus Methylenblau und Et-BUPIPERAZI/NO behandelt wurden.

Die Behandlung mit Et-BUPIPERAZI/NO in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  führte zu einem Anstieg des Permeationskoeffizienten auf  $288,4 \pm 50,0$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 1) oder  $240,0 \pm 157,7$  % der Kontrolle (Berechnungsmethode 2). Der dieser Behandlung entsprechende Anstieg der AUC beträgt  $284,2 \pm 56,0$  % der Kontrolle. Berechnet man den Differenzfaktor  $f_1$ , so ergibt sich ein Wert deutlich über 70, was einen Unterschied zwischen der Kontrolle und der betrachteten Kurve anzeigt. Der Gleichheitsfaktor  $f_2$  hingegen erreicht mit 75,59 einen Wert, der deutlich über dem festgelegten Grenzwert von 40 liegt. Er zeigt demzufolge keinen Unterschied zwischen der Kurve für die Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment nach Behandlung der Endothelzellen mit Et-BUPIPERAZI/NO und der Kurve für das Kontrollexperiment.

Da ein Unterschied zwischen beiden betrachteten Kurven nur dann postuliert werden kann, wenn beide Faktoren dieses Ergebnis stützen, lautet das Ergebnis nach Betrachtung der  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktoren, dass es keinen Unterschied zwischen beiden Kurven gibt. Dem widersprechen allerdings die berechneten Permeationskoeffizienten, die AUC-Werte und auch die graphische Darstellung in Abb. 52. Da die  $P_{app}$ -Werte und die AUC-Werte für die Kontrolluntersuchung und die mit  $250 \mu\text{M}$  NO-Donor-Prodrug behandelten Endothelzellmonolayer deutlich unterschiedlich sind, gibt es einen Unterschied im Fluß von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer zwischen den mit NO-Donor-Prodrug behandelten Monolayern und der Kontrolle.

Behandelt man Schweinehirnendothelzellmonolayer mit einer Kombination aus Guanylatcycloaseinhibitor Methylenblau und Et-BUPIPERAZI/NO so erhöhte sich der  $P_{app}$ -Wert auf  $956,1 \pm 110,8 \%$  der Kontrolle (Methode 1) oder  $675,0 \pm 377,5 \%$  der Kontrolle (Methode 2). Der AUC-Wert erreicht bei dieser Behandlung der Endothelzellen einen Wert von  $939,4 \pm 131,0 \%$  der Kontrolle. Die  $f_1$ - und die  $f_2$ -Werte zeigen für dieses Experiment einen eindeutigen Unterschied im Kurvenverlauf zur Kontrolle (Tab. 33).

Dieses Experiment zeigt deutlich, dass durch Einsatz von Methylenblau der flußsteigernde Effekt noch verstärkt werden kann. Der Effekt, der bei Et-BUPIPERAZI/NO bei zusätzlicher Zugabe von Methylenblau zu beobachten war, ist identisch mit dem Effekt bei Zugabe von Methylenblau zu NO-Donoren, direkt NO freisetzen (PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, DETA/NO).

Auch dieses Experiment zeigte deutlich, dass die AUC-Werte zur Beurteilung von Permeabilitätsexperimenten an Endothelzellkulturen herangezogen werden können.

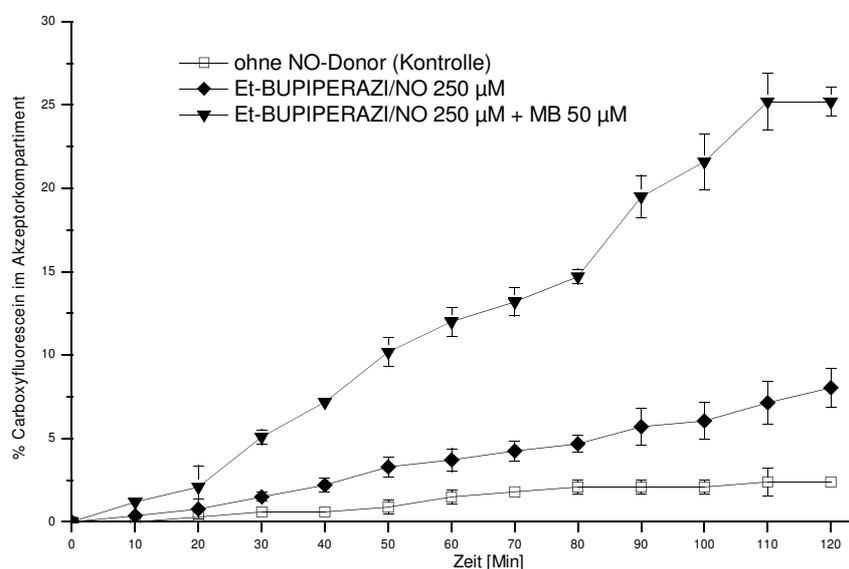


Abb. 52: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, Monolayer wurden mit Methylenblau für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde der NO-Donor Et-BUPIPERAZI/NO zugegeben, als Vergleich wurde ein un behandelter Monolayer herangezogen und ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor Et-BUPIPERAZI/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ , Kontrolle  $n=2$ )

Tab. 33:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor-Prodrug Et-BUPIPERAZI/NO 250  $\mu$ M, für die Behandlung mit Methylenblau (MB) und für die Behandlung mit Et-BUPIPERAZI/NO 250  $\mu$ M und MB 50  $\mu$ M, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ,  $*n=2$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor-Prodrug, ohne MB (Kontrolle)*	$0,18 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,14$	$9360 \pm 1527$	0,955		
Et-BUPIPERAZI/NO 250 $\mu$ M	$0,52 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,13$	$26140 \pm 3287$	0,992	184,29	75,59
Et-BUPIPERAZI/NO 250 $\mu$ M und MB 50 $\mu$ M	$1,73 \pm 0,07$	$0,90 \pm 0,30$	$86660 \pm 3065$	0,987	835,71	43,85

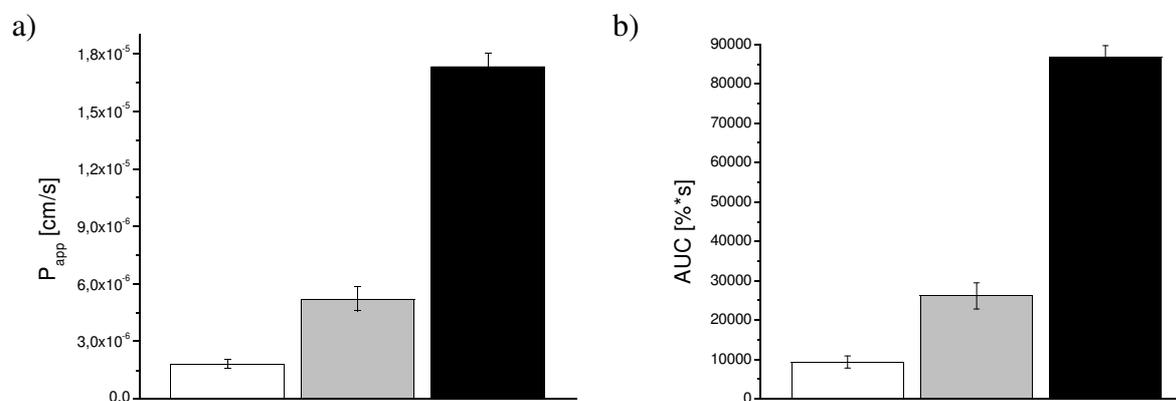


Abb. 53: a) Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ), Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1

b) AUC-Werte

Monolayer wurden mit Methylenblau für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde das NO-Donor-Prodrug Et-BUT-PIP/NO zugegeben, als Vergleich wurden ein unbehandelter Monolayer herangezogen und ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor-Prodrug Et-BUTPIP/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ , Kontrolle  $n=2$ )

□ ohne NO-Donor, ohne MB (Kontrolle)  
 ■ Et-BUTPIP/NO 250  $\mu$ M + MB 50  $\mu$ M

■ Et-BUTPIP/NO 250  $\mu$ M

### 2.5.7. PETN

PETN erhöht den Fluß von Carboxyfluorescein über Schweinehirnendothelzellmonolayer deutlich, wenn die Konzentration 250  $\mu\text{M}$  und höher beträgt. Um den Einfluss des gebildeten Stickstoffmonoxids einschätzen zu können, wurde der NO-Donor-Hemmstoff Metylenblau eingesetzt.

