

Aus der Klinik für Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Effekte der Linolsäurederivate 12,13-Epoxyoctadecensäure(-
methylester) und 12,13-Dihydroxyoctadecensäure(-methylester) auf
das isolierte murine Herz

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marwin Bannehr
aus Adelaide

Datum der Promotion: 01. März 2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Abstract	8
1. Einleitung	9
1.1. Fettsäuren	9
1.1.1. Essenzielle Fettsäuren	9
1.1.2. Biologische Eigenschaften	10
1.2. Linolsäure und Stoffwechselprodukte	11
1.2.1. Arachidonsäure und Stoffwechselprodukte	13
1.2.1.1. Epoxyeicosatriensäure (EET)	13
1.2.2. Epoxyoctadecensäure(-methylester) (EpOME) und Dihydroxyoctadecensäure(-methylester) (DiHOME)	15
1.2.2.1. Struktur und Synthese	15
1.2.2.2. Lösliche Epoxidhydrolase (sEH)	16
1.2.2.3. Elimination	18
1.2.2.4. Biologische Eigenschaften	18
1.3. Langendorff als ex vivo Modell	20
1.3.1. Historische Aspekte	20
1.3.2. Langendorff-Perfusion heute	21
1.3.2.1. Modi der Perfusion	21
1.3.2.2. Perfusionspuffer	22
1.4. Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software	24
2.2. Tiere	26
2.3. Isoliertes perfundiertes Herz nach Langendorff	26
2.3.1. Versuchsaufbau	26
2.3.2. Vorbereitung	27
2.3.3. Präparation	29
2.4. Versuchsablauf	30

2.4.1. EpOME und DiHOME, Ischämie-Reperfusion	31
2.4.2. EpOME und DiHOME, basale kardiale Funktion	31
2.5. Metabolitbestimmungen	32
2.6. Statistische Analyse	32
3. Ergebnisse	34
3.1. Effekte von EpOME und DiHOME im Ischämie-Reperusions-Versuch	34
3.1.1. Linksventrikulärer Druck	35
3.1.2. Koronarfluss	38
3.1.3. Herzfrequenz und Herzrhythmus	39
3.1.4. Zusammenfassung der Teilergebnisse	41
3.2. Effekte von EpOME und DiHOME auf die basale kardiale Funktion	41
3.2.1. Linksventrikulärer Druck, Koronarfluss, Herzfrequenz	42
3.3. Metabolit-Analyse des Perfusats	43
3.4. Zusammenfassung der Hauptergebnisse	45
4. Diskussion	46
4.1. Effekte von EpOME und DiHOME auf die kardiale Funktion	46
4.1.1. Postischämische Wirkung auf die linksventrikuläre Druckentwicklung	47
4.1.2. Postischämische Wirkung auf die Herzfrequenz und den Herzrhythmus	48
4.1.3. Rolle der löslichen Epoxidhydrolase (sEH)	48
4.1.4. Wirkung von EpOME und DiHOME auf die basale kardiale Funktion	49
4.2. Diskussion der Methode und Limitationen	49
4.3. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	50
 Bibliographie	 52
 Abkürzungsverzeichnis	 58
 Abbildungsverzeichnis	 60

Tabellenverzeichnis	61
Eidesstattliche Erklärung	62
Lebenslauf	63
Publikationsliste	65
Danksagung	67

Zusammenfassung

Hintergrund: Kardiale Ischämie-Reperfusionsschäden sind geprägt durch die Bildung und den Einfluss von Mediatoren aus Lipidbestandteilen auf der Basis mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Zu diesen zählt die Linolsäure (LA), die über CytochromP450(CYP)-Epoxygenasen zunächst zu Epoxyoctadecensäure(-methylester) (EpOME) und weiter durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) zu Dihydroxyoctadecensäure(-methylester) (DiHOME) verstoffwechselt wird.

Fragestellung: Ziel der Studie war es die Effekte von EpOME und DiHOME auf die funktionelle kardiale Erholung während der Reperfusion nach 20-minütiger Ischämie sowie auf die basale kardiale Funktion zu untersuchen.

Methoden: Zur Beantwortung der Fragestellung wurden Versuche an isolierten Mäuseherzen in einem Langendorff-System durchgeführt. Herzen von C57Bl6-Mäusen wurden 12,13-EpOME, 12,13-DiHOME oder Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) zum Vergleich ausgesetzt. Linksventrikuläre Druckentwicklung (LVPdevp), Koronarfluss (CF) und ein Elektrokardiogramm (EKG) wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Die Ischämie-Reperfusionsexperimente wurden unter Applikation von sEH-Inhibitor Adamantanylureidododecansäure (AUDA) wiederholt.

Ergebnisse: Durch Gabe von EpOME und DiHOME in einer Konzentration von 100 nM zeigte sich postischämisch eine schlechtere funktionelle Erholung der murinen Herzen mit verminderter linksventrikulärer Druckentwicklung. Die beobachteten Effekte unter EpOME, nicht aber DiHOME, konnten durch sEH-Inhibition abgewendet werden. Es wurde kein Effekt auf die basale kardiale Funktion verzeichnet.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, dass die LA-Derivate EpOME und DiHOME eine relevante Rolle bei kardialer Ischämie spielen. Eine Inhibition der sEH stellt eine neue potenzielle Behandlungsoption zur Verhinderung der nachteiligen DiHOME-Effekte bei akuter kardialer Ischämie dar.

Abstract

Background: Cardiac ischemia/reperfusion injury is associated with the formation and action of lipid mediators derived from polyunsaturated fatty acids. Among them, linoleic acid (LA) is metabolized to epoxyoctadecanoic acid (methyl ester) (EpOME) by cytochrome P450 (CYP) epoxygenases and further to dihydroxyoctadecanoic acid (methyl ester) (DiHOME) by soluble epoxide hydrolase (sEH).

Purpose: This study was to investigate the effects of EpOME and DiHOME on functional cardiac recovery during reperfusion following 20 min of ischemia as well as basal cardiac function.

Methods: This question was addressed using isolated murine hearts in a Langendorff system. Hearts from C57Bl6 mice were exposed to 12,13-EpOME, 12,13-DiHOME, or vehicle (phosphate buffered sodium; PBS). Left ventricular developed pressure (LVdevp), coronary flow (CF), and electrocardiogram (ECG) were continuously recorded. Ischemia reperfusion experiments were repeated after administration of the sEH-inhibitor adamantanylureidododecanoic acid (AUDA).

Results: At a concentration of 100 nM, both EpOME and DiHOME decreased post-ischemic functional recovery in murine hearts in regards to a diminished left ventricular developed pressure. The detrimental effects seen under EpOME, but not DiHOME, were averted by sEH inhibition. There was no effect on basal cardiac function.

Conclusion: The results indicate that LA-derived mediators EpOME and DiHOME play a relevant role in cardiac ischemic events. Inhibition of sEH appears as a potential novel treatment option to prevent detrimental DiHOME effects in acute cardiac ischemia.

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Haupttodesursache in der Welt dar. Die Koronare Herzkrankheit ist dabei die größte Gruppe mit über 7,1 Millionen Toten pro Jahr weltweit (1). Chronische Herzinsuffizienz und akutes Pumpversagen sind fatale Folgen des Myokardinfarkts (2). Die postischämische Erholung der linksventrikulären Pumpfunktion ist dabei entscheidend für das Outcome der Patienten (3). Signalmoleküle auf chemischer Basis von Fettsäuren spielen eine wichtige Rolle bei Prozessen wie Apoptose und Inflammation des Myokards während Ischämie und Reperfusion (4). Ein genaueres Verständnis von den ablaufenden Prozessen und involvierten Mediatoren bei der myokardialen Schädigung sind von Interesse für Behandlungsstrategien in der Zukunft, um Prognose und Überleben zu verbessern.

1.1. Fettsäuren

Fettsäuren sind organische Verbindungen aus Kohlenstoff und Wasserstoff, die nicht aromatisch sind. Es handelt sich um Monocarbonsäuren, die natürlicherweise in Form von Triglyceriden und Phospholipiden, als Glycerinester gebunden, vorkommen. Sie unterscheiden sich durch die Anzahl der Kohlenstoffatome sowie das Vorhandensein bzw. die Anzahl und Position ihrer Doppelbindungen. Eingeteilt werden sie in niedere (bis sieben), mittlere (acht bis zwölf) und höhere (mehr als zwölf Kohlenstoffatome) sowie gesättigte (Alkansäuren ohne Doppelbindung) und ungesättigte Fettsäuren (Alkensäure mit mindestens einer Doppelbindung) (5).

1.1.1. Essenzielle Fettsäuren

Nicht alle vom Körper benötigten Fettsäuren können endogen synthetisiert werden. Sie müssen mit der Nahrung aufgenommen werden und werden daher als essenziell bezeichnet. Zu ihnen zählen Linolsäure (LA) und Alpha-Linolensäure (ALA).

Ausgehend von LA und ALA werden durch enzymatische Prozesse weitere Metabolite synthetisiert. LA, Arachidonsäure (AA), ALA, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) können von der einen zu anderen Fettsäure durch Kettenverlängerungs- und Desaturie-

rungsprozesse umgewandelt werden. Abbildung 1 stellt eine Übersicht über die Stoffwechselwege physiologisch relevanter Fettsäuren dar.

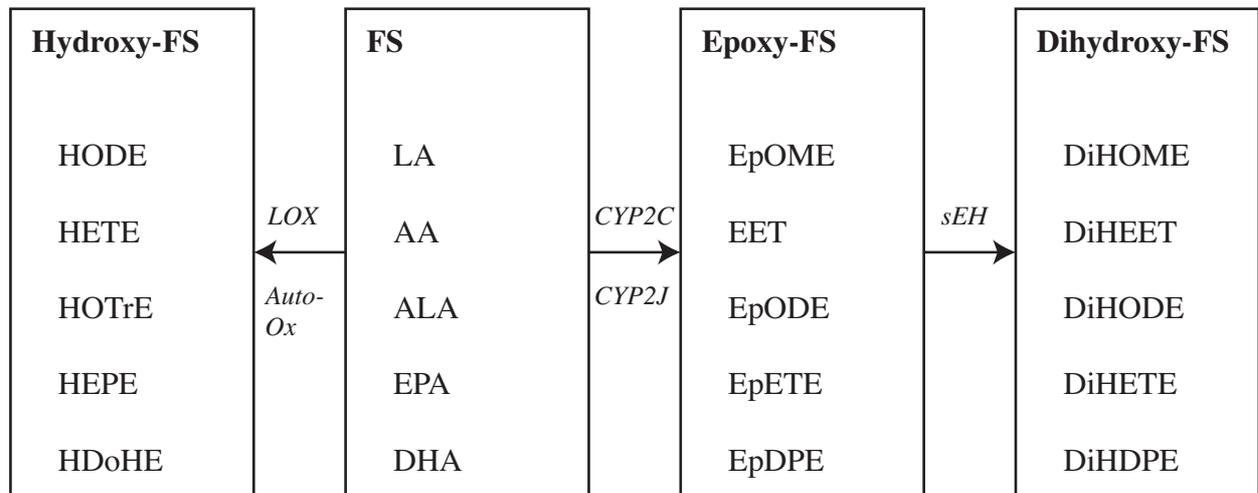


Abbildung 1: Stoffwechselwege physiologisch relevanter Fettsäuren (FS). Produktion von Hydroxy-FS durch die Lipoxygenase (LOX) oder durch Auto-Oxidation (Ox), von Epoxy-FS durch CYP2C- und CYP2J-Oxygenasen sowie ferner von Dihydroxy-FS durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH). Linolsäure/Octadecadiensäure (LA), Arachidonsäure (AA), Alpha-Linolensäure (ALA), Eicosapentaensäure (EPA), Docosahexaensäure (DHA); Hydroxyoctadecadiensäure (HODE), Hydroxyeicosatetraensäure (HETE), Hydroxyoctadecatriensäure (HOTrE), Hydroxyeicosapentaensäure (HEPE), Hydroxydocosahexaensäure (HDoHE); Epoxyoctadecensäure (EpOME), Epoxyeicosatriensäure (EET), Epoxyoctadecadiensäure (EpODE), Epoxyeicosatetraensäure (EpETE), Epoxydocosapentaensäure (EpDPE); Dihydroxyoctadecensäure (DiHOME), Dihydroxyeicosatriensäure (DiHEET), Dihydroxyoctadecadiensäure (DiHODE), Dihydroxyeicosatetraensäure (DiHETE), Dihydroxydocosapentaensäure (DiHDPE).

Nach Schuchardt et al. (6).

1.1.2. Biologische Eigenschaften von Fettsäuren

Fettsäuren haben wichtige biologische, strukturelle und funktionelle Eigenschaften. Sie sind substantielle Bestandteile von Phospholipiden und bilden Membranen von Zellen und deren Organellen. Sie können nichtionische lamellare oder kristalline Aggregate bilden und über die Plasmamembran diffundieren oder in dieser aufgenommen werden (7, 8). Damit bestimmen sie deren Fluidität und beeinflussen die Eigenschaften von Rezeptoren und membrangebundenen Enzymen, die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen und die Kinetik von Enzymen (9-20).

Freigesetzt werden Fettsäuren durch Phospholipasen. Sie sind dann zugänglich als Substrat für weitere Synthesewege. Dabei spielen sie als Mediatoren unter anderem bei Inflammation, Apoptose und Blutgerinnung eine entscheidende Rolle:

- Synthese von Hydroperoxiden durch die Lipoxygenase (LOX) als Vorläufer von Leukotrienen (21).
- Synthese von Peroxiden durch die Cyclooxygenase (COX) als Vorläufer von Prostaglandinen, Thromboxan und Prostacyclin (21).
- Synthese von Epoxiden durch CytochromP450(CYP)-Epoxygenasen (22).

Wesentliche Stoffwechselprozesse im Organismus sind sowohl auf zellulärer als auch übergeordneter Ebene abhängig von LA und LA-Derivaten.

Ferner sind Fettsäuren Energiesubstrat für die Produktion von Adenosintri-phosphat (ATP) mittels beta-Oxidation in den Mitochondrien.

Sie können im Körper in Form von Fettgewebe gespeichert werden. Neben der Aufnahme mit der Nahrung, können sie, abgesehen von den essenziellen Fettsäuren, auch endogen synthetisiert werden (23).

1.2. Linolsäure und Stoffwechselprodukte

LA (18:2) besitzt zwei Doppelbindungen und zählt deshalb zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA). Sie befinden sich an den Stellen neun und zwölf im C-18-Gerüst, bei einer Zählung ausgehend vom Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe. Somit entspricht die 12-Doppelbindung der Omega-6-Stellung, bei einer Zählung ausgehend vom Omega-Ende, gegenüber der Carboxylgruppe. Beide Atome der vorhandenen Doppelbindungen tragen unterschiedliche Substituenten. Physiologisch liegen diese beide auf der gleichen Seite. Es handelt sich daher um ein cis-Isomer (siehe Abbildung 2).

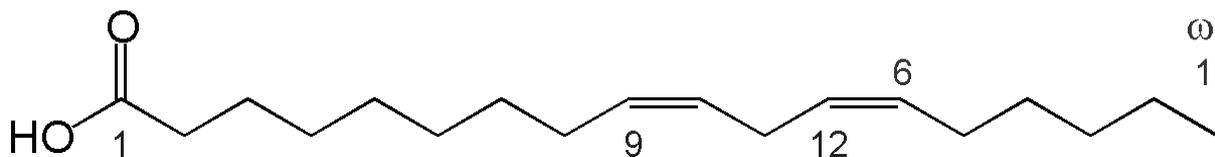


Abbildung 2: Struktur der Linolsäure (18:2; 9,12), mit Doppelbindung in Omega-6-Stellung.

LA stellt den Ausgangspunkt für die Synthese vieler Derivate mit weitreichenden metabolischen Effekten dar. Das Zusammenspiel und die Wirkung der Metabolite sind komplex. Abbildung 3 stellt eine Übersicht über die Stoffwechselwege von LA und deren Produkte dar.

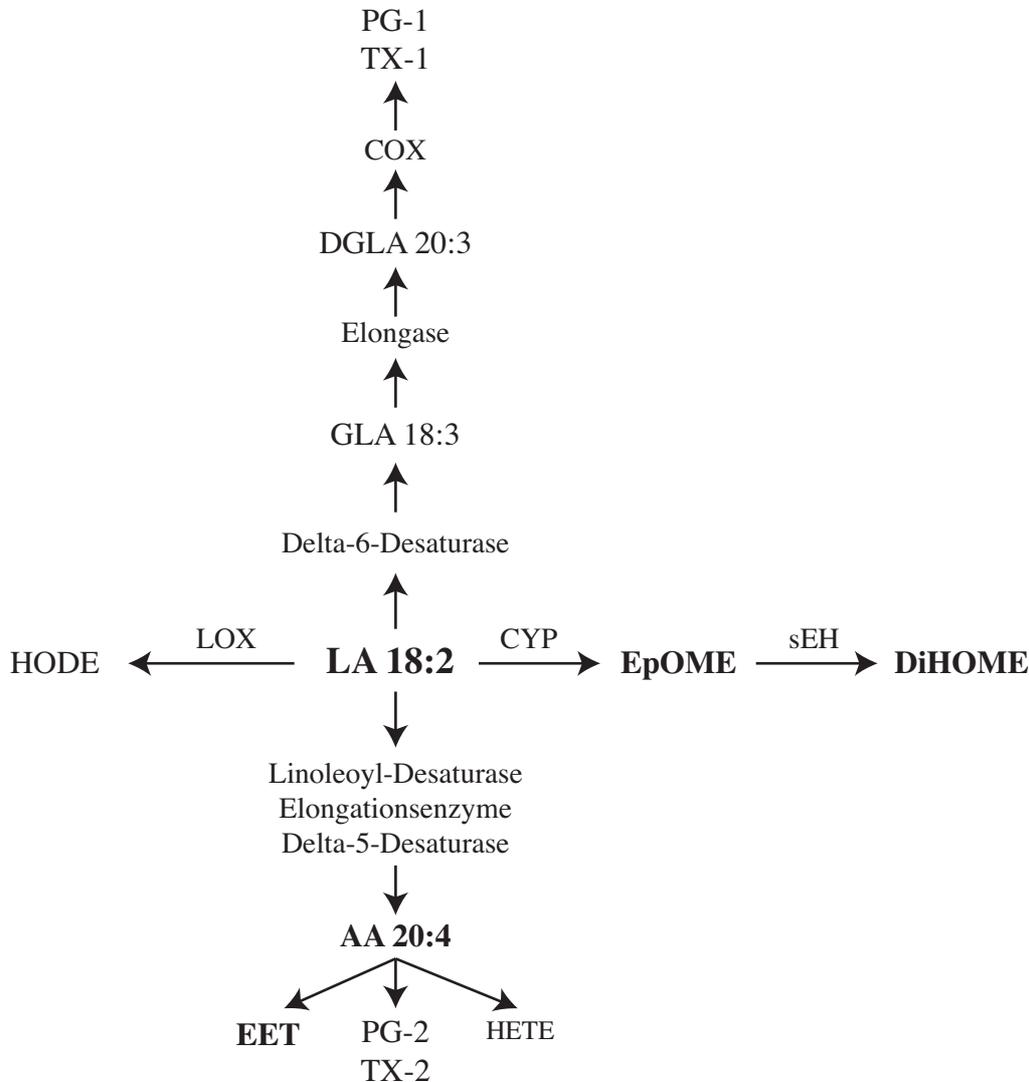


Abbildung 3: Stoffwechselwege der Linolsäure (LA) und deren Produkte. Arachidonsäure (AA), Epoxyoctadecensäuremethylester (EpOME), Dihydroxyoctadecensäuremethylester (DiHOME), Gamma-Linolsäure (GLA), Dihomogammalinolsäure (DGLA), Hydroxyoctadecdiensäure/Hydroxy-Linolsäure (HODE), Epoxyeicosatriensäure (EET), CytochromP450-Oxygenase (CYP), Cyclooxygenase (COX), Lipoxygenase (LOX), lösliche Epoxidhydroxylase (sEH), Prostaglandin (PG), Thromboxan (TX).

