

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)

Sektion Pharmakokinetik
(Leiter: Prof. Dr. Michael Weiss)

Kinetik der Metabolisierung von Ebastin im Rattenmyokard

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Susann Elitzer

geboren am 15.07.1987 in Borna

Gutachter: Prof. Dr. Michael Weiss
Prof. Dr. Ursula Müller-Werdan
Prof. Dr. Karsten Schrör, Düsseldorf

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 07.05.2013

Datum der Verteidigung: 29.04.2014

Referat

Zielsetzung: Ziel dieser Arbeit war es, erste pharmakokinetische Daten zur Metabolisierung von Ebastin im Herzmuskel zu liefern und darüber Hinweise auf die Aktivität der myokardialen CYP 2J zu erhalten. Dazu wurde, unter Verwendung einer pharmakokinetischen-pharmakodynamischen Modellierung, die Kinetik der Metabolisierung von Ebastin im Herzmuskel unter Normalbedingungen als auch unter verschiedenen Behandlungen untersucht.

Methoden: Für alle Versuchsreihen wurden isoliert perfundierte Rattenherzen in einer rezirkulierenden Langendorff-Versuchsapparatur verwendet. Die Experimente erfolgten dabei unter Kontroll-Bedingungen, mit verändertem Perfusionsmedium, nach Hypoxie-Einwirkung, nach Isoprenalin-Gabe und unter Isoprenalin-induzierter myokardialer Hypertrophie. Abschließend wurde die Wirkung eines CYP 2J-Hemmers allein sowie zusammen mit Ebastin getestet. In den Perfusatproben wurde die Konzentration von Ebastin und dessen Metaboliten, Hydroxyebastin und Carebastin, bestimmt. Die Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung eines Kompartiment-Modells. Dabei wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Metabolisierung für die Hydroxyebastin-Bildung, k_{eh} , die Carebastin-Bildung, k_{hc} , sowie die Carebastin-Metabolisierung, k_{cm} , bestimmt. Außerdem wurde der Zeitverlauf der negativ inotropen Wirkung in Bezug zu der myokardialen Ebastin-Konzentration gesetzt, um die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zu ermitteln.

Ergebnisse: Ebastin wurde zu Hydroxyebastin und dann zu Carebastin metabolisiert. Die Hypoxie-Einwirkung führte zu signifikanten Änderungen der Metabolisierungs-Parameter mit Abnahme von k_{eh} und Zunahme von k_{hc} und k_{cm} . Nach akuter Isoprenalin-Wirkung kam es zu einer signifikanten Reduktion bei k_{hc} und k_{cm} . In den hypertrophen Herzen zeigten sich signifikante Unterschiede in den Konzentrations-Zeit-Verläufen von Ebastin, Hydroxy- und Carebastin. In Anwesenheit des CYP 2J-Hemmers war eine Metabolisierung von Ebastin zu Hydroxyebastin nicht mehr nachweisbar.

Schlussfolgerungen: Mit Hilfe des pharmakokinetischen Kompartiment-Modells lassen sich quantitative Ergebnisse zur Metabolisierung von Ebastin im Herzmuskel gewinnen. Dabei kann Ebastin als Testsubstanz zur Beurteilung der Aktivität der myokardialen CYP 2J verwendet werden.

Elitzer, Susann: Kinetik der Metabolisierung von Ebastin im Rattenmyokard, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ebastin.....	1
1.1.1. Allgemeines.....	1
1.1.2. Metabolisierung.....	1
1.1.3. Antihistaminika	3
1.1.4. Herzwirkung der Antihistaminika	4
1.2. Cytochrom P 450.....	5
1.2.1. Allgemeines / Definition	5
1.2.2. Klassifizierung und Nomenklatur der Cytochrom P 450-Enzyme.....	6
1.3. Arachidonsäure.....	6
1.3.1. Metabolisierung durch Cyclooxygenase	7
1.3.2. Metabolisierung durch Lipoxygenase	9
1.3.3. Metabolisierung durch Cytochrom P 450	9
1.4. EETs.....	10
1.4.1. Wirkung der EETs.....	10
1.4.2. Metabolisierung der EETs.....	11
1.5. CYP 2J2	12
2. Zielstellung	15
3. Material und Methodik	16
3.1. Das Langendorff-Herz.....	16
3.1.1. Prinzip	16
3.1.2. Aufbau der Versuchsapparatur.....	17
3.1.3. Präparation der Versuchstiere	20
3.1.4. Perfusionsmedium.....	21
3.2. Modellierung und Datenanalyse.....	21
3.2.1. Pharmakokinetik.....	21
3.2.2. Pharmakodynamik.....	23
3.3. Medikamente und Chemikalien.....	23
3.4. Experimentelle Protokolle.....	24
3.4.1. Ebastin (Kontroll-Experimente)	24
3.4.2. Ebastin ohne BSA im Puffer	25
3.4.3. Ebastin nach Hypoxie.....	25

3.4.4.	Ebastin nach akuter Isoprenalin-Wirkung	25
3.4.5.	Ebastin unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie.....	25
3.4.6.	Ebastin mit CYP 2J-Hemmer und CYP 2J-Hemmer	26
3.5.	Probenmessung.....	27
3.6.	Statistische Analyse.....	27
4.	Ergebnisse	28
4.1.	Ebastin (Kontroll-Experimente)	28
4.2.	Ebastin ohne BSA im Puffer	32
4.3.	Ebastin nach Hypoxie.....	34
4.4.	Ebastin nach akuter Isoprenalin-Wirkung	40
4.5.	Ebastin unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie.....	46
4.6.	Ebastin mit CYP 2J-Hemmer und CYP 2J-Hemmer	50
5.	Diskussion	56
5.1.	Ebastin (Kontroll-Experimente)	56
5.2.	Ebastin ohne BSA im Puffer	57
5.3.	Ebastin nach Hypoxie.....	58
5.4.	Ebastin nach akuter Isoprenalin-Wirkung	60
5.5.	Ebastin unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie.....	61
5.6.	Ebastin mit CYP 2J-Hemmer und CYP 2J-Hemmer	63
5.7.	Methodendiskussion.....	64
6.	Zusammenfassung.....	67
7.	Literaturverzeichnis.....	69
8.	Thesen.....	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
$A_{ca}(t)$	Carebastin-Endmenge im Herz zum Zeitpunkt t
$A_{eb}(t)$	Ebastin-Endmenge im Herz zum Zeitpunkt t
A_{end}	Endkonzentration im Herz
$A_{hy}(t)$	Hydroxyebastin-Endmenge im Herz zum Zeitpunkt t
AIC	Akaike Information Criterion
bzw.	beziehungsweise
$C_{ca}(t)$	Carebastin-Konzentration zum Zeitpunkt t
$C_{eb}(t)$	Ebastin-Konzentration zum Zeitpunkt t
$C_{hy}(t)$	Hydroxyebastin-Konzentration zum Zeitpunkt t
CVR	koronarvaskulärer Widerstand
CYP 450	Cytochrom P450
DHETs	Dihydroeicosatriensäuren
DMSO	Dimethylsulfoxid
$E(t)$	inotroper Effekt
E_0	Grundlinien-Effekt
EC_{50}	benötigte Konzentration, um 50 % der maximalen Reaktion zu erzielen
EDHFs	endothelial derived hyperpolarizing factors
EETs	Epoxyeicosatriensäuren
EKG	Elektrokardiogramm
EM	Estimation-Maximization
et al.	(et alii), und andere
g	Gramm
h	Stunde
HETEs	Hydroxyeicosatetransäuren
HR	Herzfrequenz
k_{cm}	Geschwindigkeitskonstante der Carebastin-Metabolisierung
k_{eh}	Geschwindigkeitskonstante der Hydroxyebastin-Bildung
kg	Kilogramm
k_{hc}	Geschwindigkeitskonstante der Carebastin-Bildung
KHK	koronare Herzkrankheit
$k_{in,c}$	Carebastin-Aufnahme-Geschwindigkeitskonstante
$k_{in,e}$	Ebastin-Aufnahme-Geschwindigkeitskonstante
$k_{in,h}$	Hydroxyebastin-Aufnahme-Geschwindigkeitskonstante

$k_{\text{out,c}}$	Carebustin-Abgabe-Geschwindigkeitskonstante
$k_{\text{out,e}}$	Ebastin-Abgabe-Geschwindigkeitskonstante
$k_{\text{out,h}}$	Hydroxyebastin-Abgabe-Geschwindigkeitskonstante
LOX	Lipoxygenase
LVDP	sich entwickelnder linksventrikulärer Druck
$LVDP(t)$	LVDP zum Zeitpunkt t
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLEM	Maximum-Likelihood-Schätzung
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGHS	Prostaglandin-H-Synthase
PK/PD	Pharmakokinetik/Pharmakodynamik
PLA ₂	Phospholipase A ₂
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
tPA	tissue plasminogen activator
V_{res}	Reservoir-Volumen
%	Prozent
°C	Grad Celsius
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Ebastin

1.1.1. Allgemeines

Ebastin (4-Diphenylmethoxy-1-[3-(4-terbutylbenzoyl)-propyl]-piperidin) ist ein langwirksamer, selektiver H₁-Rezeptor-Antagonist der 2. Generation, der von Almirall SA entdeckt und entwickelt wurde (Roberts, 1998; Rico et al., 2009). Studien zu Ebastin finden in Europa seit 1988 und in den USA seit 1991 statt. Nach über 20-jährigem Einsatz in zahlreichen Ländern der Erde wurde die Sicherheit und Wirksamkeit von Ebastin ausgiebig demonstriert. Zu den klinischen Indikationen gehören beispielsweise neben der saisonalen und ganzjährigen allergischen Rhinitis auch die chronisch ideopatische Urtikaria und das allergische Asthma (Mattila und Paakkari, 1999; Hurst und Spencer, 2000; Lasseter et al., 2004; Gupta et al., 2005; Rico et al., 2009).

1.1.2. Metabolisierung

Nach oraler Gabe unterliegt Ebastin einem ausgeprägten First-Pass-Metabolismus in Leber und Dünndarm. Dabei wird das an sich wenig aktive Ebastin in seinen pharmakologisch aktiven Metaboliten Carebastin und weitere inaktive Metaboliten verstoffwechselt (Abb. 1). Verschiedene Cytochrom P450, vor allem CYP 3A und CYP 2J, sind an diesen Vorgängen beteiligt. Die wichtigsten primären Metaboliten sind Desalkyl- und Hydroxyebastin. Desalkylebastin entsteht durch N-Dealkylierung von Ebastin, katalysiert durch CYP 3A, während Hydroxyebastin durch Hydroxylierung unter Beteiligung von CYP 2J2 gebildet wird. Nach anschließender Carboxylierung durch CYP 2J2/3A4 entsteht aus Hydroxyebastin der aktive Metabolit Carebastin. Dieser wird durch N-Dealkylierung (CYP 3A4) zu Desalkylebastin abgebaut (Hashizume et al., 1998; Hashizume et al., 2001; Hashizume et al., 2002; Liu et al., 2006).

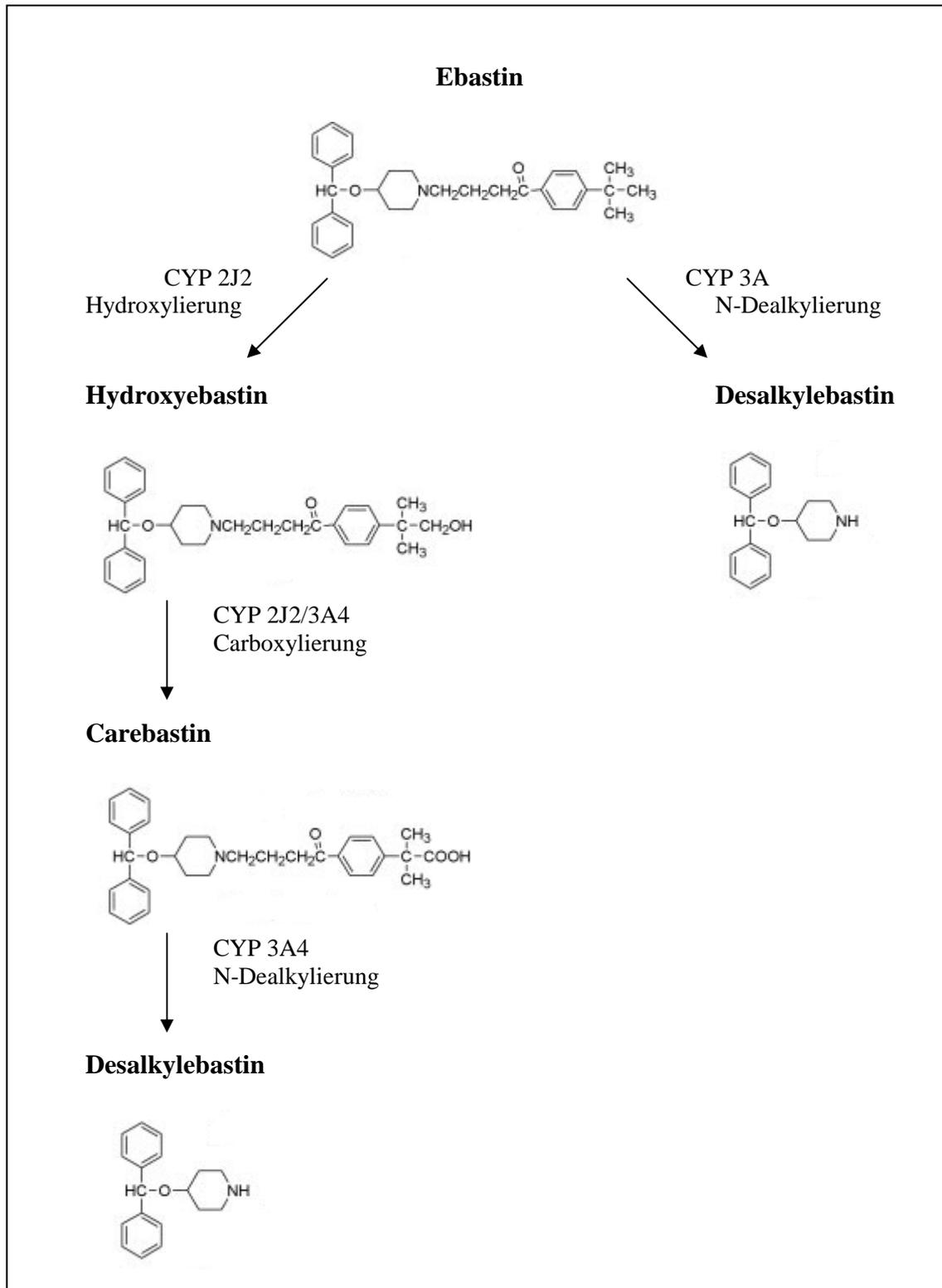


Abb. 1
 Metabolisierung von Ebastin (modifiziert nach Hashizume et al., 2001; Hashizume et al., 2002; Liu et al., 2006).

1.1.3. Antihistaminika

Histamin, einer der wichtigsten Mediatoren der allergischen Reaktion, wurde Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt (Dale und Laidlaw, 1919). 1929 erkannte Dale die Verbindung zwischen Histamin und der anaphylaktischen Reaktion (MacGlashan, 2003; Nettis et al., 2005). Das erste Antihistaminikum, 929 F (Thymo-Ethyl-Diethylamin), wurde 1937 von Bovet und Staub entdeckt (Rico et al., 2009). Im Jahr 1942 beschrieb Halpern das erste Antihistaminikum Antergan, das klinisch am Menschen eingesetzt wurde (MacGlashan, 2003; Nettis et al., 2005). Histamin vermittelt seine Wirkung über verschiedene Rezeptoren. Bislang sind vier Subtypen von Histamin-Rezeptoren beschrieben worden (H_1 , H_2 , H_3 und H_4). Sie gehören alle zu den G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (Leurs et al., 2002) und unterscheiden sich in Bezug auf Lokalisation, Second-messenger und Histamin-bindende Eigenschaften (MacGlashan, 2003). H_1 -Rezeptoren sind in den glatten Muskelzellen des Darms, der Bronchien und Blutgefäße lokalisiert. In der Regel werden alle allergischen Reaktionen durch H_1 -Rezeptoren vermittelt (Hill et al., 1997; Nettis et al., 2005). H_2 -Rezeptoren befinden sich in der Magenschleimhaut, im Uterus, im Herzen und Gehirn (Hill et al., 1997). Des Weiteren kommen sie auf Entzündungszellen und auf dem Bronchialepithel vor. Die Stimulierung der H_2 -Rezeptoren führt unter anderem zu einer erhöhten Säuresekretion aus den Belegzellen im Magen (Nettis et al., 2005). H_3 -Rezeptoren sind im Gehirn, in den glatten Muskelzellen der Bronchien und in postganglionären, cholinergen Nerven in menschlichen Bronchien lokalisiert (Hill et al., 1997; Nettis et al., 2005). Auf Neutrophilen, Eosinophilen, Mastzellen und CD4+T-Lymphozyten kommen H_4 -Rezeptoren vor (Nettis et al., 2005).

Antihistaminika werden nach dem Histamin-Rezeptor, mit dem sie interagieren, bezeichnet. Ebastin gehört zur Gruppe der H_1 -Antihistaminika. Diese werden in Antihistaminika der ersten und zweiten Generation differenziert. Erstere (zum Beispiel Chlorpheniramin, Diphenhydramin, Promethazin) sind stark lipophil, besitzen ein geringes Molekulargewicht und sind in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. Sie binden an zerebrale H_1 -Rezeptoren und verursachen so ihre bekannten Nebenwirkungen im Zentralnervensystem wie Sedierung, Schwindel, Konzentrationsstörungen und Beeinträchtigung der Reaktionszeiten (Mattila und Paakkari, 1999; Tagliatalata und Annunziato, 2000; Nettis et al., 2005; Camelo-Nunes, 2006). Außerdem werden sie rasch resorbiert und metabolisiert, weshalb sie drei- oder viermal am Tag eingenommen werden müssen (Camelo-Nunes, 2006). Ein weiterer Nachteil der Antihistaminika der ersten Generation ist ihr Mangel an Selektivität für den H_1 -Rezeptor. So sind sie in der Lage, an Acetylcholin- und Serotonin-Rezeptoren sowie Calcium-Kanäle zu binden (Kubo et al., 1987; Hayashi und Hashimoto, 1999; Nettis et al., 2005). Aufgrund ihrer Fähigkeit an muskarine Rezeptoren binden zu können, rufen sie anticholinerge Effekte wie

Tachykardie, Mundtrockenheit und Harnretention hervor (Kubo et al., 1987; Mattila und Paakkari, 1999; Camelo-Nunes, 2006).

Im Gegensatz dazu besitzen Antihistaminika der zweiten Generation (zum Beispiel Terfenadin, Loratadin, Cetirizin, Ebastin) eine lang anhaltende Wirkung mit minimalen Nebenwirkungen. Sie haben ein größeres Molekulargewicht, sind sehr hydrophob und gering lipophil, überqueren die Blut-Hirn-Schranke nicht und besitzen eine niedrigere Affinität für zerebrale H₁-Rezeptoren (Mattila und Paakkari, 1999; Taglialatela und Annunziato, 2000; Camelo-Nunes, 2006). Des Weiteren verfügen sie über eine höhere Selektivität für H₁-Rezeptoren mit geringer oder gar keiner Affinität zu muskarinen cholinergen Rezeptoren (Taglialatela und Annunziato, 2000; Holgate et al., 2003). Aufgrund ihrer verlängerten Halbwertszeit müssen Antihistaminika der zweiten Generation nur ein- oder zweimal am Tag verabreicht werden (Camelo-Nunes, 2006). Außerdem zeigen einige von ihnen eine anti-inflammatorische Wirkung (Hayashi und Hashimoto, 1999; Leurs et al., 2002; Holgate et al., 2003). Trotz der vielen Vorteile der Antihistaminika der zweiten Generation sind auch diese nicht ohne Nebenwirkungen. Zu den wichtigsten Problemen zählt die Kardiotoxizität, die zur Rücknahme von Terfenadin und Astemizol vom Markt führte (Woosley et al., 1993; Woosley, 1996; Rico et al., 2009). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass einige der Antihistaminika der zweiten Generation zu Somnolenz führen können (Rico et al., 2009).

1.1.4. Herzwirkung der Antihistaminika

Trotz des enormen Erfolgs der Antihistaminika der zweiten Generation in der Mitte der 1980er Jahre erschienen nach einigen Jahren der weltweiten klinischen Nutzung mehrere Berichte in der Literatur, in denen von polymorphen ventrikulären Rhythmusstörungen, den sogenannten „Torsades de Pointes“, nach Verabreichung von Terfenadin und Astemizol berichtet wurde (Craft, 1986; Davies et al., 1989; Monahan et al., 1990). Beide Stoffe verursachen eine Verlängerung des QT-Intervalls im EKG aufgrund der Blockade von kardialen Kalium-Kanälen (Valenzuela et al., 1997; Ohtani et al., 1999a; Paakkari, 2002). Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Repolarisation des Herzens und erhöht das Risiko für ventrikuläre Tachykardien (Torsades de Pointes-Tachykardien) (Yap und Camm, 2003; Recanatini et al., 2005). Diese polymorphe ventrikuläre Tachykardie kann eine Synkope verursachen und schlimmstenfalls in Kammerflimmern und plötzlichem Tod enden (Yap und Camm, 2003). Allerdings ist die Inzidenz von „Torsades de Pointes“ bei Stoffen, die nicht zu den Antiarrhythmika zählen, gering (Viskin, 1999; Darpö, 2001). Sie traten vor allem bei Patienten mit erhöhten Plasmaleveln von H₁-Rezeptor-Blockern auf. Ursache dafür können eine vorsätzliche Überdosierung (Craft, 1986; Davies et al., 1989) oder ein reduzierter Arzneimittel-

Metabolismus aufgrund von Lebererkrankungen oder der gleichzeitigen Einnahme von Medikamenten wie Makrolid-Antibiotika (z.B. Erythromycin) und oralen Antimykotika (z.B. Ketoconazol), die die hepatische Metabolisierung der Antihistaminika beeinträchtigen, sein (Monahan et al., 1990; Hey et al., 1996; Mattila und Paakkari, 1999; Moss und Morganroth, 1999). Des Weiteren existieren auch verschiedene prädisponierende Faktoren für die Entwicklung von Herzrhythmusstörungen wie eine angeborene oder erworbene Verlängerung des QT-Intervalls, ischämische Herzerkrankungen, Bradykardie und Störungen des Elektrolythaushalts, vor allem Hypokaliämie und / oder Hypomagnesiämie (Woosley, 1996; Yap und Camm, 2003).

In zahlreichen Studien wurde untersucht, ob Ebastin, welches eine ähnliche chemische Struktur und pharmakokinetische Eigenschaften wie Terfenadin besitzt (Ohtani et al., 1999b), ebenfalls zu ventrikulären Rhythmusstörungen (Torsades de Pointes), wie sie nach Verabreichung von Terfenadin beobachtet worden sind, führen kann. Obwohl gezeigt wurde, dass Ebastin Kalium-Kanäle von Säugetieren hemmt (Ko et al., 1997; Valenzuela et al., 1997; Ohtani et al., 1999a) und nach intravenöser Gabe das QT-Intervall in Meerschweinchen und Ratten verlängert (Hey et al., 1996; Ohtani et al., 1999b), sind keine schweren unerwünschten kardialen Wirkungen berichtet worden (Wiseman und Faulds, 1996; Moss et al., 1999; Moss und Morganroth, 1999; Hurst und Spencer, 2000; Gillen et al., 2001; Lawrence et al., 2006).

1.2. Cytochrom P 450

1.2.1. Allgemeines / Definition

Cytochrome sind hämhaltige Oxidoreduktasen. Als Oxidoreduktasen werden Enzyme bezeichnet, die Redoxreaktionen katalysieren. Sie können in fünf Gruppen eingeteilt werden. Die Cytochrom P 450-Enzyme gehören in die Gruppe der Monooxygenasen (Löffler et al., 2006) und kommen im glatten endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien in vielen verschiedenen menschlichen Geweben vor, darunter vor allem in der Leber, im Darm, der Lunge, den Nieren und der Haut (Park, 2000). Sie haben vielfältige Aufgaben im menschlichen Körper und katalysieren unterschiedliche chemische Reaktionen. So sind sie an der Biosynthese von Steroidhormonen, der Hydroxylierung von Fettsäurederivaten und der Metabolisierung der Arachidonsäure beteiligt (Löffler et al., 2006). Auch die Hydroxylierung von Xenobiotika, darunter die meisten Medikamente, gehört zu ihren Aufgaben. An der Arzneimittel-Metabolisierung sind hauptsächlich Mitglieder der CYP 1-, CYP 2- und CYP 3-

Familien beteiligt. Diese katalysieren die Umwandlung der Medikamente in Metabolite, die über die Galle oder den Harn ausgeschieden werden können (Park, 2000).

1.2.2. Klassifizierung und Nomenklatur der Cytochrom P 450-Enzyme

Die Einteilung der Cytochrom P 450-Enzyme in verschiedene Familien erfolgt anhand ihrer Gensequenz. Cytochrom P 450, die in ihrer Gensequenz in mindestens 40 Prozent übereinstimmen, werden zu einzelnen Familien zusammengefasst. In den Unterfamilien liegt die Übereinstimmung bei mindestens 55 Prozent. Die Nomenklatur der Cytochrome (z.B. CYP 2J2) orientiert sich an ihrer Einteilung. Zunächst beginnt der Name mit den Buchstaben CYP. Die folgende erste Zahl (CYP 2J2) bezeichnet die jeweilige Familie, der folgende Großbuchstabe (CYP 2J2) die Unterfamilie. Die letzte Zahl (CYP 2J2) steht für spezifische Genprodukte (Coon et al., 1992).

1.3. Arachidonsäure

Zu den vielfältigen Aufgaben der Cytochrom P 450-Enzyme zählt unter anderem die Metabolisierung der Arachidonsäure. Die Arachidonsäure gehört zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren und ist Bestandteil vieler Phosphoglyceride. In veresterter Form befindet sie sich in Zellmembranen, aus denen sie durch die Aktivierung von Phospholipasen (z.B. zytosolische Phospholipase A₂) freigesetzt wird und so den unterschiedlichen Metabolisierungswegen zugänglich gemacht werden kann (Abb. 2) (Zeldin, 2001; Gross et al., 2005; Nithipatikom und Gross, 2010).

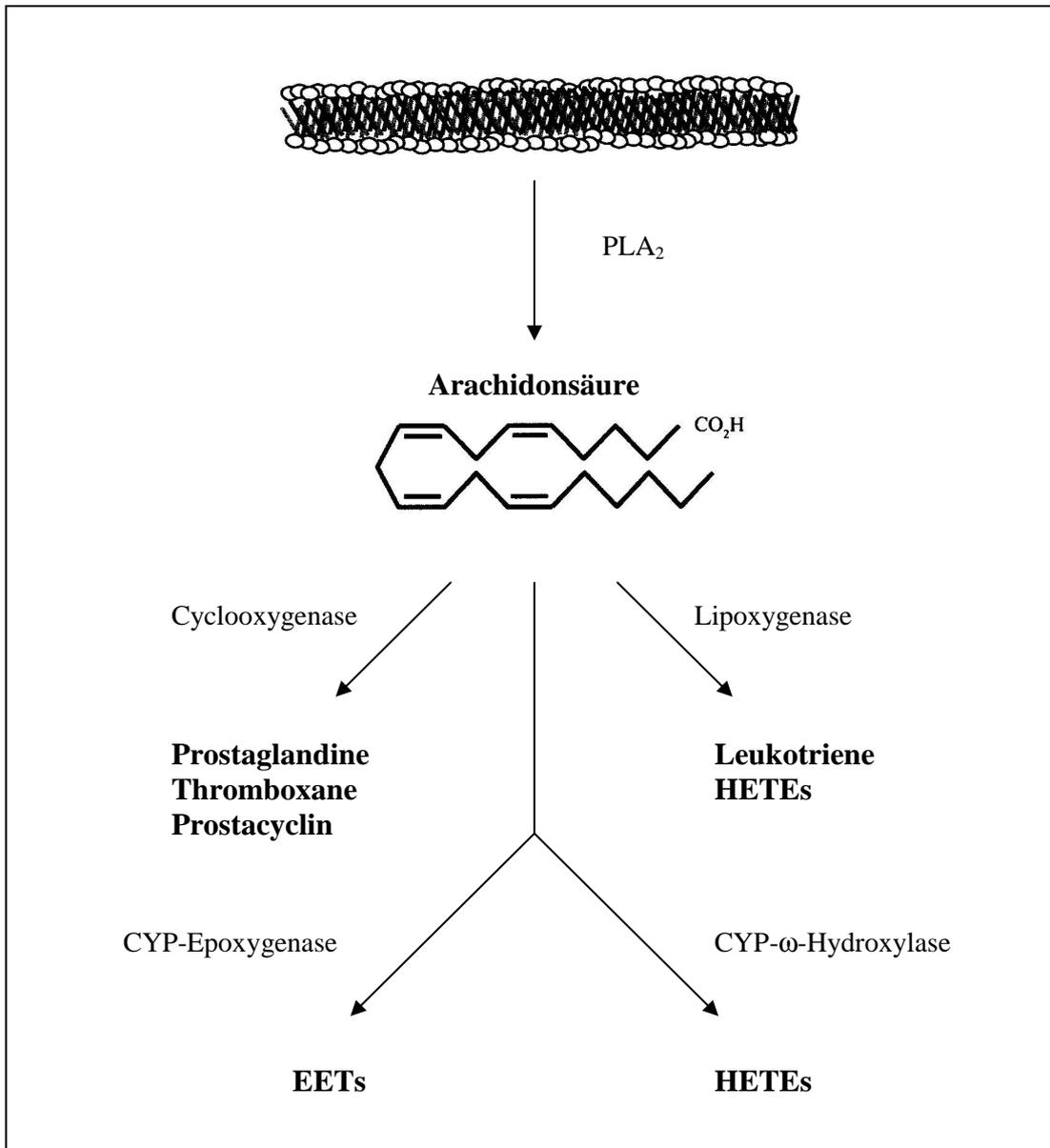


Abb. 2

Metabolisierungswege der Arachidonsäure (modifiziert aus Gross et al., 2005; Nithipatikom und Gross, 2010).