Ohne Metylenblau kommt es zu einer Steigerung des  $P_{\text{app}}$ -Wertes auf  $456,3 \pm 276,2$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 1 und auf  $311,1 \pm 272,9$  % der Kontrolle bei Berechnung nach Methode 2. Der AUC-Wert steigt auf  $465,4 \pm 294,1$  % der Kontrolle. Der  $f_1$ -Wert deutet auf einen deutlichen Unterschied der beiden Kurven hin, da er deutlich über 100 liegt und auch der  $f_2$ -Wert weist auf einen Unterschied der beiden Kurven hin, auch wenn der Wert die von mir festgelegte Grenze geringfügig überschreitet. Betrachtet man den Kurvenverlauf der Carboxyfluoresceinkonzentration in Abb. 54, so ist dieser Unterschied zwischen der Kontrolle und den Monolayern, die mit 250  $\mu\text{M}$  an PETN behandelt wurden, deutlich zu erkennen.

Werden die Endothelzellmonolayer mit einer Kombination aus Metylenblau und PETN behandelt, so steigt der  $P_{\text{app}}$ -Wert auf  $190,0 \pm 87,0$  % der Kontrolle (Methode 1) oder  $100,5 \pm 60,3$  % der Kontrolle (Methode 2). Der entsprechende AUC-Wert erreicht  $188,6 \pm 86,0$  % der Kontrolle und zeigt eine deutliche Übereinstimmung mit dem Wert für  $P_{\text{app}}$ , der nach Berechnungsmethode 1 erzielt wurde.

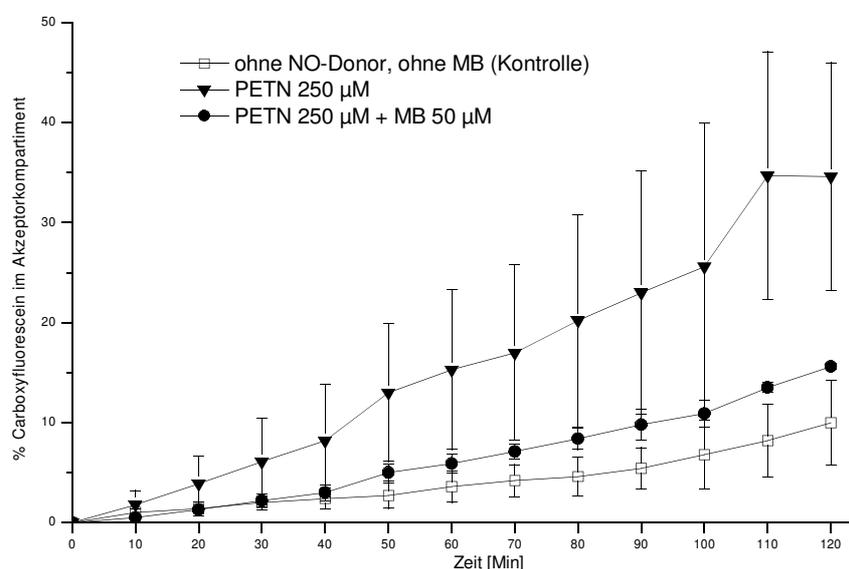


Abb. 54: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment, Monolayer wurden mit Metylenblau für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde der NO-Donor PETN zugegeben, als Vergleich dient ein un behandelter Monolayer und ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor PETN behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3)

Tab. 34:  $P_{app}$ -Werte für die Behandlung mit dem NO-Donor PETN 250  $\mu\text{M}$ , für die Behandlung mit Methylenblau (MB) und für die Behandlung mit PETN 250  $\mu\text{M}$  und MB 50  $\mu\text{M}$ , Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{app}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor, ohne MB (Kontrolle)	$0,58 \pm 0,24$	$0,63 \pm 0,29$	$28620 \pm 11816$	0,939		
PETN 250 $\mu\text{M}$	$2,25 \pm 0,97$	$1,60 \pm 1,15$	$115605 \pm 75158$	0,976	287,43	42,14
PETN 250 $\mu\text{M}$ und MB 50 $\mu\text{M}$	$0,94 \pm 0,08$	$0,52 \pm 0,14$	$52260 \pm 13926$	0,977	60,76	74,16

Der  $f_1$ -Faktor erreicht nur einen Wert von 54,01, was zeigt, dass es keinen Unterschied zwischen den Kurven nach Beeinflussung der Monolayer mit einer Kombination aus Methylenblau und PETN und der Kontrolle gibt. Auch der  $f_2$ -Faktor stützt dieses Ergebnis, da er deutlich über 40 liegt (Tab. 34). Besonders deutlich ist der Effekt zu Beginn des Experimentes. Innerhalb der ersten 40 Minuten gibt es keinen Unterschied im Carboxyfluoresceinfluß zwischen der Kontrolle und dem Carboxyfluoresceinfluß über die Monolayer, die mit einer Kombination aus Methylenblau und PETN behandelt wurden. Erst danach steigt bei den behandelten Monolayern der Fluß von Carboxyfluorescein etwas stärker an verglichen mit der Kontrolle. Dieser Unterschied ist aber nicht signifikant.

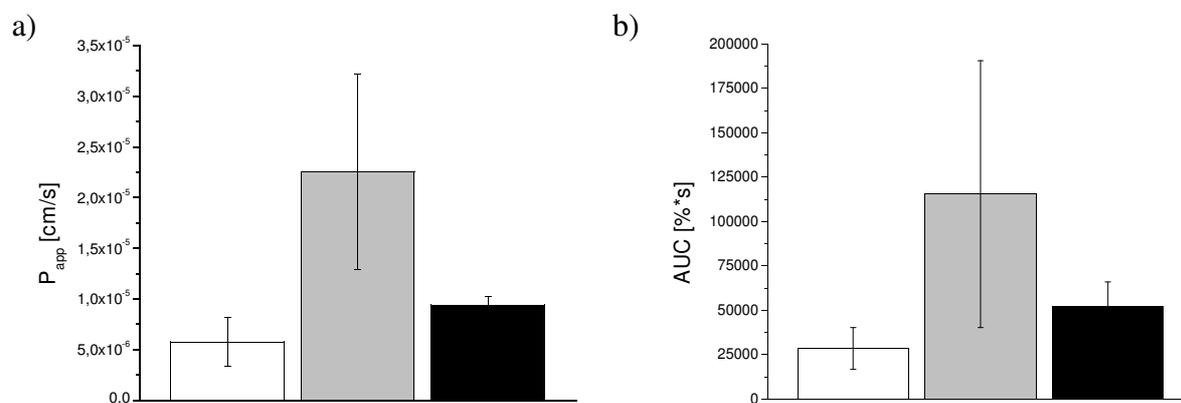


Abb. 55: a) Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ), Berechnung von  $P_{app}$  nach Methode 1  
b) AUC-Werte

Monolayer wurden mit Methylenblau für 10 Minuten vorbehandelt, danach wurde das NO-Donor-Prodrug Et-BUT-PIP/NO zugegeben, als Vergleich wurden ein un behandelter Monolayer herangezogen und ein Monolayer, der nur mit dem NO-Donor-Prodrug Et-BUTPIP/NO behandelt wurde (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

ohne NO-Donor, ohne MB (Kontrolle)
  PETN 250  $\mu\text{M}$   
 PETN 250  $\mu\text{M}$  + Methylenblau 50  $\mu\text{M}$

Diese Untersuchung zeigt einen deutlichen Unterschied in der Flußänderung nach Beeinflussung mit dem NO-Donor PETN allein im Gegensatz zur Beeinflussung mit einer Kombination aus Methylenblau und NO-Donor PETN.

Durch die Hemmung der Guanylatcyclase mittels Methylenblau wird der flußsteigernde Effekt von PETN fast vollständig aufgehoben.

