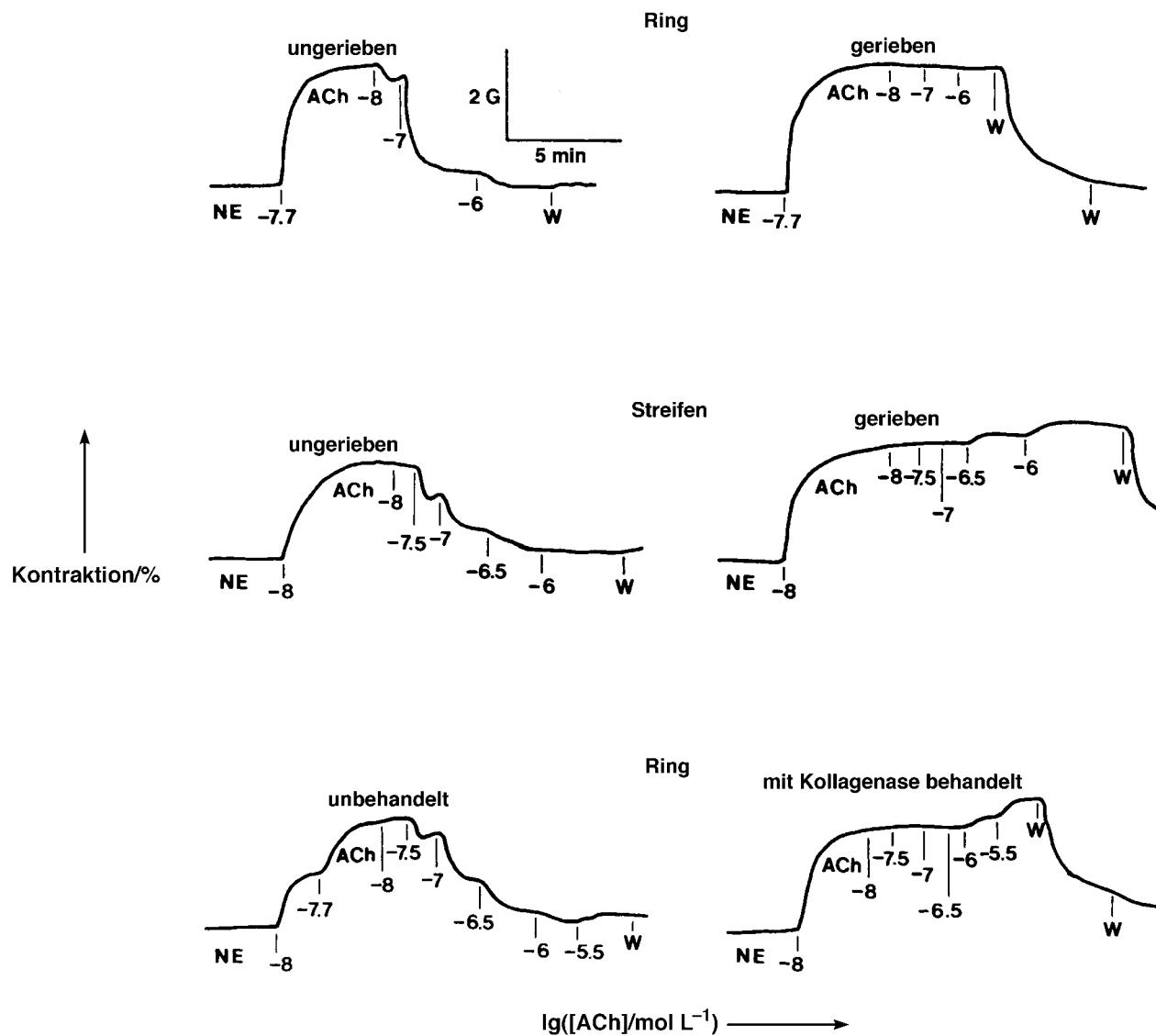


Die obligate Rolle von Endothelzellen für die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wird mit Organkammer-Experimenten verdeutlicht. Zwei Präparate, ein transversaler Ring und ein helicaler Streifen aus der Brustaorta des Kaninchens, werden in einem Organbad inkubiert und durch Noradrenalin (NE) kontrahiert.



Der Zusatz des Vasodilatators Acetylcholin (ACh) führt zu einer Relaxation der Muskelpräparate (linke Bildhälfte). Werden die Endothelzellen jedoch mechanisch (durch Reiben) oder enzymatisch (durch Kollagenase) entfernt, so bleibt die Relaxationsantwort aus (rechte Bildhälfte). Erst nach Entfernen von NE und ACh durch Auswaschen (W) relaxiert der Muskel wieder.

Der relaxierende Faktor aus Endothelzellen: Entdeckung, frühe Untersuchungen und Identifizierung als Stickstoffmonoxid (Nobel-Vortrag)**

Robert F. Furchtgott*

Eine zufällige Entdeckung

In einer vor 45 Jahren veröffentlichten Publikation, in der ich den helicalen Streifen aus der Aorta eines Kaninchens als nützliches Präparat für quantitative pharmakologische Untersuchungen von vasoaktiven Wirkstoffen und Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen vorstellte, berichtete ich über die Wirkungen von verschiedenen Catecholaminen, Natriumnitrit, Histamin und Acetylcholin (ACh) auf dieses Präparat. Ein überraschendes Ergebnis dieser Untersuchungen war,^[1] daß ACh, welches als sehr starker Vasodilatator im intakten Tier und in perfundierten Organen bekannt war, keine Relaxation hervorrief, sondern nur zur Kontraktion des Aortenstreifens führte, gleichgültig, ob der Streifen sich im Ruhezustand befand oder durch einen Vasokonstriktor wie Noradrenalin vorkontrahiert war. Etwas später benutzten wir ACh als kontrahierendes Agens, als wir die relative Stärke relaxierender Agentien wie Noradrenalin, Adrenalin und Isoproterenol bestimmten wollten, die ihre Wirkung über β -Adrenozeptoren auf helicale Streifen ausübten, in denen die α -Adrenozeptoren durch Vorbehandlung mit Dibenamin irreversibel blockiert worden waren.^[2] Die relativen Stärken der relaxierenden Wirkung dieser Catecholamine (ca. 1:50:200) wiesen auf einen Adrenozeptor vom β_2 -Typ hin.

In der Mitte der siebziger Jahre führten wir pharmakologische Studien mit isolierten Streifen aus der glatten Muskulatur der Luftröhre von Meerschweinchen durch und erhielten Hinweise darauf, daß die β -Adrenozeptoren dieses Muskels, die nach der gängigen Lehrmeinung ausschließlich aus β_2 -Rezeptoren bestehen sollten, häufig auch β_1 -Rezeptoren enthielten. Angesichts dieser unerwarteten Ergebnisse beschloß ich, die β -Rezeptoren in der glatten Muskulatur der Brustaorta des Kaninchens erneut zu untersuchen. Ich plante, zuerst in einer Reihe von Experimenten die relativen Stärken der relaxierenden Wirkung von Noradrenalin, Adrenalin und Isoproterenol auf Kaninchen-Aortenpräparate nach Vorbe-

handlung mit Dibenamin erneut zu bestimmen. Um eine Kontraktion nach der Vorbehandlung herbeizuführen, wollten wir – wie in früheren Untersuchungen – muscarinerge Agonisten wie Carbachol oder ACh benutzen. Aber schon beim allerersten Experiment dieser Serie im Mai 1978 befolgte mein Laborant meine Anweisungen nicht korrekt: Am Anfang des Experiments, vor der Blockierung der α -adrenergen Rezeptoren mit Dibenamin, testete er Carbachol auf seine kontrahierende Wirkung, bevor (statt, wie vorgeschrieben, nachdem) er eine zuvor verabreichte Testdosis Noradrenalin ausgewaschen hatte. Die Reaktion auf Carbachol war keine Kontraktion, sondern eine partielle Relaxation der Noradrenalin-induzierten Kontraktion. Anschließend testeten wir ACh. Auch hier beobachteten wir eine Relaxation des mit Noradrenalin vorkontrahierten Aortenpräparates (Abbildung 1). Zum ersten Mal in den vielen Jahren, in denen ich Kaninchenaorta für In-vitro-Experimente verwen-

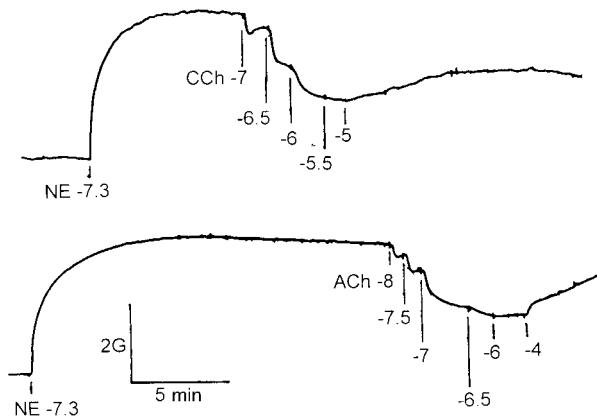


Abbildung 1. Polygramm des ersten Experimentes im Labor des Autors, bei dem die muscarinergen Agonisten Carbachol (CCh) und Acetylcholin (ACh) überraschenderweise zu einer Relaxation eines transversalen Rings aus der Brustaorta eines Kaninchens führten. Bei diesem und allen anderen Experimenten wurden – wenn nicht anders angegeben – Aortenpräparate (Ringe oder Streifen) verwendet, die sich in gläsernen Organkammern (20 mL) befanden. In diesen Kammern befand sich Krebs-Bicarbonat-Lösung, die bei 37 °C mit O₂/CO₂ (95:5) belüftet wurde. Der Schreiberausschlag zeigt Spannungsänderungen unter isometrischen Bedingungen an (für Details der experimentellen Bedingungen siehe Lit. [4]). In dieser und allen anderen Abbildungen werden – wenn nicht anderes angegeben – die kumulativen Konzentrationen der Wirkstoffe in den Organkammern als Logarithmus der molaren Konzentrationen ausgedrückt. 2G = Spannungsmaß; NE = Noradrenalin (Norepinephrin)