1.2.1. Arachidonsäure und Stoffwechselprodukte

Die AA, als Abkömmling der Linolsäure, und deren Metabolite waren in der Vergangenheit intensiver Gegenstand der Forschung.

AA (20:4) besitzt vier Doppelbindungen und zählt daher ebenfalls zu den PUFA. Die Doppelbindungen befinden sich an den Stellen fünf, acht, elf und 14 im C-20-Gerüst, die Substituenten befinden sich physiologisch auf der gleichen Seite. Somit handelt es sich auch hier um eine Omega-6-Fettsäure in Form eines cis-Isomers (siehe Abbildung 4).

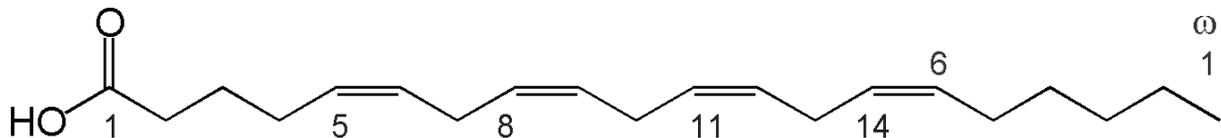


Abbildung 4: Struktur der Arachidonsäure (20:4; 5,8,11,14), mit Doppelbindung in Omega-6-Stellung.

Freie AA steht den CYP-Oxygenasen, der COX und der LOX als Substrat zur Verfügung, deren Produkte in ihrer Gesamtheit als Eicosanoide bezeichnet werden (24).

Darunter standen insbesondere die Epoxyeicosatriensäuren (EET) in den letzten Jahren im Fokus der Forschung.

1.2.1.1. Epoxyeicosatriensäure (EET)

Die vorherrschenden EET sind die Metabolite 11,12-EET und 14,15-EET, neben 5,6-EET und 8,9-EET. Sie werden vor allem in extrahepatischen Geweben über CYP2C und CYP2J synthetisiert. Ihre Stoffwechselwege und Effekte als auto- und parakrine Mediatoren sind vielfältig, sie sind maßgeblich beteiligt an der Modulation von Ionenkanalöffnungswahrscheinlichkeiten und wirken antiinflammatorisch (25).

Ein Rezeptor konnte bislang nicht entdeckt werden, auch wenn es Hinweise auf das Vorkommen eines solchen gibt. Die Vermutung eines G-Protein-abhängigen Mechanismus an glatten Muskelzellen wird diskutiert (26, 27).

Generell begünstigen EET die Einstellung bzw. die Wiederherstellung der Homöostase bei Prozessen wie Inflammation und Regulation des Gefäßtonus (28). Die spezifischen Effekten sind jedoch abhängig von dem Verhältnis der Regioisomere. Dieses ist wiederum bedingt durch Expression verschiedener CYP-Isoenzyme (29).

EET werden über viele Wege weiter metabolisiert, wobei die Hydrolyse durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) in den meisten Geweben den wichtigsten Weg darstellt (25, 30). Das Produkt ist dabei Dihydroxyeicosatriensäure (DiHET), die, wenn auch in geringerem Maße, biologisch aktiv ist und beispielsweise Einfluss auf die Relaxation der Koronararterien hat (31).

Ferner können EET in Phospholipide aufgenommen werden. Die endogenen Konzentrationen werden durch Biosynthese, Freisetzung und Abbau reguliert (28).

Vielfach wurde in der Vergangenheit die Rolle der EET auf das vaskuläre System untersucht: Es gibt Hinweise auf enge Zusammenhänge mit endothelialer Dysfunktion, einschließlich signifikanter Endorganschäden wie renovaskulären Pathologien, assoziiert mit konsekutiver arterieller Hypertonie (32, 33). Insbesondere die Blutdrucksenkung in Modellen von Angiotensin-induzierter und salzsensitiver Hypertonie, scheint erfolgsversprechend zu sein (30). Dabei kommt es zu einer EET-abhängigen Aktivierung von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen der glatten Muskulatur, was zu einer Vasodilatation führt, weswegen von einer endothelium derived hyperpolarisation factor (EDHF)-ähnlichen Wirkung gesprochen wird (34). Niedrige EET-Spiegel sind assoziiert mit kardialer Hypertrophie (35).

Erhöhte Konzentrationen vermindern die Inflammationsantwort in Kardiomyozyten und wirken kardioprotektiv in Ischämie-Reperusionsversuchen (36-38).

EET weisen eine analgetische Potenz in Schmerzmodellen auf, sie verhindern die Plättchenaggregation und fördern die Fibrinolyse (39). Ferner werden ihnen Effekte bei der Lipidregulation und Normalisierung glykämischer Dysregulation zugeschrieben (40).

1.2.2. Epoxyoctadecensäure(-methylester) (EpOME) und Dihydroxyoctadecensäure(-methylester) (DiHOME)

Eine weitaus weniger gut untersuchte Gruppe der Linolsäurederivate stellen die Epoxyoctadecensäure(-methylester) (EpOME) und deren Metabolite dar. Auf Grund ihres physiologischen Vorkommens sind diese jedoch ebenfalls von hohem Interesse für das Verständnis endogener Stoffwechselprozesse. Eine biologische Wirkung auf den Organismus wurde bereits Ende der 1980er Jahre nachgewiesen (41, 42). Ihnen werden primär toxische Effekte im Rahmen von entzündlichen Prozessen und ischämischen Ereignissen zugeschrieben.

Eine Übersicht über die Stoffwechselwege von EpOME und Dihydroxyoctadecensäure(-methylester) (DiHOME), die im Weiteren näher erläutert werden, gibt Abbildung 5.

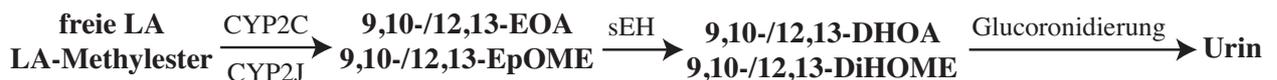


Abbildung 5: Übersicht über die Stoffwechselwege von EpOME und DiHOME. Epoxyoctadecensäure (EOA), Epoxyoctadecensäuremethylester (EpOME), Dihydroxyoctadecensäure (DHOA), Dihydroxyoctadecensäuremethylester (DiHOME), Linolsäure (LA), Cytochrom-P450 (CYP), lösliche Epoxidhydrolase (sEH).

1.2.2.1. Struktur und Synthese

EpOME ist das Epoxid der LA. Endogen kommen die Regioisomere 9,10 und 12,13 vor (Abbildung 6).

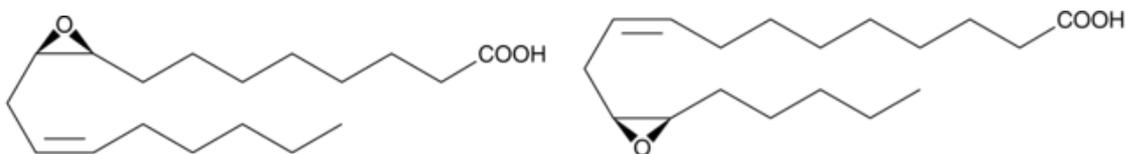


Abbildung 6: Struktur von 9,10-EpOME und 12,13-EpOME.

Abhängig davon, ob LA frei oder als Methylester als Substrat zur Verfügung steht, trägt auch das Epoxid ein Methylrest an der Carboxylgruppe.

Der enzymatische Schritt von LA zu EpOME wird mittels CYP-1A2, -3A4, -2C und 2J in verschiedenen Geweben, so auch im Endothel und in Kardiomyozyten katalysiert (37, 43, 44). Unterschiede hinsichtlich der biologischen Aktivität und Toxizität zwischen den Regioisomeren sind möglich. Das Verhältnis unterscheidet sich durch die endogenen Produktion (45-47).

Unterschiede zeigen sich außerdem in der Potenz der Metabolite in Bezug auf das Vorhandensein einer Methylgruppe, wenn auch nicht in der Wirkungsweise an sich (48, 49). Eine Differenzierung zwischen Epoxyoctadecensäuremethylester und Epoxyoctadecensäure erfolgt in der Literatur allerdings kaum, wo die Bezeichnungen weitestgehend Synonym gebraucht werden.

Die Epoxide können durch die sEH zu ihrem korrespondierenden Diol, 9,10- bzw. 12,13-DiHOME verstoffwechselt werden (45), siehe Abbildung 7.

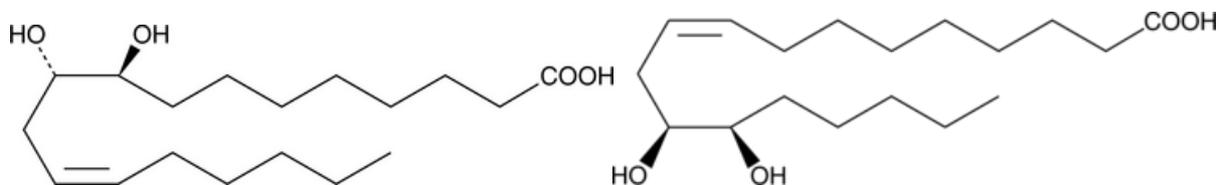


Abbildung 7: Struktur von 9,10-DiHOME und 12,13-DiHOME.

1.2.2.2. Lösliche Epoxidhydrolase (sEH)

Epoxidhydrolasen hydrolysieren Epoxide durch Hinzufügen von Wasser in einer exothermen Reaktion. Im menschlichen Körper finden sich vor allem zwei dieser Enzyme: Die microsomale Epoxidhydrolase (mEH), welche auf dem Genabschnitt EPHX1 kodiert ist und in den meisten Geweben nur eine untergeordnete Rolle spielt. Ihr Umsatz ist relativ gering (50, 51). Lediglich in bestimmten Arealen des Gehirns scheint sie von größerer Bedeutung zu sein (52, 53). Für bislang erforschte Stoffwechselprozesse ist die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) von weitaus größerer Relevanz. Sie ist auf dem EPHX2-Gen kodiert (52, 54). Darüberhinaus wurden neue Enzyme mit funktioneller Epoxidhydrolase-Aktivität gefunden, deren physiologische Beteiligung an Stoffwechselwegen bislang unklar ist (55).

Das sEH-Gen der Menschen liegt auf Chromosom acht und besteht aus 19 Exons, die für 555 Aminosäuren kodieren (54). Bei der Maus liegt das Gen auf Chromosom 14. Die 19 Exons bestehen aus 554 Aminosäuren (56).

Exprimiert wird die sEH in verschiedenen Geweben, so auch in Aorta, den Herzvorhöfen und -kammern (55, 57).

Die sEH besteht aus zwei Monomeren, die über eine kurze Prolin-reiche Verbindung zusammengehalten werden. Sie kommt vor allem im Cytosol, aber auch in den Peroxisomen vor (55, 58-60). Die N-terminale Domäne zeigt eine Phosphataseaktivität, die Lysphosphatidsäure verstoffwechselt, während die C-terminale Domäne eine Epoxidhydrolaseaktivität besitzt und Epoxide in ihre korrespondierenden Diole umsetzt. Unter die Substrate fallen vor allem EET, EpOME, DHA und EPA. Das Enzym weist dabei eine Selektivität für bestimmte Regioisomere und Enantiomere auf. Die höchsten Umsatzraten zeigen sich bei Metaboliten, deren Epoxidgruppe weiter entfernt von der Carboxylgruppe liegen (61, 62).

Höhere sEH-Protein-Level wurden in Herzen von Ratten mit Angiotensin-II- und Arsen(III)-induzierter kardialer Hypertrophie nachgewiesen (36). Ferner scheint Homocystein eine Induktion der sEH zu bewirken (63).

Die physiologische Relevanz von verschiedenen single nucleotide polymorphisms (SNPs) des sEH-Gens wurde mehrfach beschrieben (64, 65). Die CARDIA (The Coronary Artery Risk Development in Young Adults) und ARIC (The Atherosclerosis Risk in Communities)-Studie geben Hinweise darauf, dass diese eine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielen. Im Vordergrund stehen dabei Polymorphismen bei der Modulation von Fibrose, Entzündungsreaktionen und Regulation von Ionenkanälen (30, 55, 66).

Auf Grund des Zusammenhangs mit kardiovaskulären Erkrankungen und Entzündungsreaktionen stellt die sEH einen potenziellen pharmakologischen Angriffspunkt dar (67).

Bei kristallografischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Harnstoff an die Region des Enzyms mit EH-Aktivität passt und dieser die Bindung einer Fettsäure imitiert (51, 68). Davon ausgehend wurden verschiedene sEH-Inhibitoren synthetisiert, darunter auch der Enzyminhibitor Adamantanylureidododecansäure (AUDA), siehe Abbildung 8.

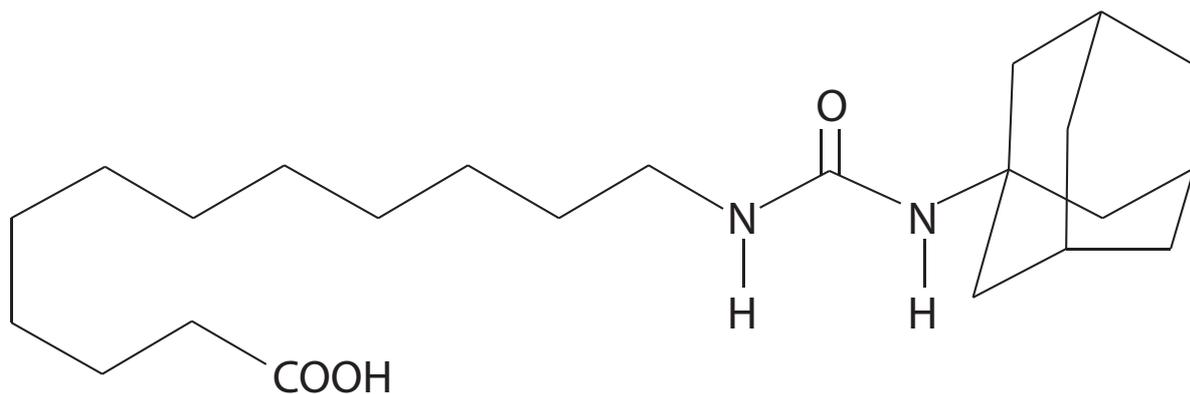


Abbildung 8: Struktur von Adamantanylureidododecansäure (AUDA).

Durch sEH-Inhibition konnte kardiales Remodelling nach induzierter Ischämie vermindert werden, wobei sich eine Verschiebung des Metabolitprofils mit einem Rückgang an Inflammationsmarkern zeigte (69). In einem anderen Modell konnten kleinere Infarktbezirke nach Koronararterienokklusion und anschließender Reperfusion nachgewiesen werden (70). Bei Versuchen am isolierten Herzen nach Langendorff zeigten sEH-defiziente Mäuse eine verbesserte Erholung der linksventrikulären Druckentwicklung nach Ischämie (47, 71).

1.2.2.3. Elimination

Die Ausscheidung von EpOME und DiHOME findet im Organismus über den Urin statt. Dazu werden die Diole glucuronidiert, um den an sich hydrophoben Stoff löslich zu machen (72, 73).

1.2.2.4. Biologische Eigenschaften

Sevanian et al. beschrieben 1979 die Akkumulation von Epoxiden im Lungenparenchym und der Alveolarmembran von Ratten nach akuter Lungenschädigung durch Exposition mit Stickstoffdioxid. Ozawa et al. konnten 1986 EpOME in der Bronchiallavage, in Anwesenheit von Leukozyten, in Rattenlungen nach Hyperoxie nachweisen und nannten den Stoff daher zunächst Leukotoxin. Sie zeigten ferner die hepatotoxische Wirkung der Substanz auf.

In weiteren tierexperimentellen Studien wurde die Toxizität auf das Herz-Kreislauf-System untersucht: EpOME bewirkt eine Verschlechterung der kardialen Funktion in Bezug auf links-

ventrikulären Druck, Aortenfluss und -druck, was bis zum Herzkreislaufversagen führen kann (41, 76, 77). Ferner wurden eine dosisabhängige Verminderung der Kontraktilität isolierter Katzenpapillarmuskeln und Koagulationsabnormalitäten im Sinne einer disseminierten intravasale Koagulation (DIC) beobachtet (42, 77) .

Kosaka et al. beschrieben erstmals am Menschen einen Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentrationen im Serum ($> 100 \mu\text{M}$) bei Verbrennungspatienten und einer erhöhten Sterblichkeit.

Dudda et al. machten 1996 ischämische Geschehen für die Induktion von Enzymen zur Freisetzung der Epoxide und ferner korrespondierender Diole verantwortlich. An *Spodoptera frugiperda*-21-Zellen bestätigte Moghaddam et al. 1997 die toxische Wirkung von frei vorliegendem EpOME, das jedoch nur bei Expression von sEH auftrat, was mit den Ergebnissen von Moran et al. aus dem gleichen Jahr einhergeht, wo eine 50 %ige Zellyse von renalen proximalen Tubuluszellen bei Gabe von DiHOME, nicht aber von EpOME oder LA induziert werden konnte. Damit wurden die potenziell unterschiedlichen Effekte von EpOME und DiHOME sowie einem enzymatischen Zwischenschritt in den Vordergrund gerückt.