## 2.6. Zusammenfassung des Einflusses von Methylenblau

Die Methylenblauwirkung unterscheidet sich deutlich bei Betrachtung der Experimente mit NO-Donoren und NO-Donor-Prodrugs. Werden Endothelzellmonolayer mit einer Kombination aus den hier untersuchten NO-Donoren PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO oder DETA/NO und Methylenblau behandelt, so wird die durch die NO-Donoren erzielte Permeabilitätsniedrigung durch die NO-Donoren für Carboxyfluorescein aufgehoben.

Wird der Effekt der Kombination aus NO-Donor-Prodrug mit Methylenblau verglichen mit dem Effekt, den der Einsatz einer Lösung aus einem NO-Donor-Prodrug erzielt, so ist bei den NO-Donor-Prodrugs keine übereinstimmende Reaktion zu beobachten. Bei Et-PHEPIPERAZI/NO und Et-BUPIPERAZI/NO war eine weitere Erhöhung der Permeabilität zu beobachten. Diese war aber nur bei Et-BUPIPERAZI/NO statistisch signifikant. Wurde der Endothelzellmonolayer mit einer Kombination aus Methylenblau und Tosyl-PYRRO/NO behandelt, so ist geringere Steigerung der Permeabilität im Vergleich zum nur mit NO-Donor-Prodrug behandeltem Endothelzellmonolayer erkennbar (Abb. 56). Methylenblau konnte aber nicht die permeabilitätssteigernde Wirkung der untersuchten NO-Donoren aufheben.

PETN führte zu einer deutlichen Steigerung der Permeabilität verglichen mit der Kontrolle bei Einsatz einer 250  $\mu$ molaren Lösung. Dieser Effekt wurde durch Methylenblau wieder aufgehoben.

Methylenblau wirkt auf zwei Wegen auf Endothelzellen ein. Einerseits wurde gezeigt [Martin 1985, Mayer 1993], dass Methylenblau die Funktion der Guanylatcyclase hemmen kann. Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung von Superoxid-Anionen, die als Scavenger funktionieren und Stickstoffmonoxid inaktivieren, bevor dieses auf die Zellen treffen kann. Diese Freisetzung von Superoxid-Anionen blockierte die Wirkung auf die Schweinehirnendothelzellen von spontan freigesetztem NO aus den NO-Donor-Substanzen PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO und DETA/NO.

Der unterschiedliche Effekt der Methylenblauzugabe bei den NO-Donor-Prodrugs kann damit zusammenhängen, dass die Konzentrationen an Methylenblau bei dem Experiment mit Tosyl-PYRRO/NO nicht ausreichend waren, um den Effekt der NO-Donor-Prodrugs zu antagonisieren.

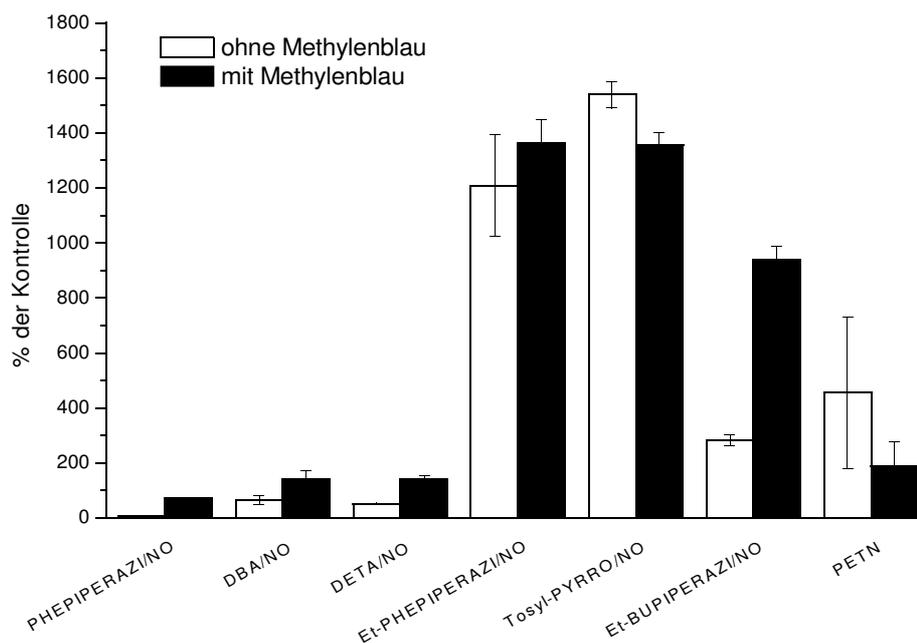


Abb. 56: Änderung der  $P_{app}$ -Werte im Vergleich zur Kontrolle, Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher NO-Donoren (PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, DETA/NO), unterschiedlicher NO-Donor-Prodrugs (Et-PHEPIPERAZI/NO, Tosyl-PYRRO/NO, Et-BUPIPERAZI/NO) und PETN sowie einer Kombination der Substanzen mit Methylenblau auf den Permeabilitätskoeffizienten von Carboxyfluorescein über Schweinehirnendothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=3$ )

Bei PETN ist ein deutlicher antagonisierender Effekt der Methylenblau-Zugabe zu erkennen. Auch diese Substanz muss erst durch Zellen umgewandelt werden, damit sie NO freisetzen kann. Diese Umsetzung basiert aber auf einem anderen Prinzip wie dies bei den NO-Donor-Prodrug aus der Gruppe der Diolate der Fall ist. Es ist möglich, dass durch Methylenblau die redoxgeförderte, nichtenzymatische Umwandlung von PETN in stärkerem Maße behindert wird verglichen mit dem Effekt auf die enzymatische Umwandlung der NO-Donor-Prodrugs der Diazoniumdiolate Tosyl-PYRRO/NO, Et-PHEPIPERAZI/NO und Et-BUPIPERAZI/NO.

### 3. Oxyhämoglobin

#### 3.1. Identität und Gehalt des gewonnenen Oxyhämoglobins

Nach der Umwandlung des gewonnenen deoxygenierten Hämoglobins in Oxyhämoglobin wurde zur Kontrolle ein Spektrum des gewonnenen Oxyhämoglobins aufgenommen. Dieses ist in Abb. 57 dargestellt. Als Vergleich sind die Daten aus der Literatur dargestellt. Es zeigt sich, dass mit der beschriebenen Methode in unserem Labor Oxyhämoglobin erzeugt werden konnte. Damit dieses in den Untersuchungen eingesetzt werden kann, wurde eine Bestimmung des Gehalts an Oxyhämoglobin durchgeführt.

Die Bestimmung des Gehalts an Oxyhämoglobin ergab für die nicht mit Natriumdithionit reduzierte Probe einen Gehalt von 2,30 mmol/Liter, für die drei reduzierten und durch Sephadex G-25 filtierten und dabei entsalzten Proben einen Gehalt von  $1,39 \pm 0,02$  mmol/Liter,  $1,36 \pm 0,01$  mmol/Liter und  $1,44 \pm 0,01$  mmol/Liter (siehe Tab. 35). Berechnet man den Mittelwert aus allen drei Bestimmungen, so ergibt sich eine durchschnittliche Konzentration von  $1,40 \pm 0,04$  mmol/Liter Oxyhämoglobin.