[*] Prof. Dr. R. F. Furchtgott

Department of Pharmacology, Box 29
SUNY Health Science Center at Brooklyn
450 Clarkson Avenue, Brooklyn, NY 11203 (USA)
Fax: (+1) 718-270-2241

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1999. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

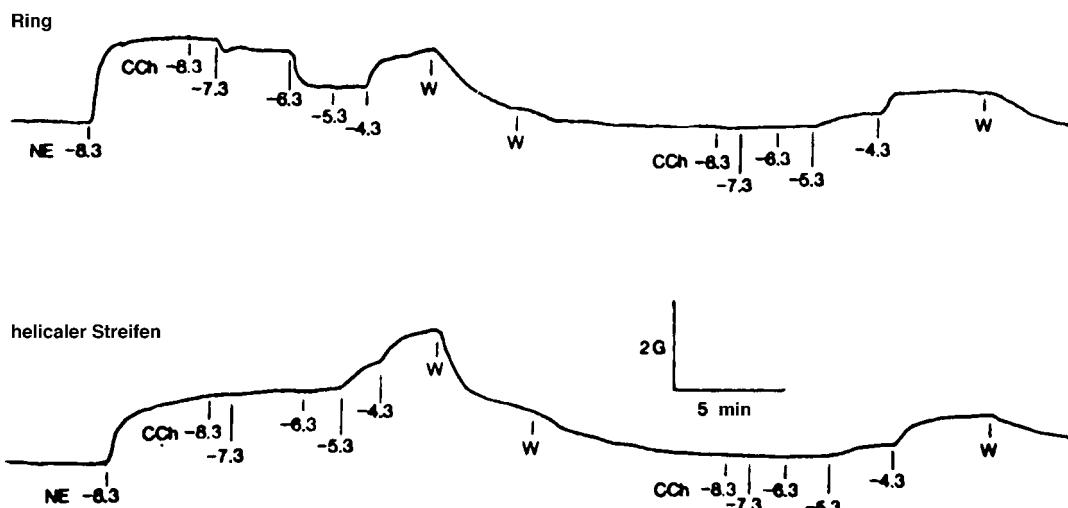


Abbildung 2. Vergleich der Reaktionen eines transversalen Rings und eines helicalen Streifens, die aus denselben Kaninchen-Brustaorta präpariert wurden, auf Carbachol. Der Ring (Weite 2.5 mm) war auf ein Paar L-förmiger Haken montiert, um ihn am Boden der Organkammer und am Kraftüberträger zu befestigen. Der Streifen war nach unserer Standardmethode präpariert worden und mit Bindfäden an beiden Enden befestigt. Nur der Ring – wenn er mit Noradrenalin vorkontrahiert war – relaxierte als Reaktion auf niedrige CCh-Konzentrationen. Später erkannten wir, daß bei unserer standardmäßigen Präparation der Streifen die Endothelzellen unabsichtlich von der Intimaoberfläche abgerieben worden waren. (Der Ring reagierte nach dem Auswaschen (W) von Noradrenalin auf die Zugabe von CCh nicht mit einer Relaxation, weil solche Präparate in Abwesenheit von Vasokonstriktoren fast keine aktive kontraktile Spannung aufweisen.) In dieser Abbildung sind die Wirkstoff-Konzentrationen als Logarithmus der Konzentration (g mL^{-1}) ausgedrückt. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [3].)

det hatte, beobachtete ich eine Relaxation dieses Blutgefäßes als Antwort auf muscarinerge Agonisten. Die unerwartete Relaxation der Kaninchenaorta durch muscarinerge Agonisten *in vitro* war sehr aufregend, da dieser Effekt mit der starken gefäßweiternden Wirkung dieser Agonisten *in vivo* in Einklang stand.

Entdeckung und frühe Untersuchungen des EDRF

Warum hatten wir die ACh-induzierte Relaxation der Aortenpräparate erst jetzt beobachtet? Eine ausführliche Beschreibung unserer Untersuchungen zu diesem Thema ist veröffentlicht worden,^[3,62] so daß hier nur kurz die Reihenfolge unserer Entdeckungen umrissen werden muß. Als erstes

war uns klar, daß wir jetzt einen transversalen Ring der Kaninchen-Brustaorta benutzten und nicht mehr einen helicalen Streifen, den wir in allen früheren Experimenten mit muscarinergen Agonisten verwendet hatten.

Daher verglichen wir in mehreren Experimenten die Wirkung von kumulativen Konzentrationen von Carbachol oder ACh auf helicale Streifen und transversale Ringe, die aus denselben Aorta präpariert worden waren. Nur die Ringe reagierten mit einer Relaxation auf diese muscarinergen Agonisten, während die Streifen kontrahierten (Abbildung 2).

Nach einigen Wochen der Arbeit bemerkten wir, daß ein leichtes Reiben an der Intima (der innersten Schicht der Gefäßwand von Arterien) – ob absichtlich oder unabsichtlich (wie es unbemerkt bei unserer Standardmethode zum Präpa-

Robert F. Furchtgott, geboren in Charleston, South Carolina, machte 1937 seinen B.S.-Abschluß in Chemie an der University of North Carolina und promovierte 1940 zum Ph.D. in Biochemie an der Northwestern University. Von 1940 bis 1949 arbeitete er am Cornell University College of Medicine und von 1949 bis 1956 an der Washington University. Er war von 1956 bis 1982 Professor und Leiter der Abteilung für Pharmakologie an der State University of New York Downstate Medical Center (jetzt SUNY Health Service Center at Brooklyn) und ist derzeit als Distinguished Professor Emeritus dort tätig. Seit 1989 ist er auch Adjunct Professor für Pharmakologie an der University of Miami School of Medicine. Seine Forschungsinteressen lagen auf dem Gebiet der Herzpharmakologie, der adrenergen peripheren Mechanismen, der Theorie der Wirkstoff-Rezeptor-Mechanismen und der Gefäßpharmakologie und -physiologie. Viele seiner Forschungsarbeiten führte er an isolierten, lebenden Herz- und Blutgefäß-Präparaten durch. Zu seinen wichtigen Entdeckungen gehört die Aufklärung der obligaten Rolle von Endothelzellen für die Relaxation von Arterien durch Acetylcholin und verwandte muscarinerge Agonisten sowie der Nachweis, daß die Relaxation eine Folge der Freisetzung eines labilen Faktors (EDRF) aus den stimulierten Endothelzellen ist. Seine herausragenden Beiträge wurden durch zahlreiche Auszeichnungen und Preise gewürdigt, darunter den Nobel-Preis für Physiologie oder Medizin im Jahr 1998.

rieren von helicalen Streifen vorgekommen war) – die relaxierende Wirkung von ACh und anderen muscarinergen Agonisten aufhob. Streifen und Ringe wiesen eine exzellente Relaxation auf, wenn man eine Berührung der Intima sorgfältig vermied. Der Verlust der Relaxationsantwort auf ACh nach Berührung der Intima war die Folge eines mechanischen Abriebs der Endothelzellen – dies konnte durch Silberfärbung und anschließende Aufsichtmikroskopie der Intimaoberfläche eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich, daß eine vorhergehende komplettete Entfernung des Aortenendothels der Intimaoberfläche durch Inkubation mit Kollagenase auch zu einem vollständigen Verlust der Relaxationsantwort auf ACh führte.

Abbildung 3 ist eine leicht modifizierte Abbildung aus der ersten ausführlichen Veröffentlichung über die obligate Rolle von Endothelzellen für die Relaxation von arteriellen glatten Muskelzellen durch ACh.^[4] In dieser Publikation beschrieben wir, daß eine Reihe anderer Arterien des Kaninchens und verschiedene Arterien anderer Spezies eine Relaxation nach ACh-Gabe auch nur dann zeigten, wenn Endothelzellen vorhanden waren. Cyclooxygenase-Inhibitoren beeinflußten die endothelabhängige Relaxation nicht. Eine Hypothese zur Erklärung der obligaten Rolle der Endothelzellen war, daß ACh über muscarinerge Rezeptoren die Endothelzellen zur Abgabe einer nichtprostanoiden Substanz stimulierte, die zu den darunterliegenden glatten Muskelzellen diffundierte und dort eine Relaxation auslöste. Diese Methode wurde durch

die „Sandwich“-Methode direkt bewiesen: Es wurde gezeigt, daß ein transversaler Aortenstreifen, von dem die Endothelzellen entfernt worden waren und der daher bei Zugabe von ACh nicht relaxiert konnte, trotzdem durch ACh relaxiert werden konnte, wenn er mit seiner endothelfreien Intimaoberfläche auf der endothelhaltigen Intimaoberfläche eines longitudinalen Aortenstreifens befestigt wurde (Abbildung 4). Die ACh-induzierte Relaxation des transversalen Streifens in diesem „Sandwich“ bewies, daß ACh die Abgabe einer diffusionsfähigen relaxierenden Substanz (oder von Substanzen) aus den Endothelzellen des longitudinalen Streifens stimulierte.^[4] Die relaxierende Substanz wurde später EDRF (endothelium-derived relaxing factor) genannt.^[5]

Es soll hier erwähnt werden, daß – obwohl wir vor unserem zufälligen Befund im Jahre 1978 nie eine Relaxation von Kaninchenorta durch ACh in meinem Labor beobachtet hatten – mehrere Berichte anderer Arbeitsgruppen zur Relaxation isolierter Arterienpräparate nach ACh-Gabe vorlagen. So berichtete z.B. Jelliffe,^[6] daß eine Kette von Aortenringen des Kaninchens, die durch Fäden abgebunden und mit Serotonin vorkontrahiert worden waren, als Reaktion auf niedrige ACh-Konzentrationen relaxierten; Vanhoutte^[7] und Toda^[8] berichteten, daß ACh in verschiedenen Präparaten von Arterienstreifen des Hundes zu einer signifikanten Relaxation von spontanen oder Wirkstoff-induzierten Kontraktionen führte. Nach unseren Ergebnissen über die obligate Rolle der Endothelzellen für die ACh-induzierte Relaxation von Arterien wurde deutlich, daß diese früheren Beispiele der ACh-induzierten Relaxation von der Anwesenheit der Endothelzellen in den untersuchten Arterienpräparaten abhingen.