Die Forschungsanstrengungen der nächsten Jahre galten dem Versuch den zu Grunde liegenden Pathomechanismus aufzuklären:

Stimers et al. erkannte 1999 eine DiHOME-bedingte Steigerung der Dauer und Verminderung des Overshoots des Aktionspotenzials von Kardiomyozyten durch eine Hemmung von I_{Na} und I_{to} , was Arrhythmien und Herzstillstand in sonst intakten Herzen begünstigte. Eine Hemmung des I_{Na} konnte auch Harrel et al. 2002 nachweisen, wobei eine Stabilisierung des Inaktivierungszustandes durch Hyperpolarisation, auf Grund einer Blockade der Kanalpore oder Verhinderung des Übergangs in den offenen Zustand des Kanals postuliert wurde. Die höchste Potenz der Effekte auf die Kanalkinetik wurde für DiHOME nachgewiesen, vorliegend als Methylester.

Außerdem wurde gezeigt, dass DiHOME eine dosisabhängigen LDH-Erhöhung bewirkt, wobei die Toxizität durch direkte Störung der mitochondrialen Funktion bedingt sei (44). Die mitochondriale Störung könne durch eine Entkopplung der Atmungskette verursacht sein und mit einer vermehrten Bildung schädigender Sauerstoffradikale einhergehen (81, 82).

Wie weiter oben beschrieben, weisen EET insgesamt eher eine kardioprotektive Wirkung auf, während bei EpOME und DiHOME deren Toxizität im Vordergrund steht. Diese gegensätzlichen Effekte sind von besonderem Interesse, da sich die Metabolite gewisse Stoffwechselwege

teilen: Edin et al. konnten 2011 bei einer CYP2J2-Überexpression eine protektive Wirkung auf das isolierte murine Herz im Ischämie-Reperfusion-Versuch durch einen erhöhten Umsatz von AA zu EET erklären. Gleichwohl führt eine CYP2C8-Überexpression bei identischem Versuchsaufbau zu einer schlechteren Erholung nach Ischämie. Dabei kommt es zu einem selektiv erhöhten Umsatz von LA zu EpOME, und ferner DiHOME, durch CYP2C8 im Verhältnis zum Umsatz von AA zu EET durch CYP2J2. Ähnliches wurde bei einer Überexpression von sowohl CYP2J2, wie auch sEH, wodurch die protektive Wirkung abgewendet wurde. Letzteres Modell resultierte in einem schnelleren Abbau von EET zu DHET und einer vermehrten Synthese von DiHOME.

Dementsprechend scheint DiHOME die vorteilhaften Effekte der EET zu maskieren, was auf Grund der gemeinsamen Endstrecke, bei pharmakologischen und genetischen Eingriff in das System, in Betracht gezogen werden sollte.

1.3. Langendorff als ex vivo Modell

Das isolierte Herz nach Langendorff ist eine Untersuchungsmethode in der kardiovaskulären und pharmazeutischen Forschung. Sie bietet die Möglichkeit Effekte von biologisch aktiven Substanzen und/oder Ereignisse, wie Ischämie, zu simulieren und deren Auswirkung auf die Herzaktivität zu erfassen. Das sind insbesondere linksventrikulärer Druck, Koronarfluss bzw. Koronarwiderstand und die elektrische Aktivität. Es handelt sich dabei um ein ex-vivo Modell. So können Organ-spezifisch physiologisch relevante Daten erhoben werden, unabhängig von neurohumoralen Faktoren und Effekten mit sonst auch potenziell tödlicher Wirkung auf den gesamten Organismus.

Vorteilhaft ist außerdem die relative Einfachheit und die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

1.3.1. Historische Aspekte

Die ersten Versuche am schlagenden Herzen gehen auf Karl Ludwigs Forschung im Jahr 1866 zurück (83, 84). Dabei nutzte er Kaninchenserum zur Perfusion eines Froschherzens, welches physiologisch aus nur einer Kammer besteht.

Vereinfacht wurde die Forschung einige Jahre später durch die Erfindung der Elektrolyt-Lösung (85). Diese Lösung ist in leicht modifizierter Form bis heute in der Praxis als (Ringer)-Vollelektrolyt-Lösung bekannt.

Die Messung der kardialen Funktion an Wirbeltierherzen wurde durch Oskar Langendorff etabliert (86). Dabei fanden vor allem Katzen-, aber auch Kaninchen- und Hundeherzen Verwendung. Die Idee bestand in der retrograden Perfusion der Aorta ascendens und damit der Koronarien bei Schluss der Aortenklappe, sodass das isolierte Herz wieder zum Schlagen gebracht wird. Langendorff zeichnete die Kontraktionen durch mechanische Kopplung mittels eines an der Herzspitze befestigten Fadens auf.

Gottlieb und Magnus beschrieben 1904 erstmals die Messung des linksventrikulären Drucks mit Hilfe der Einführung eines flüssigkeitsgefüllten Ballons in die linke Herzkammer, was den Einsatzbereich der auf Langendorff zurückgehenden Technik erheblich erweiterte. Außerdem zeigte Katz 1939, die Möglichkeit zur Bestimmung des Gefäßwiderstandes der Koronarien durch Messung des Perfusionsdrucks bei konstantem Fluss anstelle von konstantem Druck an der Aorta auf.

1967 wurde von Neely et al. das „Working Heart“ Modell vorgestellt. Dabei wird das Herz physiologisch antegrad und nicht wie in den voran erwähnten Versuchen retrograd perfundiert. Der Fluss geht vom linken Vorhof über den linken Ventrikel und linksventrikulären Ausflusstrakt in die Aorta ascendens. Auf Grund der hohen Komplexität des Versuchsaufbaus, v.a. im Mausmodell, ist ein Einsatz jedoch nur bei speziellen Fragestellungen sinnvoll.

1.3.2. Langendorff-Perfusion heute

Die Langendorff-Perfusion ist heutzutage eine etablierte Methode in der Erforschung medizinischer und pharmakologischer Fragestellungen. Apparaturen sind kommerziell erhältlich.

1.3.2.1. Modi der Perfusion

Bei der Langendorff-Perfusion an Apparaturen, wie wir sie heute kennen, stehen zwei Modi zur Verfügung:

- Konstanter Aortendruck bei erhaltener Autoregulation des vaskulären Tonus
versus

- konstanter Aortenfluss zur Untersuchung des Koronarwiderstandes.

Beide Versuchsaufbauten sind durchführbar in Kombination mit:

- Isovolumetrischer Kontraktion mit Messung des linksventrikulären Drucks mittels eines kleinen flüssigkeitsgefüllten Ballons im linken Ventrikel (LV) verbunden mit einem Drucksensor
versus
- isometrischer Kontraktion (wie Langendorff ursprünglich).

Abbildung 9 zeigt eine Langendorff-Apparatur im Labor.

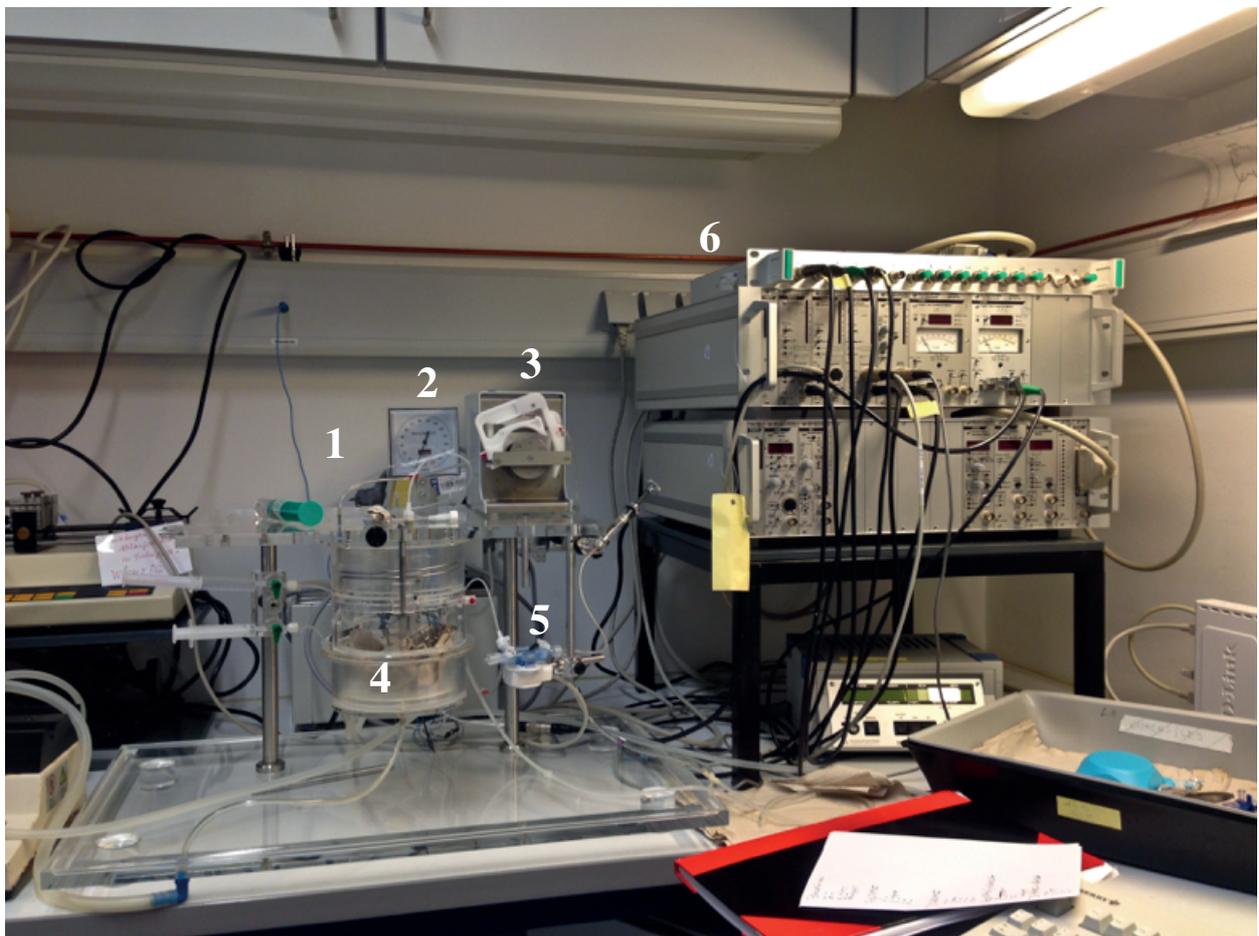


Abbildung 9: Langendorff-Apparatur heute. 1 Langendorffapparat, 2 Manometer für Aortendruck, 3 Rollenpumpe, 4 Kammer, 5 Drucksensor, 6 Datenaufnehmer.

1.3.2.2. Perfusionspuffer

Kristalloide Puffer, wie sie auf Ringer zurückgehen, sind kostengünstig, einfach in der Handhabung und Herstellung. Als günstig erwiesen hat sich der Krebs-Henseleit-Puffer in modifizierter

Form. Dieser wird mit einem Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ zur Oxygenierung und pH-Einstellung begast. Die Sauerstoffbindungskapazität ist gering, aber unter diesen Bedingungen ausreichend. Problematisch ist die Ödembildung am Herzen durch den relativ geringen onkotischen Druck. Dies kann durch Zugabe von Albumin und Fettsäuren vermieden werden, was jedoch wiederum zu starker Schaumbildung bei der Oxygenierung führt und daher insgesamt nur begrenzt Abhilfe leistet.

Ideal sind Erythrozyten-basierte Puffer für die bestmögliche kardiale Funktion ex vivo. Diese sind jedoch ungünstig in der Handhabung sowie Beschaffung und kostenintensiv (90).

1.4. Zielsetzung

Eine myokardiale Schädigung im Rahmen von ischämischen Ereignissen ist geprägt durch die Bildung und den Einfluss von Mediatoren aus Lipidbestandteilen auf der Basis mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Zu diesen zählt die LA, die über CYP450-Epoxygenasen zunächst zu EpOME und weiter durch die sEH zu DiHOME verstoffwechselt wird. Die Rolle von EpOME und DiHOME ist bei der kardialen Ischämie jedoch bislang unklar. Vorangegangene Arbeiten suggerieren eine potenzielle negative Wirkung der Metabolite. In engem Zusammenhang stehen die protektiven Effekte der EET, die sich wesentliche Stoffwechselwege teilen.

Ziel der Arbeit war es, die Effekte von 12,13-EpOME sowie dem korrespondierenden Diol 12,13-DiHOME auf die funktionelle Erholung nach induzierter Ischämie und auf die basale kardiale Funktion am isolierten murinen Herzen zu untersuchen.

Im Langendorff-Modell sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Effekte habe EpOME und DiHOME im Ischämie-Reperfusion-Versuch hinsichtlich linksventrikulärem Druck, Koronarfluss und Herzfrequenz.
2. Welche Effekte haben EpOME und DiHOME auf die basale kardiale Funktion hinsichtlich linksventrikulärem Druck, Koronarfluss und Herzfrequenz.
3. Welche Rolle spielt eine sEH-Inhibition.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software

In Tabelle 1 bis 4 sind Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software zur Übersicht aufgeführt.

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien.

Substanz	Hersteller
(±)12,(13)-Epoxy-9-cis-octadecensäuremethylester (EpOME)	Cayman Chemical, deutscher Vertriebspartner: Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
(±)12,(13)-Dihydroxy-9-cis-octadecensäuremethylester (DiHOME)	
12-Tricyclodec-1-ylaminoarbylamino-dodecansäure (AUDA)	
(±)Isoproterenol Hydrochlorid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Kaliumchlorid (KCl)	
Glucose	
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat in Wasser (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	
Calciumchlorid in Wasser (CaCl ₂ x H ₂ O)	
Heparin-Natrium 25.000 I.E.	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
Faden Supramid	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Falcon 5ml	Becton Dickinson (BD) Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Falcon 20ml	
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 3: Geräte.

Gerät	Hersteller
Langendorff Apparatur	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, March, Deutschland
Data Aquisition Hardware Modell 603	
Perfusor Modell 22	
Mikroskop Mantis	Vision Engineering, Woking, Vereinigtes Königreich
Rollenpumpe Modell ISM 834C	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Wärmepumpen Lauda E 100	Lauda, Laud-Königshofen, Deutschland
Präzisionswaage FA 1500	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Thermometer GTH 1170	Greisinger Electronic, Regenstauf, Deutschland

Tabelle 4. Software.

Software	Hersteller
Isoheart	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, March, Deutschland
SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 23.0	IBM, Chicago, Illinois, USA

2.2. Tiere

Alle Versuche wurden mit männlichen acht bis zwölf Wochen alten (25-30 g) Wildtyp-C57BL/6-Mäusen (Charles River, Sulzfeld) durchgeführt.

Die Tiere wurden übergangsweise im Tierhaus des Max Dellbrück Centrums Berlin gehalten, wo sie Zugang zu Flüssigkeit und Nahrung ad libitum und einen zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus hatten.

Alle Versuche erfolgten gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz.

2.3. Isoliertes perfundiertes Herz nach Langendorff

Einen kurzen Überblick über die Funktionsweise, Entstehung und Weiterentwicklung des nach Langendorff perfundierten, isolierten Herzens findet sich unter Punkt 1.3. der Einleitung.

2.3.1. Versuchsaufbau

Das kanülierte Herz wird retrograd über die Aorta mit begastem Perfusionspuffer perfundiert, sodass eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Glucose stattfindet und es schlagen kann. Der Aortendruck wird eingestellt, der Koronarfluss kann kontinuierlich gemessen werden. Ein Ballon im linken Ventrikel des Herzens dient als Druckaufnehmer. Epikardiale Elektroden leiten ein EKG ab. Den Versuchsaufbau der Langendorff-Perfusion zeigt schematisch Abbildung 10.

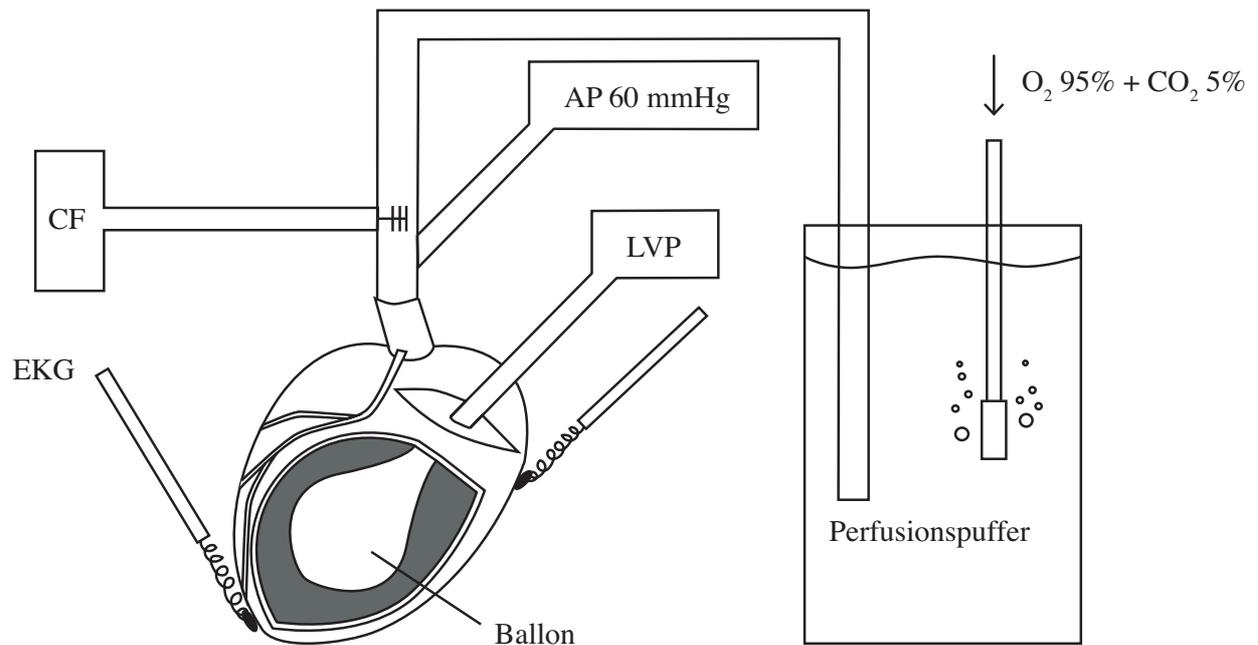


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusion. Linksventrikulärer Druck (LVP), Aortendruck (AP), Koronarfluss (CF).