1.3.1. Metabolisierung durch Cyclooxygenase

Im ersten Schritt der Prostanoidsynthese erfolgt die Bildung von Prostaglandin H_2 (PGH_2) aus Arachidonsäure mithilfe der Prostaglandin-H-Synthase (PGHS) (Smith et al., 1996; Zeldin, 2001). In dieser sind eine Cyclooxygenase- und eine Peroxidaseaktivität enthalten. Mithilfe der Cyclooxygenase erfolgt die Metabolisierung der Arachidonsäure zu Prostaglandin G_2 , während

die Peroxidase für die anschließende Umwandlung des Prostaglandin G₂ in Prostaglandin H₂ verantwortlich ist (Löffler et al., 2006). PGH₂ dient als Vorläufer für weitere Prostaglandine, Thromboxane und Prostacyclin, die aus Prostaglandin H₂ unter Beteiligung verschiedener spezifischer Prostaglandin-Synthasen gebildet werden (Abb. 3) (Smith et al., 1996; Zeldin, 2001; Löffler et al., 2006).

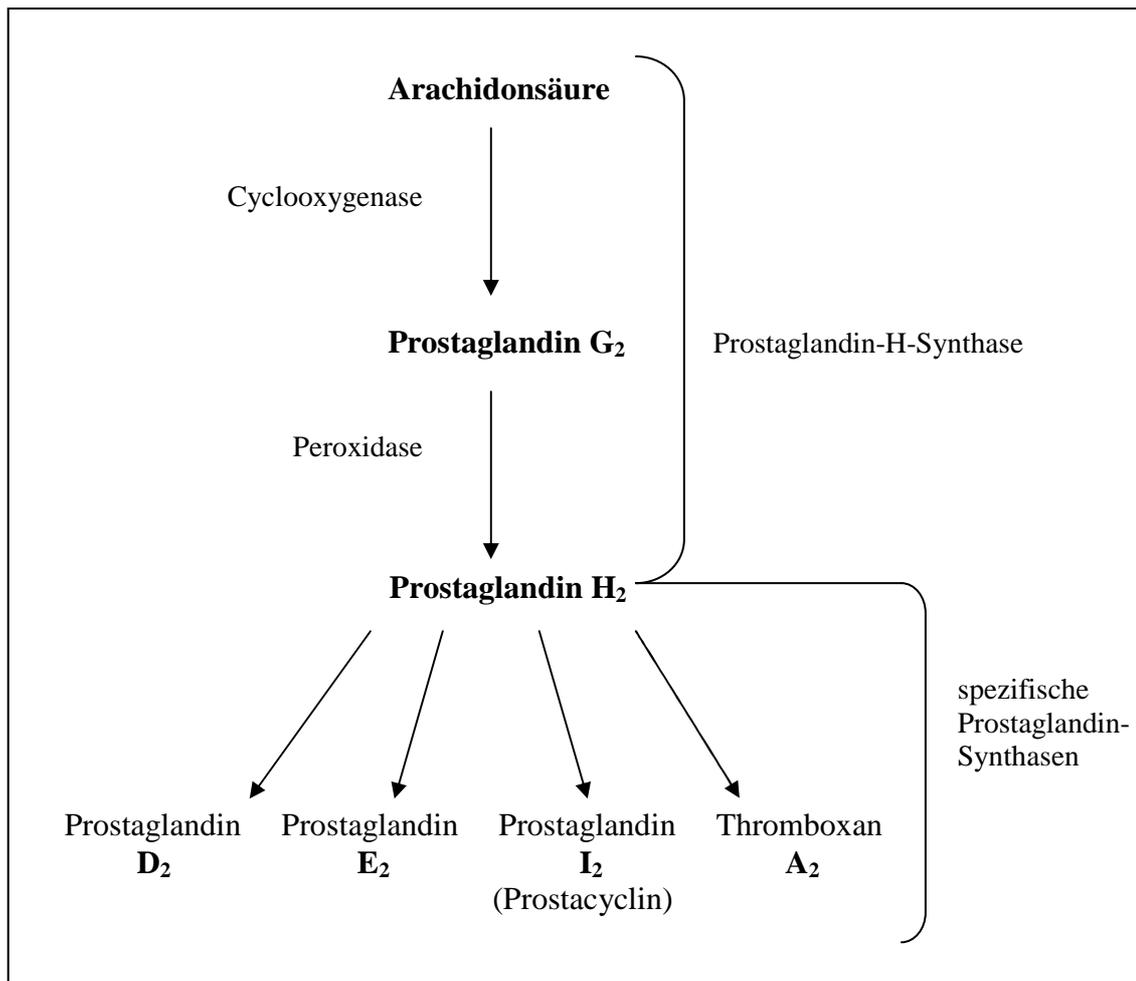


Abb. 3
Prostanoidssynthese (modifiziert aus Smith et al., 1996; Zeldin, 2001; Löffler et al., 2006).

1.3.2. Metabolisierung durch Lipoxygenase

Eine weitere Modifikation der Arachidonsäure erfolgt durch Lipoxygenasen (LOX). Es werden drei verschiedene Lipoxygenasen unterschieden. Die 5-Lipoxygenase wurde in Schweineleukozyten, im Verdauungstrakt und Thymus, in der Lunge sowie in anderen Zellen identifiziert (Breitbart et al., 1996). Sie ist an der Bildung von Leukotrien A₄ aus Arachidonsäure über 5-Hydroperoxyeicosatetraenoat (5-HPTE) beteiligt (Yamamoto et al., 2004; Löffler et al., 2006). Aus Leukotrien A₄ erfolgt die Synthese der anderen Leukotriene. Die Metaboliten der 5-Lipoxygenase haben eine bedeutende biologische Aktivität. Unter anderem zählen sie zu den stärksten Konstriktoren der glatten Muskulatur und haben einen chemotaktischen Effekt auf Leukozyten (Breitbart et al., 1996). Neben der 5-Lipoxygenase existieren außerdem die 12- und 15-Lipoxygenase, die an der Bildung von 12- bzw. 15-Hydroperoxyeicosatetraen-Säuren (12-, 15-HPETE) beteiligt sind (Breitbart et al., 1996; Yamamoto et al., 2004; Löffler et al., 2006).

1.3.3. Metabolisierung durch Cytochrom P 450

Die Metabolisierung der Arachidonsäure durch Cytochrom P 450 kann in zwei verschiedene Wege eingeteilt werden (siehe auch Abb. 2). Die CYP- ω -Hydroxylasen (vor allem CYP 3A, 4A und 4F) führen zur Entstehung von verschiedenen Hydroxyeicosatetransäuren (HETEs), einschließlich 19- und 20-HETE, während die CYP-Epoxygenasen (vor allem CYP 2C und 2J) an der Bildung von Epoxyeicosatriensäuren (EETs) beteiligt sind (Spector et al., 2004; Gross et al., 2005; Spector und Norris, 2007; Nithipatikom und Gross, 2010). Es können vier verschiedene regiomere cis-Epoxyeicosatriensäuren (EETs) unterschieden werden: 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET und 14,15-EET, von denen jedes als R, S- oder S, R-Enantiomer vorliegen kann, so dass insgesamt acht chemisch verschiedene Verbindungen entstehen (Zeldin, 2001; Spector et al., 2004; Iliff und Alkayed, 2009). Alle vier EET-Regioisomere können von jeder CYP-Epoxygenase gebildet werden. Jedoch dominieren in der Regel ein oder zwei Produkte, in den meisten Fällen 11,12- und 14,15-EET (Spector und Norris, 2007). Beispielsweise produziert die im Rattenherzen vorhandene CYP 2J3 zu 41 % 14,15-EET (Wu et al., 1997). Darüber hinaus können die zwei Enantiomere einer Epoxyeicosatriensäure unterschiedliche Funktionen besitzen. Zum Beispiel produziert die CYP 2J2 der menschlichen Niere gleiche Mengen beider 11,12-EET-Enantiomere (Wu et al., 1996), aber nur 11(R),12(S)-EET führt zur Relaxierung der kleinen Nierenarterien (Spector und Norris, 2007).

1.4. EETs

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Bildung der EETs unter Beteiligung einer CYP-Epoxygenase aus Arachidonsäure, nachdem diese mithilfe einer Phospholipase freigesetzt wurde.

1.4.1. Wirkung der EETs

EETs sind autokrine und parakrine Mediatoren. Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums im kardiovaskulären System spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation von Herz-Kreislauf-Funktionen (Chaudhary et al., 2009; Nithipatikom und Gross, 2010). Sie verursachen diese Effekte in erster Linie durch Beeinflussung des Gefäßsystems und der Nieren (Spector et al., 2004). EETs funktionieren als EDHFs (Campbell et al., 1996) und besitzen bedeutende vasodilatatorische Eigenschaften. Sie führen zur Öffnung von Calcium-aktivierten-K⁺-Kanälen (BK_{Ca}). Dies bewirkt eine Hyperpolarisation und Vasodilatation der Gefäße sowie Relaxierung der glatten Muskulatur von Gefäßen (Miura und Gutterman, 1998; Oltman et al., 1998; Campbell und Harder, 1999; Zhang et al., 2001; Li et al., 2002; Spector und Norris, 2007). Des Weiteren spielen EETs und ihre korrespondierenden DHETs bei der Regulation des Blutdrucks eine Rolle (Sinal et al., 2000).

Einige CYP-Epoxygenase-Produkte wie 11,12-EET besitzen kardioprotektive Effekte. Sie schützen das Myokard vor der schädlichen Wirkung von Ischämie und Reperfusion (Wu et al., 1997; Yang et al., 2001; Seubert et al., 2004; Gross et al., 2005). Außerdem besitzen sie eine protektive Wirkung gegen die Entstehung von postischämischen EKG-Veränderungen (Batchu et al., 2009). Des Weiteren reduzieren sie die myokardiale Infarktgröße (Nithipatikom und Gross, 2010).

Eine weitere Funktion der EETs liegt in der Beeinflussung des Gerinnungssystems. Sie wirken anti-thrombotisch und hemmen die Thrombozytenaggregation und -adhäsion an das Endothel (Heizer et al., 1991; Krötz et al., 2004). Des Weiteren besitzen EETs fibrinolytische Aktivität und erhöhen die Expression von Gewebs-Plasminogenaktivator tPA (tissue plasminogen activator) (Zeldin, 2001).

EETs haben anti-inflammatorische Eigenschaften. Durch Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB (nuclear factor kappa B) verhindern sie eine Leukozytenadhäsion an die Gefäßwand.

Außerdem senken sie die Expression Zytokin-induzierter endothelialer Zelladhäsionsmoleküle (Node et al., 1999).

Zu den weiteren Eigenschaften der EETs zählen ihre angiogene (Zhang und Harder, 2002) und anti-apoptotische (Dhanasekaran et al., 2006; Yang et al., 2007) sowie anti-oxidante (Iliff und Alkayed, 2009) Wirkung. Des Weiteren stimulieren EETs die Glukagon- und Insulinfreisetzung aus isolierten Langerhans-Inseln aus dem Ratten-Pankreas (Falck et al., 1983).

EETs besitzen außerdem eine Wirkung auf Tumorzellen. So verbesserte zum Beispiel die Zugabe von exogenen EETs die Proliferation von Krebszellen *in vitro* und *in vivo* (Chen et al., 2009). Zusätzlich erhöhen sowohl endogen gebildete als auch exogen applizierte EETs die Proliferation, Motilität, Adhäsion, Invasion und Genexpression der Krebszellen sowie das Tumorwachstum (Jiang et al., 2007; Chen et al., 2009). Außerdem hemmen EETs die Apoptose in Karzinomzellen durch Herabregulierung des proapoptotischen Proteins Bax und Hochregulation der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL (Chen et al., 2009). Anhand dieser Ergebnisse ergeben sich neue Behandlungsansätze in der Krebstherapie. So könnte die Hemmung der CYP 2J2-vermittelten Biosynthese der EETs eine mögliche Behandlung von Krebserkrankungen darstellen (Chen et al., 2009).

1.4.2. Metabolisierung der EETs

EETs werden von Epoxidhydrolasen (EH) zu ihren entsprechenden Dihydroeicosatriensäuren (DHETs) umgewandelt (Zeldin et al., 1993; Zeldin et al., 1995). Diese Metabolisierung ist regio- und stereoselektiv, wobei 14(R),15(S)-EET bevorzugt wird (Zeldin et al., 1993). DHETs wurden ursprünglich für inaktive Abbauprodukte der EETs gehalten aber weitere Studien zeigen, dass auch DHETs vasodilatatorische Eigenschaften besitzen und Calcium-aktivierte-K⁺-Kanäle (BK_{Ca}) aktivieren können (Weintraub et al., 1997; Oltman et al., 1998; Lu et al., 2001; Campbell et al., 2002).

Des Weiteren existieren weitere Metabolisierungswege der EETs wie deren Umwandlung durch Cyclooxygenase, Lipoxygenase, CYP- ω -Oxidase, Glutathion-S-Transferase, β -Oxidation, Kettenverlängerung und deren Integration in Phospholipide durch die Acyltransferase (Zeldin, 2001; Spector et al., 2004; Spector und Norris, 2007).

1.5. CYP 2J2

Wie viele andere Cytochrom P 450 wird auch CYP 2J in der Leber exprimiert. Daneben kommt es in einigen extrahepatischen Geweben vor, darunter in Herz (Wu et al., 1996; DeLozier et al., 2007), Lunge (Zeldin et al., 1996), Niere (Enayetallah et al., 2004), Pankreas (Langerhans'sche Inseln) (Zeldin et al., 1997a; Enayetallah et al., 2004) und Dünndarm (Zeldin et al., 1997b).

Wie andere Cytochrom P 450 ist auch CYP 2J2 an der Metabolisierung von Medikamenten, darunter auch Ebastin, beteiligt. So entsteht aus Ebastin durch Hydroxylierung Hydroxyebastin, welches nach anschließender Carboxylierung in den aktiven Metaboliten Carebantin umgewandelt wird (Hashizume et al., 2001; Hashizume et al., 2002; Liu et al., 2006).

Wie bereits erwähnt, wird CYP 2J2 in hohem Maße im Herzen exprimiert (Wu et al., 1996), vor allem in den kardialen Myozyten. Daneben ist es auch im Endothel der Koronararterien und in der Aorta enthalten (DeLozier et al., 2007).

Cytochrom P 450 und CYP 2J2 spielen eine bedeutende Rolle bei der menschlichen Kreislaufregulation und Homöostase (Fleming, 2001). 11,12-EET, das Produkt von CYP 2J2 und dem entsprechenden Homolog CYP 2J3 im Rattenherzen, verbessert deutlich die Erholung der kontraktilen Funktion des Herzens nach längerer globaler, kardialer Ischämie im isolierten perfundierten Rattenherz-Modell (Wu et al., 1997). In einem transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CYP 2J2 zu einer verbesserten Erholung und Wiedererlangung der linksventrikulären Funktion nach kardialer Ischämie und Reperfusion geführt hat (Seubert et al., 2004). Des Weiteren wurde für die CYP 2J2-Überexpression eine kardioprotektive Wirkung durch Hemmung des Hypoxie-/ Reoxygenierungsschadens von vaskulärem Endothel nachgewiesen (Yang et al., 2001). Außerdem schützt sie vor Doxorubicin-induzierter Kardiotoxizität (Zhang et al., 2009).

In den letzten Jahren wurden verschiedene CYP 2J2-Polymorphismen entdeckt (King et al., 2002). Sie stehen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen (Spiecker et al., 2004). Der am besten untersuchte Polymorphismus ist CYP 2J2*7. In vielen Studien wurde nach dem Zusammenhang zwischen CYP 2J2*7 und verschiedenen Krankheiten gesucht. Jedoch wurden widersprüchliche Ergebnisse gefunden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen im CYP 2J2-Gen wichtige Risikofaktoren für die Entstehung einer klinisch relevanten koronaren Herzkrankheit sind. Spiecker et al. (2004) fanden einen Zusammenhang zwischen dem CYP G-50T-Polymorphismus und einem erhöhten Risiko für

koronare Herzkrankheit (KHK). In vaskulären Endothelzellen führte der G-50T-Polymorphismus zu einer nahezu 50%igen Reduzierung der CYP 2J2-Promotor-Aktivität (Spiecker et al., 2004). Die verringerte CYP 2J2-Genaktivität könnte wiederum zu einer reduzierten EET-Synthese führen (Spiecker und Liao, 2006). Auch Lee et al. (2007) postulierten, dass der G-50T-Polymorphismus in CYP 2J2 ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer KHK ist. Des Weiteren besteht auch ein Zusammenhang mit Asthma und Hypertonie. Die Daten von Wu et al. (2007) verstärken die Annahme, dass es eine Assoziation zwischen dem Auftreten von CYP 2J2-Polymorphismen und essentieller Hypertonie gibt. Polonikov et al. (2007) fanden ein signifikant höheres Vorkommen des 50T-Allels im CYP 2J2-Gen von Asthma-Patienten verglichen mit gesunden Probanden.

Im Gegensatz zu den gerade erwähnten Ergebnissen konnten einige Studien keinen Zusammenhang zwischen CYP 2J2-Polymorphismen und verschiedenen Krankheiten feststellen. Dreisbach et al. (2005) fanden keine Beziehung zwischen dem CYP 2J2*7-Polymorphismus und einem erhöhten Risiko für Hypertonie in einer amerikanischen Population afrikanischer Abstammung. Außerdem spielt der CYP 2J2 G-50T-Polymorphismus keine signifikante Rolle in der Entwicklung eines Herzinfarktes (Börgel et al., 2008). Zhang et al. (2008) untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im CYP 2J2-Gen und dem Risiko für das Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls in einer chinesischen Population. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der CYP 2J2-G-50T-Allelfrequenz in Patienten, die einen ischämischen Schlaganfall erlitten haben, gegenüber den Kontrollpersonen festgestellt werden. Der CYP 2J2 G-50T-Polymorphismus beeinflusst das Schlaganfall-Risiko in dieser Population nicht (Zhang et al., 2008). Des Weiteren wird das Risiko einer Nierenfunktionsstörung nicht signifikant durch den CYP 2J2*7-Polymorphismus beeinflusst (Smith et al., 2008).

Neuere Studien untersuchten eine mögliche Beziehung zwischen CYP 2J2 und Krebs bzw. die Rolle von CYP 2J2 in der Krebstherapie. In vitro Experimente von Jiang et al. (2009) zeigten eine hohe Expression von CYP 2J2 in verschiedenen menschlichen Tumorgeweben und Zelllinien. Außerdem wurde ein CYP 2J2-Anstieg in Tumorproben von Patienten mit fortgeschrittenem epitheliales Ovarialkarzinom festgestellt (Freedman et al., 2007). Wie bereits erwähnt, verbessern EETs das Tumorwachstum, erhöhen die Proliferation der Karzinomzellen und verhindern die Apoptose von Krebszellen. Außerdem fördert eine CYP 2J2-Überexpression mit nachfolgender ansteigender EET-Produktion oder eine Behandlung mit synthetischen EETs die Migration, Invasion, Adhäsion und Metastasierung von Tumorzellen (Jiang et al., 2007). Alle diese Ergebnisse legen nahe, dass CYP 2J2 eine bisher unbekannte Rolle in der Pathogenese einer Vielzahl von Krebserkrankungen spielt (Jiang et al., 2007). Diese Annahme wird unter anderem durch eine Studie von Chen et al. (2009) unterstützt, in der die selektive

Hemmung von CYP 2J2 die Adhäsion und Invasion von humanen Tumorzellen reduziert. Darüber hinaus verbessert die CYP 2J2-Hemmung den Zugang der Krebszellen zur Apoptose. Alle diese Effekte sind mit einer reduzierten EET-Biosynthese verknüpft. Die Zugabe von exogenen EETs machte diese Effekte teilweise wieder rückgängig. Zusammengefasst verdeutlichen diese Erkenntnisse den möglicherweise potenziellen therapeutischen Nutzen der CYP 2J2-Inhibitoren in der Behandlung von malignen Erkrankungen (Chen et al., 2009).

2. Zielstellung

Cytochrom P 450-Enzyme haben vielfältige Aufgaben im menschlichen Körper und katalysieren unterschiedliche chemische Reaktionen. Sie kommen in vielen verschiedenen menschlichen Geweben vor, darunter vor allem in der Leber, im Darm, der Lunge, den Nieren, der Haut und dem Herzen (Wu et al., 1996; Park, 2000; DeLozier et al., 2007). Während in menschlichen Herzen CYP 2J2 exprimiert wird, findet sich in Rattenherzen das dementsprechende CYP 2J3 (Wu et al., 1996; Wu et al., 1997; DeLozier et al., 2007). Eine Aufgabe der Cytochrom P 450-Enzyme besteht unter anderem in der Metabolisierung der Arachidonsäure zu Epoxyeicosatriensäuren (EETs), die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Herz-Kreislauf-Funktionen spielen (Chaudhary et al., 2009; Nithipatikom und Gross, 2010). Des Weiteren ist CYP 2J für die Hydroxylierung des H₁-Rezeptor-Antagonisten Ebastin in der menschlichen Leber und intestinalen Mikrosomen verantwortlich (Hashizume et al., 2002; Liu et al., 2006).

Ziel dieser Arbeit ist es, erste pharmakokinetische Daten zur Metabolisierung von Ebastin im Herzmuskel zu liefern. Die kinetische Analyse von Ebastin und sequentielle Bildung von Hydroxyebastin und Carebastin erfolgte, basierend auf dem zeitlichen Verlauf der Perfusatkonzentrationen und Endmengen im Herzgewebe am Ende der Perfusion, in einer rezirkulierenden Langendorff-Versuchsapparatur, unter Verwendung eines Kompartiment-Modells. Die geschätzte myokardiale Bildungsrate von Hydroxyebastin diente dabei als Maß für die CYP 2J-Aktivität. Um die zugrunde liegende Aufnahmekinetik von Ebastin in das Herz besser zu verstehen, wurde, unter Verwendung einer pharmakokinetisch-pharmakodynamischen (PK-PD) Modellierung, die myokardiale Ebastin-Konzentration in Bezug zu deren negativ inotroper Wirkung gesetzt. Dieser Ansatz erlaubt die Schätzung der Konzentrations-Wirkungs-Parameter für den kardiodepressiven Effekt von Ebastin (Kang et al., 2011).

Des Weiteren wurde die Kinetik der Metabolisierung von Ebastin im Herzmuskel unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dabei erfolgte die Verwendung eines Gases zur Erzielung einer Hypoxie mit anschließender Reperfusion. Außerdem wurde die Wirkung einer akuten Isoprenalin-Gabe sowie der Einfluss einer Isoprenalin-induzierten kardialen Hypertrophie auf den Ebastin-Stoffwechsel untersucht. Abschließend wurde die Wirkung eines CYP 2J-Hemmers allein sowie zusammen mit Ebastin getestet, um Informationen über den Einfluss der Hemmung der CYP 2J auf die kardiale Funktion und den Ebastin-Stoffwechsel zu erhalten.

3. Material und Methodik

3.1. Das Langendorff-Herz

3.1.1. Prinzip

Das isolierte perfundierte Herz nach Langendorff ist eines der ersten Modelle eines isolierten Organs und wurde 1895 von Oscar Langendorff beschrieben (Fawzi, 1997). Das Grundprinzip des isolierten Langendorff-Herzens besteht in einer retrograden Perfusion der Koronargefäße mit einer oxygenierten physiologischen Lösung durch Einführen einer Kanüle in die Aorta ascendens. Diese retrograde Perfusion führt zum Schließen der Aortenklappe. Das Perfusat fließt während der Diastole in die Koronargefäße, die oberhalb der Aortenklappe aus der Aorta ascendens entspringen. Nach der Passage des Koronargefäßsystems gelangt das Perfusat in den rechten Herzvorhof und fließt anschließend über den rechten Ventrikel und die Pulmonalarterie ab (Fawzi, 1997; Dhein, 2005).

Als Perfusat eignet sich homologes oder heterologes Blut, Tyrode-, Locke- oder Krebs-Henseleit-Puffer. Das verwendete Perfusat wird auf physiologische Temperatur gebracht und mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) begast. Als Versuchstiere eignen sich alle laborüblichen Warmblüter wie Ratten, Meerschweinchen und Hasen (Dhein, 2005).

Der Grundaufbau des Systems ermöglicht das Arbeiten unter konstanten Druck-Bedingungen und unter konstanten Fluss-Bedingungen (Dhein, 2005). Für alle Versuchsreihen wurde das System unter konstanten Fluss-Bedingungen verwendet.

Das isolierte perfundierte Herz nach Langendorff findet zahlreiche Anwendungen im Bereich der pharmakologischen, physiologischen, morphologischen, biochemischen und klinischen Forschung. Die Methode ermöglicht die detaillierte Analyse von ventrikulären Mechanismen, metabolischen Veränderungen und Änderungen im EKG sowie der Reaktion der koronaren Blutgefäße (Sutherland und Hearse, 2000; Dhein, 2005).

Der Vorteil der Methode nach Langendorff besteht in der Übersichtlichkeit, Einfachheit und hohen Reproduzierbarkeit der Präparation. Sie ermöglicht die schnelle Untersuchung einer Vielzahl von Organen bei nur geringen Kosten. Das isolierte Organ ist frei von Rückkopplungsmechanismen sowie hormonellen und neuronalen Einflüssen, wodurch eine spezifischere Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Agenzien auf das Herz ermöglicht wird. Somit liefert das isolierte perfundierte Herz ideale Bedingungen für die Durchführung von

Dosis-Wirkungs-Studien zu metabolischen und pharmakologischen Interventionen (Sutherland und Hearse, 2000).

3.1.2. Aufbau der Versuchsapparatur

Für alle Experimente wurde die Langendorff-Versuchsapparatur „Isoliertes Herz Größe 3 Typ 830“ (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) verwendet (Abb. 4). Die Hauptbestandteile des Systems sind die Schleuderpumpe, der Oxygenator, eine Schlauchpumpe, ein Glas-Wärmeaustauscher, eine temperierbare Herzkammer und Druckaufnehmer (Transducer). Das zentrale Teil der Apparatur ist der Oxygenator, ein temperierbares, doppelwandiges Glasgefäß, dessen innerer Teil eine kugelige Form besitzt, um die Oberfläche zu vergrößern. Am oberen Teil des Oxygenators befindet sich eine rotierende Schleuderscheibe, die das mit Hilfe der Schleuderpumpe anströmende Perfusat gleichmäßig auf der Innenfläche des Oxygenators verteilt. Während das Perfusat als dünner Film nach unten fließt, erwärmt es sich und wird mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) gesättigt, welches durch eine Öffnung im unteren Bereich des Oxygenators eingeleitet wird. Im Bereich dieser Öffnung befindet sich außerdem eine Niveauelektrode und ein elektronischer Regler (LLC = Liquid Level Controller), mit dessen Hilfe der Flüssigkeitspegel des Perfusats im Oxygenator konstant gehalten werden kann. Das unten aus dem Oxygenator austretende Perfusat gelangt über eine zwischengeschaltete Schlauchpumpe zum Herzen. Sie ermöglicht das Einstellen einer konstanten Durchflussrate. Zusätzlich ist der Schlauchpumpe ein kleiner Glas-Wärmeaustauscher zum Ausgleich des Temperaturverlustes im Pumpenschlauch nachgeschaltet. Um eventuell im Perfusat vorhandene Gasblasen abzufangen, ist zwischen dem Glas-Wärmeaustauscher und der Aortenkanüle eine Blasenfalle eingebaut. An dieser befinden sich zwei seitliche Anschlussstutzen. Der Obere dient zum Entfernen der Gasblasen, während am Unteren der sich entsprechend am Herzen einstellende Perfusionsdruck über den Transducer Nummer 1 gemessen wird. Im unteren Teil der Apparatur befindet sich die Herzkammer, ein doppelwandiger Glaszylinder mit Verbindung zum Thermostat und Abflussrohr im Boden. Sie lässt sich nach Anschluss des Herzens an die Apparatur von unten über das Herz schieben (Zink et al., 2007).

Über einen in den linken Ventrikel eingebrachten Ballon, der mit dem Transducer Nummer 2 verbunden ist, erfolgt die Messung des linksventrikulären Druckes. Der Ballon wird mit 50% Methanol entfaltet, um einen diastolischen Druck von 5 bis 6 mmHg zu erzeugen. Es werden der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP), die Herzfrequenz (HR) und der koronare Perfusionsdruck gemessen und mit der HSE-Software ISOHEART (Vers. 1.1.1.129, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten,

Deutschland) aufgezeichnet. Der entstehende linksventrikuläre Druck (LVDP) ergibt sich aus $LVDP = LVSP - LVEDP$. Der koronarvaskuläre Widerstand (CVR) berechnet sich als Quotient aus Perfusionsdruck und koronarem Fluss.

Während aller Experimente erfolgte eine Rezirkulation des Perfusats. Dazu wurde in die Herzkammer ein kleines Becherglas gestellt, in der das aus dem rechten Ventrikel bzw. aus der Pulmonalarterie abfließende Perfusat gesammelt wurde. Dieses gelangte anschließend mit Hilfe der Schleuderpumpe wieder in den Oxygenator und wurde so dem System erneut zur Verfügung gestellt.