Nach unseren Ergebnissen über die obligate Rolle der Endothelzellen für die ACh-induzierte Relaxation von Arterien wurde deutlich, daß diese früheren Beispiele der ACh-induzierten Relaxation von der Anwesenheit der Endothelzellen in den untersuchten Arterienpräparaten abhingen.

Es ist interessant, daß wahrscheinlich ein versehentlicher Abrieb von Endothelzellen in einem anderen Gefäßpräparat, das in meinem Labor verwendet wurde, die Entdeckung der endothelabhängigen Vasodilatation zu einem früheren Zeitpunkt verhindert hat. Dieses Präparat war die perfundierte Zentralarterie des Kaninchenohrs, die Odd Steinsland, der in den frühen siebziger Jahren als Doktorand in meinem Labor arbeitete, benutzte, um die Inhibition der adrenergen Neurotransmission durch ACh und andere muscarinerge Agonisten, die auf präsynaptische muscarinerge inhibitorische Rezeptoren wirkten, zu untersuchen. Er wies nach, daß ACh ein starker Inhibitor der Neurotransmission war, da es die Abgabe von Noradrenalin und die Vasokonstriktion nach Nervenstimulation inhibierte.^[9] Um sicherzugehen, daß die Inhibition der Vasokonstriktion ausschließlich durch die Hemmung der Transmitter-

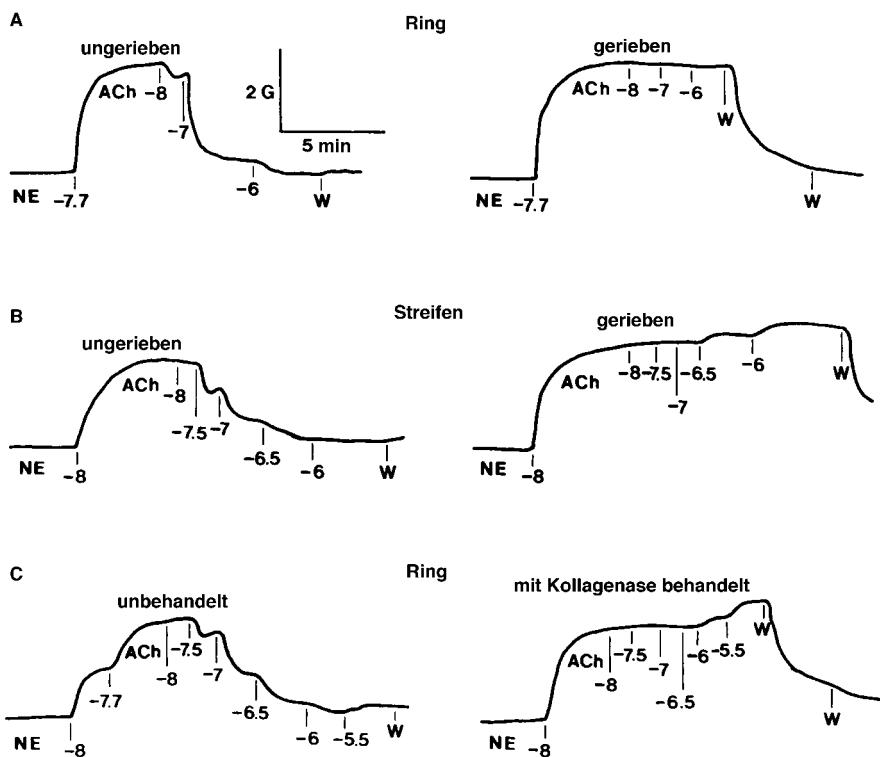


Abbildung 3. Die Schreiberaufzeichnungen zeigen den Verlust der Relaxationsantwort von Kaninchenorta auf ACh-Zugabe nach kompletter Entfernung der Endothelzellen. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Aufzeichnungen vor, auf der rechten Seite die nach der Entfernung der Endothelzellen wiedergegeben. Die Zellen aus dem Ring wurden durch Reiben der Intimaoberfläche mit einem Holzstückchen (A) oder durch Inkubation mit Kollagenase entfernt (C), aus dem transversalen Streifen durch Reiben mit einem feuchten Filterpapier (B). Nach dem Entfernen der Endothelzellen reäquilibrierten die Präparate in ihren Organkammern 1 h lang, bevor sie erneut getestet wurden. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [18].)

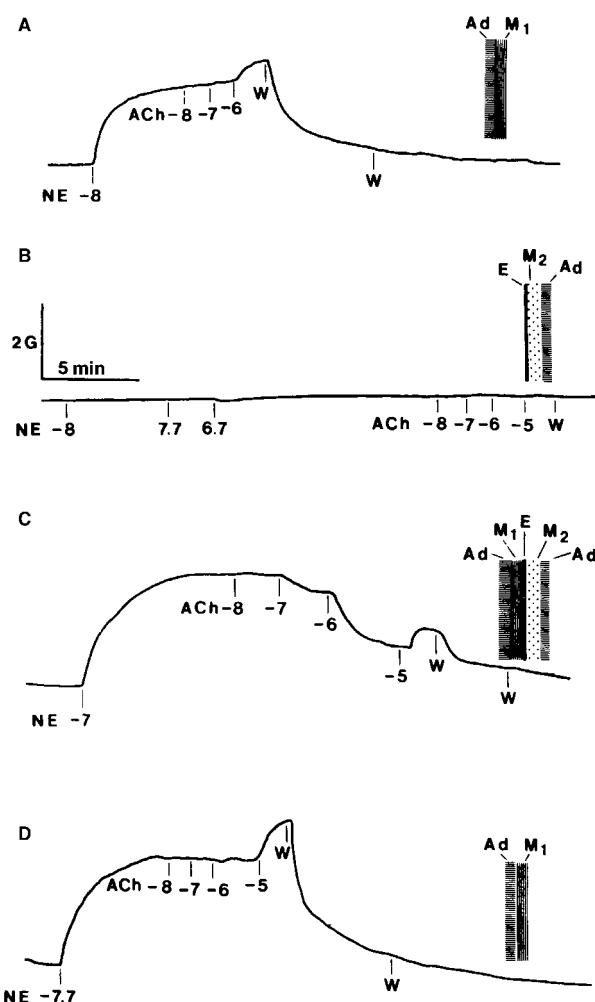


Abbildung 4. Ein „Sandwich“-Experiment, daß die Freisetzung einer relaxierenden Substanz aus Endothelzellen als Reaktion auf Zusatz von ACh zeigt. A: Bei einem transversalen Streifen der Kaninchenaorta, von dem die Endothelzellen durch Reiben entfernt worden waren, führte ACh nicht zu einer Relaxation des NE-induzierten Tonus (erster Test). B: Bei einem longitudinalen Streifen aus derselben Aorta mit Endothelzellen riefen NE und ACh wegen der Orientierung der glatten Muskelzellen nur unbedeutende Änderungen der Anspannung hervor (erster Test). C: Bei einem „Sandwich“ aus dem transversalen Streifen ohne Endothel und dem longitudinalen Streifen mit Endothel, die mit ihren gesamten Intima-oberflächen aufeinander montiert worden waren und dann reäquilibriert konnten, rief ACh jetzt eine Relaxation des NE-induzierten Tonus hervor (zweiter Test). D: Nach Entfernen des longitudinalen Streifens mit Endothel vom endothelfreien transversalen Streifen und dessen Reäquilibrierung kam es zu keiner Relaxation nach ACh-Zugabe. Die Einschübe geben vertikale Querschnitte der verwendeten Präparate wieder: Ad = Adventitia, E = Endothel, M₁ und M₂ = mediale Schichten aus glatten Muskelzellen, die vertikal bzw. horizontal orientiert sind. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [18].)

freisetzung verursacht wurde, untersuchte er, ob infundiertes ACh die durch infundiertes Noradrenalin verursachte Vasokonstriktion hemmen konnte; dies war nicht der Fall.^[9] Etwa zehn Jahre später, nachdem eine endothelabhängige Relaxation für eine Vielzahl von Arterienpräparaten nachgewiesen worden war, wunderten wir uns über den früheren Befund, daß die perfundierte Ohrarterie, die durch Noradrenalin kontrahiert worden war, keine Vasodilatation nach ACh-Gabe aufwies. Dr. Steinsland gab uns die Antwort: Bei seinen

früheren Experimenten hatte er die Entstehung von Luftblasen in der Perfusionsvorrichtung nicht verhindert, so daß diese durch die Ohrarterie gelaufen waren. Als jetzt die Luftblasen sorgfältig aus dem Perfusionsstrom entfernt wurden, führte ACh zu einer Vasodilatation (Relaxation) der Noradrenalin-induzierten Vasokontraktion.^[10] Offensichtlich hatten die Luftblasen bei den früheren Experimenten eine mechanische Entfernung der Endothelzellen bewirkt, ohne daß wir uns dessen bewußt waren.