2.3.2. Vorbereitung

Für den Perfusionspuffer dienten vier Glucose-freie Stammlösungen, die bei 4 °C gelagert wurden, siehe Tabelle 5. Vor Versuchsbeginn wurde die Arbeitslösung unter Hinzugabe von Glucose hergestellt.

Tabelle 5: Krebs-Henseleit-Puffer.

Zusammensetzung der Stammlösungen				
Stammlösung	Substanz	Molekulargewicht [g/M]	Einwaage [g/l]	Endkonzentration [mM]
1	MgSO ₄ x 7H ₂ O	246,48	5,18	2,1
	NaCl	58,44	69	118
	KCl	74,56	3,5	4,7
2	NaHCO ₃	84	41,4	24,7
3	KH ₂ PO ₄	135,1	21	0,23
4	CaCl ₂ x H ₂ O	146,9	8,82	1,5

Modifiziert nach Krebs-Henseleit.

EpOME bzw. DiHOME wurden mit Stickstoff eingengt, in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und Aliquots bei -20 °C eingefroren. Daraus wurden am Versuchstag Lösungen mit 10 nM bzw. 1 µM hergestellt, die mittels Perfusor zu einem Zehntel-Anteil des Perfusionspuffer infundiert wurden, womit am isolierten Herzen Konzentrationen von 1 nM respektive 100 nM erreicht wurden.

AUDA wurde ebenfalls in DMSO gelöst und Aliquots bei -20 °C eingefroren. Für die Versuche wurden Konzentrationen von 100 µM (Lösung), d.h. 10 µM Endkonzentration am Herzen, verwendet.

Die DMSO Menge war stets < 0,1 % des Perfusionspuffers.

Zur ventrikulären Druckmessung in den Mäuseherzen wurde ein Ballon mit folgenden Spezifikationen hergestellt:

- Adäquate Größe, d.h. größer entfaltbar, als das maximal Volumen des relaxierten Ventrikels.
- Hohe Flexibilität für eine gute Anpassung an das ventrikuläre Cavum.
- Hohe Compliance für eine adäquate Druckaufnahme.

Da es für Mäuseherzen im Gegensatz zu Rattenherzen keine käuflich erwerbbaeren Latexballons gibt, wurden die Ballons aus Frischhaltefolie gefertigt, da diese erfahrungsgemäß die Kriterien am besten erfüllt.

Der Ballon wurde über einen Schlauch mit entgastem Wasser befüllt und mit dem Drucksensor verbunden. Kritisch wurde dabei auf ein Luftblasen-freies System geachtet.

Vor den Versuchen wurde die Anlage mit destilliertem, gefiltertem Wasser gespült.

Die entsprechenden Lösungen wurden zusammengegeben, der Perfusionspuffer filtriert, anschließend mindestens eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn auf 37 °C erwärmt und mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast.

Das Langendorff-System wurde über eine separate Wärmepumpe auf eine Temperatur von 37 °C eingestellt.

2.3.3. Präparation

Um das Risiko einer Thrombembolie zu minimieren, wurde allen Mäusen 20 min vor Präparation 200 IE Heparin intraperitoneal injiziert, das in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gelöst war.

Die Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nach einem Bauchschnitt wurde das Diaphragma durchtrennt und die Thoraxhöhle eröffnet, anschließend eine bilaterale Thorakotomie durchgeführt, der Brustkorb nach oben geklappt und das schlagende Herz dargestellt. Der Herzbeutel wurde eröffnet, das Herz an den proximalen Gefäßen mit einer Pinzette gefasst und vorsichtig präpariert. Es wurde zügig gearbeitet, da die Zeit von der Durchtrennung der Aorta bis zur Perfusion durch die Langendorff-Anlage Ischämie bedeutet.

Die Kanülierung erfolgte unter einem Lichtmikroskop, wobei das Herz in gekühlter Krebs-Henseleit-Lösung lag. Schließlich wurde die Aorta ascendens durch einen Faden an der Kanüle fixiert.

Das isolierte Herz wurde mittels Kanüle mit der Langendorff-Apparatur verbunden, siehe Abbildung 11. Es galt eingeschwemmte Luftblasen als potenzielle Emboliequelle zu vermeiden.

Bei entsprechend eingestelltem Aortendruck, hier 70 mmHg, konnte das Herz adäquat perfundiert werden und begann sofort wieder zu schlagen. Der Druck blieb während allen Experimente stabil.

Durch eine Erweiterung der Mündung der Pulmonalvenen wurde der vorher präparierte Ballon durch den linken Vorhof und schließlich die Mitralklappe geschoben, bis er im linken Ventrikel

positioniert werden konnte. Er wurde auf 10 mmHg aufgepumpt, wodurch der enddiastolische Druck und damit die Vorlast vorgegeben wurde.

Die EKG-Elektroden wurden im Bereich des rechten Vorhofs und des linken Ventrikels angebracht.

Bei allen Versuchen betrug die Einschlagzeit mindestens 20 min.

Es wurden kontinuierlich aufgezeichnet: Herzfrequenz (HR), linksventrikuläre Druckentwicklung (LVPdevp), Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt) und Koronarfluss (CF).

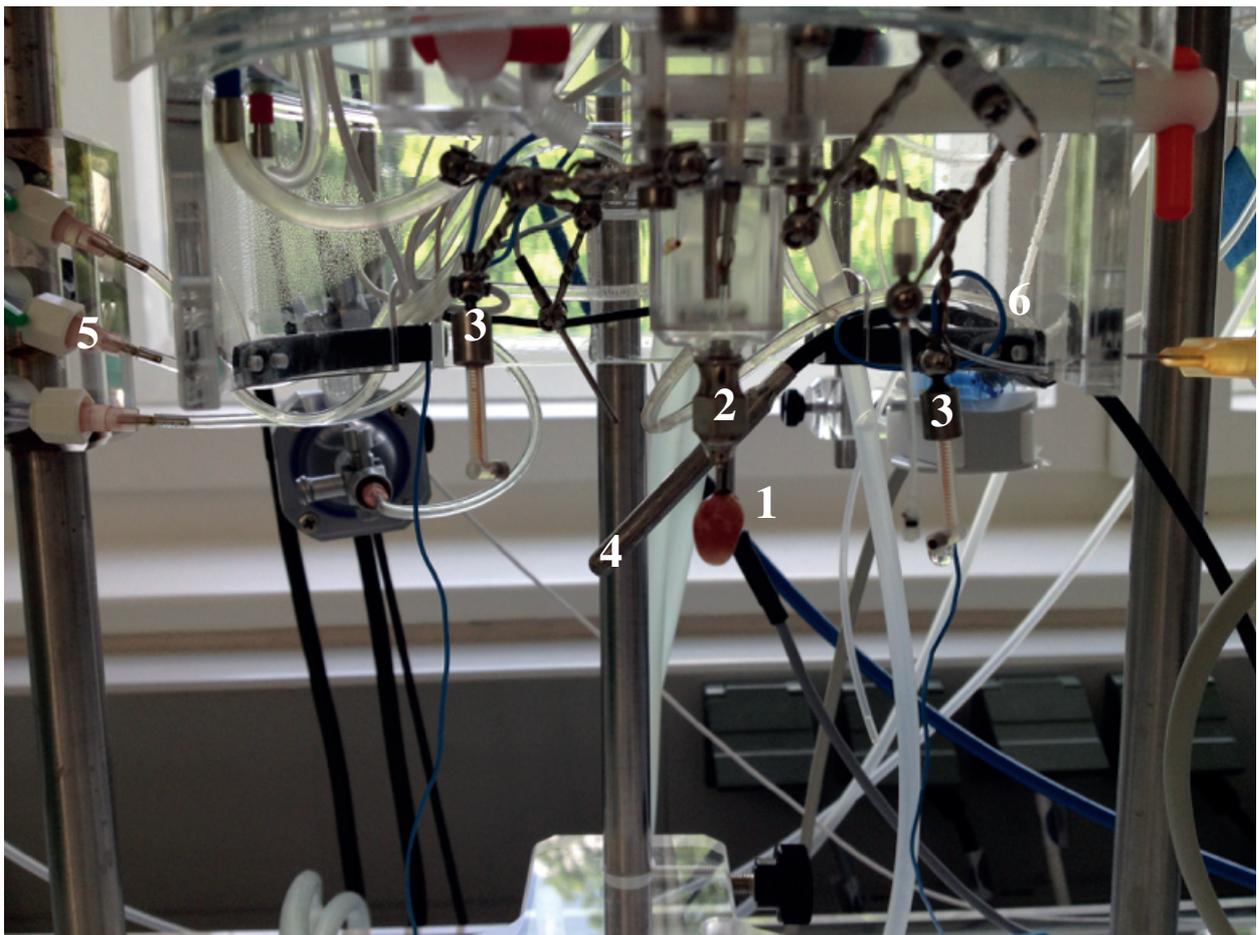


Abbildung 11: Kanüliertes Mäuserherz an Langendorff-Apparatur. 1 Mäuseherz, 2 Kanüle, 3 EKG-Elektroden, 4 Temperatursonde, 5 Perfusorzuläufe.

2.4. Versuchsablauf

Im Folgenden wird der Versuchsablauf der zwei Untersuchungsgruppen dargestellt:

- EpOME und DiHOME, Ischämie-Reperfusion
- EpOME und DiHOME, basale kardiale Funktion

2.4.1. EpOME und DiHOME, Ischämie-Reperfusion

Substanzen: EpOME 100 nM, DiHOME 100 nM, AUDA 10 μ M, PBS.

Nach dem Einschlagen wurde die Testsubstanz über 20 min kontinuierlich appliziert. Die Mittelwerte der Parameter HR, LVPdevp, dP/dt und CF aus 200 s unmittelbar vor der 20-Minütigen no-flow-Ischämie dienten als Baselinewerte. Die Perfusatsproben wurden aus den ersten ausgeworfenen Tropfen des Perfusats nach Reperfusion gewonnen. Für die vergleichende Analyse wurden nach 20 min bzw. 40 min Reperfusion erneut die Mittelwerte der Parameter aus 200 s gebildet. PBS diente als Wildtyp (WT)-Kontrolle. Abbildung 12 zeigt schematisch den Versuchsablauf.

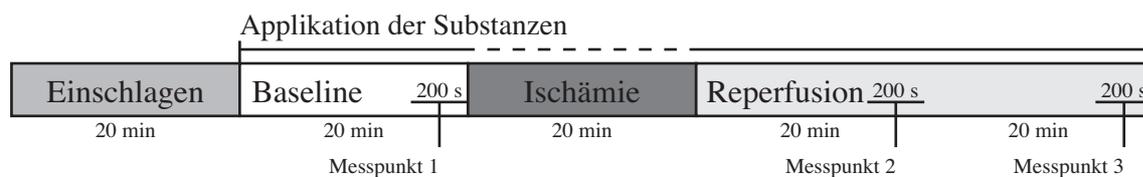


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Protokolls EpOME, DiHOME, Ischämie-Reperfusion. Applizierte Substanzen: EpOME 100 nM, EpOME 100 nM + AUDA, DiHOME 100 nM, DiHOME 100 nM + AUDA, PBS.

2.4.2. EpOME und DiHOME, basale kardiale Funktion

Substanzen: EpOME 1n M, EpOME 100 nM, DiHOME 1 nM, DiHOME 100 nM, PBS.

Nach dem Einschlagen wurden die Mittelwerte der Parameter HR, LVPdevp, dP/dt und CF aus den letzten 200 s gebildet und dienten als Baseline. Anschließend wurden die Metabolite über einen Zeitraum von 40 min kontinuierlich appliziert. Zum Vergleich wurden erneut die Mittelwerte der Parameter aus den letzten 200s des Beobachtungszeitraums berechnet. PBS diente als WT-Kontrolle. Abbildung 13 zeigt schematisch den Versuchsablauf.

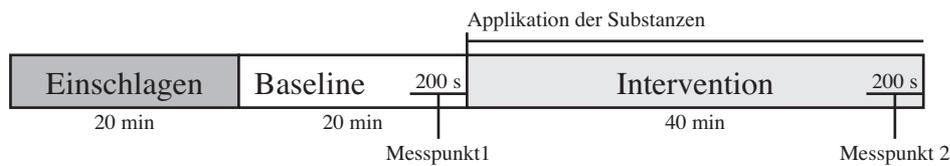


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Protokolls EpOME, DiHOME, basale kardi-ale Funktion. Applizierte Substanzen: EpOME 1 nM, EpOME 100 nM, DiHOME 1 nM, DiHOME 100 nM, PBS.

2.5. Metabolitbestimmung

Die Bestimmung der Metabolite EpOME und DiHOME im Perfusat wurde durch die Firma Lipidomix GmbH Berlin (Dr. Michael Rothe) durchgeführt. Grundlage dafür stellt die Rapid-Resolution-High-Performance Liquid Chromatography in Kombination mit Triplequad-Tandemmassenspektrometern dar.

2.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 23.0 (IBM, Chicago, IL, USA).

Die vorliegenden Messdaten der Langendorff-Versuche sind intervallskaliert und stammen aus unabhängigen Stichproben. Prozentwerte geben die relativen Änderungen im Verlauf des Versuchs an. Es wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler bestimmt. Vor der Test-Statistik auf Unterschiede wurden die Daten zuerst auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und Varianzhomogenität (Levene-Statistik) überprüft. Diese Kriterien waren formal erfüllt. Die Versuchsgruppen der Langendorffexperimente wurden untereinander mittels einer Analysis of Variance (ANOVA) mit anschließendem Post Hoc-Test (Bonferroni bzw. Least Significant Difference) auf Unterschiede getestet.

Zur Analyse der Metabolite aus dem Perfusat wurde einerseits ebenfalls eine ANOVA durchgeführt. Um die Stärke des Zusammenhangs zu prüfen erfolgte eine Korrelationsanalyse unter Angabe des Pearson-Korrelations-Koeffizienten.

Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Die grafische Darstellung erfolgte mit Adobe Illustrator CC 2016.

In den Diagrammen zur Veranschaulichung der Ergebnisse sind die Mittelwerte plus Standardfehler bzw. Standardabweichung aufgeführt. Unterschiede mit $p \leq 0,05$ wurden mit einem Sternchen (*) markiert.

3. Ergebnisse

Zur Evaluierung der Effekte von EpOME und DiHOME wurden die beiden Metabolite unter Ischämie und Reperfusion sowie basalen Bedingungen am isolierten, perfundierten Herz von C57BL/6-Mäusen untersucht.

3.1. Effekte von 12,13-EpOME und 12,13-DiHOME im Ischämie-Reperfu-sions-Versuch

Die Gabe von EpOME 100 nM und DiHOME 100 nM führte nach 40 min Reperfusion in Folge einer 20-Minütigen no-flow Ischämie zu einer signifikant schlechteren Erholung der kardialen Funktion im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe mittels PBS.

Tabelle 6 stellt eine Übersicht über die kardialen Funktionsparameter (HR, LVPdevp_{20/40}, dP/dt_{min/max} und CF) dar. Im Folgenden werden die Ergebnisse unter den Punkten 3.1.1. bis 3.1.4. im Detail aufgeführt.

Tabelle 6: Kardiale Funktionsparameter in der Wildtyp- und den Interventionsgruppen im Ischämie-Reperfusion-Versuch.

Parameter	WT			EpOME			EpOME + AUDA			DiHOME			DiHOME + AUDA		
	M	SD	SE	M	SD	SE	M	SD	SE	M	SD	SE	M	SD	SE
	n = 5			n = 5			n = 5			n = 5			n = 5		
HR [%]	87	10	5	94	52	23	80	13	6	184*	79	35	160*	94	41
LVPdevp 20 [%]	98	27	12	65	34	15	90	12	5	35*	27	12	39*	34	15
LVPdevp 40 [%]	89	30	13	49*	24	11	83	20	9	31*	28	12	45*	30	13
dP/dt _{max} [%]	85	25	11	43*	20	9	74	16	7	33*	28	13	41*	27	12
dP/dt _{min} [%]	83	24	11	44*	19	8	71	15	7	34*	24	10	44*	27	12
CF [%]	84	21	10	62	17	8	71	28	13	78	21	10	105	26	12

Verhältnis nach zu vor Ischämie, Werte sind Prozente; Herzfrequenz (HF); linksventrikuläre Druckentwicklung nach 20 min Reperfusion (LVPdevp 20); linksventrikuläre Druckentwicklung nach 40 min Reperfusion (LVPdevp 40); maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}); minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}); Koronarfluss (CF); Wildtyp (WT); Mittelwert (M); Standardabweichung (SD); Standardfehler (SE); * = p ≤ 0,05 (in Bezug zu WT).

3.1.1. Linksventrikulärer Druck

EpOME und DiHOME führen zu einer signifikant niedrigeren linksventrikulären Druckentwicklung postischämisch (89 % ± 30 vs. 49 % ± 24 bzw. 31 % ± 28; p = 0,029 bzw. p = 0,003) (siehe Abbildung 14 A und 15). Die maximale und minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit, war ebenfalls geringer (85 % ± 25 vs. 43 % ± 20 bzw. 33 % ± 28; p = 0,009 bzw. p = 0,002 und 83 % ± 24 vs. 44 % ± 19 bzw. 34 % ± 24; p = 0,012 bzw. p = 0,003) (siehe Abbildung 14 B und C).

Der Effekt auf die kardiale Funktion von EpOME konnte bei zusätzlicher Gabe von sEH-Inhibitor AUDA nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde keine Verbesserung durch AUDA in der DiHOME-Gruppe erreicht (LVPdevp 89 % ± 30 vs. 45 % ± 30; p = 0,015 und dP/dt_{max/min} 85 % ± 25 vs. 41 % ± 27; p = 0,007 und 83 % ± 24 vs. 44 % ± 27; p = 0,012) (siehe Abbildung 14 und 15).