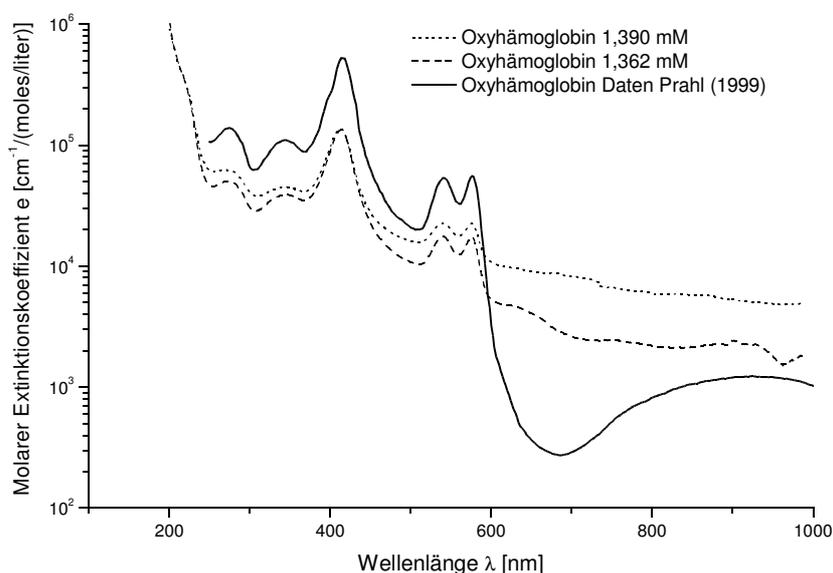


Abb. 57: Wellenlängenspektrum von zwei Oxyhämoglobinlösungen unterschiedlicher Konzentration nach Reduktion mit Natriumdithionit und anschließendem Abtrennen des Natriumdithionit durch Filtration mittels Sephadex G-25, als Vergleich die Kurve aus den Daten von Prahl (1999)

Tab. 35: Gehalt an Oxyhämoglobin in der Ausgangslösung und in den Proben nach Reduktion mit Natriumdithionit und Filtration durch Sephadex-G25 (Mittelwert  $\pm \sigma$ , n=3)

Probe	Gehalt
Ausgangslösung (keine Reduktion durch Natriumdithionit)	2,30 $\pm$ 0,01
Probe 1	1,39 $\pm$ 0,02
Probe 2	1,36 $\pm$ 0,01
Probe 3	1,44 $\pm$ 0,01

Durch die entstandene Verdünnung bei der Filtration zur Abtrennung des Reduktionsmittels wurde der Gehalt in den Proben also auf 60,5 %, 59,2 % und 62,6 % des Ausgangsgehalts reduziert. Dies entspricht den Beobachtungen bei der Durchführung der Entsalzung, da für 600  $\mu$ l eingesetzte Ausgangslösung nach dem Durchgang durch das Sephadex G-25-Bett etwa 1000  $\mu$ l dunkelrote, oxyhämoglobinhaltige Fraktion gewonnen werden konnten.

Die Untersuchungen auf den Einfluss von Oxyhämoglobin auf die Dichtigkeit von primären Schweinehirnendothelzellmonolayern wurden mit den entsprechenden Verdünnungen dieser Lösungen durchgeführt.

### 3.2. Einfluss von Oxyhämoglobin auf Schweinehirnendothelzellen

Im ersten Experiment wurde ein Vergleich zwischen unbehandelten Schweinehirnendothelzellen und Endothelzellen die mit dem NO-Donor PHEPIPERAZI/NO (250  $\mu$ M) sowie mit Endothelzellen, die mit 10  $\mu$ M Oxyhämoglobin behandelt wurden, durchgeführt. Eine 250  $\mu$ molare Lösung an PHEPIPERAZI/NO führte bei Schweinehirnendothelzellen zu der stärksten prozentualen Absenkung des Carboxyfluoresceinflusses, vergleicht man die Absenkung bei Einsatz von 250  $\mu$ M der untersuchten NO-Donoren PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO und DETA/NO. Deswegen wurde diese Substanz als Kontrolle für dieses Experiment ausgewählt. Wie in Abb. 58 zu erkennen ist, führen 250  $\mu$ M PHEPIPERAZI/NO sowie der Einsatz von 10  $\mu$ M Oxyhämoglobin zu einer deutlichen Absenkung des Flusses von Carboxyfluorescein über den Endothelzellmonolayer im Vergleich zu einem unbehandelten Monolayer. Dabei ist der Einfluss einer 10  $\mu$ molaren Lösung an Oxyhämoglobin auf den Carboxyfluoresceinfluss vergleichbar mit dem einer 250  $\mu$ molaren Lösung an NO-Donor PHEPIPERAZI/NO.

Die Werte der apparenten Permeationskoeffizienten unterscheiden sich bei diesem Experiment nicht voneinander, je nachdem, welche Berechnungsmethoden man heranzieht, da sich die Konzentration im Akzeptorkompartiment bei allen 3 unterschiedlich behandelten Monolayern linear erhöht, wie die Bestimmtheitsmaße zeigen (Tab. 36).

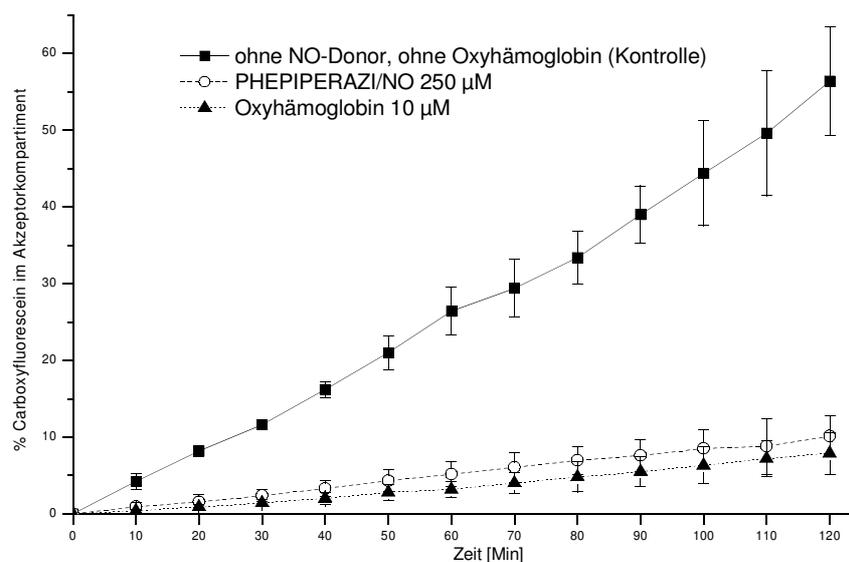


Abb. 58: Carboxyfluoresceinkonzentration im Akzeptorkompartiment ausgedrückt als Prozentsatz der eingesetzten Carboxyfluoresceindosis ( $1\mu\text{M}$ ), nach Behandlung der Monolayer mit  $10\mu\text{M}$  Oxyhämoglobin oder mit  $250\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO, als Kontrolle unbehandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

PHEPIPERAZI/NO senkt den apparenten Permeationskoeffizienten auf  $19,8 \pm 10,4\%$  der Kontrolle (Berechnung nach Methode 2) und  $19,2 \pm 5,6\%$  der Kontrolle (Berechnung nach Methode 1) verglichen mit unbehandelten Endothelzellen. Bei Einsatz von Oxyhämoglobin kommt es zu einer Absenkung auf  $10,8 \pm 3,4\%$  der Kontrolle (Berechnung nach Methode 2) und  $14,1 \pm 4,6\%$  der Kontrolle (Berechnung nach Methode 1).

Tab. 36:  $P_{\text{app}}$ -Werte für den Carboxyfluoresceinfluß über unbehandelte Endothelzellmonolayer (Kontrolle), mit  $250\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO behandelte Monolayer und mit einer Kombination aus  $250\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO und  $10\mu\text{M}$  Oxyhämoglobin behandelte Monolayer, Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten erfolgt nach Methode 1 oder Methode 2, AUC-Werte werden berechnet unter Zugrundelegung der Werte über 120 Minuten (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ ), Bestimmtheitsmaß  $r^2$ ,  $f_1$ - und  $f_2$ -Faktor für die Mittelwerte berechnet

	$P_{\text{app}}$ -Werte ( $\times 10^{-5}$ ) [cm/s]		AUC [%*s]	Bestimmtheitsmaß $r^2$	$f_1$ -Faktor	$f_2$ -Faktor
	Berechnung nach Methode 1	Berechnung nach Methode 2				
ohne NO-Donor, ohne Oxyhämoglobin (Kontrolle)	$3,68 \pm 0,46$	$3,43 \pm 0,40$	$186960 \pm 20080$	0,995		
Oxyhämoglobin $10\mu\text{M}$	$0,51 \pm 0,18$	$0,37 \pm 0,13$	$25470 \pm 9095$	0,991	86,34	28,47
PHEPIPERAZI/NO $250\mu\text{M}$ und Oxyhämoglobin $10\mu\text{M}$	$0,70 \pm 0,22$	$0,67 \pm 0,40$	$36348 \pm 11748$	0,997	80,68	29,78

Durch die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Oxyhämoglobin senkt sich der AUC-Wert auf  $13,7 \pm 4,5 \%$  der Kontrolle. Dieser Wert ist vergleichbar mit den Werten, die durch Berechnung der Permeationskoeffizienten erzielt wurden, besonders gut ist die Übereinstimmung mit der Reduktion bei Berechnung der  $P_{\text{app}}$ -Werte nach Methode 2. Wird der Endothelzellmonolayer mit 250  $\mu\text{M}$  PHEPIPERAZI/NO behandelt, so sinkt der AUC-Wert im Vergleich zur Kontrolle auf  $19,6 \pm 5,8 \%$ . Auch diese Reduktion stimmt mit der prozentualen Reduktion der  $P_{\text{app}}$ -Werte überein. Dabei ist die Übereinstimmung mit beiden Berechnungsmethoden gleich gut, da es auch keinen Unterschied in den berechneten Permeationskoeffizienten gibt (Tab. 36).