Erste Untersuchungen von Substanzen, die eine endothelabhängige Relaxation induzieren oder inhibieren können

Innerhalb weniger Jahre nach der Entdeckung, daß die ACh-induzierte Relaxation isolierter Arterien endothelabhängig war, wurde eine Reihe weiterer endothelabhängiger relaxierender Verbindungen bei Organkammer-Experimenten identifiziert, bei denen Ringe oder Streifen von Blutgefäßen aus mehreren Spezies einschließlich des Menschen benutzt wurden. Unter diesen Substanzen waren auch das Calcium-Ionophor A23187, ATP und ADP, Substanz P, Bradykinin, Histamin, Thrombin, Serotonin und Vasopressin (für Verweise auf erste Berichte zur endothelabhängigen Relaxation durch diese und andere Verbindungen siehe Lit. [11, 12]). Die früh gemachte Entdeckung, daß das Calcium-Ionophor A23187 eine sehr starke endothelabhängige relaxierende Wirkung auf alle untersuchten Gefäße hatte, wies auf eine zentrale Rolle von Calcium bei der Freisetzung oder Synthese des EDRF durch endothelabhängige relaxierende Substanzen hin.^[13]

Man erkannte bei diesen frühen Arbeiten schnell, daß – abhängig von der jeweiligen Substanz – die endothelabhängige Relaxation auf bestimmte Spezies beschränkt war oder sogar auf bestimmte Arterien einer gegebenen Spezies. Während z.B. ACh über diesen Mechanismus nahezu alle systemischen Arterien aller untersuchten Säugetiere relaxierte, führte Histamin – ein anderer starker Vasodilatator – zu einer endothelabhängigen Relaxation von Rattenarterien,^[14] aber nicht von Kaninchenarterien.^[15] Ein anderes Beispiel war Bradykinin, das eine endothelabhängige Relaxation von isolierten Arterien des Menschen und des Hundes bewirkte, aber nicht von denen des Hasen und der Katze.^[5] Man fand heraus, daß Noradrenalin die endothelabhängige Relaxation von isolierten Koronararterien des Hundes über α_2 -Adrenozeptoren der Endothelzellen aktivierte, daß aber die systemischen Arterien des Hundes nicht relaxiert wurden.^[16] Serotonin vermittelte beispielsweise die endothelabhängige Relaxation von Koronararterien, aber nicht von systemischen Arterien des Hundes.^[16, 17]

Zu den Bedingungen und Substanzen, welche die endothelabhängige Relaxation von Arterien bei den frühen Experimenten mit Organkammern inhibierten, gehörten Anoxie und einige Verbindungen, die als Inhibitoren des Metabolismus der Arachidonsäure (AA) bekannt waren.^[4, 18] Es war schon bekannt, daß in bestimmten glatten Muskelzellen eine positive Korrelation zwischen der Zunahme von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und einer Re-

laxation bestand^[19–22] und daß die Guanylat-Cyclase (G-Cyclase) von Hydroperoxiden der AA deutlich stimuliert wurde.^[23, 24] Ich spekulierte daher, daß 1) EDRF entweder ein kurzlebiges Hydroperoxid oder ein freies Radikal war, das als Zwischenprodukt bei der Oxidation der freigesetzten AA im Lipoxygenase-Weg entstand, und daß 2) EDRF die G-Cyclase der glatten Gefäßmuskulatur stimulierte, was zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration führte, wodurch dann auf unbekannte Weise eine Relaxation herbeigeführt wurde.^[18] Es stellte sich heraus, daß diese frühe Spekulation über die Natur von EDRF nicht zutraf, daß aber die Vermutung über die Rolle von cGMP richtig war.

Cyclisches GMP als Vermittler für EDRF und Nitrovasodilatatoren

Die Spekulation, daß der durch ACh freigesetzte EDRF einen Anstieg der cGMP-Konzentration stimulierte, erwies sich bald in einer Vielzahl unabhängiger Studien als richtig, z.B. denen von Rapoport und Murad,^[25] die Rattenaorta benutzten, Diamond und Chu^[26] sowie Furchtgott et al.^[27] (Kaninchenaorta), Holzmann^[28] (Koronararterien aus Rind) und Ignarro et al.^[29] (Lungenarterien aus Rind). Sie alle wiesen nach, daß ein Anstieg der cGMP-Konzentration mit der ACh-induzierten Relaxation von Blutgefäßen einherging. Dies stimmte mit der Vermutung überein, daß der Anstieg der cGMP-Konzentration im Muskel eine ursächliche Rolle für die Relaxation spielt (Abbildung 5). Die endothelabhängige Relaxation von Rattenaorta durch A23187 und Histamin^[25] und der Kaninchenaorta durch A23187^[27] war auch von einem Anstieg der cGMP-Konzentration begleitet.

Man muß an dieser Stelle betonen, daß Murad und seine Mitarbeiter^[21, 22] schon früher berichtet hatten, daß Stickstoffmonoxid (NO) ein sehr starkes Stimulans der G-Cyclase war, und sie hatten vorgeschlagen, daß verschiedene Verbindungen (z.B. Glyceryltrinitrat, Nitroprussid, Azid), von denen

man wußte, daß sie die cGMP-Konzentration erhöhten und bestimmte nichtvaskuläre Muskelzellen relaxierten, diese Wirkung über die Bildung von NO als proximalem Aktivator der G-Cyclase entfalteten. Ignarro und seine Mitarbeiter^[30] hatten auch gefunden, daß die Relaxation eines Gefäßpräparates (Koronararterie aus Rind) durch NO oder Nitroprussid mit einem Anstieg der cGMP-Konzentration verbunden war. Trotz all dieser frühen Erkenntnisse über NO vermutete keiner der Forscher, die einige Jahre später zeigten, daß die endothelabhängige Relaxation von Arterien in Organkammer-Experimenten auch mit einem Anstieg der cGMP-Konzentration korrelierte,^[30] daß EDRF das freie Radikal NO sein könnte. Entscheidende Ergebnisse, die diesen neuen Vorschlag unterstützen sollten, mußten erst noch erarbeitet werden.

Weitere Untersuchungen zum EDRF, einschließlich solcher mit der Perfusions-Bioassay-Methode

Hämoglobin und Methylenblau als Inhibitoren

Hämoglobin (Hb) und Methylenblau (MB) wurden häufig zur Hemmung der endothelabhängigen Relaxation eingesetzt. Murad et al. hatten gefunden, daß Hb die Guanylat-Cyclase in Zellextrakten inhibierte.^[21] Forscher der Universität Glasgow^[31] hatten gezeigt, daß die Relaxation von Streifen aus dem Retraktionsmuskel des Penis von Stieren (bovine retractor penis muscle, BRP) als Antwort auf nichtadrenerge, nichtcholinerge (NANC) Nervenstimulation oder auf säureaktivierte Extrakte dieses Gewebes von Hb inhibiert wurde. Gruetter et al.^[32] hatten berichtet, daß Methämaglobin (MetHb) den NO-induzierten Anstieg der vaskulären cGMP-Konzentration beeinflußte. Wir begannen im Jahr 1983 in unserem Labor mit Hb zu arbeiten. Zu dieser Zeit kam William Martin, der die Eigenschaften von Extrakten aus BRP-Muskel als Student an der Glasgower Universität untersucht hatte,^[33, 34] als Postdoktorand in mein Labor (siehe unten).

Schnell wurde klar, daß Hb ein äußerst starker und schnell wirksamer Inhibitor der endothelabhängigen Relaxation und des damit verbundenen Anstiegs der cGMP-Konzentration war, die durch ACh, A23187 und andere Verbindungen in der Ratten- und Kaninchenaorta induziert wurden.^[27, 35, 36] Myoglobin war ebenso wirksam wie Hb, aber MetHb inhibierte nur sehr schwach^[37] (Abbildung 6).