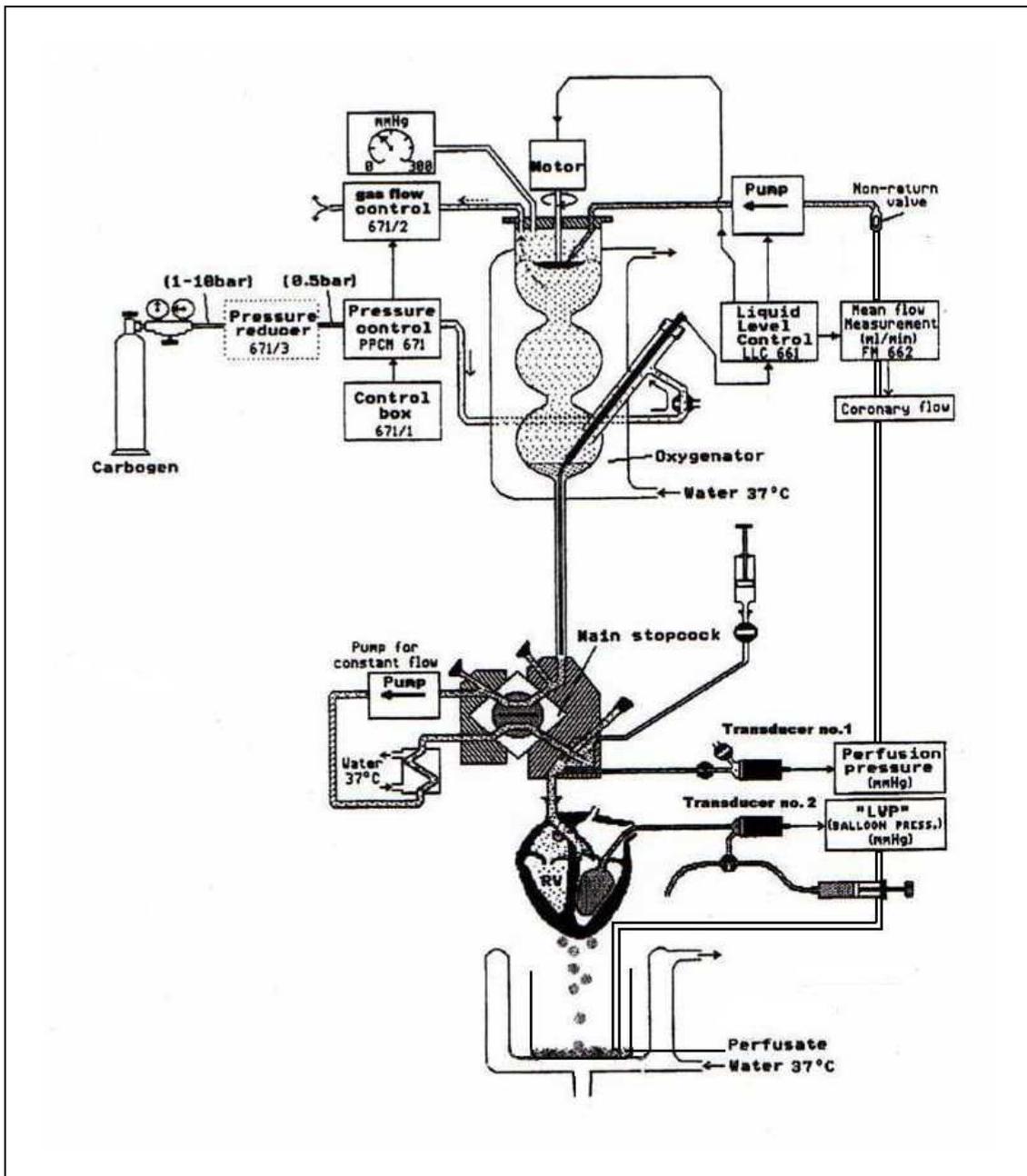


Abb. 4
 Aufbau der Langendorff-Versuchsapparatur unter konstanten Fluss-Bedingungen (modifiziert aus Zink et al., 2007).

3.1.3. Präparation der Versuchstiere

Die Behandlung der Versuchstiere sowie die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft für Versuchstiere und andere wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere. Alle Versuche wurden von der Abteilung Verbraucherschutz und Veterinärangelegenheiten vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt genehmigt.

Für alle Versuchsreihen wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 274g – 328g verwendet. Zunächst wurde das Tier durch eine intraperitoneale Injektion mit Narcoren® (16g/100ml Pentobarbital-Natrium, 50-80 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Anschließend erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 1500 Einheiten Heparin, um eine eventuell auftretende Thrombosierung und Embolisierung während der Präparation zu verhindern. Nach circa 5 min war meist eine ausreichende Narkosetiefe erreicht. Das Tier reagierte nicht mehr auf äußere Reize. Um eine vollständige Schmerzfreiheit sicherzustellen, erfolgte zusätzlich ein Genickbruch. Anschließend wurde das Tier auf einem kleinen OP-Tisch befestigt, das Fell mit Ethanol desinfiziert und mit einer Schere die Haut und Muskulatur am Hals durchtrennt. Nach dem Aufsuchen der Trachea wurde diese aufgeschnitten und mittels einer darin platzierten Kanüle an ein Beatmungsgerät angeschlossen. Anschließend erfolgte die Öffnung des Thorax. Dazu wurde das Fell entfernt und das Abdomen mit einem Medianschnitt bis hinauf zum Brustkorb geöffnet. Nach Inzision des Diaphragmas und Eröffnung der unteren Thoraxapertur erfolgte das beidseitige, möglichst lateral und weit nach kranial reichende Durchtrennen der Rippenbögen. Nachdem der vordere Brustkorb über den Kopf des Tieres weggeklappt war, zeigte sich eine freie Sicht auf das Mediastinum und das schlagende Herz. Die Vena cava caudalis wurde mit Hilfe einer Klemme abgeklemmt und das Herz mitsamt der Lunge herausgeschnitten und sofort in ein vorher bereitgestelltes Gefäß mit oxygeniertem, eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer gelegt. Als Nächstes wurde die Aorta freipräpariert, auf circa 3 bis 5 mm Länge gekürzt und retrograd mittels einer eingeführten Kanüle mit oxygeniertem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Anschließend wurde das Herz schnellstmöglich an der Langendorff-Apparatur befestigt. Nachdem die Lungen abpräpariert und das Herz vom restlichen Gewebe befreit worden war, erfolgte die Einführung eines Latex-Ballons in den linken Ventrikel durch einen kleinen Einschnitt im linken Vorhof.

3.1.4. Perfusionsmedium

Als Perfusionslösung diente ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer folgender Zusammensetzung: NaCl (118 mM), KCl (4,7 mM), CaCl₂ (1,5 mM), MgSO₄ (1,66mM), NaHCO₃ (24,88 mM), KH₂PO₄ (1,18 mM), Glucose (5,55 mM) Na-Pyruvat (2 mM) und bovines Serumalbumin (BSA) (0,1% w/v). Das Perfusat wurde täglich frisch hergestellt und durch eine 0,45 µm hydrophile Mikrofiltrationsmembran basierend auf Polyethersulfon (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) filtriert. Der fertige modifizierte Krebs-Henseleit-Puffer wurde während jedes Versuches mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) gesättigt und die Temperatur bei 37 °C konstant gehalten. Während eines Versuches passierte das Perfusat mit einer konstanten Flussrate von $9,5 \pm 0,5$ ml/min das System.

3.2. Modellierung und Datenanalyse

3.2.1. Pharmakokinetik

Grundlage der Datenanalyse war das Modell der kardialen Verteilung und sequentiellen Metabolisierung von Ebastin (Abb. 5). Es beschreibt die Wirkstoffaufnahme aus dem Reservoir mit dem Volumen V_{res} in das Herzgewebe mit Geschwindigkeitskonstanten für die Aufnahme, $k_{in,e}$, und den Efflux, $k_{out,e}$. Da keine Informationen zum Ebastin-Stoffwechsel in Rattenherzen verfügbar waren, orientiert sich das Modell an dem sequentiellen Ebastin-Metabolisierungsweg in menschlichen Lebermikrosomen (Liu et al., 2006), wobei die Beobachtung mit einbezogen wird, dass Enzyme der CYP 3A Unterfamilie gar nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß im menschlichen Myokard und Rattenmyokard exprimiert sind (Thum und Borlak, 2000a; Thum und Borlak, 2000b; DeLozier et al., 2007). Somit wird keine Dealkylierung von Ebastin und Hydroxyebastin angenommen. Die Bildung von Hydroxyebastin und dessen folgende Metabolisierung zu Carebastin werden von den Geschwindigkeitskonstanten k_{eh} und k_{hc} beschrieben und die Metabolisierung von Carebastin durch k_{cm} . Das im Myokard gebildete Hydroxyebastin und Carebastin wird in das Reservoir transportiert ($k_{out,h}$ und $k_{out,c}$) und einer Wiederaufnahme unterzogen ($k_{in,h}$ und $k_{in,c}$). Die zeitlichen Verläufe der Konzentrationen von Ebastin, $C_{eb}(t)$, Hydroxyebastin, $C_{hy}(t)$, und Carebastin, $C_{ca}(t)$, die durch Lösung der zum Kompartiment-Modell (Abb. 5) gehörenden Differentialgleichungen erhalten wurden, werden an die Daten angepasst, um die Modell-Parameter zu schätzen. Jedoch braucht man für eine Schätzung der Parameter k_{eh} , k_{hc} und k_{cm} zusätzliche Informationen, da eine Metabolisierung von

Ebastin und Hydroxyebastin durch andere Enzyme nicht ausgeschlossen werden kann. Diese Information stammt aus den Gewebekonzentrationen der Substanzen, die am Ende der Perfusion im Herzen gemessen wurden (A_{end}). Als Erstes wurde die Ebastin-Konzentration, $C_{\text{eb}}(t)$, und -Menge, $A_{\text{eb, end}}$, gefittet, um $k_{\text{in, e}}$, $k_{\text{out, e}}$ und k_{eh} zu schätzen. Zweitens wurde unter Konstanthaltung dieser Parameter die Hydroxyebastin-Daten, $C_{\text{hy}}(t)$, und -Menge im Herzen, $A_{\text{hy, end}}$, gefittet, um $k_{\text{in, h}}$, $k_{\text{out, h}}$ und k_{hc} zu schätzen. Drittens wurden auf die gleiche Weise die Carebastin-Daten, $C_{\text{ca}}(t)$, gefittet, um $k_{\text{in, c}}$, $k_{\text{out, c}}$ und k_{cm} zu erhalten (Kang et al., 2011).

Die Daten wurden mit Hilfe eines Populations-Ansatzes mit Maximum-Likelihood-Schätzung über den EM-Algorithmus, der in der Software ADAPT 5 implementiert ist, analysiert (D'Argenio et al., 2009). Das MLEM-Programm liefert eine Schätzung des Populationsdurchschnitts und interindividueller Variabilität sowie der individuellen Subjekt-Parameter. Wir haben log-normal verteilte Modellparameter angenommen und dass der Messfehler eine Standardabweichung hat, die eine lineare Funktion von der gemessenen Konzentration ist (Kang et al., 2011).

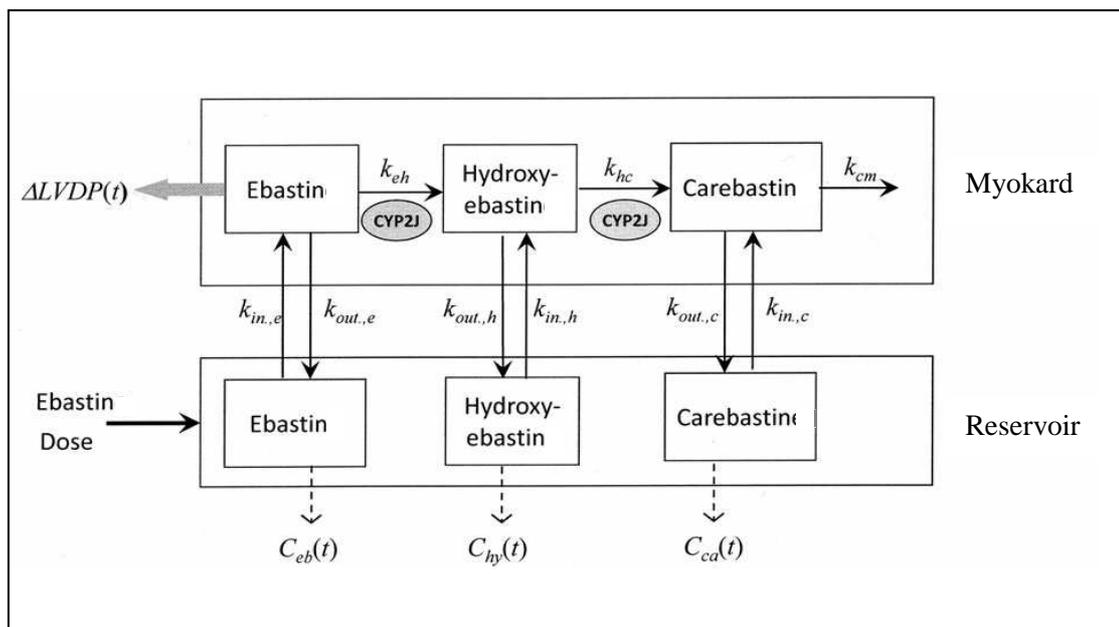


Abb. 5

Kompartiment-Modell zur Analyse des sequentiellen kardialen Metabolismus von Ebastin im isolierten Rattenherzen mit rezirkulierendem Perfusat (Kang et al., 2011).

3.2.2. Pharmakodynamik

Für den Zusammenhang zwischen der Menge von Ebastin im Myokard, $A_{eb}(t)$, die von dem Modell geschätzt wurde, und dem inotropen Effekt $E(t)$, wurde folgende Dosis-Wirkungs-Beziehung angenommen:

$$E(t) = E_0 - \frac{E_{\max} A_{eb}(t)}{A_{eb,50} + A_{eb}(t)} \quad (1)$$

wobei E_{\max} und $A_{eb,50}$ jeweils der maximale negativ inotrope Effekt und die Menge sind, um eine 50 %ige maximale Reaktion zu erhalten. Als Maß für den inotropen Effekt $E(t)$ wurde die Veränderung im sich entwickelnden linksventrikulären Druck $LVDP(t)$ verwendet, das heißt die Abnahme des LVDP in Bezug auf den Grundlinien-Wert (vor Stoffzugabe) $E_0 = LVDP_0$. Da die maximal erreichbare Reduzierung von $LVDP$ nur E_0 ist, nutzten wir dies als E_{\max} -Wert in Gleichung 1. Die pharmakodynamischen Parameter E_0 und $A_{eb,50}$ wurden durch Fitten der Gleichung 1 an die beobachteten $LVDP(t)$ -Daten bis zu dem Zeitpunkt geschätzt, bevor der LVDP-Wiederanstieg stoppt und ein scheinbares Plateau erreicht ist. Das EC_{50} des kardiodepressiven Effekts von Ebastin wurde dann entsprechend zu der Verteilung im Steady-State berechnet (Kang et al., 2011).

$$EC_{50} = \frac{k_{out,e} A_{eb,50}}{k_{in,e} V_{res}} \quad (2)$$

3.3. Medikamente und Chemikalien

Ebastin wurde von Chemos GmbH (Regenstauf, Deutschland), DL-Isoproterenol-Hydrochlorid von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) und Methanol von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Das Gas für die Hypoxie-Experimente stammt von Linde AG (Leuna, Deutschland). Alle anderen Chemikalien waren ausreichend verfügbar.

Die Herstellung des CYP 2J-Hemmers erfolgte von Prof. W. Kang, Institut für Pharmazie, Yeungnam Universität, Kyoungbuk, Südkorea. Dabei handelt es sich um eine von Lafite et al. (2006) entwickelte Verbindung (siehe Abb. 6), die als potenter CYP 2J-Hemmer fungiert.

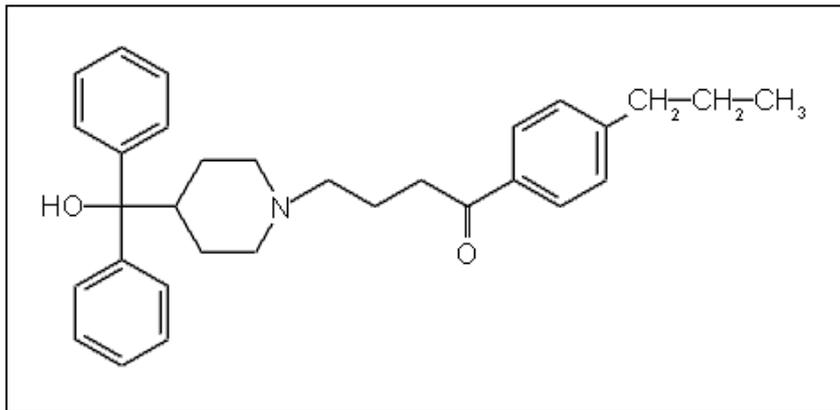


Abb. 6
Strukturformel des CYP 2J-Hemmers (nach Lafite et al., 2006).

3.4. Experimentelle Protokolle

Um eine konzentrierte Ebastin-Stammlösung zu erhalten, wurde 1 mg Ebastin in 1 ml Methanol gelöst. 40 µl dieser Stammlösung wurden mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer auf 20 ml aufgefüllt. Die fertige Lösung wurde zur Rezirkulation in ein kleines Becherglas gefüllt und in die Herzkammer gestellt. Während der Rezirkulation mischte sich die Lösung mit 40 ml modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer, der bereits im System vorhanden war.

3.4.1. Ebastin (Kontroll-Experimente)

Nach der unter 3.1.3. beschriebenen Methode wurden insgesamt 6 Herzen präpariert und an der Langendorff-Apparatur befestigt. Nachdem sich die Herzen 20 min stabilisiert hatten, erfolgte der Wechsel des Perfusats von modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer zu modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer mit Ebastin. Dazu wurde die fertige Ebastin-Lösung (20 ml) in ein Becherglas gefüllt, in die Herzkammer gestellt und durch Umstellen der Schleuderpumpe dem System zugeführt. Während der Rezirkulation mischte sich die Lösung mit 40 ml modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer, der bereits im System vorhanden war. Die Probenentnahme (jeweils 500 µl des Perfusats) erfolgte während der Rezirkulation aus dem Reservoir nach 5 min und 10 min und jede weiteren 10 min bis zu einer Endzeit von 130 min. Am Ende der Perfusion wurden alle Herzen gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie wurden zusammen mit den Proben bei -70 °C aufbewahrt.

3.4.2. Ebastin ohne BSA im Puffer

Für diese Versuchsreihe wurden 6 Herzen verwendet. Der modifizierte Krebs-Henseleit-Puffer wurde, wie unter 3.1.4. beschrieben, präpariert, allerdings ohne Zusatz von BSA. Der Versuchsablauf war analog zu 3.4.1., jedoch erfolgte die Probennahme nach 2,5 min, 5 min, 7,5 min, 10 min, 12,5 min, 15 min, 17,5 min, 20 min, 25 min, 30 min und jede weiteren 10 min bis zu einer Endzeit von 130 min.

3.4.3. Ebastin nach Hypoxie

6 Herzen wurden nach der unter 3.1.3. beschriebenen Methode präpariert und an der Langendorff-Apparatur befestigt. Nach einer Stabilisierungsphase von 20 min erfolgte die Umstellung der Begasung des Systems von Carbogen auf ein Gas ohne Sauerstoff (95% N₂, 5% CO₂) für 45 min. Anschließend wurde die Begasung wieder auf Carbogen gewechselt. Nach 2 min Reoxygenierung erfolgte der weitere Versuchsablauf wie unter 3.4.1. beschrieben.

3.4.4. Ebastin nach akuter Isoprenalin-Wirkung

Zur Herstellung der Isoprenalin-Lösung wurde zunächst 1 mg Isoprenalin in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 62 µl genommen und mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer auf 500 ml aufgefüllt.

Nach der unter 3.1.3. beschriebenen Methode wurden insgesamt 6 Herzen präpariert und an der Langendorff-Apparatur befestigt. Nachdem sich die Herzen 20 min stabilisiert hatten, erfolgte der Wechsel des Perfusats von modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer zur Isoprenalin-Lösung (0,5 µM Isoprenalin) für die Dauer von einer Stunde. Nach erneutem Umstellen des Perfusats auf modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer wurde nach 2 min die fertige Ebastin-Lösung hinzugefügt. Der weitere Versuchsablauf und die Probennahme erfolgten analog zu 3.4.1..

3.4.5. Ebastin unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie

Zur Erzeugung einer kardialen Hypertrophie erhielten 6 männliche Wistar-Ratten 7 Tage lang täglich eine intraperitoneale Injektion mit Isoprenalin (5mg/kg Körpergewicht).

Die am 8. Tag durchgeführten Experimente erfolgten wie unter 3.4.1. beschrieben.

3.4.6. Ebastin mit CYP 2J-Hemmer und CYP 2J-Hemmer

Zur Herstellung einer CYP 2J-Hemmer-Stammlösung wurden 13,67 mg des Hemmers in 1 ml DMSO gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden mit 40 µl Ebastin-Stammlösung gemischt und mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer auf 20 ml aufgefüllt.

Nach der unter 3.1.3. beschriebenen Methode wurden insgesamt 5 Herzen präpariert und an der Langendorff-Apparatur befestigt. Die Ebastin-CYP2J-Hemmer-Lösung wurde zur Rezirkulation in ein kleines Becherglas gefüllt und in die Herzkammer gestellt. Während der Rezirkulation mischte sich die Lösung mit 40 ml modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer. Während der Rezirkulation erfolgte die Probennahme (jeweils 500 µl) aus dem Reservoir nach 5 min und 10 min und jede weiteren 10 min bis zu einer Endzeit von 130 min. Am Ende der Perfusion wurden alle Herzen gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie wurden zusammen mit den Proben bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Zur Herstellung verschiedener CYP 2J-Hemmer-Stammlösungen wurden 0,05 mg, 0,11 mg, 0,55 mg, 1,09 mg, 1,64 mg, 2,19 mg, 4,1 mg und 13,67 mg des Hemmers in jeweils 1 ml DMSO gelöst. 10 µl dieser Lösungen wurden jeweils mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer auf 20 ml aufgefüllt.

Nach der unter 3.1.3. beschriebenen Methode wurden 4 Herzen präpariert und an der Langendorff-Apparatur befestigt. Die CYP 2J-Hemmer-Lösung wurde zur Rezirkulation in ein kleines Becherglas gefüllt und in die Herzkammer gestellt. Während der Rezirkulation mischte sich die Lösung mit 40 ml modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer, so dass verschiedene Endkonzentrationen von 0,02 µM, 0,04 µM, 0,2 µM, 0,4 µM, 0,6 µM, 0,8 µM, 1,5 µM und 5 µM CYP 2J-Hemmer erreicht wurden. Eine Konzentration rezirkulierte für 10 min im System. Anschließend wurde auf die nächst höhere Konzentration gewechselt. Während der Rezirkulation erfolgte die Probennahme (jeweils 500 µl) für jede Konzentration nach 5 min und 10 min. Am Ende der Perfusion wurden alle Herzen gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie wurden zusammen mit den Proben bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.5. Probenmessung

Die Bestimmung von Ebastin sowie dessen drei Metaboliten im Perfusat und im Herzen erfolgte durch Prof. W. Kang und Mitarbeiter (Institut für Pharmazie, Yeungnam Universität, Kyoungbuk, Südkorea) nach einer bereits früher beschriebenen Methode (Kang et al., 2004).

3.6. Statistische Analyse

Die gemessenen Daten werden im Text als Mittelwert \pm Standardabweichung und in den Tabellen als Mittelwerte mit inter-individueller Variabilität als in Klammern gestellter relativer Standardfehler in % dargestellt. In den Graphiken sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Säulendiagramme beinhalten Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD).

Die Messwerte der Kontrolle und behandelten Gruppen wurden unter Nutzung des t-test verglichen. Die Signifikanzprüfung der Hypertrophie-Experimente erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen (linear mixed model, S-Plus, Math Soft, Seattle, USA). Bei $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Ebastin (Kontroll-Experimente)

Die Messung von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin erfolgte aus den genommenen Proben des Perfusats. Die Konzentration von Desalkylebastin lag zu allen Messzeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze. Abbildung 7 zeigt die durchschnittlichen Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin innerhalb des Reservoirs nach initialer Zugabe einer Ebastin-Menge zwischen 7,8 und 12,1 μg ($10,1 \pm 1,5 \mu\text{g}$) zum Zeitpunkt $t = 0$. Die Menge an Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin im linken Ventrikel am Ende der Perfusion betrug $22,3 \pm 4,3 \%$, $3,6 \pm 0,9 \%$ und $19,1 \pm 5,4 \%$ der Anfangsmenge. Im Myokard wurde kein Desalkylebastin gefunden. Die gemessenen und vom Modell gefitteten Konzentrationen im Perfusat [$C_{\text{eb}}(t)$, $C_{\text{hy}}(t)$ und $C_{\text{ca}}(t)$] sowie die Endmengen im Herzen [$A_{\text{eb}}(t)$, $A_{\text{hy}}(t)$ and $A_{\text{ca}}(t)$] werden in Abbildung 8 für ein Herz dargestellt. Als Beispiel wurde das Experiment gewählt, dessen AIC-Wert (Ebastin-Daten) am nächsten zum medianen Wert der Gruppe lag (Kang et al., 2011).

Tabelle 1 zeigt die vom Modell geschätzten Parameter für die kardiale Aufnahme und Metabolisierungskinetik von Ebastin beziehungsweise Bildung von Hydroxyebastin und Carebastin. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n = 6$) und die inter-individuelle Variabilität als relativer Standardfehler (%) in Klammern (Kang et al., 2011).

Ebastin bewirkte eine Verringerung von LVDP auf $57,3 \pm 4,9 \%$ des Ausgangswerts mit einem Maximum nach 10 Minuten. Abbildung 9 zeigt den Fit, der unter Verwendung von Gleichung 1, welche den Zeitverlauf der negativ inotropen Reaktion, bezogen auf den entsprechenden Zeitverlauf der Ebastin-Menge im Herzen [$A_{\text{eb}}(t)$, siehe auch Abbildung 8], beschreibt, erhalten wurde. Der Populations-Schätzwert der pharmakodynamischen Parameter beträgt für $E_0 = 107 \pm 5,4 \text{ mmHg}$ und für $EC_{50} = 8,9 \pm 0,5 \text{ ng/ml}$. Es wurde keine signifikante Veränderung der Herzfrequenz beobachtet (Kang et al., 2011).

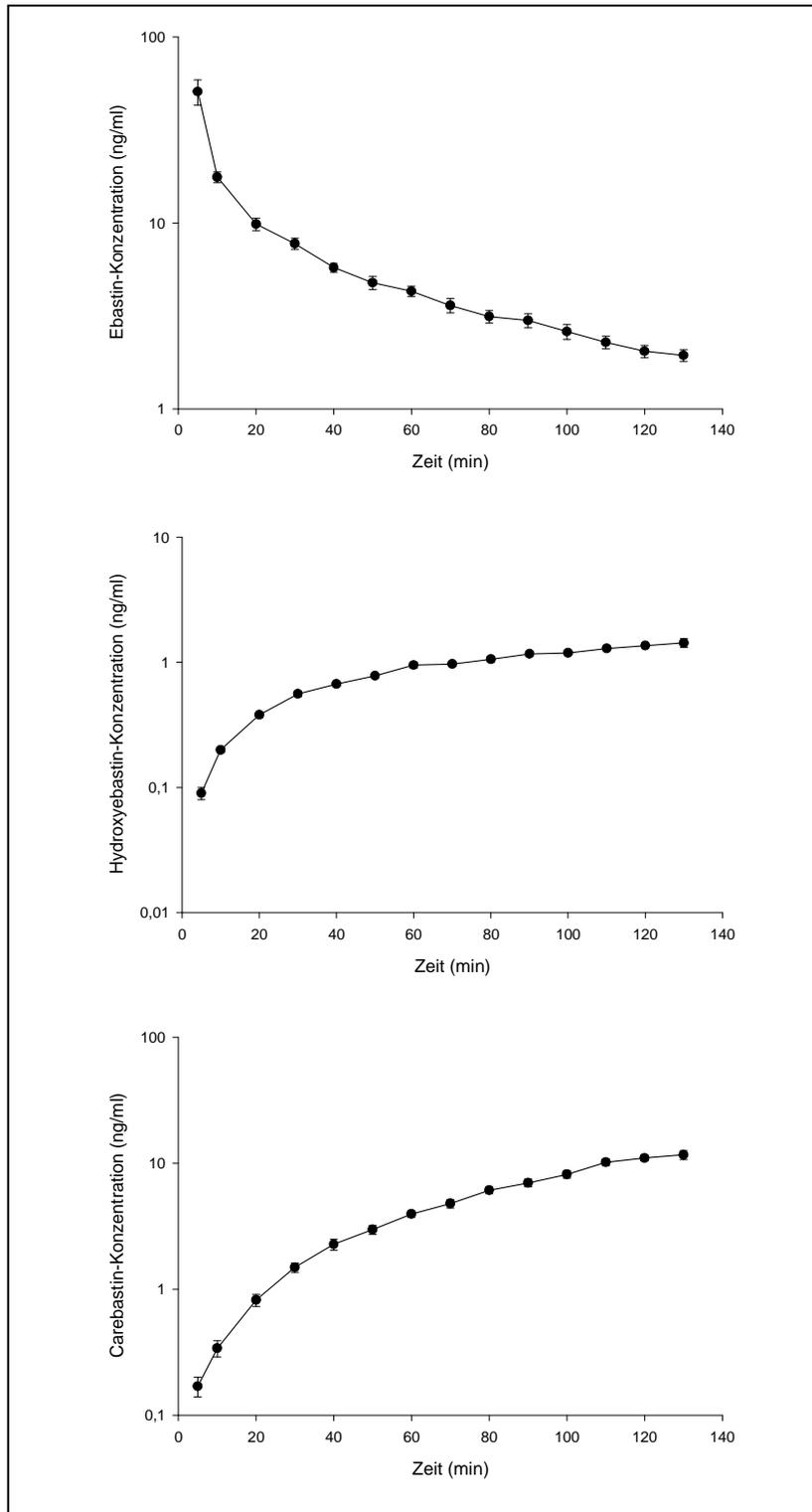


Abb. 7
 Zeitverlauf der Reservoir-Konzentration von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin.
 Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Ergebnisse von 6 Herzen (Kang et al., 2011).