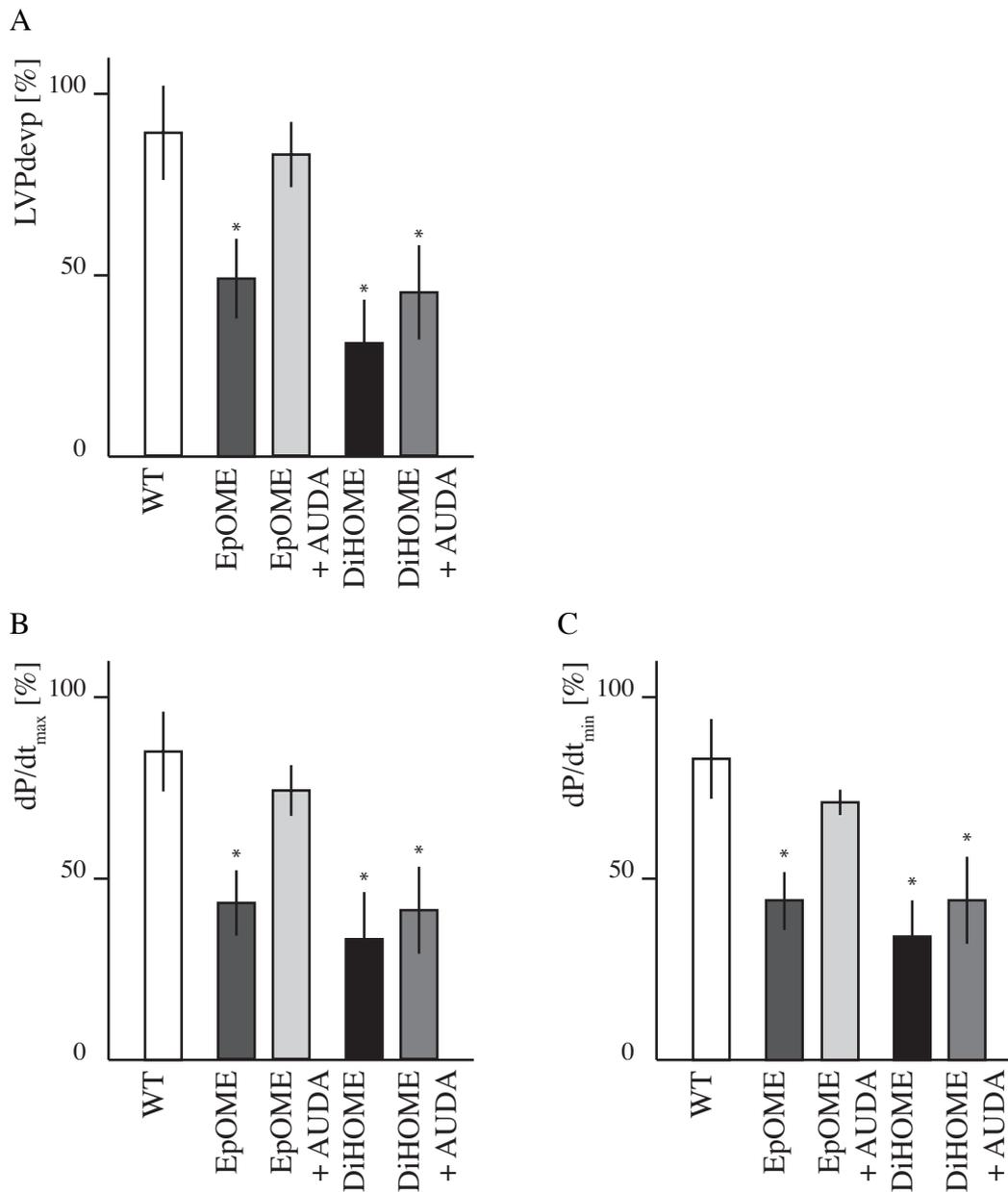
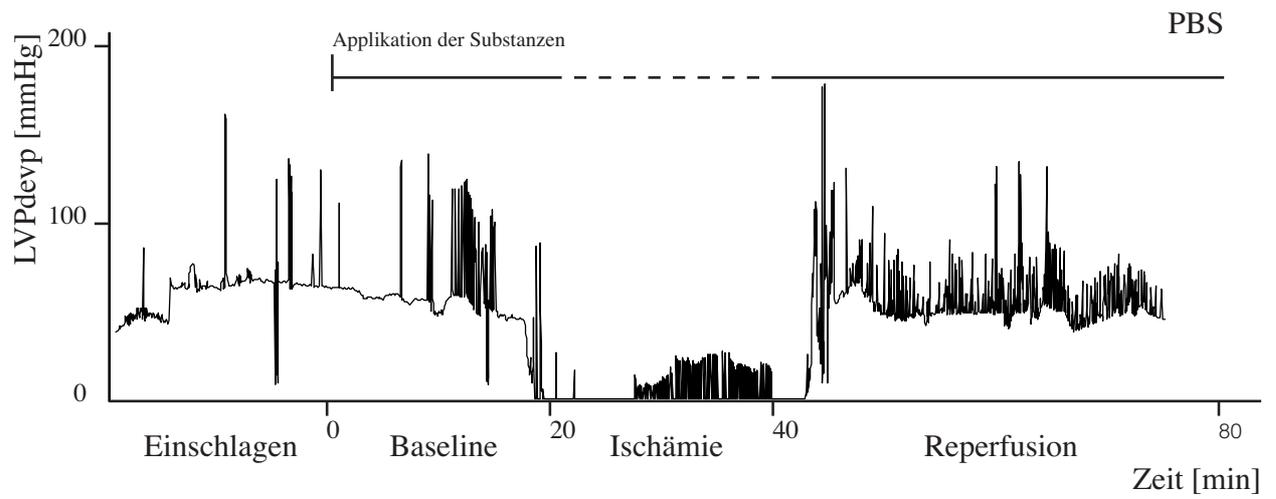
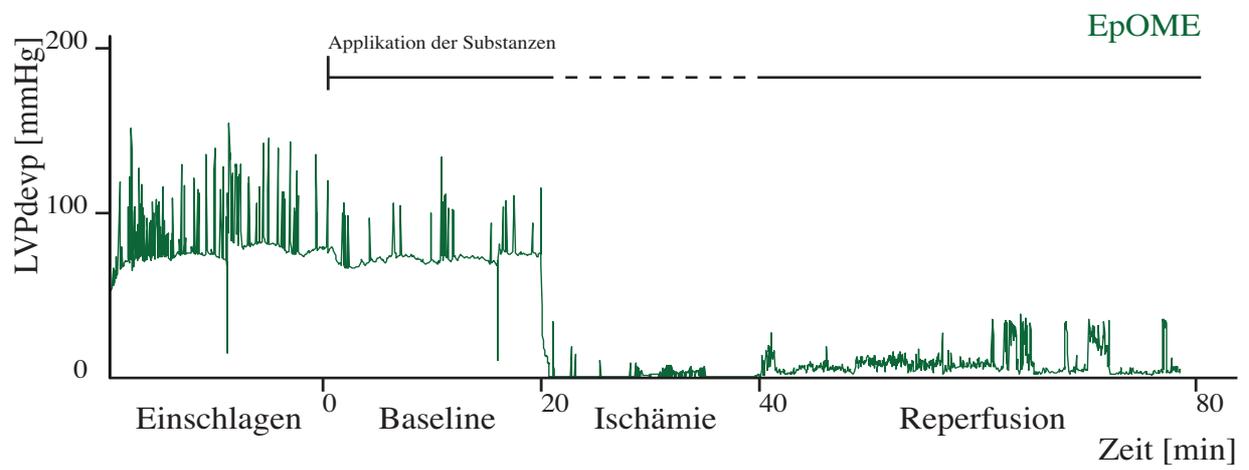


Abbildung 14: Postischämische Effekte der Metabolite EpOME und DiHOME auf den linksventrikulären Druck. A) Linksventrikuläre Druckentwicklung (LVPdevp), B) $dLVP/dt_{max}$ und C) $dLVP/dt_{min}$ jeweils in den Gruppen Wildtyp (WT), EpOME, EpOME+AUDA, DiHOME und DiHOME+AUDA. Werte sind Prozente \pm SEM, Verhältnis nach zu vor Ischämie. Signifikanzen bezogen auf die Baseline-Gruppe (WT), * = $p \leq 0,05$.

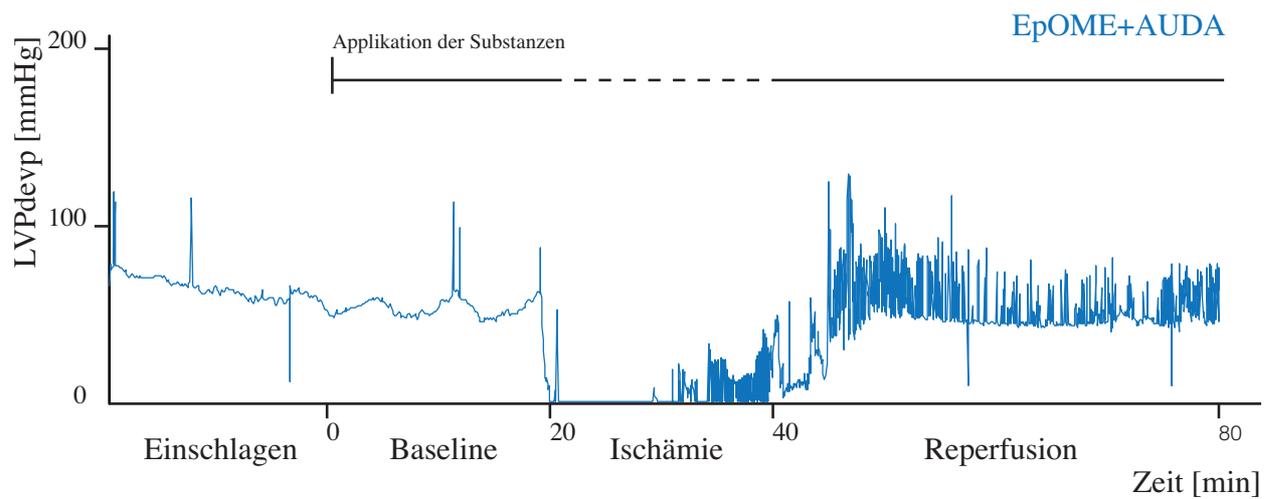
A



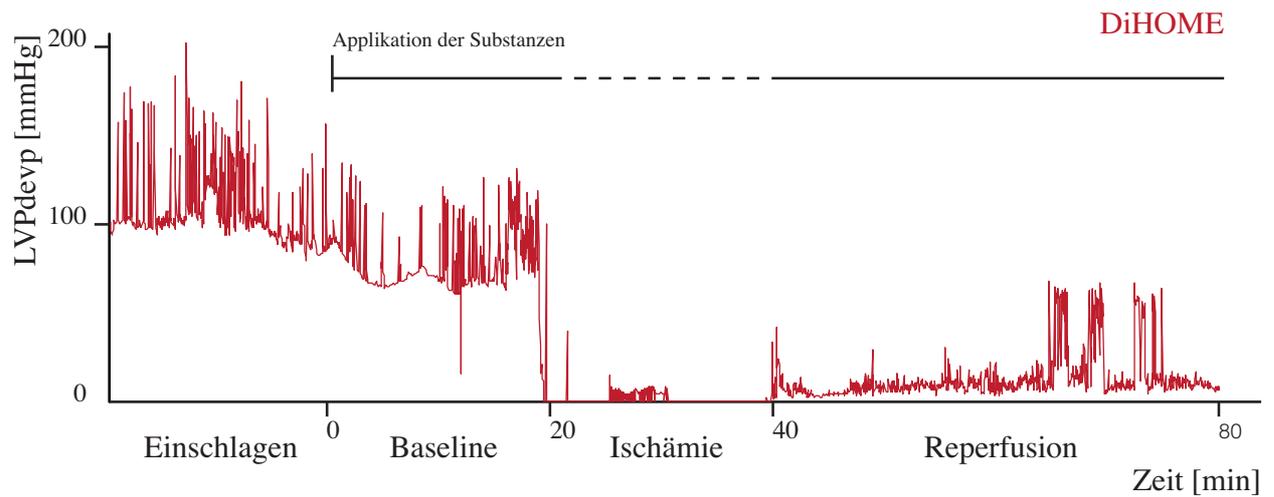
B



C



D



E

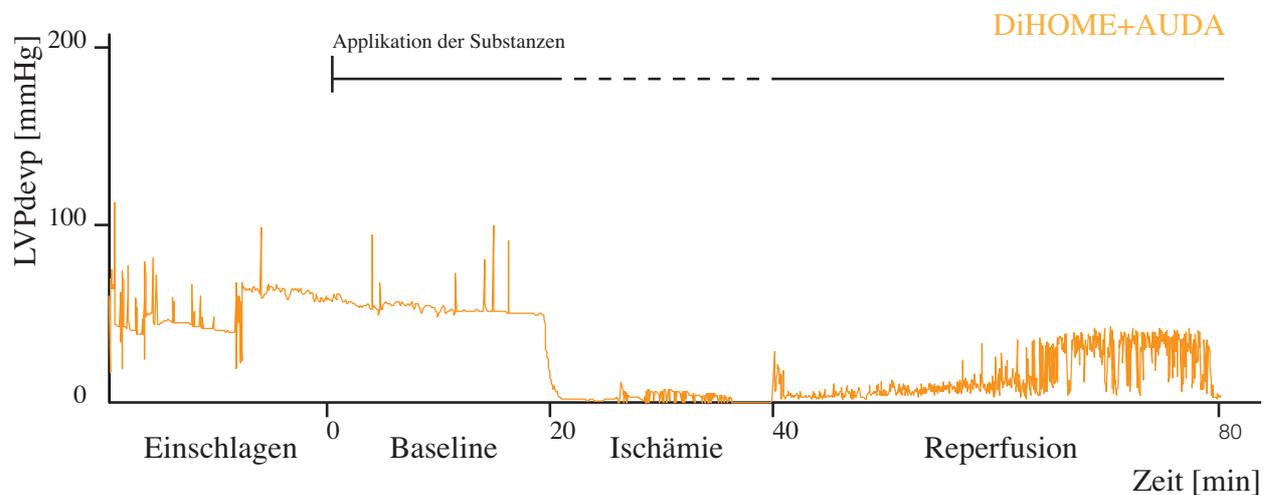


Abbildung 15: Linksventrikuläre Druckentwicklung über den zeitlichen Verlauf. Einschlagen, Baseline, no-flow Ischämie, Reperfusion. A) WT. B) EpOME. C) EpOME+AUDA. D) DiHOME. E) DiHOME+AUDA.

3.1.2. Koronarfluss

Es wurde kein statisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Koronarflusses zwischen den Gruppen WT, EpOME±AUDA und DiHOME±AUDA verzeichnet (einfaktorielle ANOVA; $p = 0,086$) (siehe Abbildung 16).

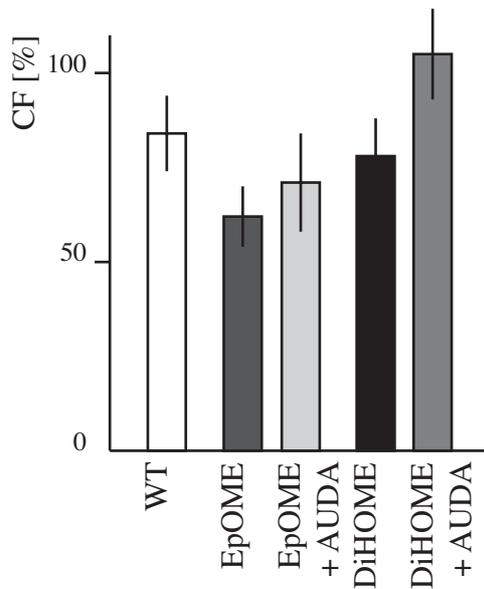


Abbildung 16: Postischämische Effekte der Metabolite EpOME und DiHOME auf den Koronarfluss in den Gruppen Wildtyp (WT), EpOME, EpOME+AUDA, DiHOME und DiHOME+AUDA. Werte sind Prozente \pm SEM, Verhältnis nach zu vor Ischämie. Keine Signifikanzen im Bezug zur Baseline (WT).

3.1.3. Herzfrequenz und Herzrhythmus

Durch Gabe von EpOME bzw. DiHOME war das Auftreten von ventrikulären Tachykardien (VT) und Kammerflimmern (VF) nach Ischämie höher als in der Kontrollgruppe, wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war (einfaktorielle ANOVA; $p = 0,221$), siehe Tabelle 7 sowie Abbildung 17 und 18.

Tabelle 7: Postischämisches Auftreten von Ventrikulären Tachykardien (VT) und Kammerflimmern (VF).

	WT		EpOME		EpOME + AUDA		DiHOME		DiHOME + AUDA	
	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
VT/VF [%]	14,1	19,7	43,9	41,1	18,8	22,7	58,9	43,9	52,5	44,9

Anteil an ventrikulären Tachykardien (VT) und Kammerflimmern (VF) während der gesamten Reperfusion. Werte sind Prozente. Wildtyp (WT); Mittelwert (M); Standardabweichung (SD).

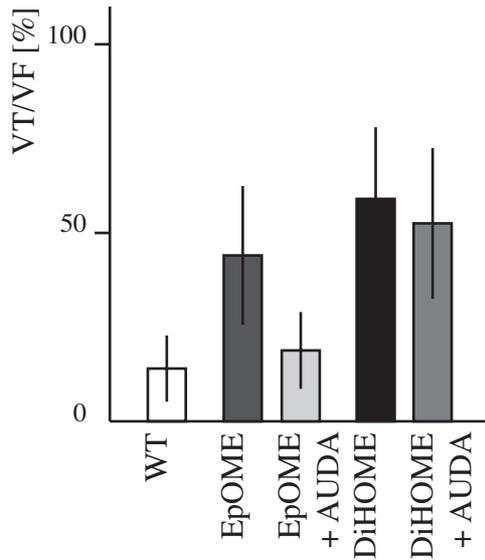


Abbildung 17: Postischämisches Auftreten von VT/VF unter EpOME und DiHOME in den Gruppen Wildtyp (WT), EpOME, EpOME+AUDA, DiHOME und DiHOME+AUDA. Werte sind Prozente \pm SEM. Keine Signifikanzen im Bezug zur Baseline (WT).