Das Ausmaß der Verstärkung der arteriellen Kontraktion, die zuvor durch Vasokonstriktoren wie Phenylephrin ausgelöst worden war, durch Hb lieferte uns ein Maß für die relaxierende Wirkung von basal freigesetztem EDRF.^[36] Seine Wirkung schien bei Aorten-

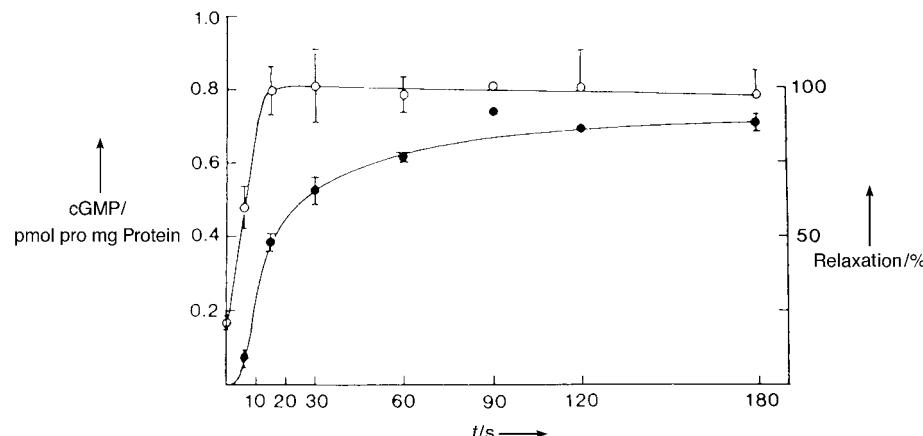


Abbildung 5. Zeitlicher Verlauf der Änderungen der Konzentration von cyclischem GMP (cGMP, ○) und der Relaxation (●) von endothelhaltigen Ringen aus der Brustaorta von Kaninchen nach Zugabe von ACh. Noradrenalin (0.1 µM) wurde zuerst zugegeben, um eine anhaltende Kontraktion hervorzurufen. Dann folgte die Zugabe von ACh (1 µM), und nach der gewünschten Expositionszeit wurde das Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Konzentration von cyclischem AMP änderte sich während der endothelabhängigen Relaxation nicht signifikant (nicht gezeigt). (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [27].)

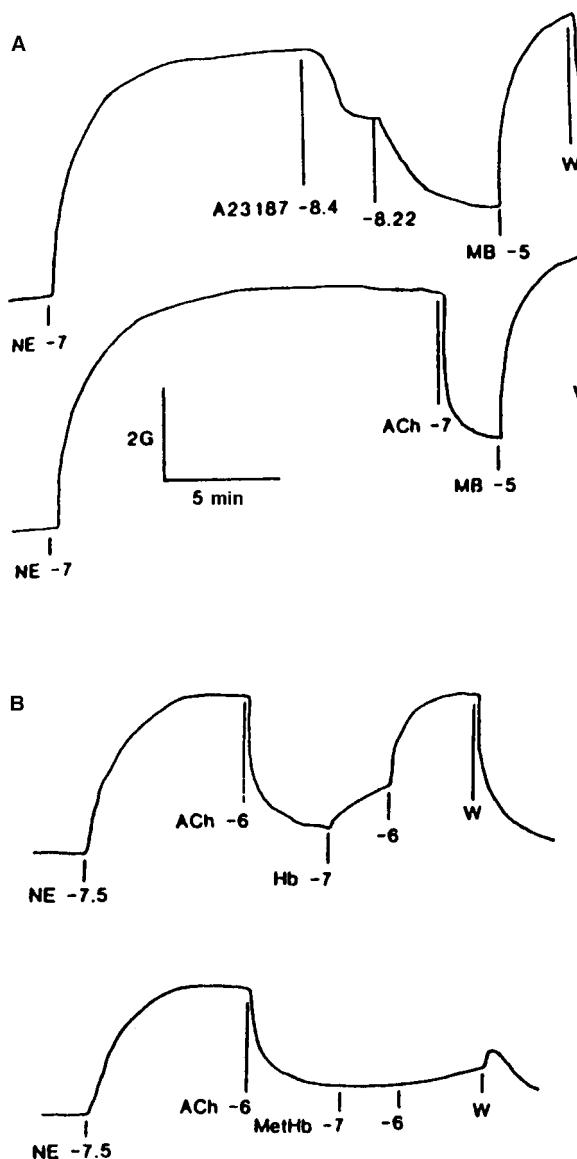


Abbildung 6. Beispiele für die Hemmung der endothelabhängigen Relaxation von Ringen aus Kaninchenaorta durch Methylenblau (MB) und Hämoglobin (Hb). A: Zugabe von MB (10 µM) hemmt die durch ACh (oben) oder das Calcium-Ionophor A23187 hervorgerufene Relaxation schnell und vollständig (unten). B: Zugabe von Hb (1 µM) hemmt die von ACh verursachte Relaxation schnell und fast vollständig (oben); die Zugabe von Methämoglobin (MetHb) in gleicher Konzentration hemmt die ACh-induzierte Relaxation allerdings nur in sehr geringem Ausmaß (unten).

ringen aus Ratte wesentlich stärker zu sein als bei Aortenringen aus Kaninchen. Nach Zugabe von Phosphodiesterase-Inhibitoren (z. B. Zaprinast oder IBMX) relaxierten die Ringe aus beiden Spezies, was mit einem Anstieg der cGMP-Konzentration verbunden war.^[38] Die Reaktionen auf die Inhibition dieser Enzyme, die cGMP zu GMP hydrolysierten, waren bei Rattenorta ausgeprägter als bei Kaninchenaorta. Dies wies auf eine höhere basale EDRF-Konzentration und eine stärkere basale Stimulation der G-Cyclase in Rattenorta hin. Die durch Phosphodiesterase-Inhibitoren verursachte Relaxation von endothelhaltigen Ringen aus beiden Spezies konnte vollständig von Hb blockiert werden.

Ursprünglich wurde vermutet, daß Hb die Relaxation und den Anstieg der cGMP-Konzentration inhibiert, indem es EDRF während der Diffusion aus Endothelzellen bindet und so verhindert, daß EDRF die G-Cyclase in Muskelzellen erreicht und aktiviert.^[35] Nach der Identifizierung des EDRF als NO wurde jedoch klar, daß das Abfangen von EDRF durch Hb unter normalen aeroben Bedingungen auf eine sehr schnelle Reaktion von HbO₂ mit NO zu NO₃⁻ und MetHb zurückzuführen war, wie zuerst Doyle und Hoekstra^[39] berichtet hatten.

Gruetter et al.^[32] hatten erstmals nachgewiesen, daß MB die Stimulation der G-Cyclase durch Nitrovasodilatatoren in zellfreien Systemen inhibiert und die durch diese Verbindungen ausgelöste Relaxation und den Anstieg der cGMP-Konzentration in glatten Gefäßmuskelzellen hemmt. Später fand man, daß MB sowohl die endothelabhängige Relaxation als auch den damit einhergehenden Anstieg der cGMP-Konzentration durch ACh in Rinderarterien^[28, 29] und durch ACh und A23187 in Kaninchenaorta^[27, 35] inhibiert. Holzman^[28] und Ignarro et al.^[29] schlossen daraus, daß die inhibierte Relaxation aus der Hemmung der G-Cyclase durch MB resultierte. Meine Mitarbeiter und ich glaubten zwar auch, daß eine derartige Enzymhemmung für die Inhibition durch MB während der Langzeit-Exposition von Kaninchenaorta verantwortlich war. Wir schlugen aber vor, daß die schnelle endothelabhängige Relaxation sofort nach der Zugabe von MB zur Organkammer (siehe Abbildung 6) aus einer direkteren Inaktivierung von EDRF durch MB resultierte.^[27, 35] Jetzt glaubt man, daß diese direktere Inaktivierung durch Superoxid-Anionen verursacht wird, die durch Reaktionen von MB im Gewebe gebildet werden.^[40]

Ergebnisse aus Untersuchungen mit der Perfusion-Bioassay-Methode

Um die Eigenschaften des EDRF direkter zu untersuchen, als dies mit Organkammer-Experimenten möglich war, wurden Perfusion-Bioassay-Methoden entwickelt. Diese Methoden, obwohl sie nicht in meinem Labor entwickelt wurden, sind insofern hier von Interesse, als sie viel zur Identifizierung des EDRF beigetragen haben. Bei dieser Versuchsanordnung befinden sich Endothelzellen am Anfang der Perfusionsskaskade (oder Superfusionsskaskade), und ein vom Endothel befreites Arterienpräparat (gewöhnlich ein Ring oder ein oder mehrere Streifen), deren Kontraktionszustand überwacht wird, ist diesbezüglich dahinter angebracht, um EDRF in der Perfusionssflüssigkeit bestimmen zu können (Bioassay). Bei manchen Versuchsanordnungen waren die Endothelzellen native Zellen auf der luminalen Oberfläche einer perfundierten Arterie,^[41-44] bei anderen waren es Kulturzellen (gewöhnlich aus Rinder- oder Schweinaorta) auf der Oberfläche von Trägerkügelchen, die sich in einer perfundierten Säule befanden.^[45, 46]

Mit diesen Perfusion-Bioassay-Methoden konnte eindeutig nachgewiesen werden, ob ein Inhibitor der endothelabhängigen Relaxation die Synthese/Abgabe des EDRF beeinflußte oder ihn nach der Freisetzung inaktivierte. Durch Veränderung der Passagezeit zwischen Endothelzellen und

Bioassay-Präparat war es zusätzlich möglich, die Abbaugeschwindigkeit des EDRF zu untersuchen. Überraschenderweise lag die geschätzte Halbwertszeit des EDRF zwischen niedrigen Werten von nur 4–6 s und hohen Werten von 50 s, je nach Art der biologischen Präparate und Versuchsbedingungen. Diese unterschiedlichen Werte ließen sich erklären, als man herausfand, daß Superoxid-Dismutase (SOD) den EDRF aus arteriellen Endothelzellen oder aus kultivierten Endothelzellen auf Mikroträgerkügelchen deutlich stabilisierte.^[47] Somit war klar, daß das Superoxid-Anion (O_2^-) den EDRF sehr schnell inaktivierte. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten für EDRF aus verschiedenen Laboratorien konnten größtenteils den unterschiedlichen O_2^- -Konzentrationen in der Perfusionsflüssigkeit zugeschrieben werden, die die Endothelzellen unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen verließ. Moncada et al.^[48] wiesen mit ihrem Perfusions-Bioassay-Verfahren nach, daß die Inhibition der endothelabhängigen Relaxation durch bestimmte reduzierende Agentien (z.B. Hydrochinon, Phenidon und Pyrogallol) prinzipiell aus der Inaktivierung des EDRF durch O_2^- resultierte, das in einer Ein-Elektronen-Oxidation des Reduktionsmittels durch O_2 gebildet worden war.