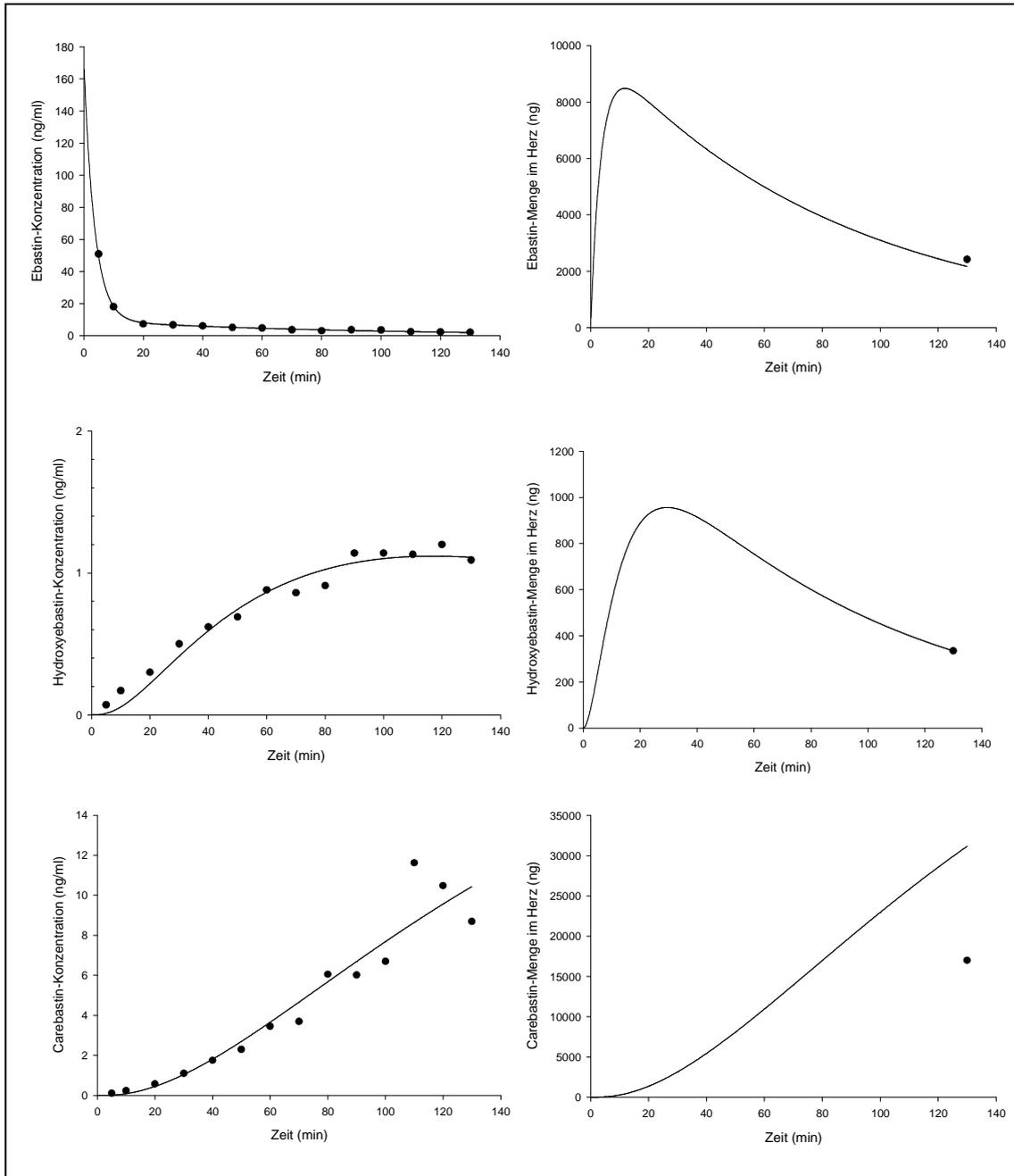


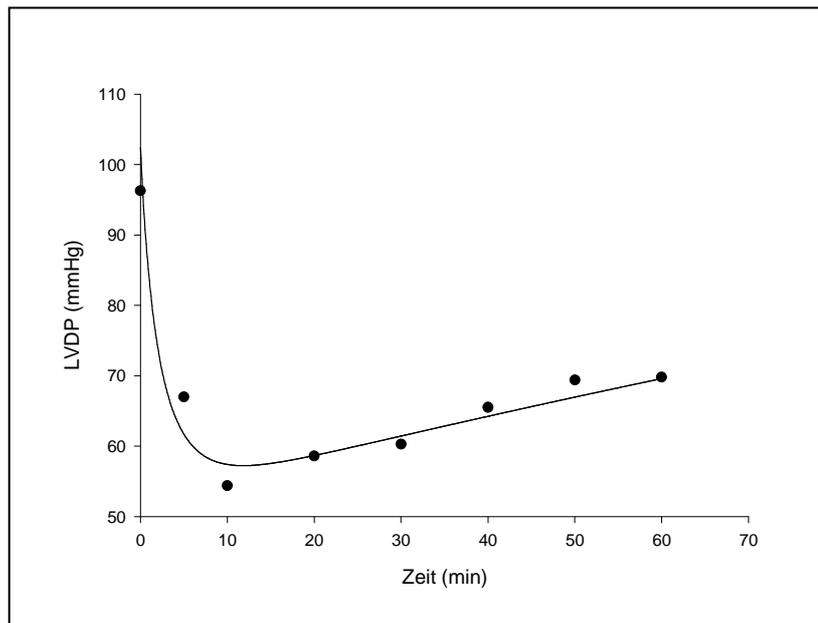
Abb. 8

Modell-Anpassung der Reservoir-Konzentration von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin in einem Herz sowie der Endmenge im Herzen am Ende der Perfusion. Die gemessenen Werte werden als schwarze Punkte, die individuelle Modell-Vorhersage als Linie dargestellt (Kang et al., 2011).

Tab. 1

Modell-Parameter für die kardiale Aufnahme und Metabolisierungskinetik von Ebastin beziehungsweise Bildung von Hydroxyebastin und Carebastin. Dargestellt sind die durch Fitten der Daten erhaltenen Mittelwerte sowie die inter-individuelle Variabilität als in Klammern gestellter relativer Standardfehler (%) der Ergebnisse von 6 Herzen (Kang et al., 2011).

Parameter (h^{-1})	Aufnahme		Metabolisierung
Ebastin	$k_{in,e}$	$k_{out,e}$	k_{eh}
	16,3 (16)	0,846 (32)	0,834 (9)
Hydroxyebastin	$k_{in,h}$	$k_{out,h}$	k_{hc}
	0,067 (7)	0,307 (49)	4,82 (22)
Carebastin	$k_{in,c}$	$k_{out,c}$	k_{cm}
	13,7 (28)	492 (17)	1,31 (5)

**Abb. 9**

Modellierung des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion als Funktion der Ebastin-Menge in einem Herz [$A_{eb}(t)$, wie in Abbildung 8 dargestellt] (Kang et al., 2011).

4.2. Ebastin ohne BSA im Puffer

In dieser Versuchsreihe wurden orientierende Experimente ohne BSA im Puffer durchgeführt. Initial erfolgte die Zugabe einer Ebastin-Menge zwischen 2,1 und 11,6 µg ($8,1 \pm 4,4$ µg) zu Beginn der Experimente. Abbildung 10 zeigt die durchschnittlichen Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ebastin und Carebastin innerhalb des Reservoirs. Nach 17,5 min lag die gemessene Ebastin-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Auch die Konzentration von Hydroxyebastin lag von Beginn an zu allen Messzeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze, weshalb eine Modellierung der Daten nicht möglich war.

Zu Beginn der Experimente betrug der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) 127,9 mmHg. Nach Ebastin-Zugabe zeigte sich ein signifikant geringerer LVDP-Abfall auf $69,4 \pm 6,3$ % ($p < 0,001$) des Ausgangswerts im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten. Der maximale Effekt wurde auch in dieser Versuchsreihe nach 10 Minuten erreicht.

Es wurde keine signifikante Veränderung der Herzfrequenz beobachtet.

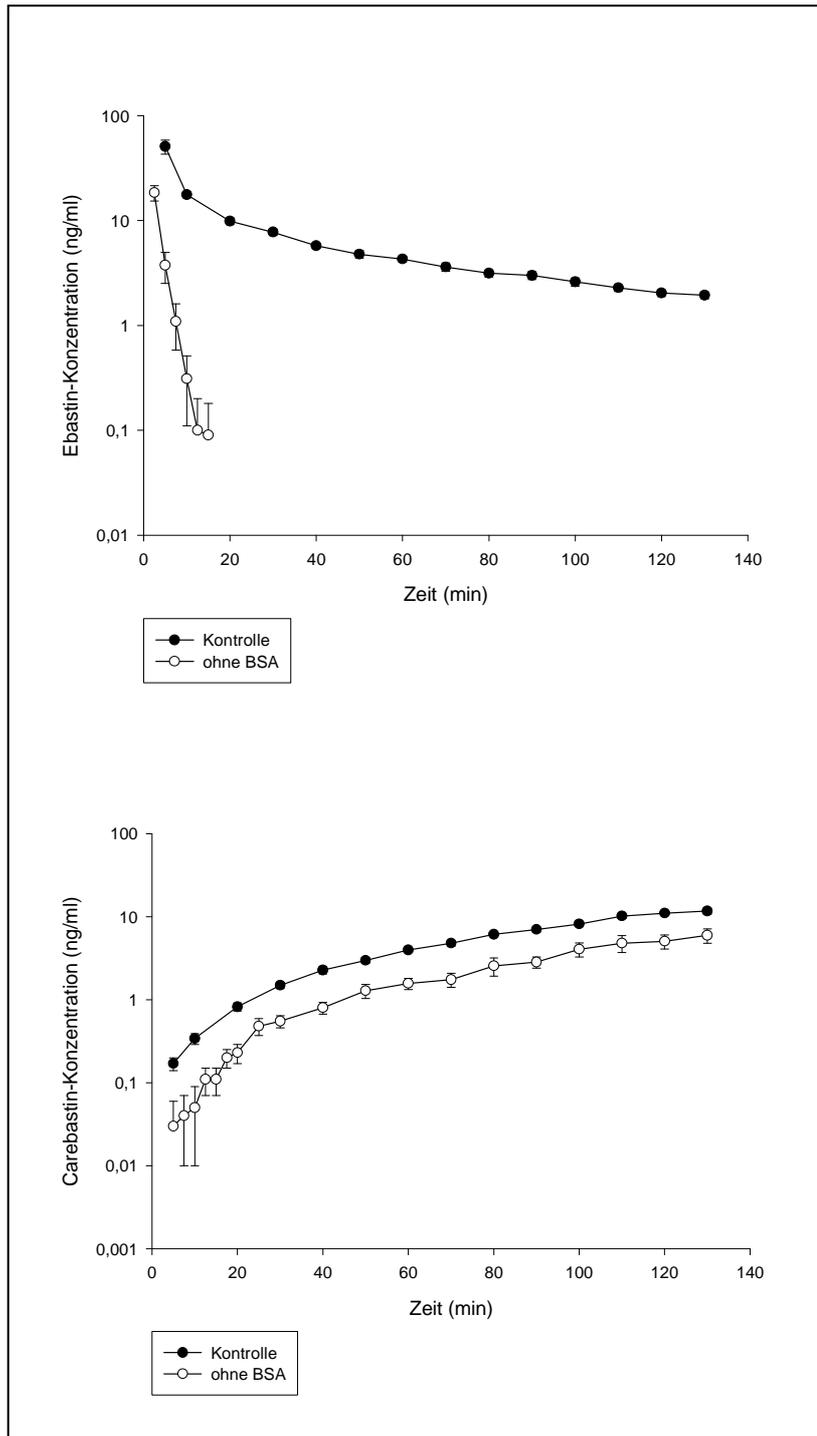


Abb. 10

Zeitverlauf der Reservoir-Konzentration von Ebastin und Carebastin der Ebastin-Experimente ohne BSA im Puffer verglichen mit der Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Ergebnisse von jeweils 6 Herzen.

4.3. Ebastin nach Hypoxie

Zur Auswertung wurden 5 der 6 Versuche verwendet. Auf die Auswertung des 6. Versuches wurde aufgrund von im Versuchsablauf aufgetretenen Arrhythmien verzichtet.

Die durchschnittlichen Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin innerhalb des Reservoirs nach der Hypoxie-Behandlung werden in Abbildung 11 im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten dargestellt. Zuvor erfolgte die Zugabe einer Ebastin-Menge zwischen 11,2 und 15,6 μg ($12,4 \pm 1,6 \mu\text{g}$) zum Zeitpunkt $t = 0$. Die Konzentration von Desalkylebastin lag zu allen Messzeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Menge an Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin im linken Ventrikel am Ende der Perfusion betrug $39,1 \pm 5,5 \%$, $1,8 \pm 0,3 \%$ und $19,5 \pm 6,9 \%$ der Anfangsmenge. Im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten zeigte sich, bei nahezu unveränderter Carebastin-Menge, eine signifikant ($p < 0,001$) höhere Ebastin-Menge sowie signifikant ($p < 0,01$) geringere Hydroxyebastin-Menge im Herzen am Ende der Perfusion. Auch in dieser Versuchsreihe wurde kein Desalkylebastin im Myokard gefunden. Abbildung 12 zeigt, beispielhaft für ein Herz, die gemessenen und vom Modell gefitteten Konzentrationen im Perfusat [$C_{\text{eb}}(t)$, $C_{\text{hy}}(t)$ und $C_{\text{ca}}(t)$] sowie die Endmengen im Herzen [$A_{\text{eb}}(t)$, $A_{\text{hy}}(t)$ und $A_{\text{ca}}(t)$].

In Tabelle 2 werden die vom Modell geschätzten Parameter für die Aufnahme und Metabolisierungskinetik von Ebastin nach der Hypoxie-Behandlung dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 5$) und die inter-individuelle Variabilität als relativer Standardfehler (%) in Klammern im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten ($n = 6$). Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Parameter sind bis auf $k_{\text{in,e}}$ jeweils statistisch signifikant.

Zunächst kam es unter Einwirkung der Hypoxie zu einem LVDP-Abfall auf $47,3 \pm 9,1 \%$ des Ausgangswerts. Der maximale Effekt wurde nach 30 Minuten der insgesamt 45-minütigen Hypoxie erreicht. Die anschließenden Reoxygenierungsphase bewirkte einen LVDP-Anstieg von $31,4 \pm 9,8 \%$ auf $78,7 \pm 16,3 \%$ des Ausgangswerts. Unter Ebastin zeigte sich eine erneute Verringerung von LVDP auf $84,5 \pm 15,7 \%$ des Wertes bei Beginn der Ebastin-Zugabe bzw. auf $74,6 \pm 25,4 \%$ des initialen Ausgangswerts zu Beginn der Hypoxie mit einem Maximum nach 20 Minuten. Im Verlauf dieser Versuchsreihe konnte nach Ebastin-Zugabe eine stärker ausgeprägte negativ inotrope Wirkung im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten beobachtet werden. Jedoch war dieser Effekt statistisch nicht signifikant, weshalb auf eine vergleichende Darstellung der LVDP-Verläufe verzichtet wurde. Die Modellierung des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion als Funktion der Ebastin-Menge im Herzen [$A_{\text{eb}}(t)$, siehe auch Abbildung 12] wird in Abbildung 13 für diese Versuchsreihe dargestellt.

Für die pharmakodynamischen Parameter konnte ein Populations-Schätzwert von $127 \pm 9,4$ mmHg für E_0 und $5,3 \pm 0,7$ ng/ml für EC_{50} ermittelt werden. In Abbildung 14 werden diese

Parameter mit denen der Kontroll-Experimente vergleichend dargestellt. Dabei zeigt sich nach der Hypoxie-Behandlung eine signifikante Zunahme des linksventrikulär entwickelten Druckes ($E_0 = LVDP_0$) von 18,7 % vor Beginn der Ebastin-Zugabe ($p < 0,01$) im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten. Außerdem fand sich eine signifikante Abnahme von EC_{50} um 40,4 % ($p < 0,05$).

Unter Einwirkung der Hypoxie kam es zu einem Abfall der Herzfrequenz auf $11,0 \pm 6,7$ % des Ausgangswerts. Der maximale Effekt wurde nach 30 Minuten der insgesamt 45-minütigen Hypoxie erreicht. Die anschließende Reoxygenierungsphase und folgende Ebastin-Zugabe bewirkte einen Anstieg der Herzfrequenz auf Ausgangsniveau. Unter Ebastin wurde in diesen Experimenten eine signifikant geringere Herzfrequenz im Vergleich zu den Kontrollversuchen beobachtet ($p < 0,001$).

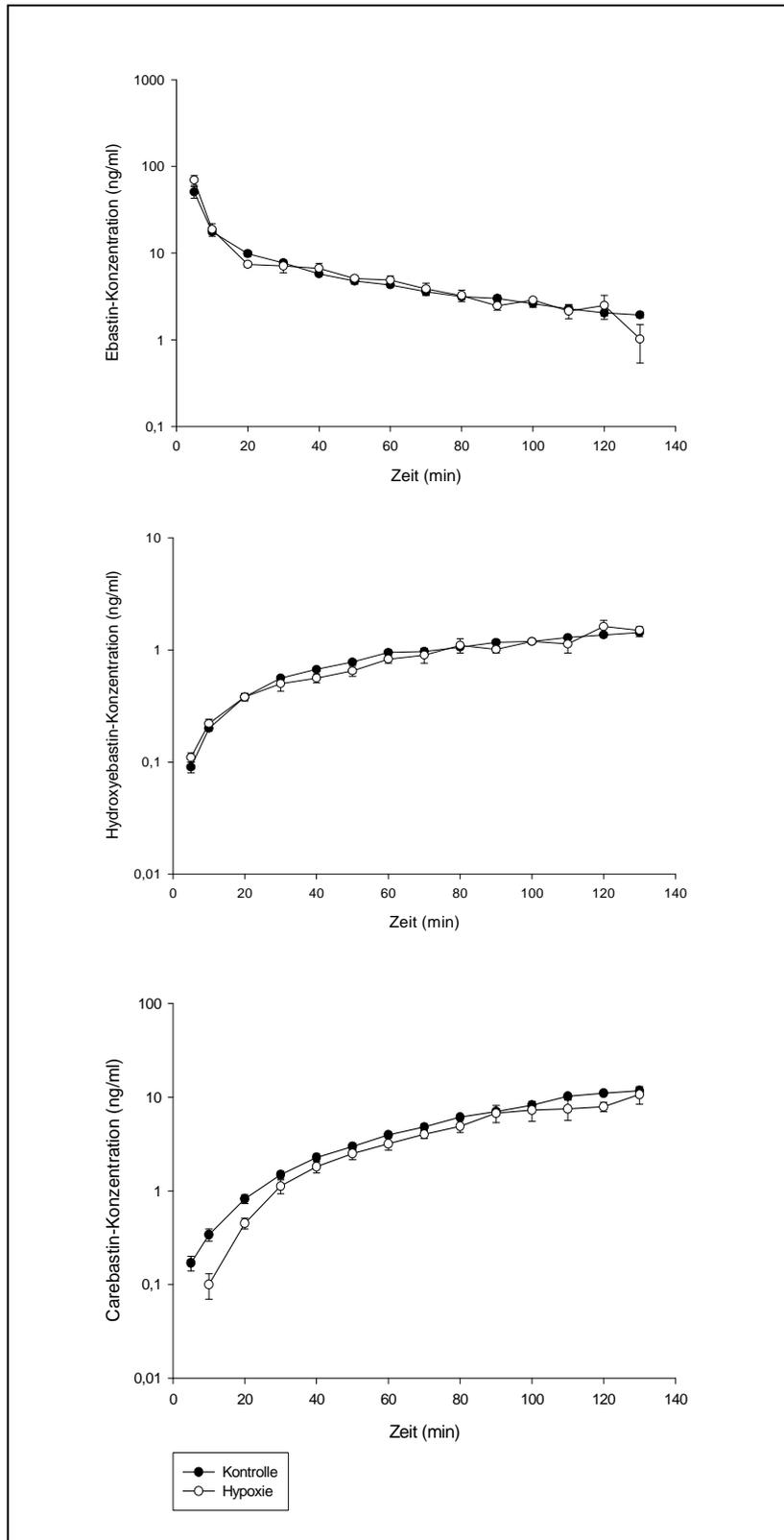


Abb. 11
 Zeitverlauf der Reservoir-Konzentration von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin nach Hypoxie (n = 5) verglichen mit der Kontrolle (n = 6). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

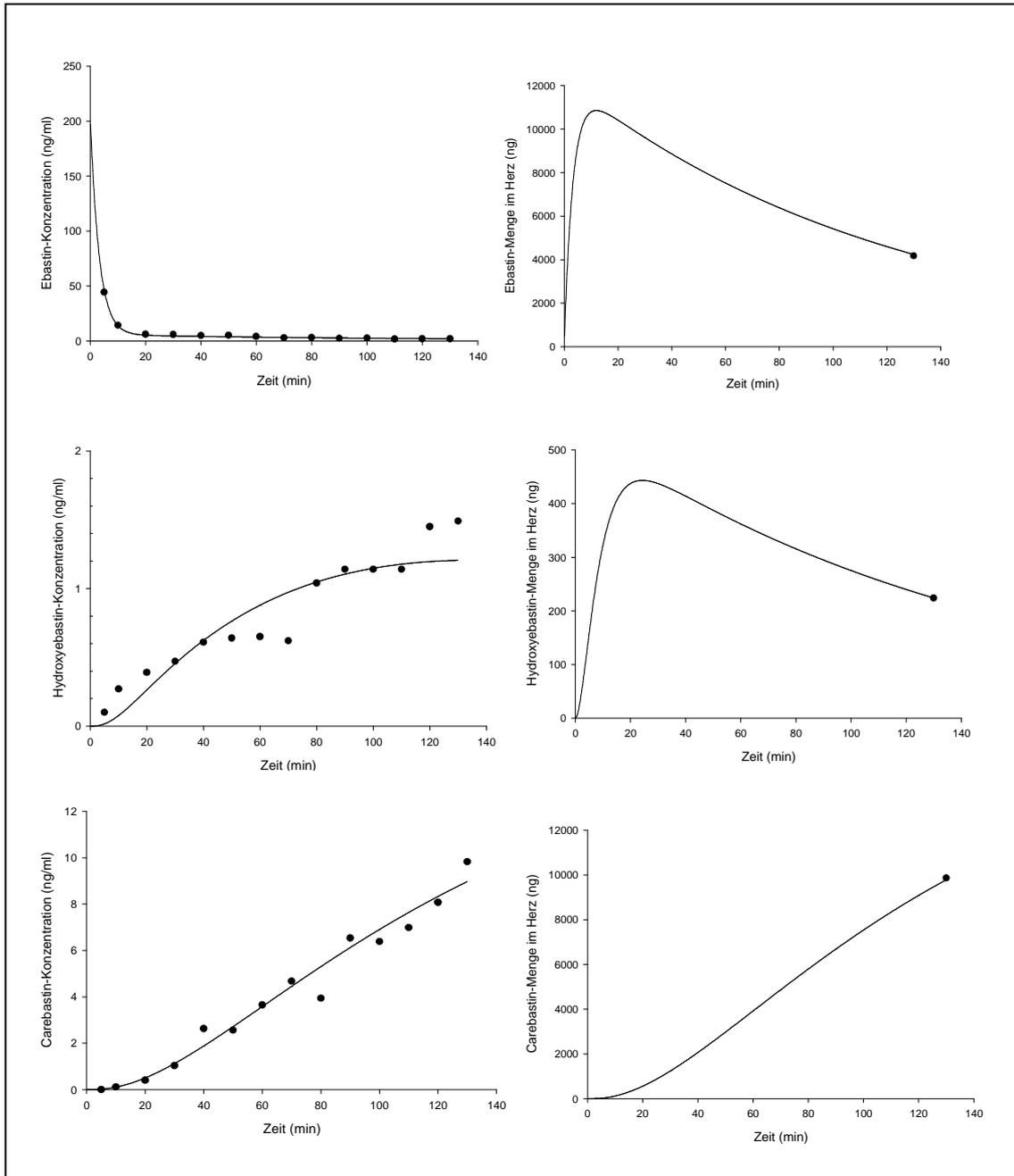


Abb. 12

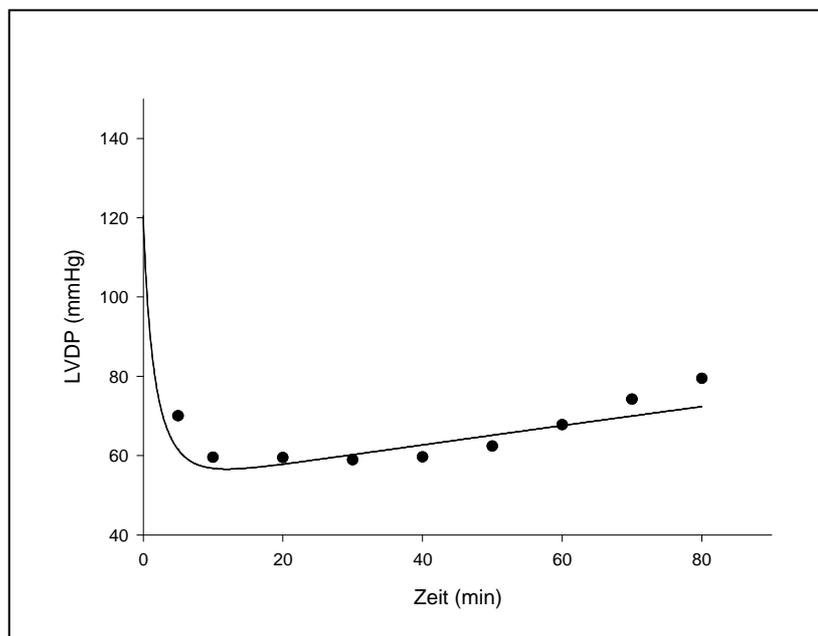
Modell-Anpassung der Reservoir-Konzentration von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin nach Hypoxie in einem Herz sowie der Endmenge im Herzen am Ende der Perfusion. Die gemessenen Werte werden als schwarze Punkte, die individuelle Modell-Vorhersage als Linie dargestellt.

Tab. 2

Modell-Parameter für die kardiale Aufnahme und Metabolisierungskinetik von Ebastin beziehungsweise Bildung von Hydroxyebastin und Carebastin nach Hypoxie im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten. Dargestellt sind die durch Fitten der Daten erhaltenen Mittelwerte sowie die inter-individuelle Variabilität als in Klammern gestellter relativer Standardfehler (%) der Ergebnisse von 6 bzw. 5 Herzen sowie die entsprechende Signifikanz.

Parameter (h^{-1})	Kontroll-Experimente	Hypoxie-Experimente	Signifikanz
$k_{out,e}$	0,846 (32)	0,514 (12)	$p < 0,05$
$k_{in,e}$	16,3 (16)	16,0 (17)	n. s.
k_{eh}	0,834 (9)	0,467 (8)	$p < 0,001$
$k_{out,h}$	0,307 (49)	0,533 (13)	$p < 0,01$
$k_{in,h}$	0,067 (7)	0,200 (20)	$p < 0,001$
k_{hc}	4,82 (22)	10,3 (16)	$p < 0,001$
$k_{out,c}$	492 (17)	296 (17)	$p < 0,001$
$k_{in,c}$	13,7 (28)	18,5 (19)	$p < 0,01$
k_{cm}	1,31 (5)	1,77 (31)	$p < 0,01$

n. s. = nicht signifikant

**Abb. 13**

Modellierung des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion als Funktion der Ebastin-Menge in einem Herz [$A_{eb}(t)$, wie in Abbildung 12 dargestellt] nach Hypoxie.

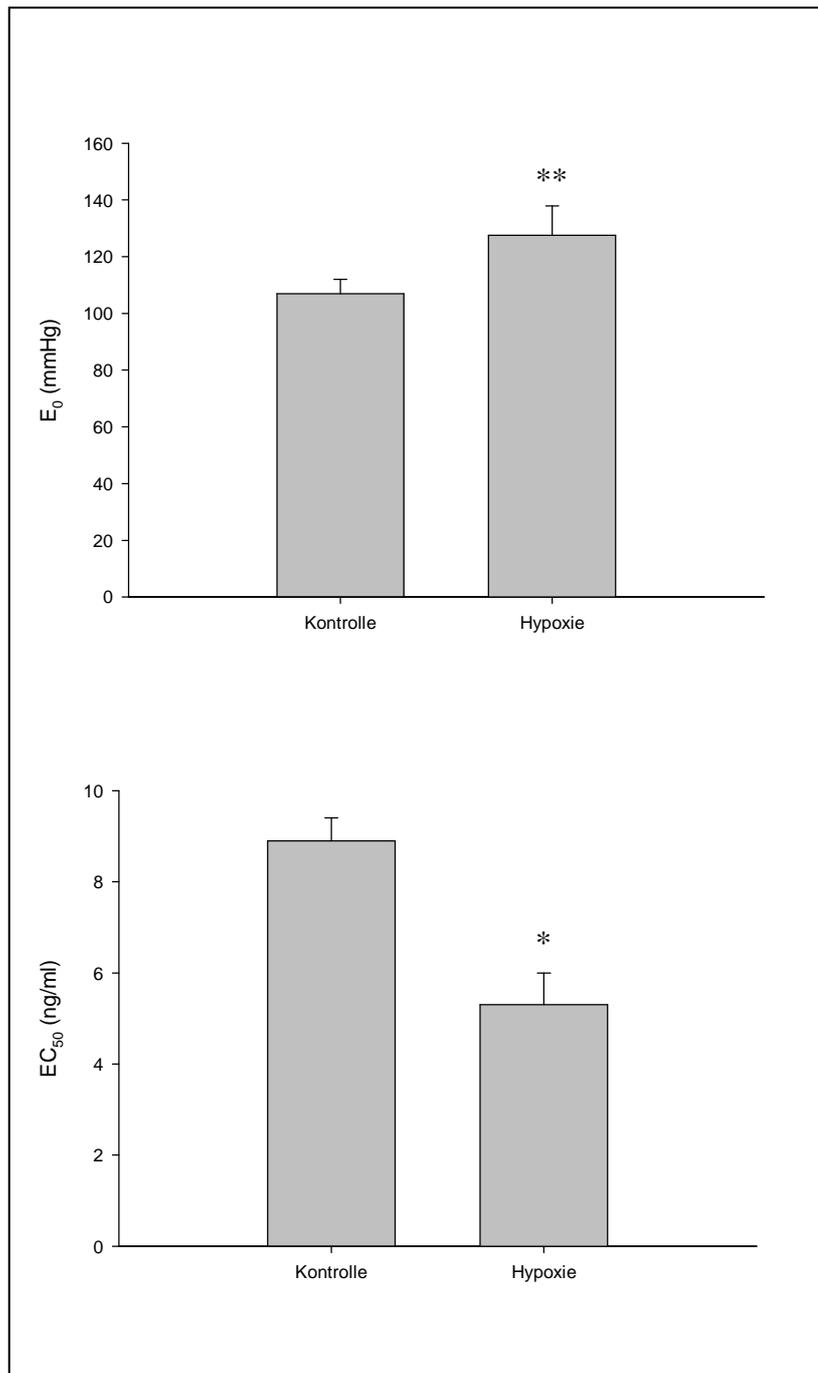


Abb. 14

Vergleich der vom Modell geschätzten pharmakodynamischen Parameter E_0 und EC_{50} nach Hypoxie mit der Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Ergebnisse von 6 Herzen der Kontrolle bzw. 5 Herzen der Hypoxie-Behandlung. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsreihen sind, wie folgt, gekennzeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4. Ebastin nach akuter Isoprenalin-Wirkung

Nachdem die akute Isoprenalin-Einwirkung von 60 Minuten beendet war, erfolgte die Zugabe einer Ebastin-Dosis zwischen 5,2 und 9,0 μg ($6,8 \pm 1,4 \mu\text{g}$). Die ermittelten durchschnittlichen Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ebastin und dessen Metaboliten werden in Abbildung 15 im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten dargestellt. Die Konzentration von Desalkylebastin lag zu allen Messzeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Menge an Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin betrug $35,3 \pm 6,5 \%$, $6,4 \pm 2,1 \%$ und $27,2 \pm 14,4 \%$ der Anfangsmenge. Somit fanden sich, verglichen mit den Kontroll-Experimenten, signifikant ($p < 0,05$) höhere Endmengen im linken Ventrikel am Ende der Perfusion. Im Myokard konnte ebenfalls kein Desalkylebastin gefunden werden. Die gemessenen und vom Modell gefitteten Konzentrationen im Perfusat [$C_{\text{eb}}(t)$, $C_{\text{hy}}(t)$ und $C_{\text{ca}}(t)$] sowie die Endmengen im Herzen [$A_{\text{eb}}(t)$, $A_{\text{hy}}(t)$ und $A_{\text{ca}}(t)$] werden in Abbildung 16 für ein Herz dargestellt.