Diese Untersuchung zeigt, dass der Einsatz von Oxyhämoglobin zu einer Abdichtung des Blut-Hirn-Schranken-Modells führt. Die Abdichtung ist vergleichbar der, die mit dem NO-Donor PHEPIPERAZI/NO erzielt wird. Dafür verantwortlich könnte die Fähigkeit von Oxyhämoglobin sein, reaktive Sauerstoffspezies zu binden. Da diese Substanzen auch von Endothelzellen gebildet werden und reaktive Sauerstoffspezies zu einer Schädigung der tight-junctions führen können, könnte durch das Binden dieser Substanzen ein positiver Effekt auf die Dichtigkeit von Endothelzellmonolayern erzielt werden.

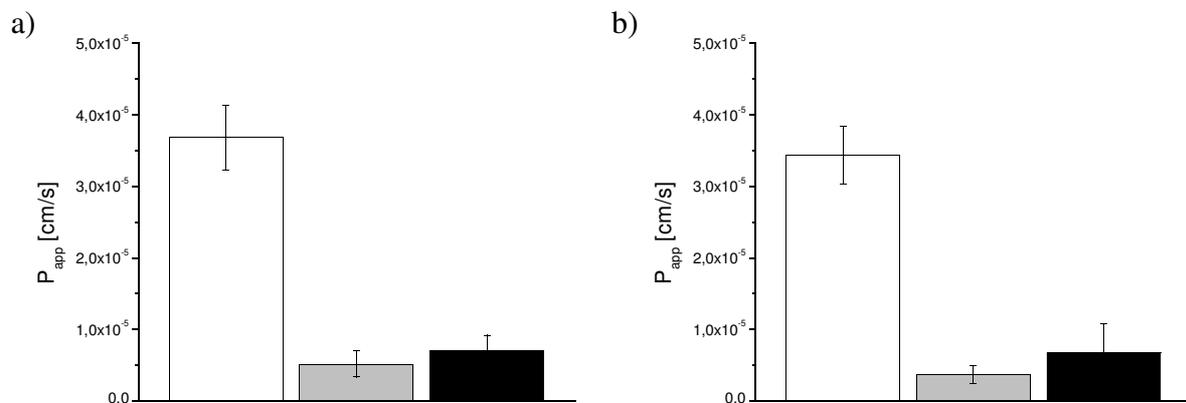


Abb. 59: Apparente Permeationskoeffizienten  $P_{\text{app}}$  für den Fluß von Carboxyfluorescein über unbehandelte und behandelte Endothelzellmonolayer (Mittelwert  $\pm \sigma$ ,  $n=3$ )

□ ohne NO-Donor (Kontrolle)    ■ Oxyhämoglobin 10  $\mu\text{M}$     ■ PHEPIPERAZI/NO 250  $\mu\text{M}$

a) Berechnung von  $P_{\text{app}}$  nach Methode 1

b) Berechnung von  $P_{\text{app}}$  nach Methode 2

# Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war am Anfang der Dissertation der Aufbau eines Blut-Hirnschranken-Modells mit Primärzellen, um Arzneistofftransportphänomene und Interaktionen von Arzneistoffen mit den Zellen der Blut-Hirnschranke studieren zu können. Die Untersuchung des Effektes, den NO-Donoren und NO-Donor-Prodrugs aus der Gruppe der Diazeniumdiolate auf Endothelzellen ausüben, ergab sich im Laufe der Arbeit als interessante Fragestellung. Es sollte geklärt werden, ob sich NO-Donor-Prodrugs identisch zu ihren Spaltprodukten verhalten oder ob es Unterschiede bei dem Einsatz von spontan NO-freisetzenden Substanzen und Prodrugs gibt.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Modell der Blut-Hirn-Schranke wurde aus Primären Schweinehirnendothelzellen gebildet. Damit ist die größtmögliche Nähe zu den in-vivo gegebenen Bedingungen erzielbar und die Ergebnisse lassen Schlüsse auf das in vivo Verhalten dieser Substanzen zu.

## 1. NO-Donoren

Die untersuchten NO-Donoren führten konzentrationsabhängig zu einer Senkung der Permeabilität für die Markersubstanz Carboxyfluorescein. Dieser Effekt konnte durch den Einsatz der NO-Scavenger-Substanz Methylenblau gehemmt werden.

NO-Donoren zeigten bei beiden benutzten Test auf Cytotoxizität und Zellvitalität, dass sie nicht cytotoxisch wirken.

## 2. NO-Donor-Prodrugs

Im Unterschied zu den spontan NO-freisetzenden Substanzen bewirken die in dieser Untersuchung benutzten NO-Donor-Prodrugs aus der Gruppe der Diazeniumdiolate eine Permeabilitätserhöhung für die Markersubstanz Carboxyfluorescein. Dieser Effekt konnte durch Methylenblau nicht aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, dass den Effekten bei NO-Donoren und NO-Donor-Prodrugs unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen.

PETN, ein Nitrat, welches ebenso wie die Prodrugs durch Zellen aktiviert werden muss, führt ebenso wie die Prodrugs zu einer Erhöhung der Permeabilität für Carboxyfluorescein. Dies lässt vermuten, dass der permeabilitätssteigernde Effekt an die Aktivierung der Substanzen gekoppelt ist oder aber dass intrazellulär freigesetztes NO einen anderen Effekt auf Endothelzellen ausübt, verglichen mit NO, welches außerhalb der Zellen gebildet wird.

### 3. Oxyhämoglobin

Durch die Substanz Oxyhämoglobin ist es möglich, den Fluß von Carboxyfluorescein über Endothelzellmonolayer deutlich zu verringern. Oxyhämoglobin kann nicht in die Zellen eindringen, so dass für diesen Effekt intrazelluläre Prozesse nicht verantwortlich sein können.

## Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Effekte der Diazeniumdiolate und der Diazeniumdiolat-Prodrugs sollten in ihrer Relevanz auf in vivo-Effekte noch untersucht werden.

Auch die Wirkung anderer Gruppen von NO-Donoren auf das Gehirnendothel sind noch nicht systematisch untersucht worden, um eine genaue Aussage über die Wirkung von NO-Donoren oder NO-Donor-Prodrugs treffen zu können.

Es müssen deshalb noch weitere Untersuchungen betrieben werden, um den genauen Mechanismus, der den beobachteten Effekten zu Grunde liegt, zu klären. Um dies zu erreichen, sollten noch weitere Marker außer Carboxyfluorescein eingesetzt werden, um den Einfluss der Marker-substanz auf das Ergebnis zu evaluieren, sowie andere Inhibitoren.