Die Entwicklung von Perfusions-Bioassay-Methoden führte auch zu der wichtigen Entdeckung, daß verstärkter Perfusionsfluß zu erhöhtem Scherstress der Endothelzellen der perfundierten Arterien führt und in der Folge zu einer erhöhten Geschwindigkeit der EDRF-Freisetzung.^[49, 50] Erhöhter Fluß durch Arterien führte sowohl *in situ*^[49, 51, 52] als auch *in vitro* zu Vasodilatation, die nicht durch Inhibitoren der Cyclooxygenase blockiert werden konnte, aber durch die Entfernung des Endothels aufgehoben wurde. Die Erkenntnis, daß erhöhter Scherstress mit vermehrter Freisetzung von EDRF korrelierte, war insofern von Bedeutung, als somit belegt war, daß EDRF eine physiologische Rolle bei der Kontrolle des regionären Blutflusses und der Regulation des Blutdrucks spielte.

Ergebnisse, die zur Identifizierung von EDRF als NO führten

Während Billy Martin in meinem Labor arbeitete (1983–1985), begann ich mich für die Arbeit zu interessieren, die er und andere im Labor von John Gillespie in Glasgow durchgeführt hatten. Sie hatten versucht, den Neurotransmitter zu identifizieren, der von nichtadrenergen, nichtcholinergen (NANC) Nerven freigesetzt wurde und zur Relaxation des BRP-Muskels und anderer Präparate der glatten Muskulatur führte. Ich erfuhr, daß sowohl die durch Stimulation von NANC-Nerven verursachte Relaxation als auch die durch einen von Martin hergestellten, teilweise gereinigten Extrakt aus BRP-Muskel (als BRP-hemmender Faktor, BRPIF, bezeichnet) verursachte Relaxation von Hb gehemmt wurden^[31] und beide mit einem Anstieg der cGMP-Konzentration im Muskel einhergingen.^[53] Ein wichtiger Aspekt der Arbeit Martins mit BRPIF-Extrakt war, daß dieser vor dem Test kurz angesäuert werden mußte, um eine relaxierende Wirkung auf Präparate der glatten Muskulatur aus dem Retraktionsmuskel des Penis und auf Arterien in Organbädern auszuüben.^[33]

Einmal durch Ansäuern aktiviert, bewirkte der BRPIF-Extrakt eine deutliche Relaxation der Muskelpräparate, die aber vorübergehend war und nur wenige Minuten anhielt.

Im Rahmen eines Symposiums in Rochester, Minnesota, im Juli 1986 berichtete ich^[54] über die verblüffende Ähnlichkeit zwischen der transienten Relaxation durch Martins säureaktivierte BRPIF-Extrakte und der transienten Relaxation der Kaninchenaorta durch angesäuerte Natriumnitrit-Lösungen ($NaNO_2$). Daß angesäuerte, nicht aber neutrale $NaNO_2$ -Lösungen starke transiente Relaxationen der Kaninchenaorta auslösten, war 15 Jahre vorher in meinem Labor erkannt worden. Damals stellte ein neuer Postdoktorand, der kumulative Dosis-Wirkungs-Beziehungen für $NaNO_2$ untersuchen sollte, seine Standardlösungen dieses Salzes zufällig mit angesäuerten Verdünnungslösung her (diese wurde in meinem Labor für die Herstellung stabilisierter Catecholamin-Standardslösungen benutzt) statt mit neutraler Verdünnungslösung (Abbildung 7). Mir wurde damals klar, daß aus durch Ansäuern von $NaNO_2$ -Lösung entstandener HNO_2 ($pK_a = 3.2$)

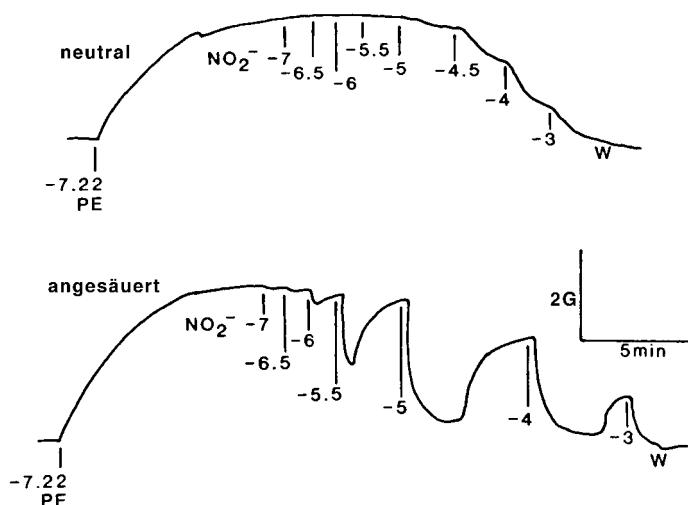


Abbildung 7. Vergleich der relaxierenden Wirkung kumulativer Gaben von neutralen und angesäuerten Natriumnitrit-Lösungen auf Ringe aus Kaninchenaorta. Bei diesem typischen Experiment wurden zwei Ringe aus derselben Aorta nach Kontraktion mit Phenylephrin (PE) mit $NaNO_2$ -Lösung versetzt, die mit neutraler oder mit angesäuertem physiologischer Kochsalzlösung (11 mm HCl) verdünnt worden war. Die angegebenen Konzentrationen sind die endgültigen Nitrit-Konzentrationen (Logarithmus der molaren Konzentration) in den Organkammern. Man beachte die starken transienten Relaxationen im Fall der angesäuerten Nitritlösungen. Die Ringe in diesem Experiment enthielten keine Endothelzellen mehr, aber die Ergebnisse waren ähnlich, wenn Endothelzellen vorhanden waren. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [54].)

sofort NO und NO_2 in niedrigen Konzentrationen als Resultat einer reversiblen Dismutation gebildet wurden [Gl. (1) und (2)]. Wurde jedoch eine angesäuerte Nitritlösung zu der in



unseren Organkammern benutzt, mit Sauerstoff gesättigten und gut gepufferten physiologischen Salzlösung gegeben, so wurde vorhandenes NO sehr schnell abgebaut. Dies erklärte

also die nur transiente Relaxation der Aortenringe bei Zusatz einer angesäuerten Nitritlösung.

Im Frühjahr 1986 erinnerte ich mich an die viel früheren, zufälligen Ergebnisse der Versuche mit angesäuerten Natriumnitrit-Lösungen und erwog die Möglichkeit, daß es sich bei Martins säureaktivierbarem BRPIF um anorganisches Nitrit handelte. Ein erstes, ermutigendes Ergebnis war, daß die Abhängigkeit der transienten Relaxation der Kaninchenaorta als Funktion des pH-Wertes der zugesetzten NaNO_2 -Lösung derjenigen ähnelte, die Martin für den Zusatz seines Extraktes zu einem BPP-Präparat erhalten hatte: maximale transiente Relaxation bei pH-Werten von 2 oder niedriger und annähernd halbmaximale transiente Relaxation bei einem pH-Wert von 3.

Als ich 1986 begonnen hatte, bei Experimenten mit Kaninchenaorta angesäuerte Nitritlösungen als NO-Quelle zu verwenden, erfuhr ich von den neuen Ergebnissen von Gryglewsky, Palmer und Moncada^[46] sowie von Rubanyi und Vanhoutte^[47], die gezeigt hatten, daß EDRF sehr schnell vom Superoxid-Anion (O_2^-) inaktiviert wird und daß Superoxid-Dismutase vor dieser Inaktivierung schützt. Ich vermutete, daß das freie Radikal NO sehr schnell mit dem freien Radikal O_2^- zu inaktivem NO_3^- reagierte, und erwog die Möglichkeit, daß es sich bei EDRF um NO handelte. (Später wurde von Beckman et al.^[55] gezeigt, daß das unmittelbare Produkt der Reaktion zwischen NO und O_2^- Peroxynitrit (ONOO^-) ist; es wird zu HONO protoniert ($\text{pK}_a = 6.8$), das bei physiologischen pH-Werten innerhalb weniger Sekunden zerfällt).