Nach dem Fitten der Daten wurden die Parameter für die kardiale Aufnahme und Metabolisierungskinetik von Ebastin nach akuter Isoprenalin-Wirkung erhalten. Diese werden in Tabelle 3 als Mittelwerte ($n = 6$) mit inter-individueller Variabilität als in Klammern gestellter relativer Standardfehler (%) im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten ($n = 6$) dargestellt. Dabei wurden für $k_{\text{in,e}}$, $k_{\text{out,h}}$, k_{hc} und k_{cm} statistisch signifikante Unterschiede ermittelt ($p < 0,01$).

Isoprenalin bewirkte zunächst einen LVDP-Anstieg von $34,5 \pm 42,0 \%$, dessen Maximum am Ende der einstündigen Behandlung erreicht wurde. Anschließend erfolgte der Wechsel des Perfusats auf modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer. Unter der nun folgenden Ebastin-Zugabe kam es zu einer Verringerung des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP) auf $90,4 \pm 11,3 \%$ des Werts zu Beginn der Ebastin-Zugabe mit einem maximalen Effekt nach 5 Minuten. Ein Vergleich des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion der Isoprenalin-Experimente nach Ebastin-Zugabe mit den Kontroll-Versuchen ist in Abbildung 17 dargestellt. Dabei zeigt sich ein signifikant geringerer LVDP-Abfall nach akuter Isoprenalin-Wirkung ($p < 0,05$). Aufgrund des schlechten Fits wurde auf die Darstellung der Modellierung des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion verzichtet.

Abbildung 18 zeigt die pharmakodynamischen Parameter E_0 und EC_{50} dieser Versuchsreihe im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten. Dabei beträgt der Populations-Schätzwert für $E_0 = 120 \pm 14,3 \text{ mmHg}$ und für $EC_{50} = 18,9 \pm 3,5 \text{ ng/ml}$. Somit ergab sich nach der Isoprenalin-Behandlung ein leicht erhöhter linksventrikulär entwickelter Druck ($E_0 = \text{LVDP}_0$) vor Beginn der Ebastin-Zugabe im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Für EC_{50} konnte eine deutlich signifikante Zunahme um 112 % ermittelt werden ($p < 0,001$).

Unter Einwirkung von Isoprenalin kam es zunächst zu einem Anstieg der Herzfrequenz um $22,2 \pm 31,0$ % des Ausgangswerts mit einem Maximum am Ende der einstündigen Behandlung und anschließendem Wechsel des Perfusats auf modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer. Nach Ebastin-Zugabe wurde in diesen Experimenten eine signifikant höhere Herzfrequenz im Vergleich zu den Kontrollversuchen beobachtet ($p < 0,001$).

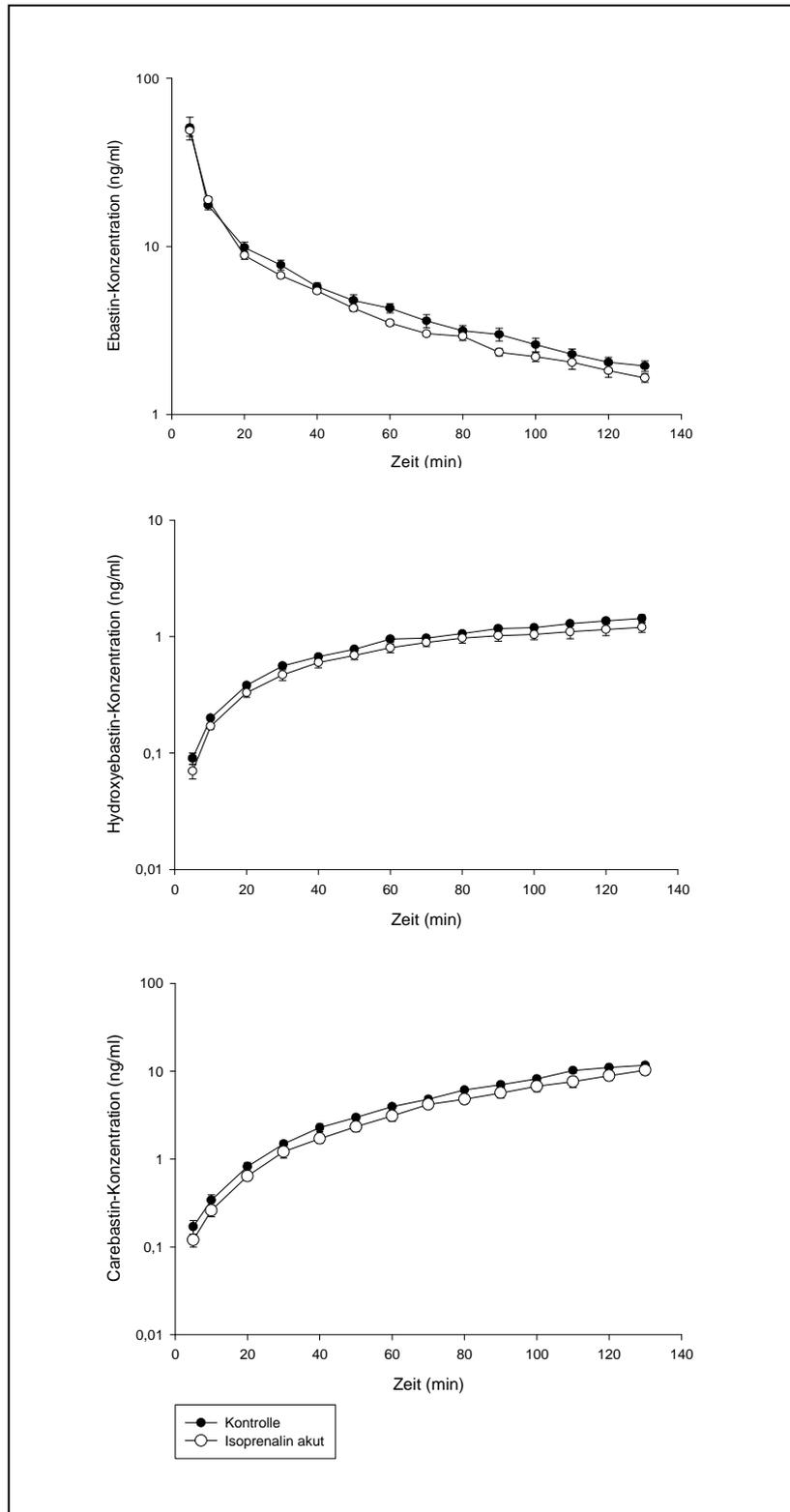


Abb. 15

Zeitverlauf der Reservoir-Konzentration von Ebasin, Hydroxyebasin und Carebasin nach akuter Isoprenalin-Wirkung verglichen mit der Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Ergebnisse von jeweils 6 Herzen.

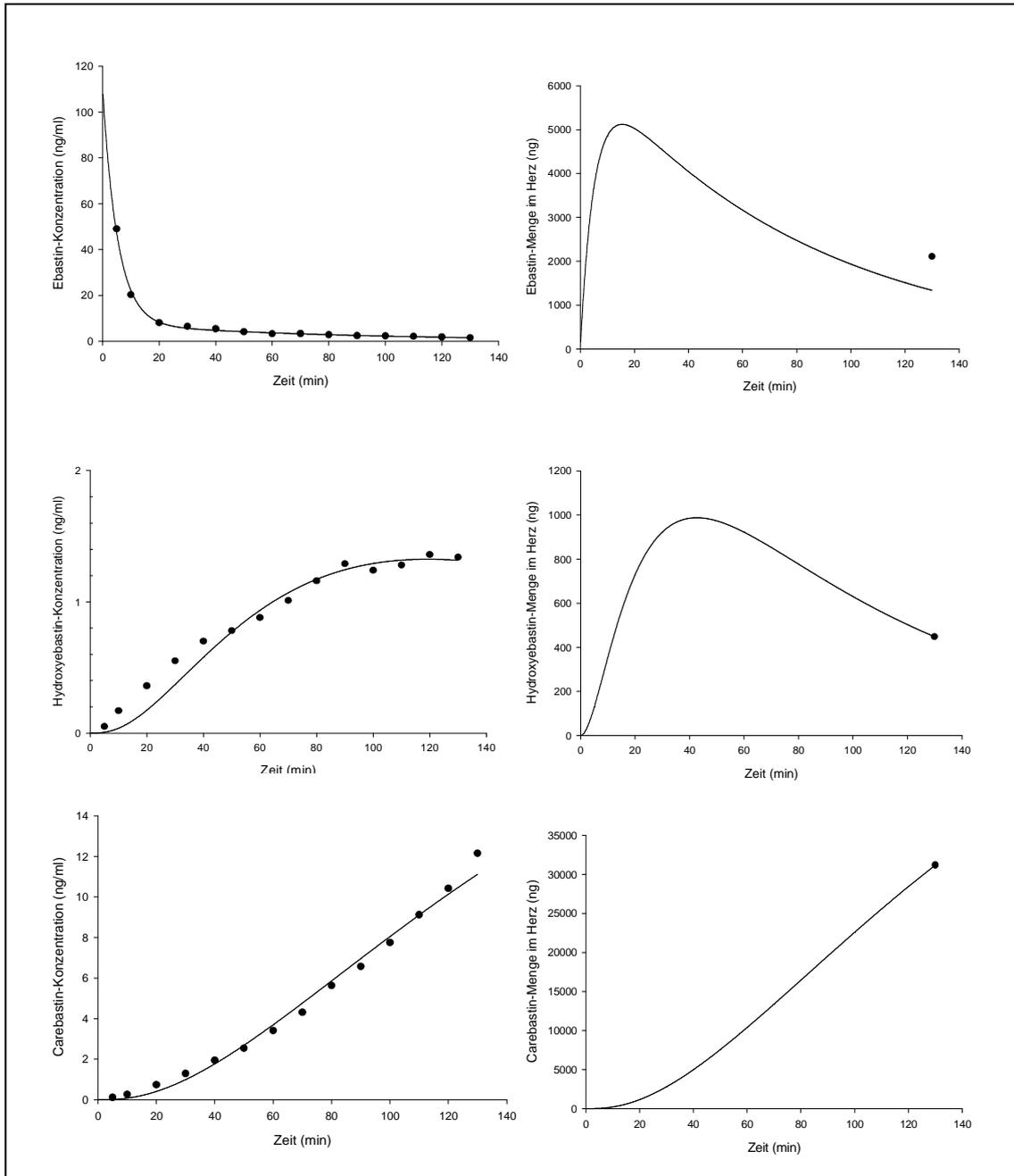


Abb. 16

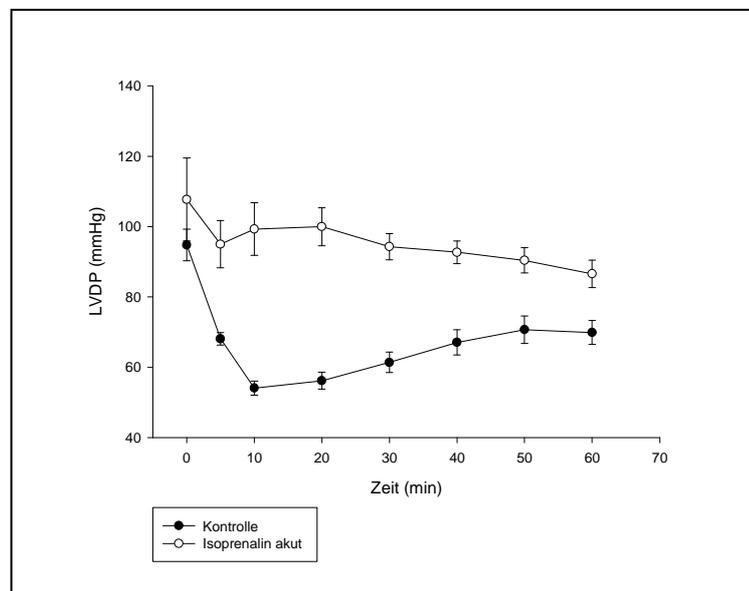
Modell-Anpassung der Reservoir-Konzentration von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin nach akuter Isoprenalin-Wirkung in einem Herz sowie der Endmenge im Herzen am Ende der Perfusion. Die gemessenen Werte werden als schwarze Punkte, die individuelle Modell-Vorhersage als Linie dargestellt.

Tab. 3

Modell-Parameter für die kardiale Aufnahme und Metabolisierungskinetik von Ebastin beziehungsweise Bildung von Hydroxyebastin und Carebastin nach akuter Isoprenalin-Wirkung im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten. Dargestellt sind die durch Fitten der Daten erhaltenen Mittelwerte sowie die inter-individuelle Variabilität als in Klammern gestellter relativer Standardfehler (%) der Ergebnisse von jeweils 6 Herzen sowie die entsprechende Signifikanz.

Parameter (h^{-1})	Kontroll-Experimente	Isoprenalin-Experimente	Signifikanz
$k_{out,e}$	0,846 (32)	0,678 (12)	n. s.
$k_{in,e}$	16,3 (16)	10,5 (13)	$p < 0,001$
k_{eh}	0,834 (9)	0,792 (9)	n. s.
$k_{out,h}$	0,307 (49)	0,612 (23)	$p < 0,01$
$k_{in,h}$	0,067 (7)	0,085 (29)	n. s.
k_{hc}	4,82 (22)	3,30 (22)	$p < 0,01$
$k_{out,c}$	492 (17)	520 (10)	n. s.
$k_{in,c}$	13,7 (28)	12,3 (11)	n. s.
k_{cm}	1,31 (5)	0,780 (11)	$p < 0,001$

n. s. = nicht signifikant

**Abb. 17**

Vergleich der negativ inotropen Reaktion nach akuter Isoprenalin-Wirkung mit der Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Ergebnisse von jeweils 6 Herzen.

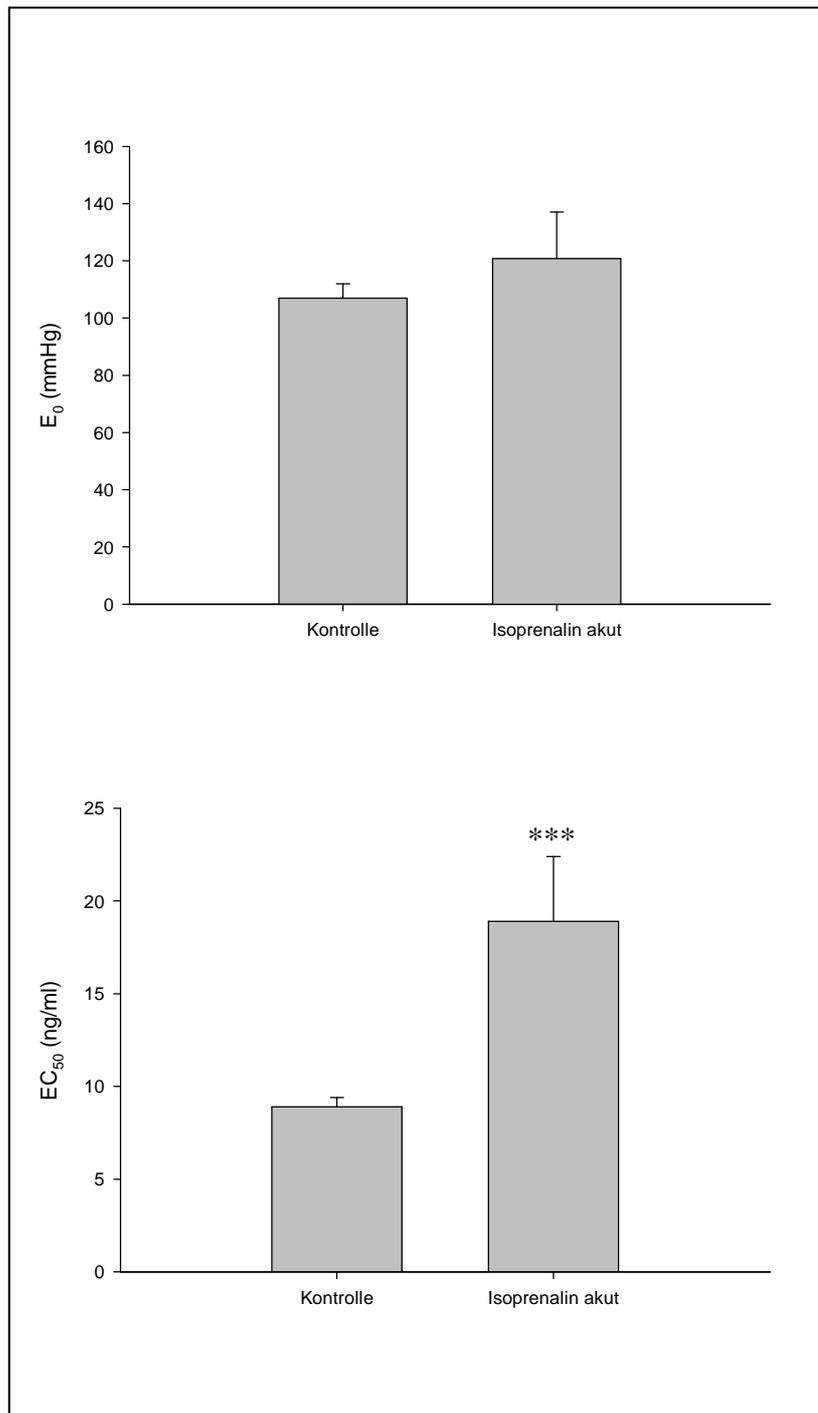


Abb. 18

Vergleich der vom Modell geschätzten pharmakodynamischen Parameter E_0 und EC_{50} nach akuter Isoprenalin-Wirkung mit der Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Ergebnisse von jeweils 6 Herzen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsreihen sind, wie folgt, gekennzeichnet: *** $p < 0,001$.

4.5. Ebastin unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie

Zur Auswertung wurden 5 der 6 Versuche herangezogen. Da der 6. Versuch aufgrund von Herzversagen vorzeitig abgebrochen werden musste, wurde auf dessen Einbeziehung in die Ergebnisauswertung verzichtet.

Die durchschnittlichen Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie innerhalb des Reservoirs werden in Abbildung 19 im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten dargestellt. Zuvor erfolgte die initiale Zugabe einer Ebastin-Menge zwischen 1,2 und 2,8 μg ($2,1 \pm 0,6 \mu\text{g}$) zum Zeitpunkt $t = 0$. Die Konzentration von Desalkylebastin lag zu allen Messzeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze. Aufgrund des schlechten Fits der Endmengen der Stoffe im Herzen war eine Modellierung der Daten dieser Versuchsreihe nicht möglich. Jedoch konnten mit Hilfe einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen (linear mixed model, S-Plus, Math Soft, Seattle, USA) signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) in den Konzentrations-Zeit-Kurvenverläufen der einzelnen Stoffe ermittelt werden (siehe auch Abb. 19).

Nach der Ebastin-Zugabe konnte eine LVDP-Reduktion auf $67,0 \pm 7,1 \%$ des Ausgangswerts nach 10 Minuten beobachtet werden. Abbildung 20 zeigt die Modellierung des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion als Funktion der Ebastin-Menge im Herzen. Ein Vergleich des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion der Hypertrophie-Experimente mit den Kontroll-Versuchen nach Ebastin-Zugabe ist in Abbildung 21 dargestellt. Dabei zeigt sich ein signifikant geringer LVDP-Abfall unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie ($p < 0,001$).

Für die pharmakodynamischen Parameter wurde ein Populations-Schätzwert von $113 \pm 11,7$ mmHg für E_0 und $9,5 \pm 3,5$ ng/ml für EC_{50} erhalten. In Abbildung 22 werden diese Parameter mit denen der Kontroll-Experimente vergleichend dargestellt. Dabei zeigen sich zwischen Hypertrophie- und Kontroll-Experimenten für E_0 als auch für EC_{50} keine signifikanten Unterschiede.

Es wurden keine signifikanten Veränderungen der Herzfrequenz beobachtet.

Um zu überprüfen, ob die Isoprenalin-Behandlung eine kardiale Hypertrophie verursacht hat, wurde das Verhältnis aus Herzgewicht zu Körpergewicht der Versuchstiere dieser Experimente mit der Kontroll-Versuchsreihe verglichen. Dabei zeigte sich unter der Isoprenalin-Behandlung ein statistisch signifikanter ($p < 0,01$) Anstieg des Verhältnis aus Herz-/Körpergewicht von 21 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 23).

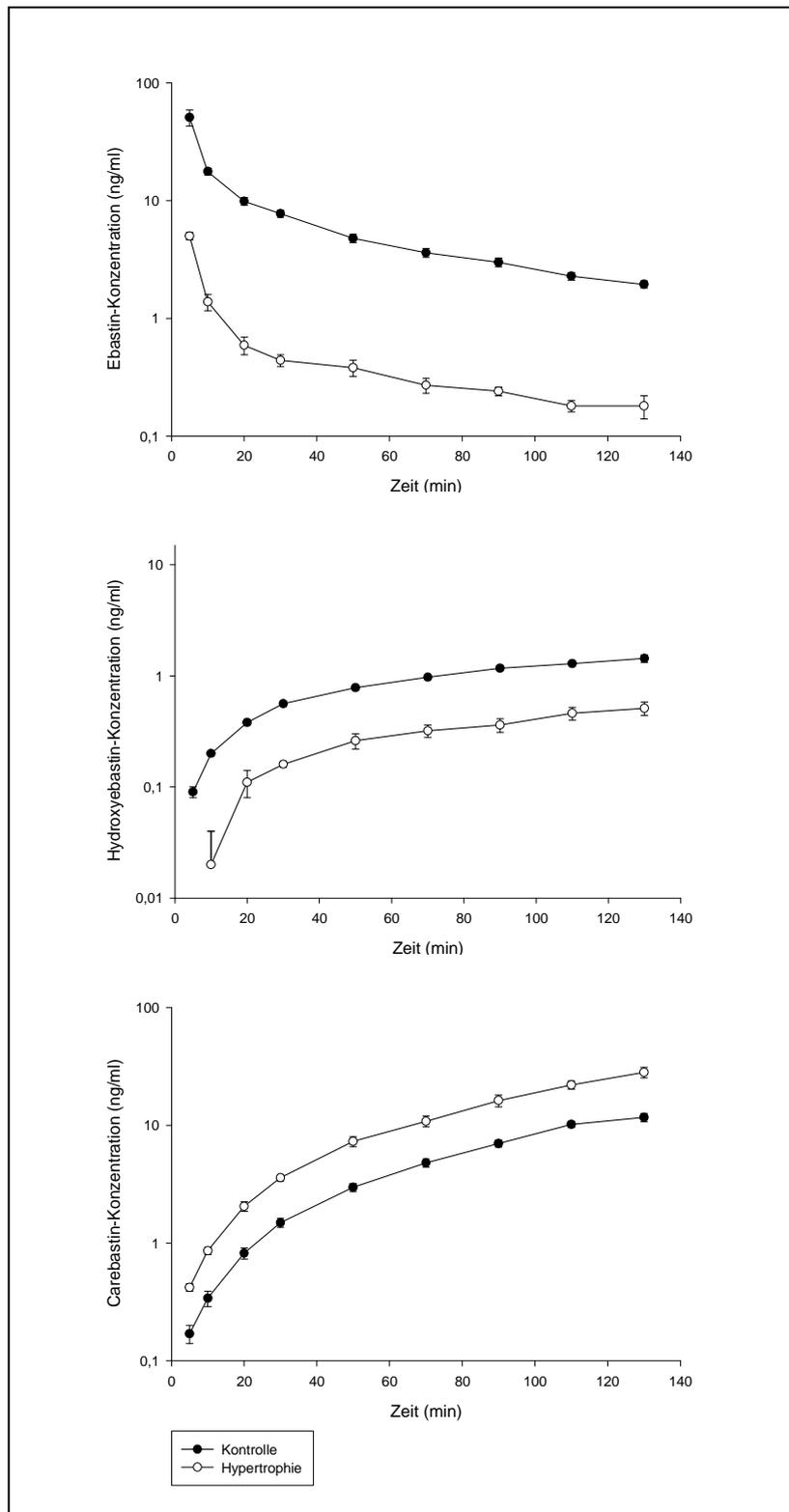


Abb. 19

Zeitverlauf der Reservoir-Konzentration von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie (n = 5) verglichen mit der Kontrolle (n = 6). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

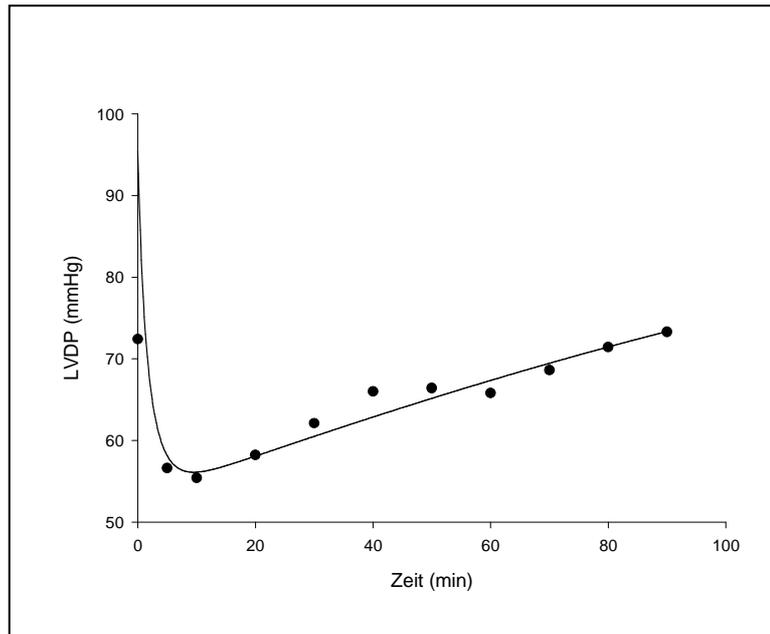


Abb. 20

Modellierung des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion als Funktion der Ebastin-Menge in einem Herz unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie.