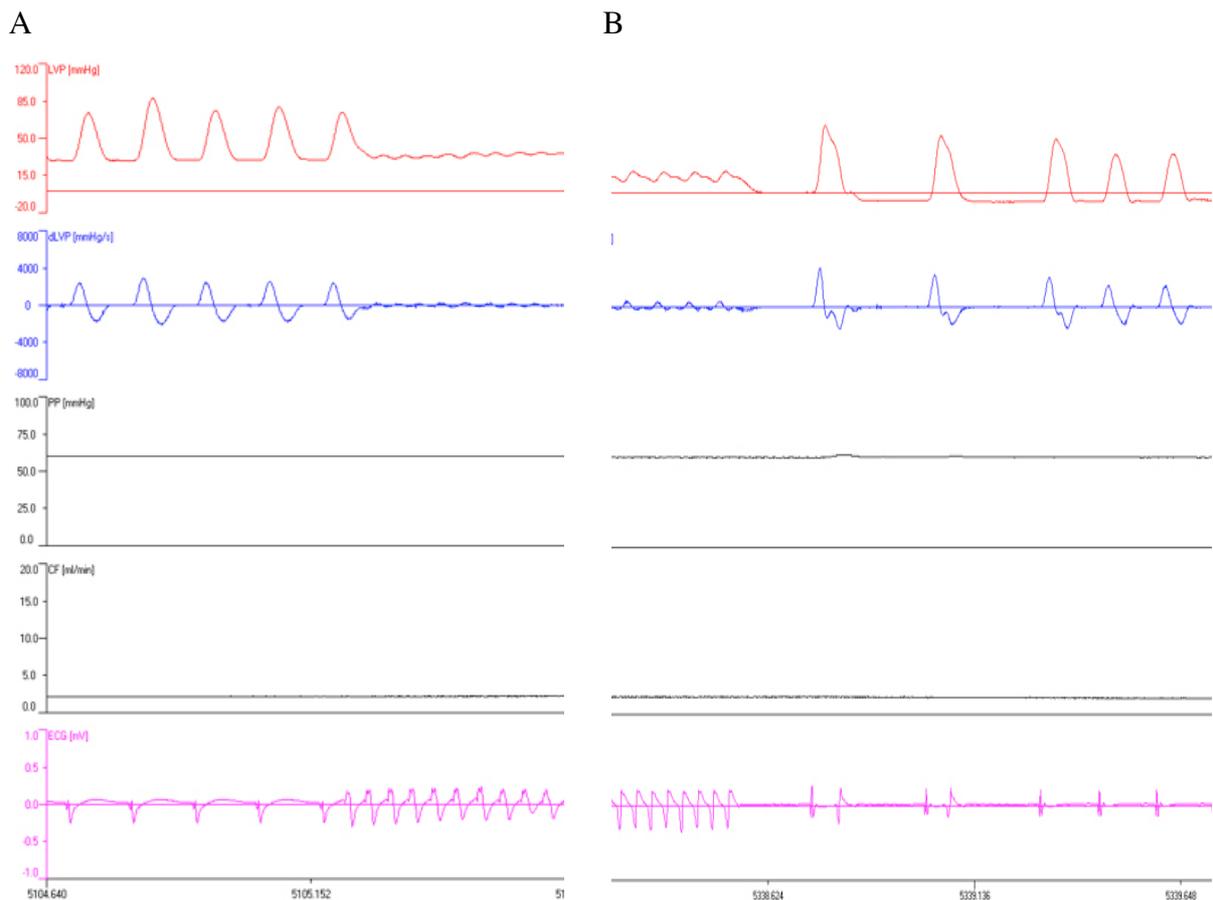


Abbildung 18: Ventrikuläre Tachykardie. A) Beginn einer VT. B) Spontankonversion einer VT in den Sinusrhythmus. Linksventrikuläre Druckentwicklung (LVP), linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dLVP), Perfusionsdruck/Aortendruck (PP), Koronarfluss (CF).

EpOME hatte keinen Einfluss auf die gemessene Herzfrequenz an sich. In der DiHOME-Gruppe zeigte sich dagegen ein signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle ($87\% \pm 10$ vs. $184\% \pm 79$; $p = 0,018$), ebenso in der DiHOME+AUDA-Gruppe ($87\% \pm 10$ vs. $160\% \pm 94$; $p = 0,050$), siehe Abbildung 19.

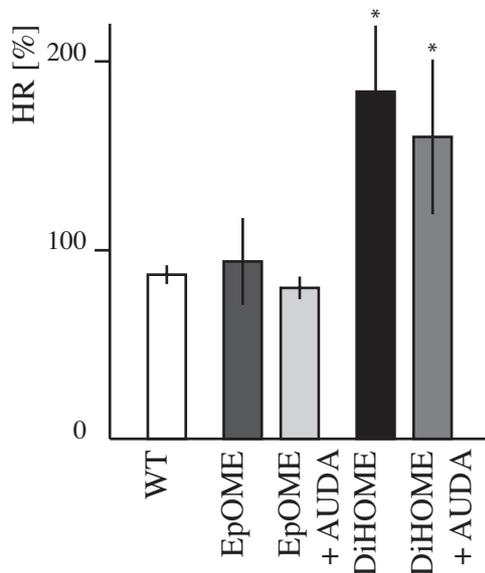


Abbildung 19: Postischämische Effekte der Metabolite EpOME und DiHOME auf die Herzfrequenz in den Gruppen WT, EpOME, EpOME+AUDA, DiHOME und DiHOME+AUDA. Werte sind Prozente \pm SEM. Verhältnis nach zu vor Ischämie. Signifikanzen bezogen auf die Baseline-Gruppe (WT), * = $p \leq 0,05$.

3.1.5. Zusammenfassung der Teilergebnisse

EpOME 100 nM und DiHOME 100 nM zeigten negative Effekte auf die Erholung der kardialen Funktion im Ischämie-Reperfusion-Modell hinsichtlich einer schlechteren linksventrikulären Druckentwicklung und Compliance. Die unter EpOME beobachteten Effekte konnten durch Hinzugabe von AUDA abgewendet werden.

Es zeigt sich in der Tendenz eine erhöhte Inzidenz von VTs und VF bei signifikant höherer Herzfrequenz unter DiHOME (\pm AUDA) postischämisch.

3.2. Effekte von EpOME und DiHOME auf die basale kardiale Funktion

Weder die Gabe von EpOME noch DiHOME hatten einen nachweisbaren Effekt auf die basale kardiale Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tabelle 8 stellt eine Übersicht über die kardialen Funktionsparameter (HR, LVPdevp_{20/40}, dP/dt_{min/max} und CF) dar.

Tabelle 8: Kardiale Funktionsparameter in der Wildtyp- und den Interventionsgruppen, basale kardiale Funktion.

Parameter	WT			EpOME 1 nM			EpOME 100 nM			DiHOME 1 nM			DiHOME 100 nM		
	n=6			n=5			n=5			n=6			n=6		
	M	SD	SE	M	SD	SE	M	SD	SE	M	SD	SE	M	SD	SE
HR [%]	89	17	7	124	79	29	113	55	25	113	42	17	96	28	11
LVPdevp [%]	84	10	4	95	28	16	75	18	8	89	25	10	106	26	11
CF [%]	83	13	5	102	22	10	93	20	9	96	22	9	124	46	19

Werte sind Prozente, Verhältnis nach zu vor Ischämie. Herzfrequenz (HR); linksventrikuläre Druckentwicklung (LVPdevp); Koronarfluss (CF); Wildtyp (WT); Mittelwert (M); Standardabweichung (SD); Standardfehler (SE). Keine Signifikanzen im Bezug zur Baseline (WT).

3.2.1. Linksventrikulärer Druck, Koronarfluss, Herzfrequenz

EpOME respektive DiHOME zeigten in den Konzentrationen 1 nM und 100nM keinen Effekt auf die untersuchten Parameter (LVPdevp, CF und HR) über den zeitlichen Verlauf von 40 min (siehe Abbildung 20).

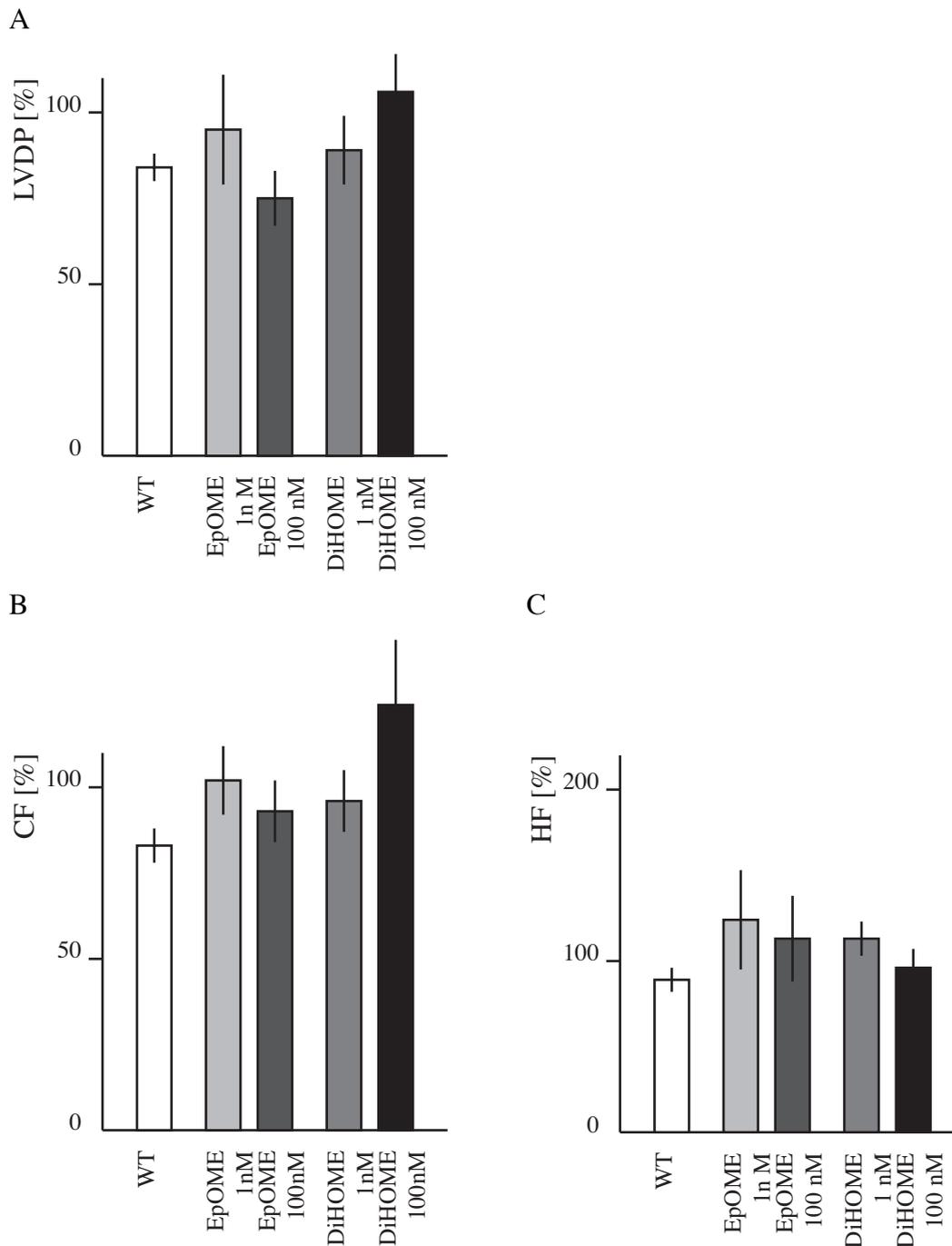


Abbildung 20: Effekte der Metabolite EpOME und DiHOME auf die basale kardiale Funktion. A) Linksventrikuläre Druckentwicklung, B) Koronarfluss, C) Herzfrequenz, jeweils in den Gruppen Wildtyp (WT), EpOME 1 nM, EpOME 100 nM, DiHOME 1 nM und DiHOME 100 nM. Werte sind Prozente \pm SEM, Verhältnis 40 min Perfusion zur Baseline. Keine Signifikanzen im Bezug zur Baseline (WT).

3.3. Metabolit-Analyse des Perfusats

In der Metabolit-Analyse wurden die Konzentrationen von EpOME und DiHOME untersucht.

Eine hohe 12,13-DiHOME-Konzentration korrelierte mittelstark mit einer geringeren linksventrikulären Druckentwicklung nach Ischämie (n = 24; Korrelation nach Pearson -0,644; p < 0,001 zweiseitig).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Konzentration von 12,13-DiHOME in der EpOME, DiHOME- und DiHOME+AUDA-Gruppe signifikant erhöht ($0,058 \pm 0,026$ ng/ml vs. $1,686 \pm 0,981$ ng/ml bzw. $11,936 \pm 5,648$ ng/ml und $7,433 \pm 4,23$ ng/ml; p = 0,021 bzw. p = 0,004 und p = 0,013), siehe Tabelle 9 und Abbildung 21. Außerdem zeigte sich ein Unterschied im Gruppenvergleich EpOME zu DiHOME und DiHOME+AUDA ($1,686 \pm 0,981$ ng/ml vs. $11,936 \pm 5,648$ ng/ml bzw. $7,433 \pm 4,236$ ng/ml; p = 0,004 bzw. p = 0,020), siehe Tabelle 9 und Abbildung 21.

Tabelle 9: Konzentration von DiHOME im Perfusat.

Parameter	WT		EpOME		EpOME +AUDA		DiHOME		DiHOME +AUDA	
	n=4	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
DiHOME [ng/ml]	0,058	0,026	1,686*	0,981	0,130	0,025	11,936*	5,648	7,433*	4,236

Werte sind Konzentrationen von 12,13-DiHOME in ng/ml im Perfusat unmittelbar nach Ischämie. Wildtyp (WT); Mittelwert (M); Standardabweichung (SD); Standardfehler (SE). Signifikanzen bezogen auf die Baseline-Gruppe (WT), * = p ≤ 0,05.

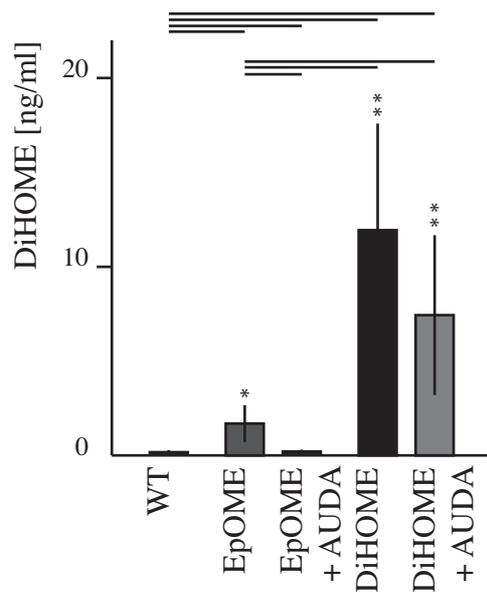


Abbildung 21: Konzentration von DiHOME im Perfusat. Werte sind Konzentrationen im Perfusat [ng/ml] \pm SD. Signifikanzen bezogen auf die Baseline-Gruppe (WT) bzw. im Vergleich zu EpOME, * = $p \leq 0,05$.

3.4. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

EpOME und DiHOME führten zu einer signifikant schlechteren Erholung der linksventrikulären Funktion im Ischämie-Reperfusion-Modell. Die beobachteten Effekte waren unter EpOME, nicht aber DiHOME, durch Inhibition der sEH abzuwenden. Eine hohe DiHOME-Konzentration im Perfusat korrelierte mit einer niedrigeren linksventrikulären Druckentwicklung nach Ischämie.

Die Metabolite EpOME und DiHOME zeigten keinen Effekt auf die basale kardiale Funktion.

4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die Effekte von 12,13-EpOME sowie dem korrespondierenden Diol 12,13-DiHOME auf die kardiale Funktion zu untersuchen. Dies sollte unter Bedingungen der myokardialen Ischämie und Reperfusion sowie im Hinblick auf die basale kardiale Aktivität erfolgen. Ferner sollte die Rolle der enzymatischen Umsetzung von EpOME zu DiHOME mittels sEH-Inhibition evaluiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass EpOME und DiHOME am Herzen eine schlechtere funktionelle Erholung hinsichtlich einer verminderten linksventrikulären Druckentwicklung nach Ischämie bewirkten. Die Applikation des sEH-Inhibitors AUDA schützte vor den negativen Effekten von EpOME.

Beide Metabolite hatten keinen Effekt auf die basale kardiale Funktion.

4.1. Effekte von EpOME und DiHOME auf die kardiale Funktion

In früheren Studien wurde gezeigt, dass EpOME und DiHOME als toxische Metabolite bei Herz- und Lungenversagen fungieren (41, 75, 77, 91). DiHOME wurde in erhöhter Konzentration bei Schweinen nach Ischämie nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass das LA-Derivat die Kontraktilität von Katzenpapillarmuskeln vermindert, eine mitochondriale Dysfunktion bewirkt und die Funktion der Na^+/K^+ -ATPase stört (10, 77, 79, 92).

Edin et al. konnten darstellen, dass sEH-defiziente Mäuse eine verbesserte Erholung der linksventrikulären Druckentwicklung aufweisen. Die Autoren machten einerseits erhöhte EET-, andererseits verminderte LA-Diol-Konzentrationen für den Effekt verantwortlich. Außerdem postulierten sie, dass eine endotheliale CYP2C8-Überexpression mit einer erhöhten DiHOME- und verminderten EET-Konzentration assoziiert sei und sich dies negativ auf die postischämische kardiale Erholung im Mausmodell auswirkte.

In dieser Studie wurde eine verminderte postischämische Kontraktilität von Mäuseherzen nachgewiesen, die mit 12,13-EpOME oder 12,13-DiHOME behandelt worden sind.

Wenn LA freigesetzt wird, z.B. im Rahmen einer Ischämie im Sinne einer Inflammationsantwort, synthetisieren CYP-Epoxygenasen die korrespondierenden Epoxide. Diese können wiederum durch die sEH weiter zu Diolen verstoffwechselt werden. Hier schützte in den Versuchen die Gabe des sEH-Inhibitors AUDA vor den unter EpOME, nicht aber den unter DiHOME beo-

bachteten Effekten. Das Ergebnis suggeriert einen sEH-abhängigen Stoffwechselweg beim kardialen Ischämie-Reperfusionsschaden bei Mäusen, wobei DiHOME die aktive Substanz mit schädigender Wirkung darstellt. Dies unterstützt die potenziell positiven Effekte einer sEH-Inhibition früherer Untersuchungen (47, 70).

Der zu Grunde liegende Mechanismus für die schädlichen Effekte von DiHOME (und EpOME) wurden in der Vergangenheit in verschiedenen Modellen diskutiert. Dabei können die Metabolite sowohl extra- als auch intrazellulär wirken, da diese in der Lage sind Plasmamembran zu passieren, sofern sie nicht an Albumin gebunden sind (81).

In den durchgeführten Experimenten konnten durch Applikation von EpOME erhöhte Endkonzentrationen von DiHOME im Perfusat erreicht werden. Dies ist durch einen gesteigerten Umsatz durch die sEH, welche in Ventrikeln, Vorhöfen und Aorta vorkommt, bei höherem Substratangebot zu erklären, was mittels Perfusat-Analyse verifiziert wurde.