Meine Spekulation vom Frühjahr 1986 über die Identität von EDRF und NO führten zu einer Vielzahl von Experimenten mit Kaninchenaorta, die wir zusammen mit D. Jothianandan und M. T. Khan durchführten. Wir verglichen die Charakteristika der Relaxation durch NO (in Form angesäuerten NaNO_2 -Lösungen) mit denen der durch EDRF (freigesetzt nach ACh-Zugabe) hervorgerufenen Relaxation. Wir fanden, daß die Relaxation durch NO und durch EDRF sehr stark von Hb, MB und Superoxid-Produzenten (z.B. Hydrochinon, Phenidon, Eisen(II)-sulfat) inhibiert und durch SOD verstärkt wurde, während Superoxid den Grad der Relaxation limitierte (Abbildung 8). Es war bereits bekannt, daß die Relaxation von glatter Muskulatur durch NO – ebenso wie die durch EDRF – von einem Anstieg der cGMP-Konzentration begleitet war. Da sich die Eigenschaften von NO und EDRF so ähnlich waren, hatte ich keine Bedenken, im Juli 1986 auf dem erwähnten Symposium vorzuschlagen, daß EDRF und NO identisch sind.^[54] (Kurz nach diesem Symposium begannen wir damit, NO-Gas anstelle von angesäuerten Nitritlösungen als NO-Quelle in unseren Experimenten zu benutzen, und erhielten identische Ergebnisse (Abbildung 9)). Ich schlug außerdem vor, daß es sich beim säureaktivierbaren hemmenden Faktor in den BPP-Extrakten von Martin und Gillespie um anorganisches Nitrit

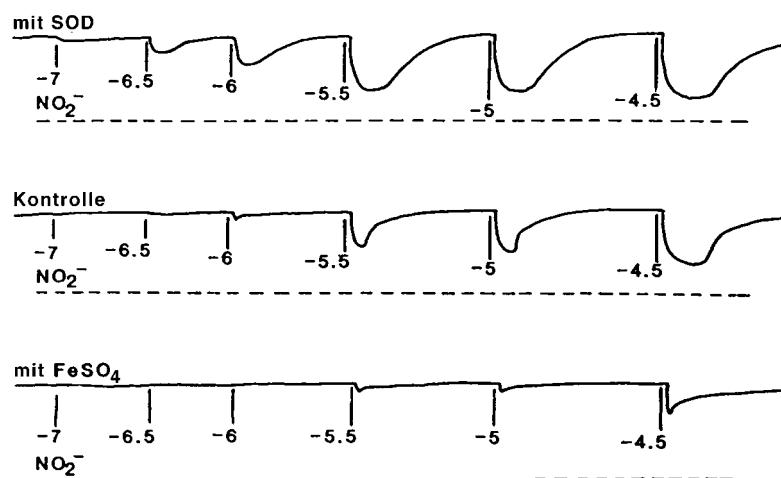


Abbildung 8. Transiente Relaxationen von endothelfreien Ringen aus Kaninchenaorta durch Stickstoffmonoxid in angesäuerten NaNO_2 -Lösungen (pH 2), Verstärkung der Relaxation durch Superoxid-Dismutase (SOD; 25 U mL^{-1}) und Hemmung durch FeSO_4 ($3 \times 10^{-4} \text{ M}$), in dessen Gegenwart verstärkt Superoxid gebildet wird. Drei Ringe aus derselben Aorta wurden durch Phenylephrin über den basalen Tonus (gestrichelte Linie) hinaus kontrahiert. SOD und FeSO_4 wurden etwa 5 min vor der ersten Zugabe der angesäuerten Nitritlösung zugesetzt. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [54].)

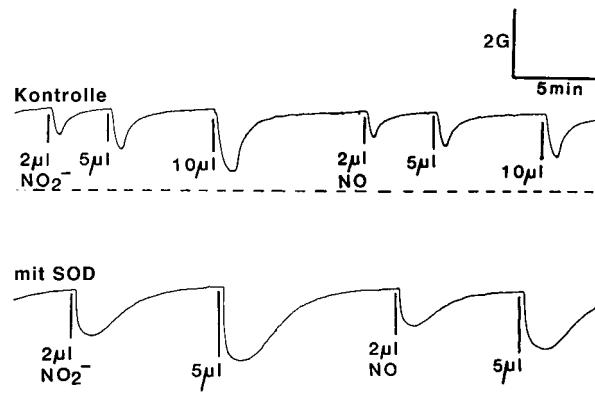


Abbildung 9. Ähnlichkeiten zwischen der relaxierenden Wirkung einer angesäuerten Natriumnitrit-Lösung (2.5 mM, pH 2.0) und einer Lösung von gasförmigem Stickstoffmonoxid (15 μM) auf Ringe aus Kaninchenaorta in Abwesenheit und Anwesenheit (30 U mL^{-1}) von Superoxid-Dismutase. (Für die Herstellung der NO-Lösungen siehe Lit. [60]). Die Zugaben erfolgten zu jeweils 20 mL Krebs-Lösung in den Organkammern, so daß der Zusatz von 2 μl NO-Lösung eine Anfangskonzentration von 1.5 nM ergab. Beide Ringe waren mit Phenylephrin vorkontrahiert worden. Die Verstärkung der transienten Relaxationen, die von NO in der angesäuerten Nitritlösung und in der NO-Lösung induziert wurden, durch SOD bewies, daß eine beträchtliche endogene Produktion von Superoxid-Anion (O_2^-) in den Organkammern stattfand.

handelte und daß zu erwägen war, ob der Neurotransmitter aus NANC-Nerven ebenfalls NO war.^[54]

Auf demselben Symposium machte Ignarro, auf der Grundlage von Untersuchungen an isolierten Lungenarterien des Rindes in seinem Labor, unabhängig von mir den gleichen Vorschlag bezüglich der Identität von EDRF und NO.^[56] (Unglücklicherweise verzögerte sich die Publikation der auf diesem Symposium präsentierten Vorträge bis 1988). Bald nach dem Symposium von 1986 verwendeten drei Laboratorien Perfusions-Bioassays, um die biologischen und chemischen Eigenschaften von EDRF und NO detaillierter zu

vergleichen. Ignarro und Mitarbeiter benutzten Lungengefäße aus Rindern,^[57] Moncada und Mitarbeiter benutzten kultivierte Endothelzellen aus Schweineaorta,^[58] und Khan und ich arbeiteten mit Kaninchenaorta^[44] als EDRF-Quelle. Alle Arbeitsgruppen fanden heraus, daß EDRF und NO, die zu Beginn der Perfusionskaskade freigesetzt bzw. infundiert wurden, ähnliche Abbaugeschwindigkeiten aufwiesen, ähnlich auf Inhibitoren wie Hb und Superoxid-Produzenten reagierten sowie auf ähnliche Weise von SOD stabilisiert wurden. Zusätzlich wurden in Ignarros Labor spektroskopische Beweise dafür erhalten, daß das Produkt der Reaktion von freigesetztem EDRF und Hb identisch mit dem Produkt der Reaktion von NO und Hb war. Moncadas Arbeitsgruppe zeigte, daß die NO-Menge, die von Bradykinin freigesetzt wurde (mit einem Chemolumineszenz-Assay bestimmt), für die Relaxation des im Bioassay verwendeten Streifens durch EDRF, der durch das Peptid freigesetzt wurde, ausreichte. Ein Jahr später machten Moncada und seine Mitarbeiter die bedeutende Entdeckung, daß das endotheliale NO aus einem Stickstoffatom der Guanidiniumgruppe von L-Arginin stammte und daß das für diese Reaktion erforderliche Enzym eine Oxygenase war (die heute als endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, eNOS, bezeichnet wird).^[59] Mit diesen Ergebnissen begann die weltweite Forschung zur Rolle von NO in der Gefäßphysiologie und der Pathophysiologie.

Trotz der Beweise für die Identität von EDRF und NO stimmten einige Ergebnisse aus verschiedenen Laboratorien in den späten achtziger Jahren mit dieser Schlußfolgerung nicht vollständig überein.^[60] Trotzdem herrscht heute allgemein Einigkeit darüber, daß EDRF entweder NO ist oder ein Addukt, das leicht NO freisetzt, oder möglicherweise ein Gemisch aus NO und einem NO-Addukt. Das schließt nicht die Möglichkeit aus, daß an der endothelabhängigen Relaxation einiger Blutgefäße auch ein Stickstoffmonoxid-freier, aus dem Endothel stammender hyperpolarisierender Faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF) zusammen mit EDRF beteiligt ist.^[61]

Die in diesem Aufsatz beschriebenen Forschungsarbeiten im Labor des Autors wurden vom National Heart, Lung, and Blood Institute der National Institutes of Health gefördert.

Eingegangen am 11. Februar 1999 [A 324]

Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Wien

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1870–1880

Stichwörter: Enzyme • Neurotransmitter • Nobel-Aufsätze
• Signaltransduktion • Stickstoffmonoxid

- [1] „Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs“: R. F. Furchtgott, S. Bhadrakom, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1953**, *108*, 129–143.
- [2] „Dibenamine blockade in strips of rabbit aorta and its use in differentiating receptors“: R. F. Furchtgott, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1954**, *111*, 265–284.
- [3] „The discovery of endothelium-dependent relaxation“: R. F. Furchtgott, *Circulation Suppl.* **1993**, *87* (V), V3–V8.
- [4] „The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by ACh“: R. F. Furchtgott, J. V. Zawadzki, *Nature* **1980**, *288*, 373–376.