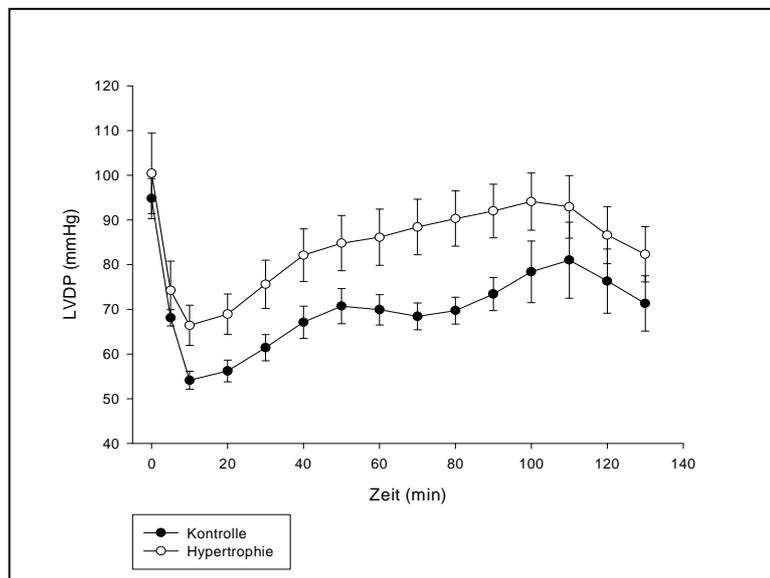


Abb. 21

Vergleich der negativ inotropen Reaktion unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie (n = 5) mit der Kontrolle (n = 6). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

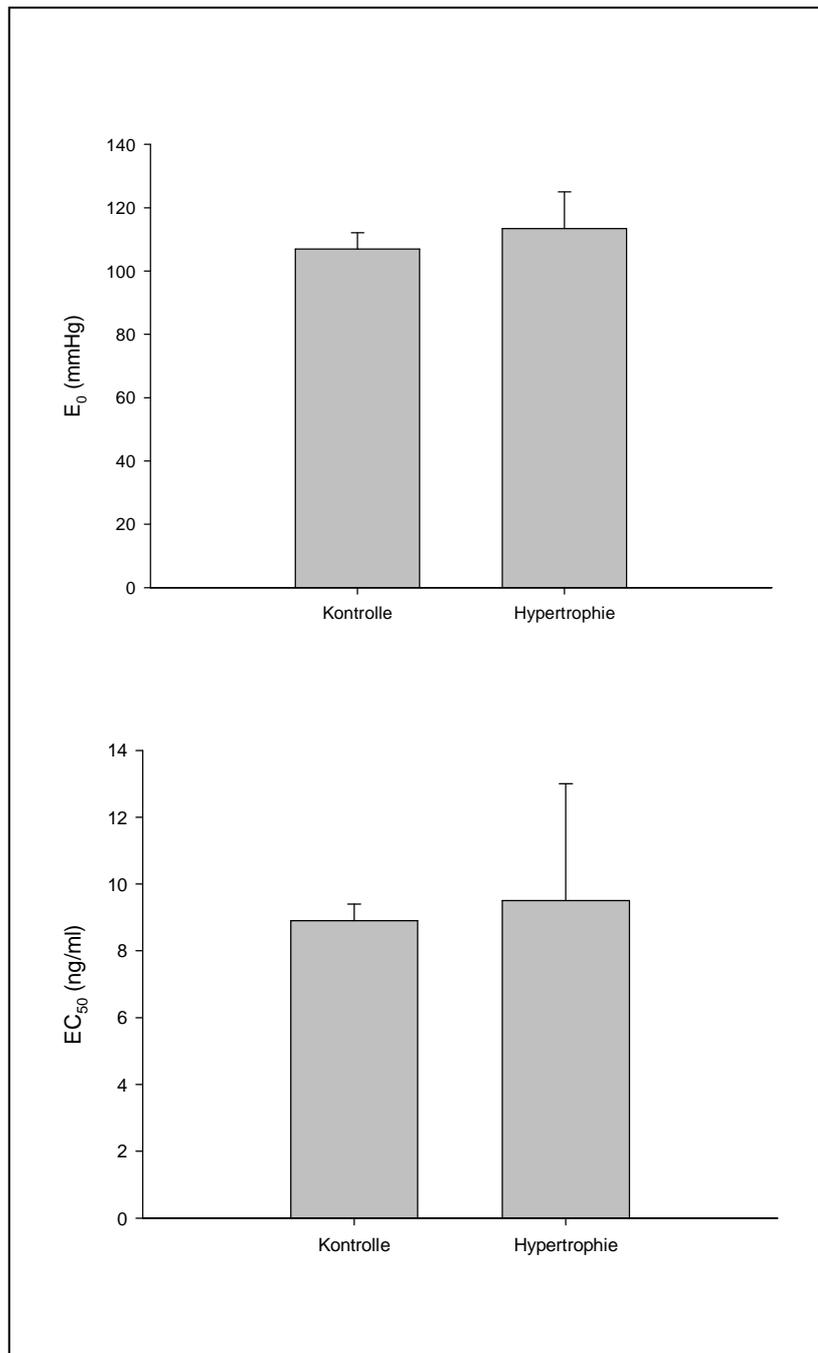


Abb. 22

Vergleich der vom Modell geschätzten pharmakodynamischen Parameter E_0 und EC_{50} unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie mit der Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Ergebnisse von 6 Herzen der Kontrolle bzw. 5 Hypertrophie-Herzen. Die Unterschiede zwischen beiden Versuchsreihen sind jeweils nicht signifikant.

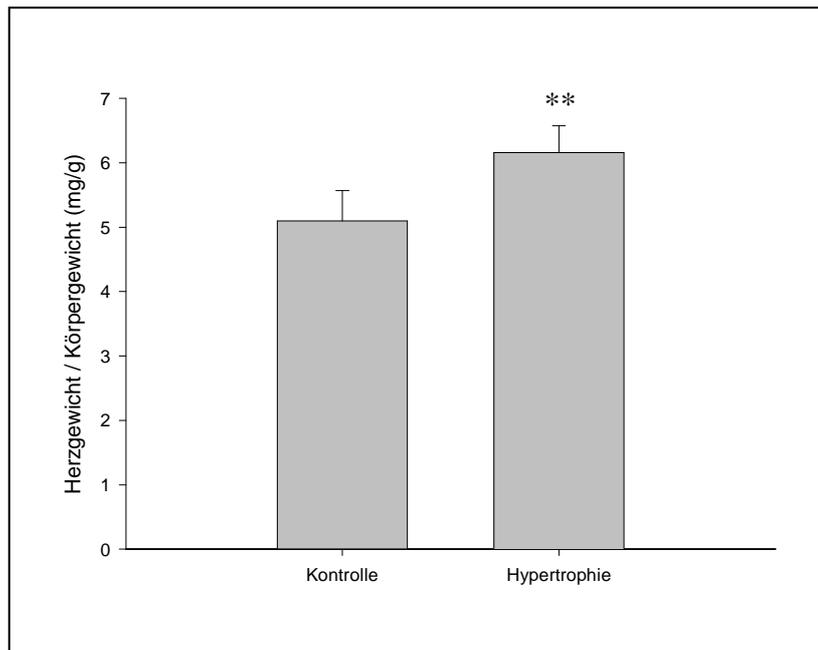


Abb. 23

Verhältnis aus Herzgewicht zu Körpergewicht (mg/g) der Versuchstiere nach täglicher Isoprenalin-Injektion für 7 Tage zur Erzeugung einer kardialen Hypertrophie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Ergebnisse von 6 Herzen der Kontrolle bzw. 5 Hypertrophie-Herzen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsreihen sind, wie folgt, gekennzeichnet: ** $p < 0,01$.

4.6. Ebastin mit CYP 2J-Hemmer und CYP 2J-Hemmer

In dieser Versuchsreihe wurden orientierende Experimente mit Ebastin unter Zugabe eines CYP 2J-Hemmers im Rahmen einer Pilotstudie durchgeführt. Zu Beginn der Experimente erfolgte die Zugabe einer Ebastin-Menge zwischen 1,4 und 2,2 μg ($1,9 \pm 0,3 \mu\text{g}$). Abbildung 24 zeigt die durchschnittlichen Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ebastin und Carebastin innerhalb des Reservoirs. Die Konzentration von Desalkylebastin lag zu allen Messzeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze. Auch die Hydroxyebastin-Konzentration war bei allen Messungen unterhalb der Bestimmungsgrenze, weshalb eine Modellierung der Daten nicht möglich war. Im Myokard wurden kein Carebastin und kein Desalkylebastin gefunden.

Nach Zugabe von Ebastin und dem CYP 2J-Hemmer kam es zu einer Verringerung von LVDP auf $33,9 \pm 4,5 \%$ des Wertes zu Beginn der Experimente. Der maximale Effekt wurde nach 20 Minuten beobachtet. Die Modellierung des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion als Funktion der Ebastin-Menge im Herzen wird in Abbildung 25 für diese Versuchsreihe dargestellt. Eine vergleichende Darstellung des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion

nach Ebastin-Zugabe mit den Kontroll-Versuchen erfolgt in Abbildung 26. Dabei fand sich eine signifikant höhere LVDP-Reduktion bei Ebastin mit CYP 2J-Hemmer ($p < 0,001$).

Abbildung 27 zeigt die pharmakodynamischen Parameter E_0 und EC_{50} dieser Versuchsreihe im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten. Dabei beträgt der Populations-Schätzwert für $E_0 = 78 \pm 5,2$ mmHg und für $EC_{50} = 0,3 \pm 0,02$ ng/ml. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme für E_0 von 27,1 % ($p < 0,001$). Auch für EC_{50} konnte in dieser Versuchsreihe eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten beobachtet werden ($p < 0,001$). Diese war mit 96,6 % besonders deutlich ausgeprägt.

Es wurde eine signifikant geringere Herzfrequenz unter Zugabe des CYP 2J-Hemmers verglichen mit den Kontroll-Versuchen beobachtet ($p < 0,001$).

Abbildung 28 zeigt die Auswirkung einer ansteigenden Konzentration des CYP 2J-Hemmers auf den sich entwickelnden linksventrikulären Druck (LVDP). Dabei sind 8 verschiedene Konzentrationen (0,02 μ M, 0,04 μ M, 0,2 μ M, 0,4 μ M, 0,6 μ M, 0,8 μ M, 1,5 μ M, 5 μ M), welche jeweils für 10 min im System zirkulierten, in aufsteigender Reihenfolge dargestellt. Der CYP 2J-Hemmer bewirkte eine durchschnittliche LVDP-Reduktion um $8,7 \pm 3,2$ % mit einem Maximum nach 5 Minuten. Danach zeigte sich ein Anstieg von LVDP um $4,4 \pm 2,2$ %, bevor die weitere Zugabe der nächst höheren Konzentration des Hemmers zu einem erneuten Abfall führte. Ab einer Hemmer-Konzentration von 1,5 μ M wurde eine kontinuierliche LVDP-Abnahme festgestellt.

Es wurde keine signifikante Veränderung der Herzfrequenz beobachtet.

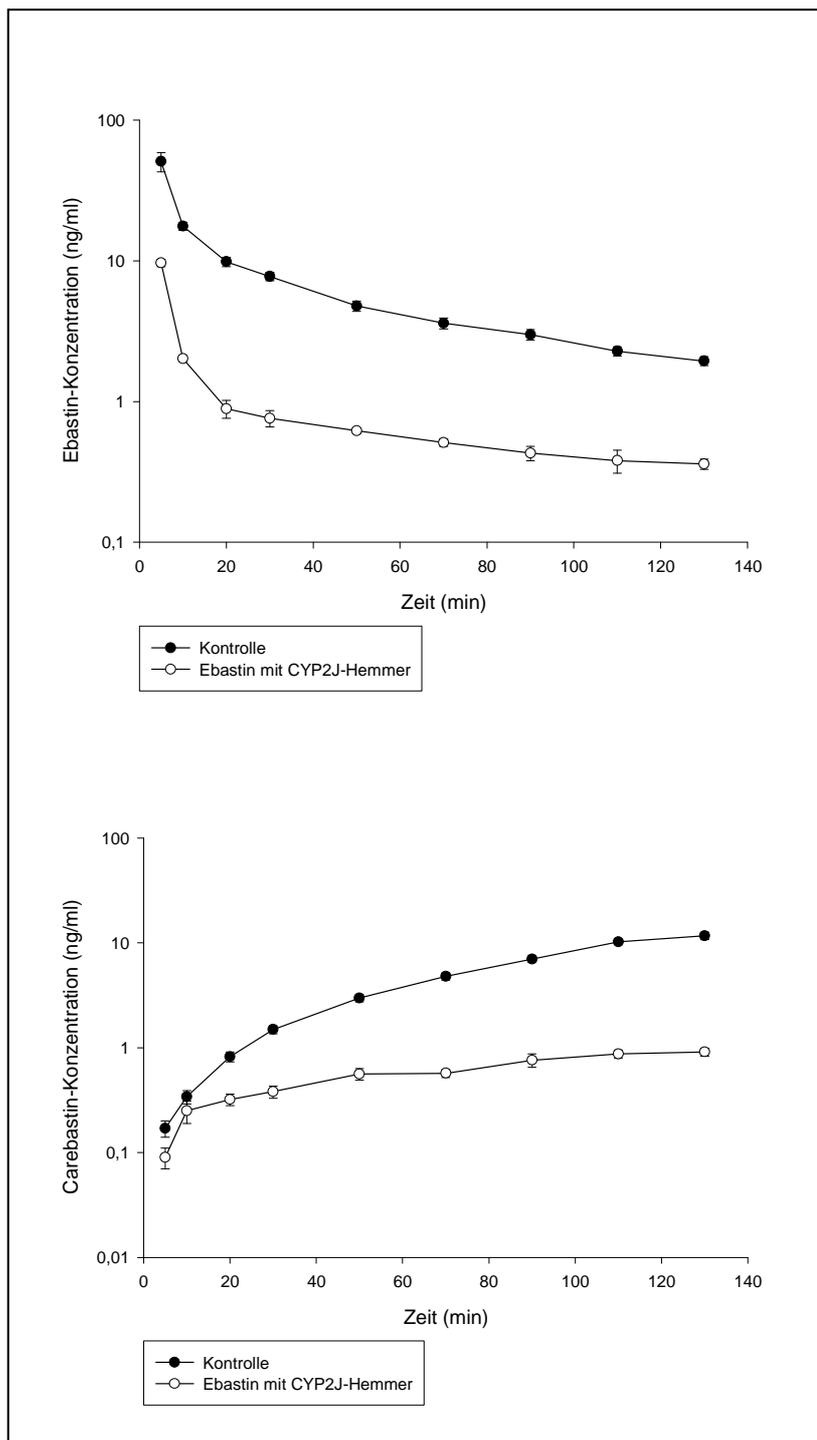


Abb. 24

Zeitverlauf der Reservoir-Konzentration von Ebastin und Carebastin von Ebastin mit CYP 2J-Hemmer (n = 5) verglichen mit der Kontrolle (n = 6). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

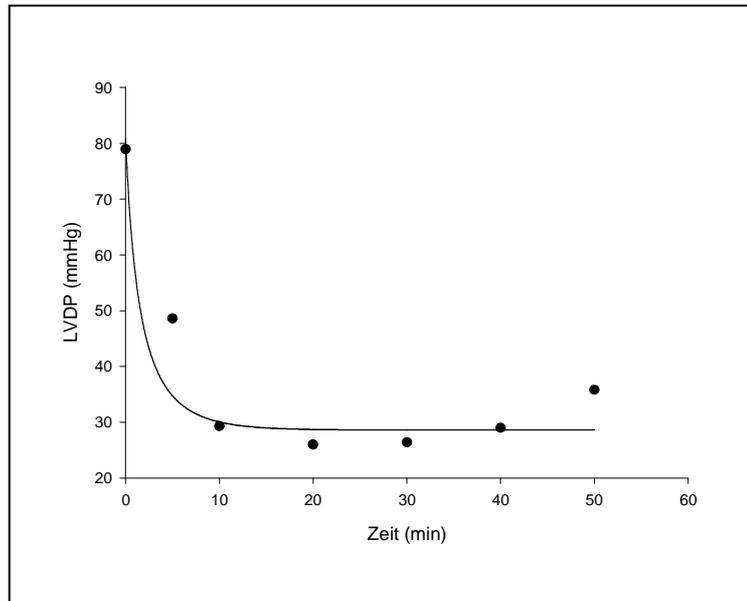


Abb. 25

Modellierung des Zeitverlaufs der negativ inotropen Reaktion als Funktion der Ebastin-Menge in einem Herz mit CYP 2J-Hemmer.

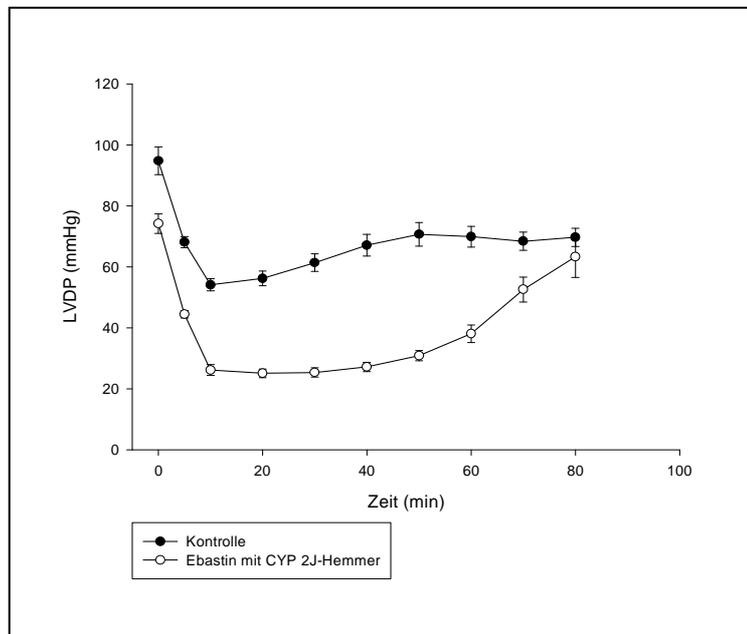


Abb. 26

Vergleich der negativ inotropen Reaktion von Ebastin mit CYP 2J-Hemmer ($n = 5$) mit der Kontrolle ($n = 6$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

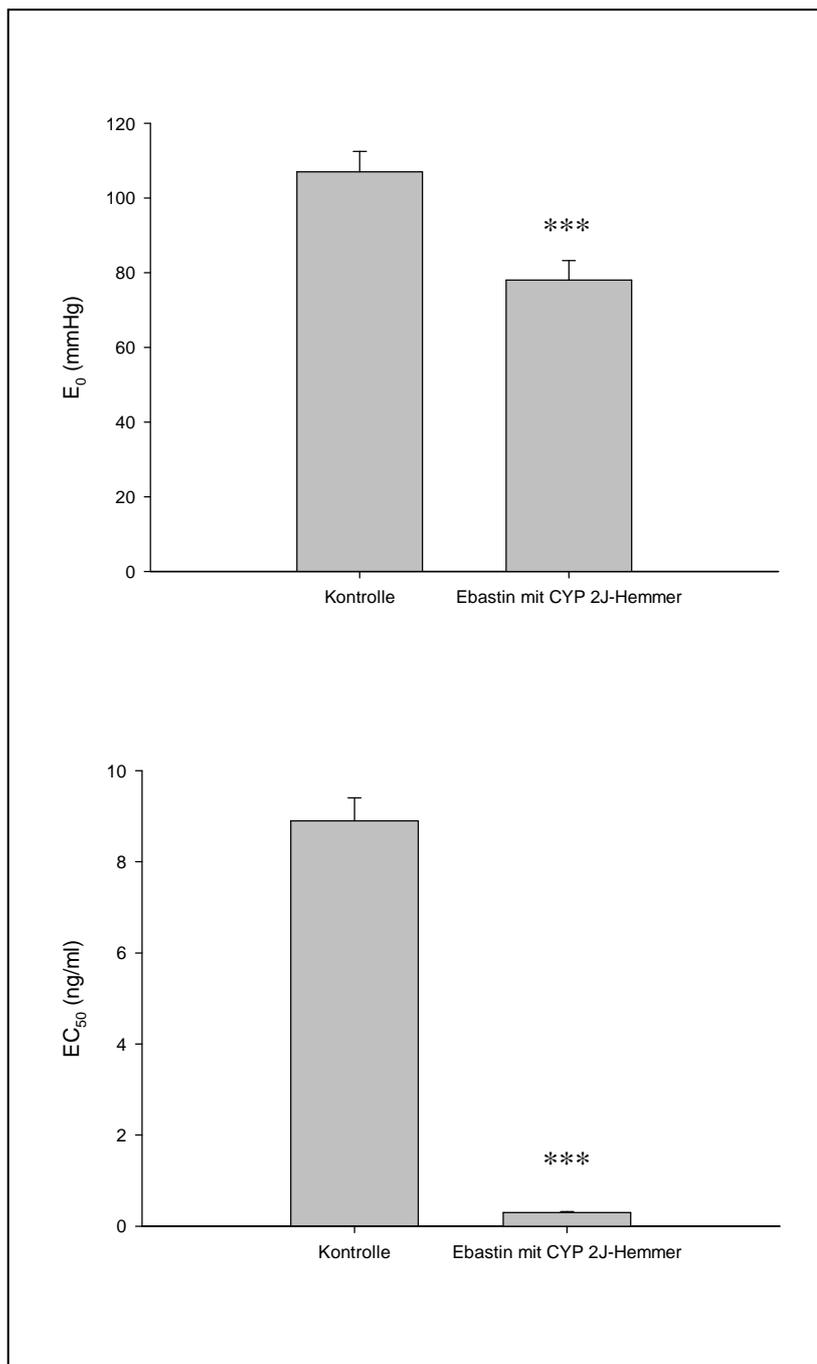


Abb. 27

Vergleich der vom Modell geschätzten pharmakodynamischen Parameter E_0 und EC_{50} von Ebastin mit CYP 2J-Hemmer und der Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Ergebnisse von 6 Herzen der Kontrolle bzw. 5 Herzen von Ebastin mit CYP 2J-Hemmer. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsreihen sind, wie folgt, gekennzeichnet: *** $p < 0,001$.

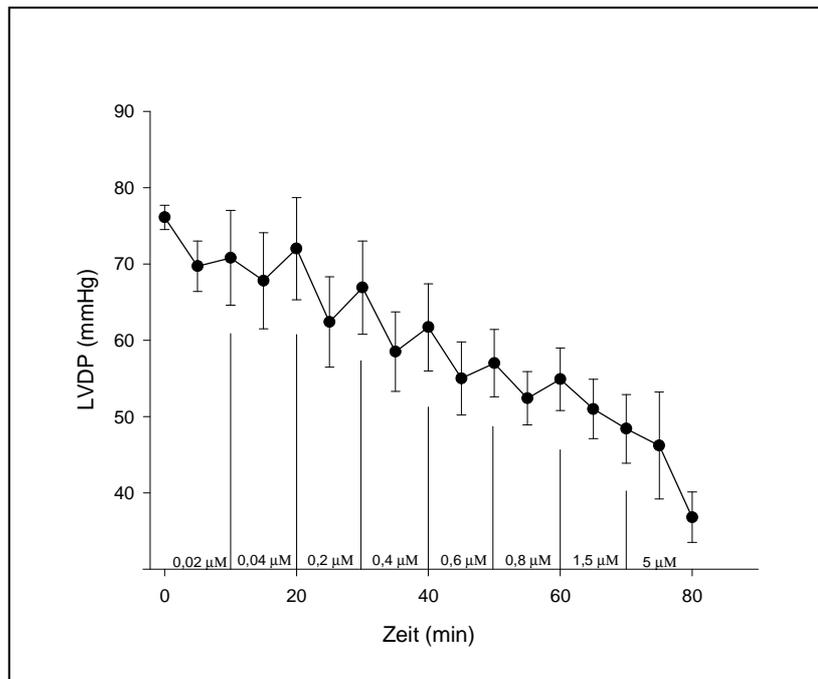


Abb. 28

Konzentrations-Wirkungs-Kurve des CYP 2J-Hemmers mit ansteigender Konzentration des Hemmers. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Ergebnisse von 4 Herzen.

5. Diskussion

5.1. Ebastin (Kontroll-Experimente)

Diese Versuchsreihe zeigt, dass Ebastin im Herzen metabolisiert wird (Kang et al., 2011). Bereits eine frühere Studie legte, basierend auf ihren Ergebnissen für menschliche Lebermikrosomen, die Verwendung von Ebastin als Testsubstanz für die Aktivität von CYP 2J2 nahe (Liu et al., 2006). Obwohl die CYP 2J3-Isoform in Rattenherzen zu 70 % mit der CYP 2J2-Isoform in menschlichen Herzen übereinstimmt (Wu et al., 1997), ist noch nicht klar, welche CYP 450-Enzyme für die Hydroxylierung von Ebastin im Rattenherzen verantwortlich sind. Trotz dieser Einschränkung liefern unsere Ergebnisse neue Erkenntnisse über die Kinetik der sequentiellen Metabolisierung von Ebastin in Rattenherzen und die Aktivität der möglicherweise daran beteiligten CYP 450-Enzyme (Kang et al., 2011). Die Darstellung des Metabolismus ähnelt stark derjenigen, die in einer früheren Studie für menschliche Lebermikrosomen beschrieben wurde (Liu et al., 2006), mit der Ausnahme, dass kein Desalkylebastin gefunden wurde. Die Konstante der Carboxylierung von Hydroxyebastin (k_{hc}) ist wesentlich höher als die der Hydroxylierung von Ebastin (k_{eh}), weshalb die Konzentration des aus Ebastin gebildeten Hydroxyebastins relativ niedrig ist. Andererseits ist die Eliminierungskonstante von Carebastin (k_{cm}) viel niedriger als die Bildungskonstante (k_{hc}), so dass Carebastin zum hauptsächlichen, relativ stabilen Metaboliten von Ebastin wird. Die gute Modellierung der Endmenge von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin im Herzen legt nahe, dass keine Metabolisierung von Ebastin und Hydroxyebastin durch andere Wege (z.B. Dealkylierung) erfolgt (Kang et al., 2011). Dies entspricht den Beobachtungen einer früheren Studie, nach deren Ergebnissen die CYP 3A-Isoformen entweder gar nicht oder nur in sehr geringen Mengen im Rattenmyokard vorhanden sind (Thum und Borlak, 2000b). Es ist jedoch noch nicht geklärt, welches Enzym für die Metabolisierung von Carebastin verantwortlich ist (k_{cm}). In einer klinischen Studie zur Pharmakokinetik wurde vermutet, dass Carebastin nicht allein durch CYP 3A4 metabolisiert wird (Shon et al., 2010). Interessanterweise ähneln die in vivo beobachteten Plasma-Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ebastin und dessen Metaboliten (Kang et al., 2004) denen hier ex vivo am isolierten perfundierten Rattenherzen nach Langendorff gewonnenen Ergebnissen. Nun stellt sich die Frage, ob der kardiale Metabolismus von Ebastin zur gesamten Clearance von Ebastin in vivo beiträgt. Obwohl eine Extraktion von ca. 90 % im perfundierten Rattenherzen vorlag, könnte die kardiale Extraktion in vivo aufgrund der hohen Plasmaproteinbindung wesentlich geringer sein. Aber auch die Möglichkeit, dass ein Teil der Ebastin-Clearance in vivo auf den Metabolismus im Herzen zurückzuführen ist, kann

nicht ausgeschlossen werden. Beachtet werden muss, dass eine rezirkulierende Perfusion des Herzens gewählt wurde, da so eine Akkumulation der gebildeten Metaboliten möglich ist. Die Populations-Modellierung, bei der gleichzeitig die Konzentrations-Zeit-Daten aus allen Herzen unter Verwendung der Daten aus allen Herzen anstatt nur eines Herzens gefittet werden, hat sich als erfolgreich erwiesen, wenn Parameter unter Verwendung einer individuellen Modellierung schlecht geschätzt werden können (Krudys et al., 2006; Kang et al., 2011).

Zum Vergleich der aktuellen Schätzung für die EC_{50} der negativ inotropen Wirkung von Ebastin mit der Situation in vivo: eine in Ratten gemessene ungebundene Fraktion von $< 0,2\%$ (Fujii et al., 1997) würde zu einem Wert von $3,2\text{ mg/ml}$ führen. Dieser ist um das Vierfache höher als die EC_{50} für die QT-Verlängerung in Ratten (Ohtani et al., 1999b). Da jedoch diese Ebastin-Konzentrationen sehr viel höher als die klinisch maximal erreichbaren Plasmakonzentrationen im Menschen sind (Moss und Morganroth, 1999), unterstützen die aktuellen Ergebnisse die Tatsache, dass Ebastin keine klinisch schädlichen kardialen Wirkungen besitzt (Moss und Morganroth, 1999; Kang et al., 2011).

Der Mechanismus, der der negativ inotropen Wirkung von Ebastin bei höheren Konzentrationen zugrunde liegt, ist noch nicht geklärt. Neben der Hypothese, dass Ebastin zu einer Freisetzung von Histamin führt (was in einer reduzierten ventrikulären Kontraktilität bei Ratten resultiert) (Llenas et al. 1999), könnte eine Hemmung der CYP 2J per se einen negativen inotropen Effekt haben (Kang et al., 2011).

5.2. Ebastin ohne BSA im Puffer

In dieser Versuchsreihe wurden orientierende Experimente ohne BSA im Perfusionsmedium durchgeführt. Ebastin besitzt eine hohe Plasmaproteinbindung von über 95% (Simons, 2002). Aufgrund des fehlenden Albumin-Gehalts im Puffer erfolgte eine sehr schnelle kardiale Aufnahme und Bindung von Ebastin sowie ein geringer und mit zunehmendem Zeitverlauf fehlender Rückfluss in das Reservoir. Auch die Reservoir-Konzentrationen von Hydroxyebastin und Carebastin lassen auf eine Akkumulation der Metaboliten im Herzen schließen. Da das Fehlen von Serumalbumin unphysiologischen Bedingungen entspricht und eine Analyse der Daten aufgrund des Verteilungsverhaltens der drei Stoffe nicht möglich war, eignet sich dieser Versuchsaufbau nicht für die Durchführung von Experimenten zur Gewinnung pharmakokinetischer Daten über den Ebastin-Stoffwechsel im Herzen. Dennoch wurde in dieser Versuchsreihe die Rolle der Plasmaproteinbindung für die kardiale Pharmakokinetik von Ebastin besonders deutlich.

5.3. Ebastin nach Hypoxie

Ziel dieser Versuchsreihe war es, mit Ebastin als Testsubstanz zur Beurteilung der myokardialen CYP 2J, Informationen über die Aktivität dieses Enzyms nach 45-minütiger Hypoxie und anschließender Reoxygenierung (2 Minuten) zu erhalten. Dafür wurde die Begasung des Systems von Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) auf ein Gas ohne Sauerstoff (95% N₂, 5% CO₂) gewechselt.

Einige Studien haben sich bereits mit diesem Thema beschäftigt. So publizierten Yang et al. (2001) eine reduzierte CYP 2J2-Expression in aortalen Endothelzellen vom Rind, welche einer 24-stündigen Hypoxie und anschließender Reoxygenierung für 4 Stunden ausgesetzt waren. Auch bei Marden et al. (2003) zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Sie untersuchten die Auswirkung einer 16-stündigen Hypoxie und anschließender Reoxygenierungsphase von 30 Minuten auf eine menschliche Leberzelllinie. Dabei kam es zu einer Herabregulierung der CYP 2J2 während der hypoxischen Phase. Die anschließende Reoxygenierung bewirkte zwar einen Wiederanstieg der CYP 2J2-mRNA-Level, allerdings blieben die CYP 2J2-Proteinlevel reduziert. Entsprechend dieser Ergebnisse zeigte sich auch in der durchgeführten Versuchsreihe eine reduzierte Hydroxylierungskonstante von Ebastin (k_{eh}). Diese hatte sich nach Einwirkung von Hypoxie und anschließender Reoxygenierung, verglichen mit den Kontroll-Versuchen, nahezu halbiert, was mit einer Herabregulierung der CYP 2J erklärt werden kann und den Beobachtungen der oben genannten Studien entspricht. Jedoch fanden sich gegenteilige Werte für die Carboxylierungskonstante von Hydroxyebastin (k_{hc}) sowie Eliminierungskonstante von Carebastin (k_{cm}). So kam es zu einer Verdoppelung von k_{hc} und auch für k_{cm} konnte ein Anstieg beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen sowohl im Widerspruch zu anderen publizierten Studien (Yang et al., 2001; Marden et al., 2003) als auch zu den aktuellen Ergebnissen für die Hydroxylierungskonstante von Ebastin (k_{eh}). Unklar scheint, warum es unter Hypoxie und anschließender Reoxygenierung nicht ebenfalls zu einer Reduzierung von k_{hc} und k_{cm} gekommen ist. Die erhöhte Carboxylierungskonstante von Hydroxyebastin (k_{hc}) sowie Eliminierungskonstante von Carebastin (k_{cm}) lassen auf eine erhöhte Metabolisierung der beiden Stoffe und folglich gesteigerte Cytochrom P450-Enzymaktivität schließen.