---

# Literaturverzeichnis

## A

**Abbott, N. J.,** Revest, P. A., Greenwood, J., et al. (1997): Preparation of primary rat brain endothelial cell culture. In: *Drug Transport Across the Blood-Brain Barrier*. de Boer, A. G., Sutanto, W., Harwood, Amsterdam, 5–16

**Ahmed, S. A.,** Gogal, R. M., and Walsh, J. E. (1994): A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assays. In: *Journal of Immunological Methods*, 170, 211–224

**Al-Naemi, H.,** and Baldwin, A. L. (1999): Nitric oxide: role in venular permeability recovery after histamine challenge. In: *American Journal of Physiology*, 277, H2010–H 2016

**Al-Naemi, H.,** and Baldwin, A. L. (2000): Nitric oxide protects venules against histamine-induced leaks. In: *Microcirculation*, 7, 215–223

**Arnold, S.,** Antoine, D., Blaser, H., Bloch, W., Andresen, C., and Addicks, K. (1999): Nitric oxide decreases microvascular permeability in bradykinin stimulated and nonstimulated conditions. In: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 33, 938–947

## B

**Bauer, B.,** (2002): Dissertation: In vitro Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke zur Untersuchung der Permeation und P-Glycoprotein-Interaktion von Arzneistoffen

**Blasig, I. E.,** Giese, H., Schroeter, M. L., Sporbert, A., Utepbergenov, D. I., Buchwalow, I. B., Neubert, K., Schonfelder, G., Freyer, D., Schimke, I., Siems, W. E., Paul, M., Haseloff, R. F., and Blasig, R. (2001): NO and Oxyradical Metabolism in New Cell Lines of Rat Brain Capillary Endothelial Cells Forming the Blood–Brain Barrier. In: *Microvascular Research*, 62(2), 114–127

**Blasini, R.,** Lehmann, G., and Schömig, A. (1997): NO-Donoren in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. In: *Internist*, 38, 448–452

**Boje, K. M. K.,** and Lakhman, S. S. (2000): Nitric oxide redox species exert differential permeability effects on the blood-brain barrier. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293, 545–550

**Bornstein, M. B.** (1958): Reconstituted rattail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in Maximow slides and roller tubes. In: *Laboratory Investigation*, 7(2), 134–137

**Brenman, J. E.,** and Bredt, D. S. (1996): Nitric oxide signaling in the nervous system. In: *Methods in Enzymology*, 269, 119–129

**C**

**Chi, O. Z.,** Liu, X. and Weiss, H. R. (1999): Effects of Cyclic GMP on Microvascular Permeability of the Cerebral Cortex. In: *Microvascular Research*, 58, 35–40

**Costa, P.** and Lobo, J. M. S. (2001): Modeling and comparison of dissolution profiles. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 123–133

**Crouch, S.,** Kozłowski, R., Slater, K., and Fletcher, J. (1993): The use of ATP Bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. In: *Journal of Immunological Methods*, 160(1), 81–88

**Cucullo, L.,** McAllister, M. S., Kight, K., Krizana-Bengez, L., Marroni, M., Mayberg, M. R., Stanness, K. A., and Janigro, D. (2002): A new dynamic in vitro model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier. In: *Brain Research*, 951, 243–254

**D**

**Dehouck, M.-P.,** Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J. C., and Cecchelli, R. (1990): An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. In: *Journal of Neurochemistry*, 54, 1798–1801

**Dehouck, B.,** Dehouck, M.-P., Fruchart, J.-C., and Cecchelli, R. (1994): Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood–brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. In: *Journal of Cell Biology*, 126, 465–473.

**F**

**Fachinformation Trinitrosan 5 mg/50 mg,** 2005, Merck Pharma GmbH

**FDA-Guidance:** Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms (1997)

**Feletou, M.,** Bonnardel, E., and Canet, E. (1996): Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide. In: *British Journal of Pharmacology*; 118, 1371–1376

**Franke, H.,** Galla, H. J., and Beuckmann, C. T. (2000): Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. In: *Brain Research Protocols*, 5, 248–256

**Fujii, E.,** Wada, K., Ishida, H., Yoshioka, T., and Muraki, T. (1999): Role of endogenous nitric oxide in the nitric oxide donor-induced plasma extravasation of mouse skin. In: *European Journal of Pharmacology*, 377, 219–222

## G

**Garberg, P.**, Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R. D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J. E., Raub, T. J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Öberg, J.-O., and Österberg, T. (2005): In vitro models for the blood-brain barrier. In: *Toxicology in Vitro*, 19, 299–334

**Gaillard, P. J.**, van der Sandt, I. C. J., Voorwinden, L. H., Vu, D., Nielsen, J. L., de Boer, A. G., and Breimer, D. D. (2000): Astrocytes increase the functional expression of p-Glycoprotein in an *in vitro* model of the blood-brain barrier. In: *Pharmaceutical Research*, 17(10), 1198–1205

**Gaillard, P. J.**, Voorwinden, L., Nielsen, J. L., Ivanov, A., Atsumi, R., Engman, H., Ringbom, C., de Boer, A. G., and Breimer, D. D. (2001): Establishment and functional characterisation of an *in vitro* model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain endothelial cells and astrocytes. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 215–222

**Giese, H.**, Mertsch, K., and Blasig, I. E. (1995): Effect of MK-801 and U83836E on a porcine brain capillary endothelial cell barrier during hypoxia. In: *Neuroscience Letters*, 191, 169–172

**Gimeno, G.**, Carpentier, P. H., Desquand-Billiald, S., Hanf, R., and Finet, L. (1998): L-Arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester cause macromolecular extravasation in the microcirculation of awake hamsters. In: *European Journal of Pharmacology*, 346, 275–282

**González, D.**, Herrera, B., Beltrán, A., Otero, K., Quintero, G., and Rojas, A. (2003): Nitric oxide disrupts VE-cadherin complex in murine microvascular endothelial cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304, 113–118

**Greenwood, J.**, Pryce, G., Devine, L., Male, D. K., dos Santos, W. L. C., Calder, V. L., and Adamson, P. (1996): SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics. In: *Journal of Neuroimmunology*, 71, 51–63

**Gupta, M. P.**, Ober, M. D., Patterson, C., Al-Hassani, M., Natarajan, V., and Hart, C. M. (2001): Nitric oxide attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced endothelial barrier dysfunction: mechanism of protection. In: *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280, L116–L126

## H

**Hayashi, K.**, Noguchi, N., and Niki, E. (1995): Action of nitric oxide as an antioxidant against oxidation of soybean phosphatidylcholine liposomal membranes. In: *FEBS letters*, 370, 37–40

**Heyn, G.** (2003): PETN-Tradition mit Zukunft. In: *Pharmazeutische Zeitung*, 45

**Holschermann, H.**, Noll, T., Hempel, A., and Piper, H. M. (1997): Dual role of cGMP in modulation of macromolecule permeability of aortic endothelial cells. In: *American Journal of Physiology*, 272, H91–H98

**Hüsgen, B.** (2003): Dissertation: Wirkungen von NO bei Artherosklerose, Einfluss von Geschlecht, Blutgefäßbett und NO-Bildungsort, 22

**Hurst, R. D.** and Clark, J. B. (1997): Nitric oxide-induced blood-brain barrier dysfunction is not mediated by inhibition of mitochondrial respiratory chain activity and/or energy depletion. In: Nitric Oxide: Biology and Chemistry 1, 121–129

**Hurst, R. D.**, and Fritz, I. B. (1996): Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. In: Journal of Cellular Physiology, 167(1), 81–88

## I

**Iwasaki, T.**, Kanda, T., and Mizusawa, H. (1999): Effects of pericytes and various cytokines on integrity of endothelial monolayer originated from blood-nerve barrier: an in vitro study. In: Journal of medical and dental sciences, 46(1), 31–40

## J

**Johnston, B.**, Gaboury, J. P., Suematsu, M., and Kubes, P. (1999): Nitric oxide inhibits microvascular protein leakage induced by leucocyte adhesion-independent and adhesion-dependent inflammatory mediators. In: Microcirculation, 6, 153–162

## K

**Kacem, K.**, LaCombe, P., Seylaz, J., and Bonvento, G. (1998): Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. In: GLIA, 23, 1–10

**Kanner, J.**, Harel, S., and Granit, R. (1991): Nitric oxide as an antioxidant. In: Archives of Biochemistry and Biophysics, 289(1), 130–136

**Kido, Y.**, Tamai, I., Okamoto, M., Suzuki, F., and Tsuji A. (2000): Functional Clarification of MCT1-Mediated Transport of Monocarboxylic Acids at the Blood-Brain Barrier Using In Vitro Cultured Cells and In Vivo BUI Studies. In: Pharmaceutical Research, 17, 55–63