In Studien am Menschen wurden EpOME- und DiHOME-Konzentrationen zwischen 10 und 100 μM im Plasma bei Verbrennungsoffer nachgewiesen (78). In Tierversuchen zeigten wesentlich niedrigere Konzentrationen Effekte auf die Funktion von Endorganen sowie einzelnen Zellen (37, 93-95). Konzentrationen zwischen 1 und 100 nM schienen daher für die Untersuchungen adäquat.

4.1.1. Postischämische Wirkung auf die linksventrikuläre Druckentwicklung

Eine verminderte linksventrikuläre Druckentwicklung kann potenziell durch eine DiHOME assoziierte gesteigerte Freisetzung von Sauerstoffradikalen bedingt sein (82). Dabei kommt es zu einem erhöhten zellulären Energiebedarf zur Stabilisierung des Membranpotenzials. Dies ist insbesondere unter ischämischen Bedingungen kritisch. Damit einher geht eine Oxidation von Proteinen, die folglich in ihrer Funktionsfähigkeit gestört werden und akkumulieren, was eine weitere Zellschädigung mit sich führt.

Ferner ist eine mitochondriale Dysfunktion und Störung der Na^+/K^+ -ATPase als Ursache für eine Verringerung der Kontraktilität möglich (10, 92, 96). Die ATP-Regeneration und die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials sind vital für die Zellfunktion. Kommt es zu einem Zusammenbruch des Membranpotenzials, können Zellsignale nicht weitergegeben werden und eine

effektive Kontraktion durch elektromechanische Kopplung, insbesondere mittels Calcium-Einstrom, wird unmöglich.

Schließlich kann auch eine Veränderung der Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen, über eine Änderungen des Membranpotenzials die Herzaktion beeinflussen, die ebenfalls als schädigender Mechanismus in Betracht gezogen werden muss (80).

4.1.2. Postischämische Wirkung auf die Herzfrequenz und den Herzrhythmus

In der DiHOME- und DiHOME-AUDA-Gruppe konnte eine höhere Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

Stimers et al. beschrieben, dass DiHOME durch Inhibition von Natriumkanälen frühe Nachdepolarisationen bewirken könne, was wiederum in ventrikulären Tachykardien, insbesondere Torsade-de-Pointes-Tachykardien, resultieren kann (80). Das mag die beobachteten Effekte in dieser Studie mit einem in der Tendenz deutlich vermehrten Auftreten ventrikulärer Tachykardien und einer dadurch im Durchschnitt höheren Herzfrequenz erklären. Interessanterweise konnte eine höhere Herzfrequenz nicht in der EpOME-Gruppe beobachtet werden. Dort waren die DiHOME-Konzentrationen in der Perfusatanalyse jedoch niedriger im Vergleich zur DiHOME- oder DiHOME+AUDA-Gruppe, wenngleich signifikant höher als in der WT-Kontrolle. Letzteres ist dadurch zu erklären, dass EpOME zunächst durch die sEH umgesetzt werden muss und die Enzymaktivität limitiert ist. Mutmaßlich haben bereits geringere DiHOME-Konzentrationen einen negativen Effekt auf die postischämie Druckerholung, während Rhythmusstörungen erst bei höheren Konzentrationen induziert werden.

4.1.3. Rolle der löslichen Epoxidhydrolase (sEH)

Bei der Betrachtung der Effekte ist im vorliegenden Modell eine alleinige ursächliche Wirkung von EpOME bzw. DiHOME anzunehmen. In vivo wirken die Substanzen jedoch gemeinsam mit weiteren Fettsäurederivaten. Allen voran teilen sie sich Stoffwechselwege mit den AA-Abkömmlingen, den EET. Diesen wird eine antiinflammatorische Potenz sowie eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben (36-38). Der Abbau der EET erfolgt durch die sEH zu DiHEET. Eine sEH-Hemmung hat daher geringere Konzentrationen der schädigenden DiHOME und gleichzeitig höhere Konzentrationen der schützenden EET zur Folge. Sie stellt damit in zweierlei

Hinsicht einen potenziell günstigen therapeutischen Angriffspunkt dar. Dies entspricht auch den bereits publizierten Ergebnissen, in denen eine pharmakologische Inhibition bzw. ein sEH-knock-out mit einer Verschiebung des Metabolitprofils und einem Rückgang an Inflammationsmarkern assoziiert war sowie kleinere Infarktareale und eine bessere postischämische kardiale Erholung nachgewiesen werden konnten (37, 47, 69, 70, 97).

Die Rolle von EpOME und DiHOME bei der kardialen Ischämie war bislang unklar. Vorangegangene Arbeiten suggerierten eine potenzielle negative Wirkung der Metabolite im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen und kardiovaskulären Ereignissen. Im Gegensatz dazu stehen die protektiven Effekte der EET, die über gemeinsame Stoffwechselwege in enger Beziehung stehen. Dies ist die erste Studie, die beschreibt, dass EpOME und DiHOME einen alleinigen negativen Effekt auf die kardiale Erholung nach Ischämie am isolierten Herzen haben, wobei dieser durch sEH-Inhibition abwendbar ist.

4.1.4 Wirkung von EpOME und DiHOME auf die basale kardiale Funktion

Einen Effekt auf die basale kardiale Funktion hinsichtlich der erhobenen Parameter konnte in diesen Versuchen nicht beobachtet werden. Gegebenenfalls wäre bei einer wesentlich längeren Versuchsdauer eine Wirkung auf das isolierte Herz zu verzeichnen. Denkbar ist jedoch auch, dass die schädigende Wirkung nur unter bestimmten Bedingungen auftritt, wie z.B. gleichzeitiger Ischämie. Weitere Versuche sind nötig, um dies zu bestätigen.

4.2. Diskussion der Methode und Limitationen

Das isolierte, perfundierte Herz nach Langendorff als ex vivo-Modell bietet die Möglichkeit unabhängig von neurohumeralen Einflüssen des Organismus einzelne Substanzen in ihrer Wirkung zu untersuchen. Nach anfänglichen methodischen Schwierigkeiten, wie der Herstellung des Ballons für den Druckabnehmer sowie der Kanülierung der Herzen, die nach der entsprechenden Übungszeit überwunden wurden, konnten verlässliche Daten erhoben werden. Sicher sind der Methode gewisse Grenzen gesetzt, insbesondere hinsichtlich einer Ödembildung bei Verwendung kristalloider Lösungen. Dadurch ist die Versuchsdauer auf einige wenige Stunden begrenzt, sodass Langzeiteffekte nicht untersucht werden können. In den hier durchgeführten Versuchen

konnte eine visuelle Ödematisierung am Ende der Ischämie-Reperfusion-Versuche beobachtet werden, welche durch die Dauer des Versuchs, aber auch durch die induzierte Ischämie bedingt sein können.

Insgesamt stellt das isolierte, perfundierte Herz aber eine exzellente Möglichkeit zur Testung pharmakologischer Einflüsse auf die physiologischen Eigenschaften des Herzens dar.

Bekanntlich existieren die beiden Regioisomere 9,10- und 12,13-EpOME sowie 9,10- und 12,13-DiHOME. Ob diesen Isomeren nochmals eine unterschiedliche biologische Wirkung zugesprochen werden muss, ist bislang nicht klar. In jedem Fall zeigen sich Unterschiede in der endogenen Produktion und damit im Verhältnis dieser (37, 43, 44, 47). Nachweise in Bezug auf eine unterschiedlich starke Wirkung gibt es für andere LA- und AA-Derivate (22, 28, 98, 99). Ob dies auch für EpOME und DiHOME zutrifft, war nicht Gegenstand der aktuellen Arbeit, sollte jedoch in der Zukunft geprüft werden.

Die hier durchgeführten Grundlagenversuche wurden an Mäusen praktiziert. Weitere Untersuchungen an einer größeren Zahl von Tieren und perspektivisch in einem anderen Tiermodell sind zur Bestätigung und weiteren Einordnung der Bedeutung der Ergebnisse nötig. Die möglichen Mechanismen auf zellulärer Ebene der hier beobachteten Effekte am ganzen Herzen bleiben spekulativ. Weitere Versuche an einzelnen Zellen sind nötig, um die zu Grunde liegenden Mechanismen auf zellulärer Ebene besser zu verstehen. In früheren Studien konnten Kinetik-Veränderungen von Ionenkanälen beschrieben werden. Hier wären weitere Untersuchungen zur Calcium-Homöostase von besonderem Interesse, z.B. mittels Calcium-Imaging oder Patch-Clamp, da diese in direktem Zusammenhang zur Kontraktilität steht.

4.8. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, allen voran die Koronare Herzkrankheit, stellen die häufigste Todesursache weltweit dar. Die Erholung der linksventrikulären Funktion nach stattgehabter Ischämie ist entscheidend für Prognose und Überleben der Patienten. Fettsäurederivate fungieren als Mediatoren während Ischämie und Reperfusion. Die durchgeführten Versuche zeigen eine relevante Rolle von EpOME und DiHOME bei der funktionellen Erholung nach induzierter Ischämie am Mäuseherzen auf. EpOME und DiHOME verursachen eine verminderte postischämi-

sche linksventrikuläre Druckentwicklung. DiHOME ist nach Ischämie assoziiert mit einer höheren Herzfrequenz und möglicherweise mit dem vermehrten Auftreten ventrikulärer Tachykardien. Interessanterweise sind die beobachteten negativen Effekte unter EpOME durch sEH-Inhibition abwendbar. Das Enzym stellt somit einen potenziellen therapeutischen Angriffspunkt beim kardialen Ischämie-Reperfusionsschaden dar.

Bibliographie

1. Pagidipati NJ, Gaziano TA. Estimating deaths from cardiovascular disease: a review of global methodologies of mortality measurement. *Circulation*. 2013;127(6):749-56.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Despres JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW, Turner MB. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;131(4):e29-322.
3. Cleland JG, Torabi A, Khan NK. Epidemiology and management of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the aftermath of a myocardial infarction. *Heart*. 2005;91 Suppl 2:ii7-13; discussion ii31, ii43-8.
4. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002;53(1):31-47.
5. McNaught AD, Wilkinson A. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997.
6. Schuchardt JP, Schmidt S, Kressel G, Dong H, Willenberg I, Hammock BD, Hahn A, Schebb NH. Comparison of free serum oxylipin concentrations in hyper- vs. normolipidemic men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013;89(1):19-29.
7. Cistola DP, Hamilton JA, Jackson D, Small DM. Ionization and phase behavior of fatty acids in water: application of the Gibbs phase rule. *Biochemistry*. 1988;27(6):1881-8.
8. Elias AW, Chapman D, Ewing DF. Phospholipid phase transitions. Effects of n-alcohols, n-monocarboxylic acids, phenylalkyl alcohols and quaternary ammonium compounds. *Biochimica et biophysica acta*. 1976;448(2):220-30.
9. Das UN. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology journal*. 2006;1(4):420-39.
10. Ha J, Dobretsov M, Kurten RC, Grant DF, Stimers JR. Effect of linoleic acid metabolites on Na(+)/K(+) pump current in N20.1 oligodendrocytes: role of membrane fluidity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;182(1):76-83.
11. Kang JX, Leaf A. Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na⁺ channels by directly binding to the channel proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(8):3542-6.
12. Xiao YF, Kang JX, Morgan JP, Leaf A. Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(24):11000-4.
13. Bogdanov KY, Spurgeon HA, Vinogradova TM, Lakatta EG. Modulation of the transient outward current in adult rat ventricular myocytes by polyunsaturated fatty acids. *The American journal of physiology*. 1998;274(2 Pt 2):H571-9.
14. Crumb WJ, Jr., Munfakh N, Heck HA, Harrison LH, Jr. Fatty acid block of the transient outward current in adult human atrium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1999;289(1):386-91.
15. Huang JM, Xian H, Bacaner M. Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(14):6452-6.
16. Xiao YF, Gomez AM, Morgan JP, Lederer WJ, Leaf A. Suppression of voltage-gated L-type Ca²⁺ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(8):4182-7.
17. Ordway RW, Singer JJ, Walsh JV, Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends in neurosciences*. 1991;14(3):96-100.
 18. Lamers JM, Hulsmann WC. Inhibition of (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase of heart by fatty acids. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1977;9(4):343-6.
 19. Nguyen N, Glanz D, Glaesser D. Fatty acid cytotoxicity to bovine lens epithelial cells: investigations on cell viability, ecto-ATPase, Na⁺(+), K⁺(+)-ATPase and intracellular sodium concentrations. *Experimental eye research*. 2000;71(4):405-13.
 20. Owens K, Kennett FF, Weglicki WB. Effects of fatty acid intermediates on Na⁺-K⁺-ATPase activity of cardiac sarcolemma. *The American journal of physiology*. 1982;242(3):H456-61.
 21. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5548):1871-5.
 22. Spector AA, Kim HY. Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1851(4):356-65.
 23. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2011;155(2):117-30.
 24. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological reviews*. 2002;82(1):131-85.
 25. Spector AA. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *Journal of lipid research*. 2009;50 Suppl:S52-6.
 26. Wong PY, Lin KT, Yan YT, Ahern D, Iles J, Shen SY, Bhatt RK, Falck JR. 14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14(R),15(S)-EET) receptor in guinea pig mononuclear cell membranes. *Journal of lipid mediators*. 1993;6(1-3):199-208.
 27. Yang W, Tuniki VR, Anjaiah S, Falck JR, Hillard CJ, Campbell WB. Characterization of epoxyeicosatrienoic acid binding site in U937 membranes using a novel radiolabeled agonist, 20-125i-14,15-epoxyeicosa-8(Z)-enoic acid. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;324(3):1019-27.
 28. Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Progress in lipid research*. 2004;43(1):55-90.
 29. Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *Journal of lipid research*. 2000;41(2):163-81.
 30. Imig JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiological reviews*. 2012;92(1):101-30.
 31. Campbell WB, Deeter C, Gauthier KM, Ingraham RH, Falck JR, Li PL. 14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid relaxes bovine coronary arteries by activation of K(Ca) channels. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;282(5):H1656-64.
 32. Bellien J, Joannides R, Richard V, Thuillez C. Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: a promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacology & therapeutics*. 2011;131(1):1-17.
 33. Minuz P, Jiang H, Fava C, Turolo L, Tacconelli S, Ricci M, Patrignani P, Morganti A, Lechi A, McGiff JC. Altered release of cytochrome p450 metabolites of arachidonic acid in renovascular disease. *Hypertension*. 2008;51(5):1379-85.
 34. Campbell WB, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):881-95.

35. Monti J, Fischer J, Paskas S, Heinig M, Schulz H, Gosele C, Heuser A, Fischer R, Schmidt C, Schirdewan A, Gross V, Hummel O, Maatz H, Patone G, Saar K, Vingron M, Weldon SM, Lindpaintner K, Hammock BD, Rohde K, Dietz R, Cook SA, Schunck WH, Luft FC, Hubner N. Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease. *Nature genetics*. 2008;40(5):529-37.
36. Ai D, Pang W, Li N, Xu M, Jones PD, Yang J, Zhang Y, Chiamvimonvat N, Shyy JY, Hammock BD, Zhu Y. Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(2):564-9.
37. Edin ML, Wang Z, Bradbury JA, Graves JP, Lih FB, DeGraff LM, Foley JF, Torphy R, Ronnekleiv OK, Tomer KB, Lee CR, Zeldin DC. Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxygenase CYP2C8 increases susceptibility to ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart. *FASEB J*. 2011;25(10):3436-47.
38. Seubert J, Yang B, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Gabel S, Gooch R, Foley J, Newman J, Mao L, Rockman HA, Hammock BD, Murphy E, Zeldin DC. Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and p42/p44 MAPK pathway. *Circulation research*. 2004;95(5):506-14.
39. Inceoglu B, Wagner K, Schebb NH, Morisseau C, Jinks SL, Ulu A, Hegedus C, Rose T, Brosnan R, Hammock BD. Analgesia mediated by soluble epoxide hydrolase inhibitors is dependent on cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5093-7.
40. De Taeye BM, Morisseau C, Coyle J, Covington JW, Luria A, Yang J, Murphy SB, Friedman DB, Hammock BB, Vaughan DE. Expression and regulation of soluble epoxide hydrolase in adipose tissue. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2010;18(3):489-98.
41. Sugiyama S, Hayakawa M, Nagai S, Ajioka M, Ozawa T. Leukotoxin, 9, 10-epoxy-12-octadecenoate, causes cardiac failure in dogs. *Life sciences*. 1987;40(3):225-31.
42. Hayakawa M, Kosaka K, Sugiyama S, Yokoo K, Aoyama H, Izawa Y, Ozawa T. Proposal of leukotoxin, 9,10-epoxy-12-octadecenoate, as a burn toxin. *Biochemistry international*. 1990;21(3):573-9.
43. Bylund J, Ericsson J, Oliw EH. Analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic and linoleic acids by liquid chromatography-mass spectrometry with ion trap MS. *Analytical biochemistry*. 1998;265(1):55-68.
44. Moran JH, Mitchell LA, Bradbury JA, Qu W, Zeldin DC, Schnellmann RG, Grant DF. Analysis of the cytotoxic properties of linoleic acid metabolites produced by renal and hepatic P450s. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;168(3):268-79.
45. Moghaddam MF, Grant DF, Cheek JM, Greene JF, Williamson KC, Hammock BD. Bioactivation of leukotoxins to their toxic diols by epoxide hydrolase. *Nat Med*. 1997;3(5):562-6.
46. Thompson DAH, B. D. Dihydroxyoctadecamonoenoate esters inhibit the neutrophil respiratory burst. *J Biosci*. 2007;32(2):279-91.
47. Chaudhary KR, Zordoky BN, Edin ML, Alsaleh N, El-Kadi AO, Zeldin DC, Seubert JM. Differential effects of soluble epoxide hydrolase inhibition and CYP2J2 overexpression on postischemic cardiac function in aged mice. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2013;104-105:8-17.
48. Harrell MD, Stimers JR. Differential effects of linoleic Acid metabolites on cardiac sodium current. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002;303(1):347-55.
49. Moran JH, Weise R, Schnellmann RG, Freeman JP, Grant DF. Cytotoxicity of linoleic acid diols to renal proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;146(1):53-9.