Unsere Ergebnisse einer partiell erhöhten Cytochrom P450-Aktivität stehen teilweise im Gegensatz zu anderen publizierten Ergebnissen. Zu bedenken ist aber, dass in diesen Studien (Yang et al., 2001; Marden et al., 2003) eine wesentlich längere hypoxische Phase als in unseren Experimenten vorlag und es aufgrund der geringeren Hypoxie-Dauer nur zu einer geringfügigen oder keiner Verringerung der CYP 2J-Aktivität gekommen sein könnte. Bei anderen Cytochromen, genauer CYP 2C, zeigte sich bereits eine zeitabhängige Veränderung der Enzymexpression als Reaktion auf Hypoxie. So wurde ein gleichbleibendes CYP 2C-RNA-

Level erst nach 4 Stunden Hypoxie erreicht (Michaelis et al., 2005). Möglicherweise ist es während der kurzen hypoxischen Phase und anschließender Reoxygenierung aber auch zu einer erhöhten Cytochrom P450-Aktivität gekommen, wie auch von Michaelis et al. (2005) beobachtet. Sie untersuchten den Effekt von Hypoxie auf die CYP 2C8/9-Expression in menschlichen Endothelzellen. Dabei zeigte sich eine ansteigende Expression von CYP 2C8-RNA und CYP 2C-Protein. Die erhöhte CYP 2C-Expression stand im Zusammenhang mit einer vermehrten EET-Bildung, genauer 11,12-EET und 11,12-DHET (Michaelis et al., 2005). Auch in retinalen Endothelzellen konnte unter hypoxischen Bedingungen ein signifikanter Anstieg in der CYP 2C-Expression nachgewiesen werden. Hier zeigten sich ebenfalls erhöhte 11,12-EET- und 14,15-EET-Level nach 16-stündiger Hypoxie (Michaelis et al., 2008). Des Weiteren wurde unter Hypoxie eine erhöhte CYP 3A-Expression und reduzierte CYP 1A-Expression und Aktivität in der Leber beobachtet (Kurdi et al., 1999; Fradette et al., 2002; Fradette et al., 2007). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Auswirkungen einer Hypoxie-Behandlung auf die CYP-Expression isoformspezifisch sein kann (Fradette et al., 2007). Auch am Ebastin-Metabolismus sind verschiedene CYP-Isoformen beteiligt (Liu et al., 2006). In den aktuell durchgeführten Experimenten fand sich eine höhere Metabolisierungskonstante von Hydroxyebastin (Bildungskonstante von Carebastin) (k_{hc}) und Eliminierungskonstante von Carebastin (k_{cm}) nach Hypoxie verglichen mit den Kontroll-Experimenten. Dabei orientiert sich das verwendete Modell der Metabolisierung von Ebastin stark an dem von Liu et al. (2006) für menschliche Lebermikrosomen. In diesem erfolgt die Carboxylierung von Hydroxyebastin neben CYP 2J2 auch durch CYP 3A4, welches auch an der weiteren Metabolisierung von Carebastin beteiligt sein soll. Obwohl die CYP 3A-Isoformen nur in sehr geringen Mengen im Rattenmyokard vorhanden sind (Thum und Borlak, 2000b), könnte es unter Hypoxie zu einer Zunahme der Enzymaktivität gekommen sein, was sich in den erhöhten Metabolisierungsparametern von Hydroxy- und Carebastin äußert. Entsprechend wurde in verschiedenen Studien eine ansteigende CYP 3A-Expression unter Hypoxie beobachtet (Kurdi et al., 1999; Fradette et al., 2002; Fradette et al., 2007).

Unter Einwirkung von Hypoxie kam es zunächst zu einem Abfall von LVDP, welcher durch die anschließende kurze Reoxygenierungsphase teilweise rückgängig gemacht werden konnte. Auch Seubert et al. (2004) fanden diesen LVDP-Verlauf während Hypoxie und anschließender Reoxygenierung. Die EC_{50} nach Hypoxie-Einwirkung lag mit $5,3 \pm 0,7$ ng/ml signifikant unterhalb deren der Kontroll-Versuche mit $8,9 \pm 0,5$ ng/ml.

Es wurde eine signifikant geringere Herzfrequenz beobachtet ($p < 0,001$), welche noch auf die Auswirkung der zuvor durchgeführten Hypoxie-Behandlung zurückzuführen sein könnte. Außerdem könnte auch Ebastin diese Verringerungen bewirkt haben. Ohtani et al. (1999b) beobachteten, dass Ebastin eine Bradykardie hervorrufen kann.

5.4. Ebastin nach akuter Isoprenalin-Wirkung

Isoprenalin zählt zu den Sympathomimetika. Die positiv chronotrope und inotrope Wirkung dieses Stoffes ist hinreichend bekannt. So kommt es zu einer Erhöhung der Schlagfrequenz und Steigerung der Kontraktionskraft des Herzens (Ross et al., 1965; Ledda et al., 1975; Nuttall und Snow, 1982).

Es existieren einige Studien über den Effekt des indirekten Sympathomimetikums Methamphetamin auf die Cytochrom P450-Aktivität in der Leber von Ratten nach chronischer Gabe. Zendulka et al. (2010) beobachteten keine Beeinflussung der metabolischen Aktivität der CYP 1A2, 2C6 und 2D2 in isoliert perfundierten Rattenlebern nach 10 Tage andauernder intraperitonealer Methamphetamin-Gabe in ansteigender Dosierung von 2,5 mg/kg/Tag bis 10 mg/kg/Tag. Auch Minarikova et al. (2006) fanden keine signifikanten Änderungen der CYP 1A-, 3A- oder 2D-Aktivität nach einer oralen Gabe von Methamphetamin in einer täglichen Dosierung von 10 mg/kg für 5 Tage. Jedoch kam es zu einer Hemmung der CYP 2E. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Dostalek et al. (2007). Die sechstägige intraperitoneale Methamphetamin-Injektion resultierte in einer Induktion der CYP 2C6 und 2D. Insgesamt lassen diese Beobachtungen auf eine dosisabhängige Beeinflussung der Cytochrom P450-Aktivität schließen, wobei mit zunehmender Methamphetamin-Dosis die Möglichkeit einer Enzyminduktion steigt (Zendulka et al., 2010). Diese Publikationen basieren alle auf Untersuchungen an Rattenlebern. Jedoch existieren auch Informationen zu kardialen Cytochromen. So untersuchten Wang et al. (2002) die Einwirkung von Cocain, eines indirekten Sympathomimetikums, auf die Funktion kardialer Cytochrom P 450. Dabei führten die täglichen Injektionen von Cocain über einen Zeitraum von 14 Tagen zu einem signifikanten Anstieg von kardialen CYP 1A1 und 2J2 in Mäusen.

Ziel des aktuell durchgeführten Versuches war es, Informationen über die Auswirkung einer einstündigen Isoprenalin-Behandlung auf die Aktivität der myokardialen Cytochrom P450 zu gewinnen. Dabei zeigte sich für die Hydroxylierungskonstante von Ebastin (k_{ch}), im Vergleich zu den Kontroll-Versuchen, keine signifikante Abnahme, was auf eine unveränderte bis minimal reduzierte CYP 2J-Aktivität hindeutet. Im Gegensatz dazu fanden sich sowohl für die Carboxylierungskonstante von Hydroxyebastin (k_{hc}) als auch die Eliminierungskonstante von Carebastin (k_{cm}) deutlich reduzierte Werte nach der akuten Isoprenalin-Behandlung. So scheint die akute Einwirkung des direkten Sympathomimetikums Isoprenalin zu einer Herabregulierung der Aktivität der myokardialen Cytochrome, genauer CYP 2J und CYP 3A, zu führen. Diese Ergebnisse nach akuter Isoprenalin-Einwirkung stehen nicht im Widerspruch zu den oben zitierten Befunden nach chronischer Gabe, da der Faktor Zeit für die Enzyminduktion eine wichtige Rolle spielt.

Zunächst kam es unter Einwirkung der Isoprenalin-Lösung zu einem LVDP-Anstieg mit einem Maximum am Ende der einstündigen Behandlung. Die anschließende Ebastin-Zugabe bewirkte einen signifikant ($p < 0,05$) geringeren LVDP-Abfall im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten. Dies entspricht auch den ermittelten pharmakodynamischen Parametern. Während nach akuter Isoprenalin-Einwirkung $18,9 \pm 3,5$ ng/ml Ebastin benötigt werden, um 50% des maximalen LVDP-Abfalls (EC_{50}) zu erzielen, wird dieser Effekt in den Kontroll-Versuchen schon bei $8,9 \pm 0,5$ ng/ml erreicht. Der, der negativ inotropen Wirkung von Ebastin bei höheren Konzentrationen, zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht geklärt. Es existiert die Hypothese, dass Ebastin zu einer Freisetzung von Histamin führt, was in einer reduzierten ventrikulären Kontraktilität resultiert (Llenas et al., 1999). Für Isoprenalin ist bekannt, dass es die antigenvermittelte Freisetzung von Mediatorsubstanzen wie Histamin hemmt (Chong et al., 1995). So könnte es durch die vorherige Isoprenalin-Einwirkung zu einer geringeren Histaminfreisetzung und damit Ebastin-Wirkung im Hinblick auf den negativ inotropen Effekt gekommen sein. Daneben besitzt Isoprenalin selbst eine positiv inotrope Wirkung (Ledda et al., 1975).

Unter der Isoprenalin-Behandlung wurde eine signifikant höhere Herzfrequenz im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten beobachtet. Dies entspricht dem Fakt, dass Isoprenalin eine positiv chronotrope Wirkung am Herzen besitzt (Ross et al., 1965; Nuttall und Snow, 1982).

5.5. Ebastin unter Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie

Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums im kardiovaskulären System spielen EETs eine wichtige Rolle bei der Regulation von Herz-Kreislauf-Funktionen (Chaudhary et al., 2009; Nithipatikom und Gross, 2010). Ihre vasodilatativen (Weintraub et al., 1997; Miura und Gutterman, 1998; Zhang et al., 2001), anti-thrombotischen (Heizer et al., 1991; Krötz et al., 2004) und anti-inflammatorischen (Node et al., 1999) Eigenschaften sind hinreichend bekannt.

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Effekt einer experimentell induzierten kardialen Hypertrophie auf die Metabolisierung von Ebastin zu untersuchen und dadurch indirekt Informationen über die Aktivität von CYP 2J zu erhalten.

Zur Erzeugung einer kardialen Hypertrophie erhielten die Versuchstiere eine tägliche intraperitoneale Injektion mit Isoprenalin (5 mg/kg Körpergewicht) für 7 Tage. Diese Dosis wurde gewählt, da sie eine kardiale Hypertrophie induziert, ohne Herzversagen oder einen Blutdruckanstieg zu verursachen (Kráľová et al., 2008). Zum Ausschluss einer Beeinflussung der Versuchstiere durch die täglich verabreichten Injektionen hätte zusätzlich eine

Kontrollgruppe mit gewichtsmäßig adaptierten Tieren gebildet werden müssen. Diese hätten ebenfalls eine tägliche intraperitoneale Injektion gleichen Volumens mit einer physiologischen Kochsalzlösung über denselben Zeitraum erhalten sollen. Jedoch standen für die Versuchsdurchführung keine entsprechenden Versuchstiere zur Verfügung.

Aufgrund des schlechten Fits der Endmengen der Stoffe im Herzen war eine Modellierung der Daten dieser Versuchsreihe nicht möglich, so dass keine pharmakokinetischen Parameter zum Ebastin-Metabolismus ermittelt werden konnten. Jedoch lässt sich auch anhand der durchschnittlichen Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin im Reservoir auf die Aktivität der myokardialen CYP 2J schließen. Die Konzentrationen von Ebastin und Hydroxyebastin sind unter Hypertrophie wesentlich geringer als in der Kontrollgruppe, während die Carebastin-Konzentrationen unter der Behandlung höher liegen. Dies legt eine höhere Metabolisierung von Ebastin und somit eine höhere Aktivität des daran beteiligten Enzyms CYP 2J nahe.

Ebenfalls eine erhöhte CYP 2J3-Genexpression zeigte sich in Herzen von spontan hypertensiven Ratten verglichen mit normotensiven (Thum und Borlak, 2002). Zuvor fanden Yu et al. (2000) bereits eine ansteigende CYP 2J-Expression und EET-Bildung in den Nieren von spontan hypertensiven Ratten.

Thum und Borlak (2002) untersuchten die Beeinflussung der Cytochrom P450-Expression und des Testosteron-Metabolismus in hypertrophen Herzen. Dabei konnte eine zwei- bis dreifach erhöhte Genexpression für CYP 2A6/7 und 4A11 im hypertrophen Gewebe festgestellt werden, während CYP 2J2 und 2E1 nahezu unverändert blieben. Außerdem fand sich ein zunehmender Testosteron-Metabolismus und eine damit verbundene Induktion der CYP-Monooxygenasen, was eine wichtige Rolle dieser Enzyme im Rahmen einer kardialen Hypertrophie nahe legt. Zordoky et al. (2008) konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Isoprenalin-induzierter kardialer Hypertrophie und signifikanten Veränderungen der Genexpression verschiedener Cytochrom P450 herstellen. Auch sie fanden keine veränderte CYP 2J3-Genexpression. Stattdessen kam es zu einer Induktion von CYP 1A1, 1B1 und 4A3 sowie Hemmung von CYP 2C11 und 2E1. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu unseren Beobachtungen. Jedoch scheint eine kardiale Hypertrophie unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität der einzelnen CYP 450-Unterfamilien zu haben. Im Rahmen einer Hypoxie-Behandlung konnte festgestellt werden, dass deren Auswirkung auf die CYP-Expression isoformspezifisch sein kann (Fradette et al., 2007). Auch am Ebastin-Metabolismus sind verschiedene CYP-Isoformen beteiligt. So erfolgt die Bildung von Hydroxy- und Carebastin vor allem durch CYP 2J, während an der Metabolisierung von Carebastin hauptsächlich CYP 3A beteiligt ist (Liu et al., 2006). Entsprechend den Ergebnissen von Thum und Borlak (2002), bei denen nur eine minimale Erhöhung der CYP 2J2-Genexpression beobachtet werden konnte, scheint es auch in unserer Versuchsreihe zu einer Erhöhung der CYP 2J-Aktivität gekommen zu sein, während

CYP 3A gar nicht beeinflusst oder in ihrer Aktivität reduziert worden ist. Dies würde sowohl die wesentlich geringeren Konzentrationen von Ebastin und Hydroxyebastin unter Hypertrophie, aufgrund eines erhöhten Metabolismus durch ansteigende CYP 2J-Aktivität, als auch die höhere Carebastin-Konzentration durch einen geringeren Abbau durch CYP 3A, im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten, erklären.

In diesen Experimenten zeigte sich ein signifikant ($p < 0,001$) geringerer LVDP-Abfall verglichen mit den Kontroll-Versuchen. Dies lässt auf einen geringeren negativ inotropen Effekt von Ebastin im hypertrophen Myokard schließen.

Es wurden keine signifikanten Veränderungen der Herzfrequenz beobachtet. Dies entspricht den Beobachtungen von Král'ová et al. (2008), welche ebenfalls keine signifikanten Änderungen der Herzfrequenz zwischen der mit Isoprenalin behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe beobachten konnten.

5.6. Ebastin mit CYP 2J-Hemmer und CYP 2J-Hemmer

Inhibitoren von Cytochromen werden häufig verwendet, um die Rolle einzelner CYP 450-Isoenzyme in verschiedenen Stoffwechselprozessen festzustellen. Dazu werden verschiedene Hemmer von CYP 450-Isoenzymen auf ihre inhibitorische Spezifität gegenüber CYP-vermittelten Reaktionen getestet. So fand sich Furafyllin als Inhibitor der Phenacetin-Metabolisierung (CYP 1A2-vermittelt), Sulphaphenazol als selektiver Inhibitor der CYP 2C9-katalysierten Tolbutamid-Metabolisierung und Ketoconazol als selektiver Inhibitor der CYP 3A4-Aktivität, um einige Beispiele zu nennen (Bourrié et al., 1996; Eagling et al., 1998; Moody et al., 1999). Auch für CYP 2J2 wurden verschiedene Inhibitoren entwickelt (Lafite et al., 2006). Als Probe für deren Wirksamkeit diente dabei die Hydroxylierung von Ebastin durch rekombinantes CYP 2J2. Die Grundlage für die Entwicklung eines CYP 2J2-Inhibitors bildete Terfenadin, welches bereits als CYP 2J2-Hemmer beschrieben wurde (Lafite et al., 2006).

Bei den von Lafite et al. (2006) entwickelten CYP 2J2-Inhibitoren wurde die Verbindung in Abbildung 6 ausgewählt, da hiervon die niedrigste Konzentration benötigt wird, um eine 50 %ige Hemmung der Hydroxylierung von Ebastin durch CYP 2J2 zu erhalten ($IC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$). Außerdem stellt diese Verbindung einen selektiven CYP 2J2-Hemmer dar. Andere, im kardiovaskulären System auftretende Cytochrome, wie CYP 3A4, werden durch sie kaum beeinflusst (Lafite et al., 2006).

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Einfluss der CYP 2J-Hemmung auf die kardiale Funktion und den Ebastin-Stoffwechsel festzustellen. Dafür nutzen wir die von Prof. W. Kang (Institut

für Pharmazie, Yeungnam Universität, Kyungbuk, Südkorea) hergestellte Verbindung (siehe Abb. 6) als potenten CYP 2J-Hemmer unter Verwendung von Ebastin als Testsubstanz zur Beurteilung der Aktivität der myokardialen CYP 2J.

In dieser Versuchsreihe lag die Konzentration von Hydroxyebastin zu allen Messzeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze und auch die Mittelwerte der Carebastin-Konzentrationen waren stets unter 1 ng/ml und damit wesentlich geringer im Vergleich zu den Kontroll-Experimenten. Diese geringe Ebastin-Metabolisierung legt eine gute Wirkung des CYP 2J-Hemmers nahe und liefert einen weiteren Anhaltspunkt, dass Ebastin als Testsubstanz zur Beurteilung der myokardialen CYP 2J verwendet werden kann.

Wie auch bei den Kontroll-Versuchen konnte unter Einwirkung von Ebastin mit dem CYP 2J-Hemmer ein LVDP-Abfall beobachtet werden. Dieser war jedoch signifikant stärker ausgeprägt als in den Kontroll-Experimenten ($p < 0,001$). Dies entspricht auch den ermittelten pharmakodynamischen Parametern. Die EC_{50} unter Ebastin mit CYP 2J-Hemmer lag bei $0,3 \pm 0,02$ ng/ml, im Vergleich zu $8,9 \pm 0,5$ ng/ml in den Kontroll-Versuchen ohne Hemmer. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die negativ inotrope Wirkung von Ebastin unter Zugabe des CYP 2J-Hemmers verstärkt wird. Dabei wäre es interessant zu wissen, ob die Hemmung der myokardialen CYP 2J an sich eine negativ inotrope Wirkung besitzt. Um dies zu testen, wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Es wurden die Auswirkungen von ansteigenden Konzentrationen des CYP 2J-Hemmers, welche jeweils für 10 min im System zirkulierten, auf den sich entwickelnden linksventrikulären Druck (LVDP) untersucht. Dabei konnte ein LVDP-Abfall beobachtet werden, anhand dessen darauf geschlossen wurde, dass die Hemmung der CYP 2J per se einen negativen inotropen Effekt besitzt. Allerdings führte die gleichzeitige Gabe von Ebastin und CYP 2J-Hemmer zu einem LVDP-Abfall, der über die reine Addition der negativ inotropen Wirkung von Ebastin und CYP 2J-Hemmer allein hinausging.

Es wurde eine signifikant geringere Herzfrequenz unter Ebastin mit CYP 2J-Hemmer, verglichen mit den Kontroll-Versuchen, beobachtet ($p < 0,001$), während weder unter Ebastin allein noch innerhalb der Konzentrations-Wirkungskurven des CYP 2J-Hemmers signifikante Veränderungen gefunden werden konnten.

5.7. Methodendiskussion

Das isolierte perfundierte Herz nach Langendorff findet zahlreiche Anwendungen im Bereich der pharmakologischen, physiologischen, morphologischen, biochemischen und klinischen Forschung (Sutherland und Hearse, 2000; Dhein, 2005). Es liefert ideale Bedingungen für die

Durchführung von Dosis-Wirkungs-Studien zu metabolischen und pharmakologischen Interventionen (Sutherland und Hearse, 2000). Außerdem ermöglicht es eine genaue Analyse pharmakokinetisch-pharmakodynamischer (PK/PD) Prozesse, weshalb es in vielen Studien verwendet wurde. Im Vergleich zur Pharmakokinetik des gesamten Organismus liefert die Betrachtung eines einzelnen Organs direkte, detaillierte Informationen über PK/PD-Prozesse auf der Organ-Ebene. Des Weiteren bietet das isoliert perfundierte Herz im Vergleich zu in vitro Studien den Vorteil, dass verschiedene pharmakokinetische Parameter gleichzeitig ausgewertet werden können (Weiss, 2011).

Zur Gewinnung pharmakokinetischer Daten zur Metabolisierung von Ebastin im Herzmuskel wurde ein Kompartiment-Modell verwendet. Diese mathematische Modellierung ermöglicht es, Transport- und Metabolisierungsprozesse im Herzen zu untersuchen, die eine wichtige Rolle bei dem quantitativen Verständnis der kardialen Aufnahme, des Metabolismus und der Elimination von Wirkstoffen spielen, deren direkte Beobachtung aber nicht möglich ist. Dabei wird die Verteilungskinetik eines Wirkstoffes vereinfacht als Transfer zwischen verschiedenen Kompartimenten dargestellt. In der traditionellen PK/PD-Modellierung wird die Plasmakonzentration eines Wirkstoffes mit dem zeitlichen Verlauf dessen pharmakologischer Wirkung verknüpft (Weiss, 2011). Dies kam auch in dem hier beschriebenen Modell zur Anwendung. Basierend auf der Grundlage des sequentiellen Ebastin-Metabolisierungswegs in menschlichen Lebermikrosomen (Liu et al., 2006) wurde ein pharmakokinetisch-pharmakodynamisches Kompartiment-Modell entwickelt. Dabei wurde unter anderem der Verlauf der Ebastin-Konzentration mit dem Zeitverlauf dessen kardialer Wirkung verknüpft. Das verwendete Modell stellt eine geeignete Methode zur kinetischen Analyse von Ebastin und dessen Metaboliten dar. Anhand der ermittelten Ergebnisse wurde deutlich, dass die Kinetik des sequentiellen Ebastin-Metabolismus sehr gut von dem entwickelten Kompartiment-Modell beschrieben wurde. Unter Nutzung dieses Modells lassen sich sowohl Informationen über die Wirkstoffaufnahme aus dem Reservoir in das Herzgewebe als auch deren Efflux mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten für die Aufnahme und den Efflux bestimmen. Des Weiteren können Metabolisierungs-Parameter ermittelt werden, mit deren Hilfe auf die Enzymaktivität der am Ebastin-Metabolismus beteiligten Cytochrome geschlossen werden kann. So lassen sich mit einfachen Mitteln Informationen über die Aktivität einzelner Cytochrome sowohl unter Standardbedingungen als auch unter verschiedenen pathophysiologischen Zuständen ermitteln. Jedoch ist ein Modell per Definition immer eine Vereinfachung, dessen Gültigkeit von den Zielen der Modellierung und dem Detaillierungsgrad der verfügbaren Daten abhängig ist. Das bedeutet, dass Modellauswahl und experimentelles Design eng miteinander verknüpft sind (Weiss, 2011).

Ebastin, ein H₁-Antihistaminikum der zweiten Generation, wurde als Testsubstanz zur Beurteilung der myokardialen Cytochrome (CYP 2J) verwendet. Dies stellt eine gute

Wirkstoffauswahl dar, da die Möglichkeit der Nutzung von Ebastin als Testsubstanz für die Beurteilung der Aktivität von CYP 2J bereits publiziert wurde (Liu et al., 2006). Außerdem sind über keine schweren unerwünschten kardialen Wirkungen unter Verwendung von Ebastin, im Gegensatz zu anderen Antihistaminika, berichtet worden (Wiseman und Faulds, 1996; Moss et al., 1999; Moss und Morganroth, 1999; Hurst und Spencer, 2000; Gillen et al., 2001; Lawrence et al., 2006).

Um die Konzentration des verwendeten Stoffes Ebastin und dessen Metaboliten zu den verschiedenen Messzeitpunkten zu bestimmen, wurde eine Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie verwendet. Dieses Verfahren stellte sich bereits in einer früheren Publikation als eine sehr einfache, sensible und präzise Möglichkeit zur gleichzeitigen Bestimmung von Ebastin und seinen drei Metaboliten (Hydroxyebastin, Carebastin, Desalkylebastin) dar. Es eignet sich gut für in vitro und in vivo Studien zur Pharmakokinetik von Ebastin (Kang et al., 2004).

6. Zusammenfassung

Cytochrom P 450-Enzyme haben vielfältige Aufgaben im menschlichen Körper und katalysieren unterschiedliche chemische Reaktionen. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle im Arzneimittel-Metabolismus. Ziel dieser Arbeit war es, erste pharmakokinetische Daten zur Metabolisierung des H₁-Antihistaminikums Ebastin im Herzmuskel zu liefern und darüber Hinweise auf die Aktivität der kardialen CYP 2J zu erhalten. Dabei erfolgte die kinetische Analyse von Ebastin und sequentielle Bildung von Hydroxyebastin und Carebastin unter Verwendung eines neu entwickelten pharmakokinetisch-pharmakodynamischen Kompartiment-Modells (Kang et al., 2011), welches auf der Grundlage des sequentiellen Ebastin-Metabolisierungswegs in menschlichen Lebermikrosomen beruht (Liu et al., 2006). Die vom Modell geschätzten Metabolisierungs-Parameter (Geschwindigkeitskonstante der Hydroxyebastin-Bildung, k_{ch} , der Carebastin-Bildung, k_{hc} , sowie der Carebastin-Metabolisierung, k_{cm}) dienen dabei als Maß für die Aktivität der am Ebastin-Metabolismus beteiligten CYP 2J und 3A.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern neue Erkenntnisse über die Kinetik der sequentiellen Metabolisierung von Ebastin in Rattenherzen und die Aktivität der daran beteiligten CYP 450-Enzyme. Dabei ähnelt der aktuell beobachtete Metabolismus von Ebastin stark demjenigen, der für menschliche Lebermikrosomen beschrieben wurde (Liu et al., 2006). Die pharmakokinetische Modellierung der Daten eröffnet die Möglichkeit, unter Verwendung von Ebastin als Testsubstanz, die Aktivität kardialer CYP 2J zu ermitteln.

Des Weiteren wurden die Effekte pathophysiologischer Bedingungen untersucht. Der Einfluss einer 45-minütigen Hypoxie und anschließende Reoxygenierung führte zu einer Reduzierung von k_{ch} sowie Zunahme von k_{hc} und k_{cm} , was für eine Herabregulierung der CYP 2J-Aktivität sowie gesteigerte CYP 3A-Aktivität spricht. Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen, dass die Auswirkung einer Hypoxie-Behandlung auf die CYP-Expression isoformspezifisch sein kann (Fradette et al., 2007). Außerdem belegen sie, dass am Ebastin-Metabolismus verschiedene Cytochrom-Unterfamilien beteiligt sind (Liu et al., 2006).

Auch die einstündige Einwirkung von Isoprenalin resultierte ebenfalls in einer Änderung der Metabolisierungs-Parameter. Es kam zu einer signifikanten Abnahme von k_{hc} und k_{cm} mit daraus folgender Abnahme der CYP 2J- und 3A-Aktivität. Zusammen mit anderen publizierten Ergebnissen nach chronischer Wirkstoff-Gabe, die keine signifikanten Änderungen der hepatischen CYP 3A-Aktivität nach oraler fünftägiger Methamphetamin-Gabe (Minarikova et al., 2006) jedoch einen signifikanten Anstieg kardialer CYP 1A1 und 2J2 nach 14-tägiger Cocain-Gabe (Wang et al., 2002) feststellen konnten, belegen die aktuellen Daten, dass der Faktor Zeit für die Enzyminduktion eine wichtige Rolle spielt.

Des Weiteren führte eine Isoprenalin-induzierte kardiale Hypertrophie zu einer erhöhten CYP 2J-Aktivität, worauf anhand signifikanter Unterschiede der Konzentrations-Zeit-Verläufe von Ebastin, Hydroxyebastin und Carebastin geschlossen werden konnte.

Die Gabe von Ebastin in Kombination mit einem CYP 2J-Hemmer resultierte in einer deutlich ausgeprägten Inhibierung der CYP 2J-Aktivität und liefert einen weiteren Anhaltspunkt, dass Ebastin als Testsubstanz zur Beurteilung der kardialen CYP 2J verwendet werden kann. Außerdem wird deutlich, dass die Hemmung der CYP 2J mit einer Verstärkung des negativ inotropen Effektes verbunden ist.

Zusammengefasst lässt die pharmakokinetische Modellierung des sequentiellen Ebastin-Metabolismus in Rattenherzen vermuten, dass CYP 2J darin eine große Rolle spielt. Die Ergebnisse können zum Verständnis der funktionellen Eigenschaften der CYP 2J in Ratten beitragen und liefern wertvolle Anhaltspunkte, wie sich der Einfluss verschiedener pathophysiologischer Zustände, wie Hypoxie, die Einwirkung eines Sympathomimetikums sowie kardiale Hypertrophie, auf die Aktivität der im Herzen vorhandenen Cytochrome auswirkt. Diese Informationen sind auch von klinischem Interesse. So können Induktion oder Hemmung der kardialen CYP zu Veränderungen im Stoffwechsel von körpereigenen Stoffen sowie Änderung im Metabolismus verschiedener Medikamente führen, was sowohl in einer Beeinflussung der Herzfunktion als auch der Arzneimittelwirkung resultieren kann.