**Knepler, J. L., Jr.**, Taher, L. N., Gupta, M. P., Patterson, C., Pavalko, F., Ober, M. D., and Hart, C. M. (2001): Peroxynitric causes endothelial cell monolayer dysfunction. In: American Journal of Physiology – Cell Physiology, 281, C1064–C1075

**Kröncke, K. D.**, Brenner, H. H., Rodriguez, M. L., Eitzkorn, K., Noack, E. A., Kolb, H., and Kolb-Bachofen, V. (1993): Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. In: Biochimica et Biophysica Acta, 1182(2), 221–229

**Kröncke, K. D.**, Fehsel, K., and Kolb-Bachofen, V. (1997). Brief review: Nitric oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection – How, why, when, and where? In: Nitric Oxide: Biology and Chemistry, 1(2), 107–120

**Kubes, P.** (1993): Nitric oxide-induced microvascular permeability alterations: A regulatory role for cGMP. In: American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology, 265, H1909–H1915

## L

**Lauer, R.,** Bauer, R., Linz, B., Pittner, F., Peschek, G. A., Ecker, G., Friedl, P., Noe, C.R. (2004): Development of an in vitro blood–brain barrier model based on immortalized porcine brain microvascular endothelial cells. In: *Il Farmaco*, 59, 133–137

**Lechardeur, D.,** Schwartz, B., Paulin, D., and Scherman, D. (1995): Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain-derived endothelial cell line. In: *Experimental Cell Research*, 220, 161–170

**Lüllmann, H.,** Mohr, K. und Hein, L. (2006): *Pharmakologie und Toxikologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

## M

**Marczin, N.,** Ryan, U. S., and Catravas, J. D. (1992): Methylene Blue Inhibits Nitrovasodilator- and Endothelium-Derived Relaxing Factor-Induced Cyclic GMP Accumulation in Cultured Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Generation of Superoxide Anion. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263, 170–179

**Mariani-Pedroso, S. R.,** Bizeto, L. Antunes, Zatz, R. and de Nucci, G. (1995): Dissimilarity between prostaglandin E<sub>1</sub> and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin in vivo. In: *Prostaglandin, leukotrienes and essential fatty acids*, 52, 399–402

**Martin, W.,** Villani, G. M., Jothianandan, D., and Furchgott, R.F. (1985): Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 132, 708–716

**Mayer, B.,** Brunner, F., and Schmidt, K. (1993): Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. In: *Biochemical Pharmacology* 45, 367–374

**Mayhan, W. G.** (1992): Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin. In: *Inflammation*, 16, 295–305

**Mayhan, W. G.** (1994): Nitric oxide accounts for histamine-induced increases in macromolecular extravasation. In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 266, H2369–H2373

**Mayhan, W. G.** (1995): Role of nitric oxide in disruption of the blood-brain barrier during acute hypertension. In: *Brain Research*, 686, 99–103

**Mayhan, W. G.,** and Didion, S. P. (1996): Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide. In: *Stroke*, 27, 965–970

**Mayhan, W. G.** (1999): VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. In: *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 276, C1148–C1153

**Mayhan, W. G.** (2000): Nitric oxide donor-induced increase in permeability of the blood-brain barrier. In: *Brain Research* 866, 101–108

**Megard, I.,** Garrigues, A., Orłowski, S., Jorajuria, S., Clayette, P., Ezan, E., and Mabondzo, A. (2002): A co-cultured-based model of human blood-brain barrier: application to active transport of indinavir and in vivo-in vitro correlation. In: *Brain Research*, 977, 153–167

**Menconi, M. J.,** Unno, N., Smith, M., Aguirre, D. E., and Fink, M. P. (1998): Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425, 189–203

**Miclescu, A.,** Basu, S., and Wikl, L. (2006): Methylene blue added to a hypertonic-hyperoncotic solution increases short-term survival in experimental cardiac arrest. In: *Critical Care Medicine*, 34(11), 2806–2813

**Mooradian, D. L.,** and Diglio, C. A. (1991): Production of a transforming growth factor by RSV-transformed rat cerebral microvasculature endothelial cells. In: *Tumor Biology*, 12, 171–183

**Mottaleb, M. A.,** Brumley, W. C., and Sovocool, G. W. (2004): Nitro Musk Metabolites Bound to Carp Hemoglobin: Determination by EIMS versus Electron Capture Negative Ion MS. In: *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 84(14-15), 1069–1078

**Muruganandam, A.,** Moorhouse Herx, L., Monette, R., Durkin, J. P., and Stanimirovic, B. (1997): Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. In: *FASEB Journal*, 11(13), 1187–1197

**Mutschler, E.,** Geisslinger, G., Kroemer, H. K. und Schäfer-Korting, M. (2001): *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH, Stuttgart

## N

**Nag, S.** (2003): Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. In: *Methods in Molecular Medicine: The blood-brain barrier: Biology and research protocols*, 89, 3–36

**Neuhaus, W.,** Trzeciak, J., Lauer, R., Lachmann, B., and Noe, C. R. (2006): APTS-labeled dextran ladder: A novel tool to characterize cell layer tightness. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 1035–1039

**Neuhaus, W.,** Lauer, R., Oelzant, S., Fringelic, U. P., Eckera, G. F., and Noea, C. R. (2006): A novel flow based hollow-fiber blood-brain barrier in vitro model with immortalised cell line PB-MEC/C1-2. In: *Journal of Biotechnology*, 125, 127–141

## O

- Olivier, J. A.** (1992): Endothelium-derived relaxing factor contributes to the regulation of endothelial permeability. In: *Journal of Cellular Physiology*, 151, 506–511
- Olsson, T.,** Gulliksson, H., Palmeborn, M., Bergstrom, K., and Thore, A. (1983): Leakage of adenylate kinase from stored blood cells. In: *Journal of Applied Biochemistry*, 5, 347–445
- Omidi, Y.,** Campbell, L., Barar, J., Connell, D., Akhtar, S., and Gumbleton, M. (2003): Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. In: *Brain Research*, 990(1-2), 95–112

## P

- Pardridge, W. M.** (1999): Blood-brain barrier biology and methodology. In: *Journal of Virology*, 5, 556–569
- Parkinson, F. E.,** Friesen, J., Krizana-Bengez, L., and Janigro, D. (2003): Use of a three-dimensional in vitro model of the rat blood-brain barrier to assay nucleoside efflux from brain. In: *Brain Research*, 980, 233–241
- Perutz, M. F.** (1968): Preparation of hemoglobin crystals. In: *Journal of Crystal Growth*, 2, 54–56
- Perrière, N.,** Demeuse, Ph., Garcia, E., Regina, A., Debray, M., Andreux, J.-P., Couvreur, P., Scherrmann, J.-M., Tamsamani, J., Couraud, P.-O., Deli, M., and Roux, F. (2005): Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier specific properties. In: *Journal of Neurochemistry*, 93, 279–289
- Prahl, S.** (1999): Optical Absorption of Hemoglobin. In: <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/index.html> und <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/summary.html>

## R

- Radomski, M. W.,** Palmer, R. M. J., and Moncada, S. (1987): The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 148(3), 1482–1489
- Radomski, M. W.,** Palmer, R. M. J., and Moncada, S. (1987): Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. In: *British Journal of Pharmacology*, 92(1), 181–187
- Radomski, M. W.,** Palmer, R. M. J., and Moncada, S. (1987): The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. In: *British Journal of Pharmacology*, 92(3), 639–646

**Radomski, M. W.,** Palmer, R. M. J., and Moncada, S. (1990): An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(13), 5193–5197

**Ramsohoye, P. V.,** and Fritz, I. B. (1998): Preliminary characterisation of glial-secreted factors responsible for the induction of high electrical resistances across endothelial monolayers in a blood-brain barrier model. In: Neurochemical Research, 23(12), 1545–1551

**Raub, T. J.,** Kuentzel, S. L., and Sawada, G. A. (1992): Permeability of bovine microvessel endothelial cells *in vitro*: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. In: Experimental Cell Research, 199, 330–340