50. Luria A, Weldon SM, Kabcenell AK, Ingraham RH, Matera D, Jiang H, Gill R, Morisseau C, Newman JW, Hammock BD. Compensatory mechanism for homeostatic blood pressure regulation in Ephx2 gene-disrupted mice. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(5):2891-8.
51. Morisseau C, Hammock BD. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2005;45:311-33.
52. Marowsky A, Burgener J, Falck JR, Fritschy JM, Arand M. Distribution of soluble and microsomal epoxide hydrolase in the mouse brain and its contribution to cerebral epoxyeicosatrienoic acid metabolism. *Neuroscience*. 2009;163(2):646-61.
53. Sura P, Sura R, Enayetallah AE, Grant DF. Distribution and expression of soluble epoxide hydrolase in human brain. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2008;56(6):551-9.
54. Larsson C, White I, Johansson C, Stark A, Meijer J. Localization of the human soluble epoxide hydrolase gene (EPHX2) to chromosomal region 8p21-p12. *Human genetics*. 1995;95(3):356-8.
55. Decker M, Arand M, Cronin A. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Archives of toxicology*. 2009;83(4):297-318.
56. Grant DF, Spearow JL, Storms DH, Edelhoff S, Adler DA, Disteché CM, Taylor BA, Hammock BD. Chromosomal mapping and expression levels of a mouse soluble epoxide hydrolase gene. *Pharmacogenetics*. 1994;4(2):64-72.
57. Chawengsub Y, Aggarwal NT, Nithipatikom K, Gauthier KM, Anjaiah S, Hammock BD, Falck JR, Campbell WB. Identification of 15-hydroxy-11,12-epoxyeicosatrienoic acid as a vasoactive 15-lipoxygenase metabolite in rabbit aorta. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294(3):H1348-56.
58. Gomez GA, Morisseau C, Hammock BD, Christianson DW. Structure of human epoxide hydrolase reveals mechanistic inferences on bifunctional catalysis in epoxide and phosphate ester hydrolysis. *Biochemistry*. 2004;43(16):4716-23.
59. Luo B, Norris C, Bolstad ES, Knecht DA, Grant DF. Protein quaternary structure and expression levels contribute to peroxisomal-targeting-sequence-1-mediated peroxisomal import of human soluble epoxide hydrolase. *Journal of molecular biology*. 2008;380(1):31-41.
60. Newman JW, Morisseau C, Hammock BD. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Progress in lipid research*. 2005;44(1):1-51.
61. Morisseau C, Inceoglu B, Schmelzer K, Tsai HJ, Jinks SL, Hegedus CM, Hammock BD. Naturally occurring monoepoxides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are bioactive antihyperalgesic lipids. *Journal of lipid research*. 2010;51(12):3481-90.
62. Newman JW, Morisseau C, Harris TR, Hammock BD. The soluble epoxide hydrolase encoded by EPXH2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(4):1558-63.
63. Zhang D, Xie X, Chen Y, Hammock BD, Kong W, Zhu Y. Homocysteine upregulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo. *Circulation research*. 2012;110(6):808-17.
64. Fornage M, Hinojos CA, Nurowska BW, Boerwinkle E, Hammock BD, Morisseau CH, Doris PA. Polymorphism in soluble epoxide hydrolase and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;40(4):485-90.
65. Saito S, Iida A, Sekine A, Eguchi C, Miura Y, Nakamura Y. Seventy genetic variations in human microsomal and soluble epoxide hydrolase genes (EPHX1 and EPHX2) in the Japanese population. *Journal of human genetics*. 2001;46(6):325-9.
66. Wutzler A, Kestler C, Perrot A, Loehr L, Huemer M, Parwani AS, Attanasio P, Ozcelik C, Schunck WH, Gollasch M, Haverkamp W, Boldt LH. Variations in the human soluble

epoxide hydrolase gene and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation. *International journal of cardiology*. 2013;168(4):3647-51.

67. Shen HC, Hammock BD. Discovery of inhibitors of soluble epoxide hydrolase: a target with multiple potential therapeutic indications. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(5):1789-808.

68. Imig JD. Cardiovascular therapeutic aspects of soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Cardiovascular drug reviews*. 2006;24(2):169-88.

69. Li N, Liu JY, Timofeyev V, Qiu H, Hwang SH, Tuteja D, Lu L, Yang J, Mochida H, Low R, Hammock BD, Chiamvimonvat N. Beneficial effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors in myocardial infarction model: Insight gained using metabolomic approaches. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;47(6):835-45.

70. Motoki A, Merkel MJ, Packwood WH, Cao Z, Liu L, Iliff J, Alkayed NJ, Van Winkle DM. Soluble epoxide hydrolase inhibition and gene deletion are protective against myocardial ischemia-reperfusion injury in vivo. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;295(5):H2128-34.

71. Seubert JM. Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function. 2006.

72. Jude AR, Little JM, Bull AW, Podgorski I, Radominska-Pandya A. 13-hydroxy- and 13-oxooctadecadienoic acids: novel substrates for human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2001;29(5):652-5.

73. Street JM, Evans JE, Natowicz MR. Glucuronic acid-conjugated dihydroxy fatty acids in the urine of patients with generalized peroxisomal disorders. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(7):3507-16.

74. Sevanian A, Mead JF, Stein RA. Epoxides as products of lipid autoxidation in rat lungs. *Lipids*. 1979;14(7):634-43.

75. Ozawa T, Hayakawa M, Takamura T, Sugiyama S, Suzuki K, Iwata M, Taki F, Tomita T. Biosynthesis of leukotoxin, 9,10-epoxy-12 octadecenoate, by leukocytes in lung lavages of rat after exposure to hyperoxia. *Biochemical and biophysical research communications*. 1986;134(3):1071-8.

76. Ishizaki T, Shigemori K, Nakai T, Miyabo S, Ozawa T, Chang SW, Voelkel NF. Leukotoxin, 9,10-Epoxy-12-Octadecenoate Causes Edematous Lung Injury Via Activation of Vascular Nitric-Oxide Synthase. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1995;269(1):L65-L70.

77. Sigfried MRA, N.; Lefer, A. M.; Elisseou, E. M.; Zipkin, R.E. Direct cardiovascular actions of two metabolites of linoleic acid. *Life sciences*. 1990;46(1):427-33.

78. Kosaka K, Suzuki K, Hayakawa M, Sugiyama S, Ozawa T. Leukotoxin, a linoleate epoxide: its implication in the late death of patients with extensive burns. *Molecular and cellular biochemistry*. 1994;139(2):141-8.

79. Dudda A, Spittler G, Kobelt F. Lipid oxidation products in ischemic porcine heart tissue. *Chem Phys Lipids*. 1996;82(1):39-51.

80. Stimers JR, Dobretsov M, Hastings SL, Jude AR, Grant DF. Effects of linoleic acid metabolites on electrical activity in adult rat ventricular myocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1438(3):359-68.

81. Moran JH, Nowak G, Grant DF. Analysis of the toxic effects of linoleic acid, 12,13-cis-epoxyoctadecenoic acid, and 12,13-dihydroxyoctadecenoic acid in rabbit renal cortical mitochondria. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;172(2):150-61.

82. Viswanathan S, Hammock BD, Newman JW, Meerarani P, Toborek M, Hennig B. Involvement of CYP 2C9 in mediating the proinflammatory effects of linoleic acid in vascular endothelial cells. *J Am Coll Nutr*. 2003;22(6):502-10.

83. Cyon E. Über den Einfluss der Temperaturänderungen auf Zahl, Dauer und Stärke der Herzschläge. *Berichte über die Verhandlungen der Königlich Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. Mathematisch-Physische Classe.* 1866;18:256-306.
84. Zimmer HG. The isolated perfused heart and its pioneers. *News Physiol Sci.* 1998;13:203-10.
85. Miller DJ. Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart. *The Journal of physiology.* 2004;555(Pt 3):585-7.
86. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflugers Arch.* 1895;61:291-332.
87. Gottlieb R, Magnus R. Digitalis und Herzarbeit. Nach Versuchen an überlebenden Warmblutherzen. *Path Pharmacol.* 1904;51:30-63.
88. Katz G. A new method for coronary perfusion of the mammalian heart. *Arch Int Pharmacodyn.* 1939;61:109-12.
89. Neely JR, Liebermeister H, Battersby EJ, Morgan HE. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *The American journal of physiology.* 1967;212(4):804-14.
90. Liao R, Podesser BK, Lim CC. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2012;303(2):H156-67.
91. Ishizaki T, Takahashi H, Ozawa T, Chang SW, Voelkel NF. Leukotoxin, 9,10-epoxy-12-octadecenoate causes pulmonary vasodilation in rats. *The American journal of physiology.* 1995;268(1 Pt 1):L123-8.
92. Mitchell LA, Moran JH, Grant DF. Linoleic acid, cis-epoxyoctadecenoic acids, and dihydroxyoctadecadienoic acids are toxic to Sf-21 cells in the absence of albumin. *Toxicol Lett.* 2002;126(3):187-96.
93. Greene JF, Williamson KC, Newman JW, Morisseau C, Hammock BD. Metabolism of monoepoxides of methyl linoleate: bioactivation and detoxification. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2000;376(2):420-32.
94. Sakai T, Ishizaki T, Ohnishi T, Sasaki F, Ameshima S, Nakai T, Miyabo S, Matsukawa S, Hayakawa M, Ozawa T. Leukotoxin, 9,10-epoxy-12-octadecenoate inhibits mitochondrial respiration of isolated perfused rat lung. *The American journal of physiology.* 1995;269(3 Pt 1):L326-31.
95. Thompson DA, Hammock BD. Dihydroxyoctadecamonoenoate esters inhibit the neutrophil respiratory burst. *Journal of biosciences.* 2007;32(2):279-91.
96. Sisemore MF, Zheng J, Yang JC, Thompson DA, Plopper CG, Cortopassi GA, Hammock BD. Cellular characterization of leukotoxin diol-induced mitochondrial dysfunction. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2001;392(1):32-7.
97. Seubert JM, Sinal CJ, Graves J, DeGraff LM, Bradbury JA, Lee CR, Goralski K, Carey MA, Luria A, Newman JW, Hammock BD, Falck JR, Roberts H, Rockman HA, Murphy E, Zeldin DC. Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function. *Circulation research.* 2006;99(4):442-50.
98. Cabral M, Martin-Venegas R, Moreno JJ. Differential cell growth/apoptosis behavior of 13-hydroxyoctadecadienoic acid enantiomers in a colorectal cancer cell line. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2014;307(6):G664-71.
99. Lu T, VanRollins M, Lee HC. Stereospecific activation of cardiac ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids: a structural determinant study. *Molecular pharmacology.* 2002;62(5):1076-83.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ALA	Alpha-Linolensäure
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintri-phosphat
AUDA	Adamantanylureidododecansäure
CF	Koronarfluss
COX	Cyclooxygenase
CYP	CytochromP450-Oxygenase
DGLA	Dihomogamma-Linolsäure
DHA	Docosahexaensäure
DHOA	Dihydroxyoctadecensäure
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie
DiHDPE	Dihydroxydocosapentaensäure
DiHETE	Dihydroxyeicosatriensäure
DiHODE	Dihydroxyoctadecadiensäure
DiHOME	Dihydroxyoctadecensäuremethylester
dLVP	Druckanstiegsgeschwindigkeit
DMSO	Dimethylsulfoxid
dP/dt	Druckanstiegsgeschwindigkeit
EET	Epoxyeicosatriensäure
EDHF	endothelium derived hyperpolarisation factor
EPA	Eicosapentaensäure
EpDPE	Epoxydocosapentaensäure
EpETE	Epoxyeicosatetraensäure
EpODE	Epoxyoctadecadiensäure
EOA	Epoxyoctadecensäure
EpOME	Epoxyoctadecensäuremethylester
FS	Fettsäure
GLA	Gamma-Linolsäure
HDoHE	Hydroxydocosahexaensäure
HEPE	Hydroxyeicosapentaensäure

HETE	Hydroxyeicosatetaensäure
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
HoTrE	Hydroxydocosahexaensäure
HR	Herzfrequenz
IE	Internationale Einheiten
LA	Linolsäure
LOX	Lipoxygenase
LT	Leukotrien
LV	linker Ventrikel/linksventrikulär
LVP	linksventrikulärer Druck
LVPdevp	linksventrikuläre Druckentwicklung
M	Mittelwert
mEH	microsomale Epoxidhydrolase
PBS	phosphate buffered sodium, bzw. Phosphat gepufferter Salzlösung
PG	Prostaglandin
PP	Perfusionsdruck
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
sEH	lösliche Epoxidhydrolase
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TX	Thromboxan
VF	Kammerflimmern
VT	ventrikuläre Tachykardie
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

1. Stoffwechselwege physiologisch relevanter Fettsäuren.
2. Struktur der Linolsäure.
3. Stoffwechselwege der Linolsäure und deren Produkte.
4. Struktur der Arachidonsäure.
5. Übersicht über die Stoffwechselwege von EpOME und DiHOME.
6. Struktur von 9,10-EpOME und 12,13-EpOME.
7. Struktur von 9,10-DiHOME und 12,13-DiHOME.
8. Struktur von Adamantanylureidododecansäure (AUDA).
9. Langendorff-Apparatur heute.
10. Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusion.
11. Kanüliertes Mäuserherz an Langendorff-Apparatur.
12. Schematische Darstellung des Protokolls EpOME, DiHOME, Ischämie-Reperfusion.
13. Schematische Darstellung des Protokolls EpOME, DiHOME, basale kardiale Funktion.
14. Postischämische Effekte der Metabolite EpOME und DiHOME auf den linksventrikulären Druck.
15. Linksventrikuläre Druckentwicklung über den zeitlichen Verlauf.
16. Postischämische Effekte der Metabolite EpOME und DiHOME auf den Koronarfluss.
17. Postischämisches Auftreten von VT/VF unter EpOME und DiHOME.
18. Ventrikuläre Tachykardie.
19. Postischämische Effekte der Metabolite EpOME und DiHOME auf die Herzfrequenz.
20. Effekte der Metabolite EpOME und DiHOME auf die basale kardiale Funktion.
21. Konzentration von DiHOME im Perfusat.

Tabellenverzeichnis

1. Chemikalien und Reagenzien.
2. Verbrauchsmaterialien.
3. Geräte.
4. Software.
5. Krebs-Henseleit-Puffer.
6. Kardiale Funktionsparameter in der Wildtyp- und den Interventionsgruppen im Ischämie-Reperfusion-Versuch.
7. Postischämisches Auftreten von VT/VF.
8. Kardiale Funktionsparameter in der Wildtyp- und den Interventionsgruppen, basale kardiale Funktion.
9. Konzentrationen von DiHOME im Perfusat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Marwin Jonas Bannehr, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Effekte der Linolsäurederivate 12,13-Epoxyoctadecensäure(-methylester) und 12,13-Dihydroxyoctadecensäure(-methylester) auf das isolierte murine Herz“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE – www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Marwin Bannehr

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Journalpublikationen

Effects of propofol on ventricular repolarization and incidence of malignant arrhythmias in adults.

Wutzler A, De Asmundis C, Matsuda H, Bannehr M, Loehr L, Voelk K, Jungmann J, Huemer M, Attanasio P, Parwani A, Boldt LH, Brugada P, Haverkamp W.

J Electrocardiol. 2018 Mar - Apr;51(2):170-174. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2017.11.003. Epub 2017 Nov 11.

PMID: 29174097

Improvement of lay rescuer chest compressions with a novel audiovisual feedback device : A randomized trial.

Wutzler A, von Ulmenstein S, Bannehr M, Völk K, Förster J, Storm C, Haverkamp W.

Med Klin Intensivmed Notfmed. 2017 Apr 4. doi: 10.1007/s00063-017-0278-9.

PMID: 28378150

Performance of chest compressions with the use of a new audio-visual feedback device: a randomized manikin study in health care professionals.

Wutzler A, Bannehr M, von Ulmenstein S, Loehr L, Förster J, Kühnle Y, Finn A, Storm C, Haverkamp W.

Resuscitation. 2015 Feb;87:81-5. doi: 10.1016/j.resuscitation.2014.10.004. Epub 2014 Oct 17.

PMID: 25449342

The use of direct oral anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation: a study on physicians' perspective and preferences.

Wutzler A, Bannehr M, Pöhlmann AC, Haverkamp W.

Int J Cardiol. 2014 Jul 15;175(1):188-91. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.245. Epub 2014 Apr 29.

PMID: 24814893

Poster und Vorträge mit Abstractveröffentlichungen

Post-procedural Tricuspid Regurgitation predicts long-term survival in patients undergoing Percutaneous Mitral Valve Repair.

Bannehr M, Löbe U, Neuß M, Haase-Fielitz A, Butter C.

(Rapid fire Presentation ESC Congress 2018)

Linoleic acid metabolite DiHOME acts to decrease post-ischemic cardiac recovery in murine hearts.

Bannehr M, Löhr L, Haverkamp W, Schunck WH, Gollasch M, Wutzler A.

(Poster DGK Jahrestagung 2017)

Hemmung von kardialen Cav1.2-Kanälen im sEH-Knock-out Modell der Maus

Löhr L, Bannehr M, Rothe M, Fischer R, Haverkamp W, Schunck WH, Gollasch M, Wutzler A.

(Poster DGK Jahrestagung 2017)

Externes Gegenpulsationsverfahren in der ambulanten Therapie der chronischen Herzinsuffizienz senkt Herzinsuffizienzmarker NT-proBNP und verbessert die Lebensqualität

Bannehr M, Danke A, Hetzer R, Hotz H.

(Vortrag DGfK DGHTG 2016)

Effects of Propofol on Ventricular Repolarization and Incidence of Malignant Arrhythmias in Adults undergoing Electrophysiological Procedures

Wutzler A, Matsuda H, Bannehr M, Huemer M, Parwani A, Attanasio P, Blaschke F, Boldt LH, Haverkamp W.

(Poster DGK Jahrestagung 2015)

Decreased Cerebral Oxygen Saturation in Chronic Heart Failure

Wutzler A, Mareck S, Bannehr M, Boldt LH, Storm C, Haverkamp W, Blaschke F.

(Poster DGK Jahrestagung 2015)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. Alexander Wutzler für die gute Betreuung und fortwährende Unterstützung von der Durchführung der Experimente im Labor über die statistische Analyse bis hin zur finalen Version dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Maik Gollasch für die Unterstützung bei Planung, Durchführung und Auswertung dieser Arbeit und einem stets guten Rat bei Schwierigkeiten im Labor.

Herrn Prof. Dr. Michael Gotthardt sowie Herrn Prof. Dr. Ingo Morano für die Einarbeitung in die Methode sowie Nutzung der Laborräume, insbesondere der Langendorff-Apparatur.

Frau PD Dr. Anja Haase-Fielitz für Anregungen, Kommentare und Verbesserungsvorschläge bei der Entstehung der Monographie.

Lena Löhr für die gemeinsamen Stunden im Labor, sowie die Einführung in das laborexperimentelle Arbeiten.

Meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meiner Frau Carolin Bannehr, die mir auf dem langen Weg mit Höhen und Tiefen stets zur Seite stand.