- [5] „The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin“: P. D. Cherry, R. F. Furchtgott, J. V. Zawadzki, D. Jothianandan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 2106–2110.
- [6] „Dilator and constrictor effects of acetylcholine on isolated rabbit aortic chains“: R. W. Jelliffe, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1962**, *135*, 349–353.
- [7] „Inhibition by acetylcholine of adrenergic neurotransmission in vascular smooth muscle“: P. M. Vanhoutte, *Circ. Res.* **1974**, *34*, 317–326.
- [8] „The action of vasodilating drugs on isolated basilar, coronary and mesenteric arteries of the dog“: N. Toda, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1974**, *193*, 376–384.
- [9] „Inhibition of adrenergic neurotransmission by parasympathomimetics in the rabbit ear artery“: O. S. Steinsland, R. F. Furchtgott, S. M. Kirpekar, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1973**, *184*, 346–356.
- [10] „Endothelium-derived relaxing factor: some old and new findings“: R. F. Furchtgott, D. Jothianandan, A. D. Freay in *Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System* (Hrsg.: S. Moncada, E. A. Higgs), Elsevier, Amsterdam, **1990**, S. 5–17.
- [11] „Endothelium-derived relaxing and contracting factors“: R. F. Furchtgott, P. M. Vanhoutte, *FASEB J.* **1989**, *3*, 2007–2018.
- [12] „The 1989 Ulf von Euler Lecture: Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor“: R. F. Furchtgott, *Acta Physiol. Scand.* **1990**, *139*, 257–270.
- [13] „The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by ACh and some other vasodilators“: R. F. Furchtgott, *Trends Pharmacol. Sci.* **1981**, *2*, 173–176.
- [14] „Role of endothelium in the vasodilator responses of rat thoracic aorta to histamine“: J. Van de Voorde, I. Leusen, *Eur. J. Pharmacol.* **1983**, *87*, 113–120.
- [15] „Role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle“: R. F. Furchtgott, *Circ. Res.* **1983**, *53*, 557–573.
- [16] „Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin“: T. M. Cocks, J. A. Angus, *Nature* **1983**, *305*, 627–630.
- [17] „5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries“: R. A. Cohen, J. T. Shepherd, P. M. Vanhoutte, *Am. J. Physiol.* **1983**, *245*, H1077–H1080.
- [18] „Role of endothelium in the vasodilator response to ACh“: R. F. Furchtgott, J. V. Zawadzki, P. D. Cherry in *Vasodilatation* (Hrsg.: P. Vanhoutte, I. Leusen), Raven Press, New York, **1981**, S. 49–66.
- [19] „Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle“: S. Katsuki, F. Murad, *Mol. Pharmacol.* **1977**, *13*, 330–341.
- [20] „Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets“: E. Böhme, H. Graf, G. Schultz, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1978**, *9*, 131–143.
- [21] Übersichtsartikel: „Guanylate cyclase activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin“: F. Murad, C. K. Mittal, W. P. Arnold, S. Katsuki, H. Kimura, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1978**, *9*, 145–158.
- [22] Übersichtsartikel: „Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions of cyclic GMP“: F. Murad, W. P. Arnold, C. K. Mittal, J. M. Braughler, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1979**, *11*, 175–204.
- [23] „Stimulation of platelet guanylate cyclase by unsaturated fatty acid peroxides“: H. Hidaka, T. Asano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 3657–3661.
- [24] „Redox modulation of splenic cell soluble guanylate cyclase activity: Activation by hydrophilic and hydrophobic antioxidants represented by ascorbic and dehydroascorbic acids, fatty acid hydroperoxides, and prostaglandin endoperoxides“: N. D. Goldberg, G. Graff, M. K. Haddox, J. H. Stephenson, D. B. Glass, M. E. Moser, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1978**, *9*, 101–130.
- [25] „Agonist-induced endothelium-dependent relaxations in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP“: R. M. Rapoport, F. Murad, *Circ. Res.* **1983**, *52*, 352–357.
- [26] „Possible role for cyclic GMP in endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta by ACh. Comparison with nitroglycerin“: J. Diamond, E. B. Chu, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1983**, *41*, 369–381.

- [27] „Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries“: R. F. Furchtgott, P. D. Cherry, J. V. Zawadzki, D. Jothianandan, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1984**, 6 (Supplement 2), S336–S344.
- [28] „Endothelium-induced relaxation by ACh associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips“: S. Holzmann, *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1982**, 8, 409–419.
- [29] „Association between cyclic GMP accumulation and ACh-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery“: L. J. Ignarro, T. M. Burke, K. S. Wood, M. S. Wolin, P. J. Kadowitz, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, 228, 682–690.
- [30] „Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and carcinogenic nitrosoamine“: C. A. Gruetter, B. K. Barry, D. B. McNamara, D. Y. Gruetter, P. J. Kadowitz, L. J. Ignarro, *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1979**, 5, 211–214.
- [31] „Oxyhaemoglobin blocks nonadrenergic inhibition in the bovine retractor penis muscle“: A. Bowman, J. S. Gillespie, D. Pollock, *Eur. J. Pharmacol.* **1982**, 85, 221–224.
- [32] „Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glycetyl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin“: C. A. Gruetter, D. Y. Gruetter, J. E. Lyon, P. J. Kadowitz, E. F. Ignarro, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, 219, 181–186.
- [33] „Some physical and chemical properties of the smooth muscle inhibitory factor in extracts of the bovine retractor penis muscle“: J. S. Gillespie, J. C. Hunter, W. Martin, *J. Physiol.* **1981**, 315, 111–125.
- [34] „Actions on the cardiovascular system of an inhibitory material extracted from the bovine retractor penis“: A. Bowman, J. S. Gillespie, W. Martin, *Br. J. Pharmacol.* **1981**, 72, 365–372.
- [35] „Selective blockade of endothelium-dependent and glycetyl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta“: W. Martin, G. M. Villani, D. Jothianandan, R. F. Furchtgott, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, 232, 708–716.
- [36] „Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor (EDRF)“: W. Martin, R. F. Furchtgott, G. M. Villani, D. Jothianandan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, 237, 529–538.
- [37] „Blockade of endothelium-dependent and glycetyl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta by certain ferrous hemoproteins“: W. Martin, G. M. Villani, D. Jothianandan, R. F. Furchtgott, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, 233, 679–685.
- [38] „Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor (EDRF)“: W. Martin, R. F. Furchtgott, G. M. Villani, D. Jothianandan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, 237, 539–547.
- [39] „Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins“: M. P. Doyle, J. W. Hoekstra, *J. Inorg. Biochem.* **1981**, 14, 351–358.
- [40] Siehe: „Methylene blue inhibits vasodilation of skeletal muscle arterioles to ACh and nitric oxide via the extracellular generation of superoxide anion“: M. S. Wolin, P. D. Cherry, J. M. Rodenburg, E. J. Messina, G. Kaley, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, 254, 872–876.
- [41] „Species-dependent differences in the value of endothelium-derived vascular relaxing factor“: U. Förstermann, G. Trogisch, R. Busse, *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, 106, 639–643.
- [42] „The nature of the endothelium-derived vascular relaxant factor“: T. M. Griffith, D. H. Edwards, A. C. Newby, M. J. Lewis, A. C. Newby, A. H. Henderson, *Nature* **1984**, 305, 645–647.
- [43] „Bioassay of endothelium-derived relaxing factor“: G. M. Rubanyi, R. R. Lorenz, P. M. Vanhoutte, *Am. J. Physiol.* **1985**, 249, H1077–H1080.
- [44] „Additional evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide“: M. T. Khan, R. F. Furchtgott in *Pharmacology* (Hrsg.: M. J. Rand, C. Raper), Elsevier, Amsterdam, **1987**, S. 341–344.
- [45] „Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture“: T. M. Cocks, J. A. Angus, J. H. Campbell, G. R. Campbell, *J. Cell Physiol.* **1985**, 123, 310–320.
- [46] „Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor“: P. J. Gryglewski, R. M. Palmer, S. A. Moncada, *Nature* **1986**, 320, 454–456.
- [47] „Superoxide anions and hyperoxia inactive endothelium-derived relaxing factor“: G. M. Rubanyi, P. M. Vanhoutte, *Am. J. Physiol.* **1986**, 250, H822–H827.
- [48] „Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor“: S. Moncada, R. M. J. Palmer, R. J. Gryglewski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 9164–9168.
- [49] „Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition“: J. Holtz, U. Förstermann, U. Pohl, M. Giesler, E. Bassenge, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1984**, 6, 1161–1169.
- [50] „Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor“: G. M. Rubanyi, J. C. Romero, P. M. Vanhoutte, *Am. J. Physiol.* **1986**, 250, H1145–H1149.
- [51] „Mediation of flow-dependent arterial dilation by endothelial cells“: L. Kaiser, H. V. Sparks, Jr., *Circ. Shock.* **1986**, 18, 109–114.
- [52] „Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo“: U. Pohl, J. Holtz, R. Busse, E. Bassenge *Hypertension*, **1986**, 8, 37–44.
- [53] „Cyclic GMP mediates neurogenic relaxation in the bovine retractor penis muscle“: A. Bowman, A. H. Drummond, *Br. J. Pharmacol.* **1984**, 81, 665–674.
- [54] „Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide“: R. F. Furchtgott in *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, and Endothelium* (Hrsg.: P. M. Vanhoutte), Raven Press, New York, **1988**, S. 401–414.
- [55] „Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide“: J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1620–1624.
- [56] „Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical“: L. J. Ignarro, R. E. Byrns, K. S. Wood in *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, and Endothelium* (Hrsg.: P. M. Vanhoutte), Raven Press, New York, **1988**, S. 427–435.
- [57] „Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide“: L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, G. Chaudhuri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 9265–9269.
- [58] „Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor“: R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada, *Nature* **1987**, 327, 524–526.
- [59] „Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine“: R. M. J. Palmer, D. S. Ashton, S. Moncada, *Nature* **1988**, 333, 664–666.
- [60] Für einen Übersichtsartikel zu diesen scheinbaren oder wirklichen Ungereimtheiten siehe: „Comparison of properties of nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor: Some cautionary findings“: R. F. Furchtgott, M. T. Khan, D. Jothianandan in *Endothelium-derived Relaxing Factors* (Hrsg.: G. M. Rubanyi, P. M. Vanhoutte), Karger, Basel, **1990**, S. 8–21.
- [61] Übersichtsartikel: „Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone“: C. J. Garland, F. Plane, B. K. Kemp, T. M. Cocks, *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, 16, 23–30.
- [62] „The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide“: R. F. Furchtgott, *J. Am. Med. Assoc.* **1996**, 276, 1186–1188.