**Rauhala, P.,** Sziraki, I., and Chiueh, C. C. (1996): Peroxidation of brain lipids *in vitro*: nitric oxide versus hydroxyl radicals. In: Free Radical Biology and Medicine, 21(3), 391–394

**Regina, A.,** Romero, I. A., Greenwood, J., Adamson, P., Bourre, J. M., Couraud, P.-O., and Roux, F. (1999): Dexamethasone regulation of p-Glycoprotein activity in an immortalized rat brain endothelial cell line, GPNT. In: Journal of Neurochemistry, 73, 1954–1963

**Reichel, A.,** Begley, D. J., and Abbott, N. J. (2003): An overview of *in vitro* techniques for blood-brain barrier studies. In: Methods in Molecular Medicine, 89, 307–324

**Roux, F.,** Durieu-Trautmann, O., Chaverot, N., Claire, M., Mailly, P., Bourre, J.-M., Strosberg, A. D., and Couraud, P.-O. (1994): Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. In: Journal of Cellular Physiology, 159, 101–113

**Roux, F.,** and Couraud, P.-O. (2005): Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. In: Cellular and Molecular Neurobiology, 25(1), 41–58

**Rubbo, H.,** Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B. A. (1994): Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. In: The Journal of Biological Chemistry, 269(42), 26066–26075

**Rubin, L. L.,** Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., and Morales, J. (1991): A cell culture model of the blood-brain barrier. In: The Journal of Cell Biology, 115, 1725–1735

## S

**Santaguida, S.,** Janigro, D., Hossain, M., Oby, E., Rapp, E., and Cucullo, L. (2006): Side by side comparison between dynamic versus static models of the blood-brain barrier *in vitro*: A permeability study. In: Brain Research, 1109, 1–13

**Shukla, A.,** Dikshit, M., and Srimal, R. C. (1996): Nitric oxide-dependent blood-brain barrier permeability alteration in the rat brain. In: Experientia, 52(2), 136–140

**Sobue, K.**, Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M. E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K., and Kato, T. (1999): Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. In: *Neuroscience Research*, 35(2), 155–164

**Squatrito, R. C.**, Connor, J. P., and Buller, R. E. (1995): Comparison of a novel redox dye cell growth assay to the ATP bioluminescence assay. In: *Gynecologic Oncology*, 58, 101–105

**Stamler, J. S.**, Singel, D. J., and Loscalzo, J. (1992): Biochemistry of nitric-oxide and its redox activated form. In: *Science*, 258, 1898–1902

**Stanness, K. A.**, Guatteo, E., and Janigro, D. (1996): A dynamic model of the blood-brain barrier „in-vitro“. In: *Neurotoxicology*, 17(2), 481–496

**Stanness, K. A.**, Westrum, L. E., Fornaciari, E., Mascagni, P., Nelson, J. A., Stenglein, S. G., Myers, T. and Janigro, D. (1997): Morphological and functional characterisation of an in vitro blood-brain barrier model. In: *Brain Research*, 771, 329–342

**Stannes, K. A.**, Neumaier, J. F., Sexton, T. J., Grant, G. A., Emmi, A., Maris, D. O., and Janigro, D. (1999): A new model of the blood-brain barrier: co-culture of neuronal, endothelial and glial cells under dynamic conditions. In: *NeuroReport*, 10, 3725–3731

**Suda, K.**, Rothen-Rutishauser, B., Gunthert, M., and Wunderli-Allenspach, H. (2001): Phenotypic characterisation of human umbilical vein endothelial (ECV 304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. In: *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*, 37(8), 505–514

## T

**Tao-Cheng, J.-H.**, Nagy, Z., and Brightman, M. W. (1987): Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. In: *Journal of Neuroscience*, 7(10), 3293–3299

**Terasaki, T.**, and Hosoya, K. (2001): Conditionally immortalized cell lines as a new in vitro model for the study of barrier functions. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24, 111–118

**Teifel, M.**, and Friedl, P. (1996): Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. In: *Experimental Cell Research*, 228, 50–57

**Timpl, R.**, Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H., and Kuhn, K. (1981): A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membrane. In: *European Journal of Biochemistry*, 120, 203–211

**Timpl, R.**, Rohde, H., Risteli, L., Ott, U., Robey, P. G., and Martin, G. R. (1982): Laminin In: *Methods in Enzymology*, 82, Pt. A, 831–838

**Timpl, R.** (1993): Proteoglycans of basement membranes. In: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 49(5), 417–428

**Török, M.**, Huwyler, J., Gutmann, H., Fricker, G. and Drewe, J. (2003): Modulation of transendothelial permeability and expression of ATP-binding cassette transporters in cultured brain

capillary endothelial cells by astrocytic factors and cell-culture conditions. In: *Experimental Brain Research* 153, 356–365

**Tsai, A. L.** (1994): How does NO activate heme-proteins? In: *FEBS Letters* 341, 141-145.

## V

**Vidwans, A. S.**, Kim, S., Coffin, D. O., Wink, D. A. and Hewett, S. J. (1999): Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murine mixed cortical cell culture. In: *Journal of Neurochemistry* 72 (5), 1843–1852.

## W

**Weksler, B. B.**, Subileau, E. A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D. K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I. A., and Couraud, P. O. (2005): Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. In: *FASEB Journal*, 19(13), 1872–1874

**Williams, D. L. H.** (2003): A chemist's view of the nitric oxide story. In: *Organic and Biomolecular Chemistry*, 1, 441–449

**Wink, D. A.**, Hanbauer, I., Krishna, M. C., Degraff, W., Gamson, J., and Mitchell, J. B. (1993): Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 9813–9817

**Wink, D. A.**, Cook, J. A., Krishna, M. C., Hanbauer, I., DeGraff, W., Gamson, J., Mitchell, J. B. (1995): Nitric oxide protects against alkyl peroxide-mediated cytotoxicity: further insights into the role nitric oxide plays in oxidative stress. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319(2), 402–407

**Wink, D. A.**, Cook, J. A., Pacelli, R., DeGraff, W., Gamson, J., Liebmann, J., Krishna, M. C., and Mitchell, J. B. (1996): The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331(2), 241–248

**Wolburg, H.**, Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauß, B., Schmid, E.-M., Öcalan, M., Farrell, C., and Risau, W. (1994): Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. In: *Journal of Cell Science*, 107(5), 1347–1357

**Wong, D.**, Dorovini-Zis, K., and Vincent, S. R. (2004): Cytokines, nitric oxide and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. In: *Experimental Neurology* 190, 446–455

## Y

**Yamada, Y.**, Furumichi, T., Furui, H., Yokoi, T., Ito, T., Yamauchi, K., Yokota, M., Hayashi, H., and Saito, H. (1990): Roles of calcium, cyclic nucleotides, and protein kinase C in regulation of endothelial permeability. In: *Arteriosclerosis*, 10, 410–420

---

**Yamamoto, T.**, and Bing, R. J. (2000): Nitric Oxide Donors (44565). In: *Experimental Biology and Medicine*, 225, 200–206

**Yao, S. K.**, Ober, J. C., Krishnaswami, A., Ferguson, J. J., Anderson, H. V., Golino, P., Buja, L. M., and Willerson, J. T. (1992): Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. In: *Circulation*, 86, 1302–1309

**Yates, M. T.**, Lambert, L. E., Whitten, J. P., McDonald, I., Mano, M., Ku, G., and Mao, S.J. (1992): A protective role for nitric oxide in the oxidative modification of low density lipoproteins by mouse macrophages. In: *FEBS letters*, 309, 135–138

**Yuan, Y.**, Granger, H. J., Zawieja, D. C. and Chilian, W. M. (1992): Flow modulates coronary venular permeability by a nitric oxide-related mechanism. In: *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 263, H641–H646

## Z

**Zenker, D.**, Begley, D., Bratzke, H., Rübsamen-Waigmann, H., and von Briesen, H. (2003): Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. In: *Journal of Physiology*, 551(3), 1023–1032

**Zhang, R.**, Zhang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Lu, M., LaPointe, M. and Chopp, M. (2001): A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. In: *Annals of Neurology* 50 (5), 602-611.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Blaustein,

Sven Winter