7. Literaturverzeichnis

Batchu SN, Law E, Brocks DR, Falck JR, Seubert JM (2009) Epoxyeicosatrienoic acid prevents postischemic electrocardiogram abnormalities in an isolated heart model. *J Mol Cell Cardiol* 46:67–74.

Börgel J, Bulut D, Hanefeld C, Neubauer H, Mügge A, Epplen JT, Holland-Letz T, Spiecker M (2008) The CYP2J2 G-50T polymorphism and myocardial infarction in patients with cardiovascular risk profile. *BMC Cardiovasc Disord* 8:1-6.

Bourrié M, Meunier V, Berger Y, Fabre G (1996) Cytochrome P450 Isoform Inhibitors as a Tool for the Investigation of Metabolic Reactions Catalyzed by Human Liver Microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 277:321-332.

Breitbart E, Sofer Y, Shainberg A, Grossman S (1996) Lipoxygenase activity in heart cells. *FEBS Lett* 395:148-152.

Camelo-Nunes IC (2006) New antihistamines: a critical view. *J Pediatr* 82:S173-S180.

Campbell WB, Deeter C, Gauthier KM, Ingraham RH, Falck JR, Li PL (2002) 14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid relaxes bovine coronary arteries by activation of K_{Ca} channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:1656-1664.

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR (1996) Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Circ Res* 78:415-423.

Campbell WB, Harder DR (1999) Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors and Vascular Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Regulation of Tone. *Circ Res* 84:484-488.

Chaudhary KR, Batchu SN, Seubert JM (2009) Cytochrome P450 enzymes and the heart. *IUBMB Life* 61:954–960.

Chen C, Li G, Liao W, Wu J, Liu L, Ma D, Zhou J, Elbekai RH, Edin ML, Zeldin DC, Wang DW (2009) Selective Inhibitors of CYP2J2 Related to Terfenadine Exhibit Strong Activity against Human Cancers in Vitro and in Vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 329:908–918.

Chong LK, Morice AH, Yeo WW, Schleimer RP, Peachell PT (1995) Functional desensitization of beta agonist responses in human lung mast cells. *Am J Resp Cell Mol* 13:540-546.

Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ, Vaz ADN (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J* 6:669-673.

Craft TM (1986) Torsade de pointes after astemizole overdose. *Brit Med J* 292:660.

D'Argenio DZ, Schumitzky A, Wang X: ADAPT 5 User's Guide: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software. Biomedical Simulations Resource, Los Angeles, 2009, pp. 9-60.

Dale HH, Laidlaw PP (1919) Histamine shock. *J Physiol* 52:355–390.

Darpö B (2001) Spectrum of drugs prolonging QT interval and the incidence of torsades de pointes. *Eur Heart J Suppl* 3:K70–K80.

Davies AJ, Harindra V, McEwan A, Ghose RR (1989) Cardiotoxic effect with convulsions in terfenadine overdose. *Brit Med J* 298:325.

DeLozier TC, Kissling GE, Coulter SJ, Dai D, Foley JF, Bradbury JA, Murphy E, Steenbergen C, Zeldin DC, Goldstein JA (2007) Detection of Human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in Cardiovascular Tissues. *Drug Metab Dispos* 35:682–688.

Dhanasekaran A, Al-Saghir R, Lopez B, Zhu D, Gutterman DD, Jacobs ER, Medhora M (2006) Protective effects of epoxyeicosatrienoic acids on human endothelial cells from the pulmonary and coronary vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:517-531.

Dhein S: The Langendorff heart. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M (Ed): Practical methods in cardiovascular research. Springer-Verlag, Berlin, 2005, pp. 155-172.

Dostalek M, Jurica J, Pistovcakova J, Hanesova M, Tomandl J, Linhart I, Sulcova A (2007) Effect of methamphetamine on cytochrome P450 activity. *Xenobiotica* 37:1355–1366.

Dreisbach AW, Japa S, Sigel A, Parenti MB, Hess AE, Srinouanprachanh SL, Rettie AE, Kim H, Farin FM, Hamm LL, Lertora JLL (2005) The Prevalence of CYP2C8, 2C9, 2J2, and Soluble Epoxide Hydrolase Polymorphisms in African Americans With Hypertension. *Am J Hypertens* 18:1276–1281.

Eagling VA, Tjia JF, Back DJ (1998) Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 45:107-114.

Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, Grant DF (2004) Distribution of Soluble Epoxide Hydrolase and of Cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in Human Tissues. *J Histochem Cytochem* 52:447–454.

Falck JR, Manna S, Moltz J, Chacos N, Capdevila J (1983) Epoxyeicosatrienoic acids stimulate glucagon and insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 114:743–749.

Fawzi AB: The Langendorff Heart. In: McNeill JH (Ed): Measurement of cardiac Function. CRC Press, Boca Raton, 1997, pp. 1-9.

Fleming I (2001) Cytochrome P450 and Vascular Homeostasis. *Circ Res* 89:753-762.

Fradette C, Batonga J, Teng S, Piquette-Miller M, du Souich P (2007) Animal Models of Acute Moderate Hypoxia Are Associated with a Down-Regulation of CYP1A1, 1A2, 2B4, 2C5, and 2C16 and Up-Regulation of CYP3A6 and P-glycoprotein in Liver. *Drug Metab Dispos* 35:765–771.

Fradette C, Bleau AM, Pichette V, Chauret N, du Souich P (2002) Hypoxia-induced down-regulation of CYP1A1/1A2 and up-regulation of CYP3A6 involves serum mediators. *Br J Pharmacol* 137:881-891.

Freedman RS, Wang E, Voiculescu S, Patenia R, Bassett RL, Deavers M, Marincola FM, Yang P, Newman RA (2007) Comparative Analysis of Peritoneum and Tumor Eicosanoids and Pathways in Advanced Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 13:5736-5744.

Fujii T, Matsumoto S, Hatoyama T, Miyazaki H (1997) Studies on the first-pass metabolism of ebastine in rats. *Arzneimittelforschung* 47:949–953.

Gillen MS, Miller B, Chaikin P, Morganroth J (2001) Effects of supratherapeutic doses of ebastine and terfenadine on the QT interval. *Br J Clin Pharmacol* 52:201-204.

Gross GJ, Falck JR, Gross ER, Isbell M, Moore J, Nithipatikom K (2005) Cytochrome P450 and arachidonic acid metabolites: Role in myocardial ischemia/reperfusion injury revisited. *Cardiovas Res* 68:18–25.

Gupta P, Verma U, Sharma R (2005) Novel Antihistamines. *JK Science* 7:234-235.

Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, Kamataki T, Funae Y (2002) Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the Metabolism of Ebastine in Human Intestinal Microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 300:298–304.

Hashizume T, Mise M, Matsumoto S, Terauchi Y, Fujii T, Imaoka S, Funae Y, Kamataki T, Miyazaki H (2001) A Novel Cytochrome P450 Enzyme Responsible for the Metabolism of Ebastine in Monkey Small Intestine. *Drug Metab Dispos* 29:798–805.

Hashizume T, Mise M, Terauchi Y, Luan O, Fujii T, Miyazaki H, Inaba T (1998) N-Dealkylation and Hydroxylation of Ebastine by Human Liver Cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 26:566-571.

Hayashi S, Hashimoto S (1999) Anti-inflammatory actions of new antihistamines. *Clin Exp Allergy* 29:1593-1596.

Heizer ML, McKinney JS, Ellis EF (1991) 14,15-Epoxyeicosatrienoic acid inhibits platelet aggregation in mouse cerebral arterioles. *Stroke* 22:1389-1393.

Hey JA, del Prado M, Kreutner W, Egan RW (1996) Cardiotoxic and drug interaction profile of the second generation antihistamines ebastine and terfenadine in an experimental animal model of torsade de pointes. *Arzneimittel-Forschung* 46:159-163.

- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL (1997) International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. *Pharmacol Rev* 49:253-278.
- Holgate ST, Canonica GW, Simons FER, Taglialatela M, Tharp M, Timmerman H, Yanai K (2003) Consensus group on new-generation antihistamines (CONGA): present status and recommendations. *Clin Exp Allergy* 33:1305-1324.
- Hurst M, Spencer CM (2000) Ebastine: An Update of its Use in Allergic Disorders. *Drugs* 59:981-1006.
- Iloff JJ, Alkayed NJ (2009) Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition: Targeting Multiple Mechanisms of Ischemic Brain Injury with a Single Agent. *Future Neurol* 4:179-199.
- Jiang JG, Ning YG, Chen C, Ma D, Liu ZJ, Yang S, Zhou J, Xiao X, Zhang XA, Edin ML, Card JW, Wang J, Zeldin DC, Wang DW (2007) Cytochrome P450 Epoxygenase Promotes Human Cancer Metastasis. *Cancer Res* 67:6665-6674.
- Jiang JG, Fu XN, Chen CL, Wang DW (2009) Expression of cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase 2J2 in human tumor tissues and cell lines. *Chinese J Cancer* 28:93-96.
- Kang W, Elitzer S, Noh K, Bednarek T, Weiss M (2011) Myocardial pharmacokinetics of ebastine, a substrate for cytochrome P450 2J, in rat isolated heart. *Br J Pharmacol* 163:1733-1739.
- Kang W, Liu KH, Ryu JY, Shin JG (2004). Simultaneous determination of ebastine and its three metabolites in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 813:75-80.
- King LM, Ma J, Srettabunjong S, Graves J, Bradbury JA, Li L, Spiecker M, Liao JK, Mohrenweiser H, Zeldin DC (2002) Cloning of CYP2J2 Gene and Identification of Functional Polymorphisms. *Mol Pharmacol* 61:840-852.
- Ko CM, Ducic I, Fan J, Shuba YM, Morad M (1997) Suppression of Mammalian K⁺ Channel Family by Ebastine. *J Pharmacol Exp Ther* 281:233-244.
- Kráľová E, Mokran T, Murin J, Stankovicova T (2008) Electrocardiography in Two Models of Isoproterenol-Induced Left Ventricular Remodeling. *Physiol Res* 57:S83-S89.
- Krötz F, Riexinger T, Buerkle MA, Nithipatikom K, Gloe T, Sohn HY, Campbell WB, Pohl U (2004) Membrane Potential-Dependent Inhibition of Platelet Adhesion to Endothelial Cells by Epoxyeicosatrienoic Acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:595-600.
- Krudys KM, Kahn SE, Vicini P (2006). Population approaches to estimate minimal model indexes of insulin sensitivity and glucose effectiveness using full and reduced sampling schedules. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E716-E723.

- Kubo N, Shirakawa O, Kuno T, Tanaka C (1987) Antimuscarinic Effects of Antihistamines: Quantitative Evaluation by Receptor-Binding Assay. *Japan J Pharmacol* 43:277-282.
- Kurdi J, Maurice H, El-Kadi AOS, Ong H, Dalkara S, Belanger PM, du Souich P (1999) Effect of hypoxia alone or combined with inflammation and 3-methylcholanthrene on hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits. *Br J Pharmacol* 128:365-373.
- Lafite P, Dijols S, Buisson D, Macherey AC, Zeldin DC, Dansettea PM, Mansuy D (2006) Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human cytochrome P450 2J2. *Bioorg Med Chem Lett* 16:2777–2780.
- Lasseter KC, Dilzer SC, Vargas R, Waldman S, Noveck RJ (2004) Pharmacokinetics and Safety of Ebastine in Patients with Impaired Hepatic Function Compared with Healthy Volunteers. *Clin Pharmacokinet* 43:121-129.
- Lawrence CL, Bridgland-Taylor MH, Pollard CE, Hammond TG, Valentin JP (2006) A Rabbit Langendorff Heart Proarrhythmia Model: Predictive Value for Clinical Identification of Torsades de Pointes. *Brit J Pharmacol* 149:845-860.
- Ledda F, Marchetti P, Mugelli A (1975) Studies on the positive inotropic effect of phenylephrine: A comparison with isoprenaline. *Br J Pharmacol* 54:83-90.
- Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC (2007) CYP2J2 and CYP2C8 polymorphisms and coronary heart disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Pharmacogenet Genomics* 17:349–358.
- Leurs R, Church MK, Tagliabatella M (2002) H₁-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin Exp Allergy* 32:489-498.
- Li PL, Zhang DX, Ge ZD, Campbell WB (2002) Role of ADP-ribose in 11,12-EET-induced activation of K_{Ca} channels in coronary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:1229-1236.
- Liu K, Kim M, Lee D, Yoon Y, Kim MJ, Shon JH, Choi CS, Choi YK, Desta Z, Shin JG (2006) Characterization of Ebastine, Hydroxyebastine, and Carebastine Metabolism by Human Liver Microsomes and Expressed Cytochrome P450 Enzymes: Major Roles for CYP2J2 and CYP3A. *Drug Metab Dispos* 34:1793–1797.
- Llenas J, Cardelús I, Heredia A, de Mora F, Gristwood RW (1999) Cardiotoxicity of Histamine and the Possible Role of Histamine in the Arrhythmogenesis Produced by Certain Antihistamines. *Drug Saf* 21:33-38.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Aufl., Springer Verlag, Berlin, 2006, S. 420-425, 506-508.
- Lu T, Katakam PVG, VanRollins M, Weintraub NL, Spector AA, Lee H (2001) Dihydroxyeicosatrienoic acids are potent activators of Ca²⁺-activated K⁺ channels in isolated rat coronary arterial myocytes. *J Physiol* 534.3:651–667.

- MacGlashan D (2003) Histamine : A mediator of inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 112:S53-S59.
- Marden NY, Fiala-Ber E, Xiang SH, Murray M (2003) Role of activator protein-1 in the down-regulation of the human CYP2J2 gene in hypoxia. *Biochem J* 373:669–680.
- Mattila MJ, Paakkari I (1999) Variations among non-sedating antihistamines: are there real differences? *Eur J Clin Pharmacol* 55:85-93.
- Michaelis UR, Fisslthaler B, Barbosa-Sicard E, Falck JR, Fleming I, Busse R (2005) Cytochrome P450 epoxygenases 2C8 and 2C9 are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *J Cell Sci* 118:5489-5498 .
- Michaelis UR, Xia N, Barbosa-Sicard E, Falck JR, Fleming I (2008) Role of Cytochrome P450 2C Epoxygenases in Hypoxia-Induced Cell Migration and Angiogenesis in Retinal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1242–1247.
- Minarikova V, Hadasova E, Moritz KU, Scheuch E, Siegmund E (2006). Comparison of the influence of methamphetamine and phenobarbital on the activity of hepatic microsomal monooxygenases in the rat. *Homeostasis Hlth Dis* 44:135–137.
- Miura H, Gutterman DD (1998) Human Coronary Arteriolar Dilation to Arachidonic Acid Depends on Cytochrome P-450 Monooxygenase and Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *Circ Res* 83:501-507.
- Monahan BP, Ferguson CL, Killeavy ES, Lloyd BK, Troy J, Cantilena LR (1990) Torsades de Pointes Occurring in Association With Terfenadine Use. *JAMA* 264:2788-2790.
- Moody GC, Griffin SJ, Mather AN, McGinnity DF, Riley RJ (1999) Fully automated analysis of activities catalysed by the major human liver cytochrome P450 (CYP) enzymes: assessment of human CYP inhibition potential. *Xenobiotica* 29:53-75.
- Moss AJ, Chaikin P, Garcia JD, Gillen M, Roberts DJ, Morganroth J (1999) A review of the cardiac systemic side-effects of antihistamines: ebastine. *Clin Exp Allergy* 29:200-205.
- Moss AJ, Morganroth J (1999) Cardiac Effects of Ebastine and Other Antihistamines in Humans. *Drug Saf* 21:69-80.
- Nettis E, Colanardi MC, Ferrannini A, Tursi A (2005) Antihistamines as Important Tools for Regulating Inflammation. *Curr Med Chem* 4:81-89.
- Nithipatikom K, Gross GJ (2010) Epoxyeicosatrienoic Acids: Novel Mediators of Cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 000:1-8.
- Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK (1999) Anti-inflammatory Properties of Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids. *Science* 285:1276-1279.

- Nuttall A, Snow HM (1982) The cardiovascular effects of ICI 118,587: A β_1 -adrenoceptor partial agonist. *Br J Pharmacol* 77:381-388.
- Ohtani H, Hanada E, Hirota M, Sato H, Kotaki H, Sawada Y, Uemura H, Nakaya H, Iga T (1999a) Inhibitory Effects of the Antihistamines Epinastine, Terfenadine, and Ebastine on Potassium Currents in Rat Ventricular Myocytes. *J Pharm Pharmacol* 51:1059-1063.
- Ohtani H, Sato H, Iga T, Kotaki H, Sawada Y (1999b) Pharmacokinetic–pharmacodynamic analysis of the arrhythmogenic potency of a novel antiallergic agent, ebastine, in rats. *Biopharm Drug Dispos* 20:101–106.
- Oltman CL, Weintraub NL, VanRollins M, Dellsperger KC (1998) Epoxyeicosatrienoic Acids and Dihydroxyeicosatrienoic Acids Are Potent Vasodilators in the Canine Coronary Microcirculation. *Circ Res* 83:932-939.
- Paakkari I (2002) Cardiotoxicity of new antihistamines and cisapride. *Toxicol Lett* 127:279–284.
- Park BK (2000) Cytochrome P450 enzymes in the heart. *Lancet* 355:945-956.
- Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA, Khoroshaya IV, Kozhuhov MA, Panfilov VI (2007) Promoter Polymorphism G-50T of a Human CYP2J2 Epoxygenase Gene Is Associated With Common Susceptibility to Asthma*. *Chest* 132:120-126.
- Recanatini M, Poluzzi E, Masetti M, Cavalli A, de Ponti F (2005) QT Prolongation Through hERG K⁺ Channel Blockade: Current Knowledge and Strategies for the Early Prediction During Drug Development. *Med Res Rev* 25:133-166.
- Rico S, Antonijoan RM, Barbanoj MJ (2009) Ebastine in the light of CONGA recommendations for the development of third-generation antihistamines. *J Asthma Allergy* 2:73–92.
- Roberts DJ (1998) Towards the optimal antihistamine: Studies with ebastine. *Inflamm Res* 47:S36–S37.
- Ross J, Linhart JW, Braunwald E (1965) Effects of Changing Heart Rate in Man by Electrical Stimulation of the Right Atrium : Studies at Rest, during Exercise, and with Isoproterenol. *Circulation* 32:549-558.
- 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 (2004) Enhanced Postischemic Functional Recovery in CYP2J2 Transgenic Hearts Involves Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels and p42/p44 MAPK Pathway. *Circ Res* 95:506-514.
- Shon JH, Yeo CW, Liu KH, Lee SS, Cha IJ, Shin JG (2010) Itraconazole and Rifampin Alter Significantly the Disposition and Antihistamine Effect of Ebastine and Its Metabolites in Healthy Participants. *J Clin Pharmacol* 50:195-204.

Simons FER (2002) Comparative pharmacology of H₁ antihistamines: clinical relevance. *Am J Med* 113:38S-46S.

Sinal CJ, Miyata M, Tohkin M, Nagata K, Bend JR, Gonzalez FJ (2000) Targeted Disruption of Soluble Epoxide Hydrolase Reveals a Role in Blood Pressure Regulation. *J Biol Chem* 275:40504-40510.

Smith HE, Jones JP, Kalhorn TF, Farin FM, Stapleton PL, Davis CL, Perkins JD, Blough DK, Hebert MF, Thummel KE, Totah RA (2008) Role of cytochrome P450 2C8 and 2J2 genotype in calcineurin inhibitor induced chronic kidney disease. *Pharmacogenet Genomics* 18:943-953.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271:33157-33160.

Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL (2004) Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* 43:55-90.

Spector AA, Norris AW (2007) Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:996-1012.

Spiecker M, Darius H, Hankeln T, Soufi M, Sattler AM, Schaefer JR, Node K, Börgel J, Mügge A, Lindpaintner K, Huesing Anika, Maisch B, Zeldin DC, Liao JK (2004) Risk of Coronary Artery Disease Associated With Polymorphism of the Cytochrome P450 Epoxygenase CYP2J2. *Circulation* 110:2132-2136.

Spiecker M, Liao JK (2006) Cytochrome P450 Epoxygenase CYP2J2 and the Risk of Coronary Artery Disease. *Trends Cardiovas Med* 16:204-208.

Sutherland FJ, Hearse DJ (2000) The Isolated Blood And Perfusion fluid Perfused Heart. *Pharmacol Res* 41:613-627.

Taglialatela M, Annunziato L (2000) Novel insights into the molecular mechanism of the cardiac actions of histamine H₁ receptor antagonists. *Dermatol Ther* 13:361-373.

Thum T, Borlak J (2000a). Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet* 355:979-983.

Thum T, Borlak J (2000b) Cytochrome P450 mono-oxygenase gene expression and protein activity in cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Br J Pharmacol* 130:1745-1752.

Thum T, Borlak J (2002) Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J* 16:1537-1549.

Valenzuela C, Delpon E, Franqueza L, Gay P, Vicente J, Tamargo J (1997) Comparative effects of non-sedating histamine H₁ receptor antagonists, ebastine and terfenadine, on human Kv1.5 channels. *Eur J Pharmacol* 326:257-263.

Viskin S (1999) Long QT syndromes and torsade de pointes. *Lancet* 354:1625-1633.

- Wang JF, Yang Y, Sullivan MF, Min J, Cai J, Zeldin DC, Xiao YF, Morgan JP (2002) Induction of Cardiac Cytochrome P450 in Cocaine-Treated Mice. *Exp Biol Med* 227:182-188.
- Weintraub NL, Fang X, Kaduce TL, VanRollins M, Chatterjee P, Spector AA (1997) Potentiation of Endothelium-Dependent Relaxation by Epoxyeicosatrienoic Acids. *Circ Res* 81:258-267.
- Weiss M (2011) Functional characterization of drug uptake and metabolism in the heart. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7:1295-1306.
- Wiseman LR, Faulds D (1996) Ebastine. a review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of allergic disorders. *Drugs* 51:260-77.
- Wosley RL (1996) Cardiac Actions of Antihistamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:233-252.
- Wosley RL, Chen Y, Freiman JP, Gillis RA (1993) Mechanism of the Cardiotoxic Actions of Terfenadine. *JAMA* 269:1532-1536.
- Wu S, Chen W, Murphy E, Gabel S, Tomer KB, Foley J, Steenbergen C, Falck JR, Moomaw CR, Zeldin DC (1997) Molecular Cloning, Expression, and Functional Significance of a Cytochrome P450 Highly Expressed in Rat Heart Myocytes. *J Biol Chem* 272:12551–12559.
- Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, Zeldin DC (1996) Molecular Cloning and Expression of CYP2J2, a Human Cytochrome P450 Arachidonic Acid Epoxygenase Highly Expressed in Heart. *J Biol Chem* 271:3460–3468.
- Wu SN, Zhang Y, Gardner CO, Chen Q, Li Y, Wang GL, Gao PJ, Zhu DL (2007) Evidence for Association of Polymorphisms in CYP2J2 and Susceptibility to Essential Hypertension. *Ann Hum Genet* 71:519-524.
- Yamamoto S, Suzuki H, Ueda N, Takahashi Y, Yoshimoto T: Chapter 5. Mammalian lipoxygenases. In: Curtis-Prior P (Ed): *The Eicosanoids*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2004, pp. 53-56.
- Yang B, Graham L, Dikalov S, Mason RP, Falck JR, Liao JK, Zeldin DC (2001) Overexpression of Cytochrome P450 CYP2J2 Protects against Hypoxia-Reoxygenation Injury in Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells. *Mol Pharmacol* 60:310–320.
- Yang S, Lin L, Chen J, Lee CR, Seubert JM, Wang Y, Wang H, Chao ZR, Tao DD, Gong JP, Lu ZY, Wang DW, Zeldin DC (2007) Cytochrome P-450 epoxygenases protect endothelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor- α via MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:142-151.
- Yap YG, Camm AJ (2003) Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart* 89:1363-1372.

Yu Z, Huse LM, Adler P, Graham L, Ma J, Zeldin DC, Kroetz DL (2000) Increased CYP2J Expression and Epoxyeicosatrienoic Acid Formation in Spontaneously Hypertensive Rat Kidney. *Mol Pharmacol* 57:1011–1020.

Zeldin DC (2001) Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism. *J Biol Chem* 276:36059–36062.

Zeldin DC, Foley J, Boyle JE, Moomaw CR, Tomer KB, Parker C, Steenbergen C, Wu S (1997a) Predominant Expression of an Arachidonate Epoxygenase in Islets of Langerhans Cells in Human and Rat Pancreas. *Endocrinology* 138:1338-1346.

Zeldin DC, Foley J, Goldsworthy SM, Cook ME, Boyle JE, Ma J, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, Wu S (1997b) CYP2J Subfamily Cytochrome P450s in the Gastrointestinal Tract: Expression, Localization, and Potential Functional Significance. *Mol Pharmacol* 51:931–943.

Zeldin DC, Foley J, Ma J, Boyle JE, Pascual JMS, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, Wu S (1996) CYP2J subfamily P450s in the lung: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol* 50:1111-1117.

Zeldin DC, Kobayashi J, Falck JR, Winder BS, Hammock BD, Snapper JR, Capdevila JH (1993) Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase. *J Biol Chem* 268:6402-6407.

Zeldin DC, Wei S, Falck JR, Hammock BD, Snapper JR, Capdevila JH (1995) Metabolism of Epoxyeicosatrienoic Acids by Cytosolic Epoxide Hydrolase: Substrate Structural Determinants of Asymmetric Catalysis. *Arch Biochem Biophys* 316:443-451.

Zendulka O, Juřica J, Sabová M, Šulcová A (2010) Methamphetamine does not influence the metabolic activity of CYP 1A2, 2C6 and 2D2 isoenzymes in the animal study. *Act Nerv Super Rediviva* 52:269–271.

Zhang C, Harder DR (2002) Cerebral Capillary Endothelial Cell Mitogenesis and Morphogenesis Induced by Astrocytic Epoxyeicosatrienoic Acid. *Stroke* 33:2957-2964.

Zhang L, Ding H, Yan J, Hui R, Wang W, Kissling GE, Zeldin DC, Wang DW (2008) Genetic variation in cytochrome P450 2J2 and soluble epoxide hydrolase and risk of ischemic stroke in a Chinese population. *Pharmacogenet Genomics* 18:45–51.

Zhang Y, El-Sikhry H, Chaudhary KR, Batchu SN, Shayeganpour A, Jukar TO, Bradbury JA, Graves JP, DeGraff LM, Myers P, Rouse DC, Foley J, Nyska A, Zeldin DC, Seubert JM (2009) Overexpression of CYP2J2 provides protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:37-46.

Zhang Y, Oltman CL, Lu T, Lee HC, Dellsperger KC, VanRollins M (2001) EET homologs potently dilate coronary microvessels and activate BK_{Ca} channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:2430-2440.

Zink R, Heiny O, Steiert A: Bedienungsanleitung für die Versuchs-Apparatur Isoliertes Herz Größe 3 Typ 830. Version 1.3. HSE Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland, 2007, S. 6-16.

Zordoky BNM, Aboutabl ME, El-Kadi AOS (2008) Modulation of Cytochrome P450 Gene Expression and Arachidonic Acid Metabolism during Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy in Rats. *Drug Metab Dispos* 36:2277–2286.

8. Thesen

1. Die Auswertung der am perfundierten Rattenherzen gemessenen kinetischen Daten zur Metabolisierung von Ebastin mit einem Kompartiment-Modell liefert quantitative Informationen über die sequentielle Metabolisierung von Ebastin im Herzmuskel und Hinweise auf die Aktivität der daran beteiligten Cytochrome.
2. Ebastin kann als Testsubstanz zur Beurteilung myokardialer CYP 2J verwendet werden.
3. Nach Hypoxie und anschließender Reoxygenierung kommt es zu einer Herabregulierung der kardialen CYP 2J-Aktivität sowie gesteigerten CYP 3A-Aktivität.
4. Die einstündige Isoprenalin-Behandlung resultiert in einem reduzierten Ebastin-Metabolismus sowie geringerer CYP 2J- und 3A-Aktivität im Herzen.
5. Die Isoprenalin-induzierte kardiale Hypertrophie ist begleitet von einer erhöhten CYP 2J-Aktivität im hypertrophen Gewebe.
6. In Anwesenheit eines CYP 2J-Hemmers werden die Ebastin-Metabolisierung und der negativ inotrope Effekt stark reduziert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susann Elitzer
Geburtsdatum: 15.07.1987
Ort: Borna
Familienstand: ledig
Staatsbürgerschaft: deutsch

Schulbildung

09/1994 – 08/1998 Grundschule Zedtlitz/Neukirchen
09/1998 – 07/2006 Pestalozzi-Gymnasium in Borna
Abschluss: Abitur (Durchschnittsnote 1,4)

Studium

10/2006 – 11/2012 Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Staatsexamen (Note 2,0)

Praktische Ausbildung

Praktisches Jahr:

08/2011 – 12/2011 Innere Medizin am Spital Wil, Spitalregion Fürstenland Toggenburg, Schweiz
12/2011 – 03/2012 Augenheilkunde am Universitätsklinikum Halle
03/2012 – 07/2012 Chirurgie am HELIOS Klinikum, Sangerhausen

Beruflicher Werdegang

ab 05/2013 Assistenzärztin in der Klinik für Augenheilkunde, Kreiskrankenhaus Rudolf Virchow GmbH, Glauchau

Halle (Saale), den 24.04.2013

Susann Elitzer

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 24.04.2013

Susann Elitzer

Erklärung über vorherige Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, dass von mir, Susann Elitzer, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den 24.04.2013

Susann Elitzer

Danksagung

Von Beginn an haben mich mehrere Menschen bei der Arbeit an meiner Dissertation begleitet und unterstützt. Bei allen möchte ich mich hiermit herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Weiss für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung. Er hat mich während dieser Arbeit kontinuierlich mit seinem Fachwissen und konstruktiven Anregungen unterstützt.

Außerdem danke ich Prof. W. Kang und seinen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie, Yeungnam Universität, Kyoungbuk, Südkorea für die Messung der Proben und Herstellung des CYP 2J-Hemmers. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei Petra Arendt, Frau Günther, Frau Niebisch, Tobias Bednarek und Rana Hassna bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenso gilt mein Dank dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Neumann sowie allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin danke ich meinen Eltern und Freunden, die mir durch ihre Unterstützung während des Studiums den Weg zu dieser Arbeit ermöglicht haben.