

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie
Direktor: Prof. Dr. med. B. Maisch
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Untersuchungen zur dilatativen Kardiomyopathie:
Docosahexaensäure als neuer Biomarker für die Dilatation und
minimal invasiver Herzbeutelzugang (AttachLifter)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Thomas Philipp Rupp
aus Tübingen

Marburg 2012

Angenommen vom
Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 28. Juni 2012.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. B. Maisch

Korreferent: Prof. Dr. med. R. Moosdorf



Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Kardiomyopathien	6
1.2 Zusammenhang kardiale Erkrankungen und Fettsäuren	9
1.2.1 Plötzlicher Herztod und n-3 Fettsäuren	9
1.2.2 Herzinsuffizienz und n-3 Fettsäuren	12
1.3 Fettsäuren	13
1.3.1 Struktur von Fettsäuren	13
1.3.2 Fettsäurestoffwechsel	15
1.3.2.1 Biosynthese gesättigter Fettsäuren	15
1.3.2.2 Biosynthese ungesättigter Fettsäuren	17
1.3.2.3 Fettsäureabbau	19
1.4 Perikardzugang	21
2 Zielstellung	24
3 Patienten, Material und Methoden	25
3.1 Mikrobestimmung des Fettsäureprofils mit Gaschromatographie	25
3.1.1 Extraktion von Lipiden	25
3.1.2 Umesterung der Triglyzeride mit Methanol	25
3.1.3 Gaschromatographie	26
3.1.4 Integration der Fettsäurepeaks	29
3.2 Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz	30
3.2.1 Echokardiographie und Wandspannung	31
3.2.2 Zeitbereichsanalyse der Herzfrequenzvariabilität	31
3.3 Bestimmung von Aldehyden in Fischölpräparaten mit Massenspektrometrie	31
3.4 Verabreichung von EPA+DHA Ethylestern an gesunde Probanden	33
3.5 Druckbelastung des Herzens bei der Ratte	34
3.6 Statistische Auswertung	35
4 Ergebnisse	36
4.1 Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz	36
4.1.1 Korrelationen von Serumfettsäuren	36
4.1.2 Kategorisierung nach LVEDD	39
4.1.3 Kategorisierung nach LVEF	44
4.2 Bestimmung von oxidativen Abbauprodukten von n-3 Fettsäuren mit Massenspektrometrie	53

4.3 Verabreichung von EPA+DHA Ethylestern an gesunde Probanden	55
4.4 Nicht insuffiziente Druckbelastung bei DOCA-Salz Ratten	57
4.5 Perikardzugang und intraperikardiale Navigation	60
4.5.1 AttachLifter	61
4.5.2 AttachGuider	64
4.5.3 Patent-Entwicklung	66
5 Diskussion	67
5.1 Methodendiskussion	67
5.2 Fettsäurekorrelationen bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz	67
5.3 Fettsäurespiegel mit Kategorisierung nach LVEDD und LVEF	68
5.4 Erhöhte Wandspannung in Zusammenhang mit veränderter Herzfrequenzvariabilität	70
5.5 Veränderung der Fettsäuredesaturasen bei gesteigerter Sympathikusaktivität	71
5.6 Nicht insuffiziente kardiale Druckbelastung bei DOCA-Salz Ratten	74
5.7 α -Linolensäure als Ausgangsfettsäure von EPA und DHA	75
5.8 Anti-arrhythmogene Effekte hoch ungesättigter Fettsäuren	76
5.9 n-3 Fettsäuren und Standardmedikation bei eingeschränkter Herzfunktion	78
5.10 Unterschiede in n-3 Fettsäurepräparaten	79
5.11 Risikoarme Perikardpunktion und intraperikardiale Navigation	80
6 Zusammenfassung	83
7 Abkürzungsverzeichnis	84
8 Literaturnachweis	86
9 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	96
10 Danksagung	97

1 Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

Die Kardiomyopathie wurde 1980 erstmals von der World Health Organization und der International Society and Federation of Cardiology klassifiziert und als eine unbekannte Erkrankung des Herzmuskels bezeichnet (1). Grundsätzlich ist diese Erkrankung nicht Folge eines Hypertonus, angeborener Herzfehler, einer Herzklappenerkrankung, einer koronaren Herzkrankheit oder von Perikarderkrankungen. Die Klassifikation wurde 1996 (87) als eine Herzerkrankung mit einer kardialen Dysfunktion präzisiert und um die Kardiomyopathien erweitert, die durch spezifische Herz- oder Systemerkrankungen wie die Myokarditis, der Morbus Fabry, die Amyloidose oder andere erklärt werden können. Zudem wurde die phänotypische Unterscheidung einer dilatativen (DCM, systolische Pumpstörung des dilatierten Ventrikels), hypertrophen (HCM, mit und ohne Obstruktion, reduzierte diastolische Relaxation des verdickten Herzmuskels, häufig autosomal dominant vererbt), restriktiven (RCM, reduzierte diastolische Dehnbarkeit auch bei normaler Myokarddicke, z.B. infolge Endomyokardfibrose) und arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVCM, überwiegend rechtsventrikuläres kombiniertes Pumpversagen mit ventrikulären Tachykardien, häufig autosomal dominant vererbt) und die nichtklassifizierbaren Kardiomyopathien (verschiedene Störungen, z.B. „isolierte LV-non-compaction“) eingeführt. Die American Heart Association veröffentlichte 2006 eine Definition basierend auf weitergehenden genotypischen Veränderungen. Primäre Kardiomyopathien wurden in genetische, gemischte und erworbene Erkrankungen eingeteilt (70). Die European Society of Cardiology überarbeitete 2008 die Klassifikation von 1996, um zunächst dem klinischen Aspekt d.h. dem funktionellen und morphologischen Phänotyp gerecht zu werden und anschließend der weiterführenden Diagnostik Rechnung tragen zu können (28). Hiermit entfällt die Unterscheidung in primäre/sekundäre bzw. spezifische/unspezifische Kardiomyopathien. Die Kardiomyopathie als myokardiale Erkrankung, die nicht ursächlich durch eine koronare Herzkrankheit, einen Hypertonus, eine Herzklappen- oder angeborene Herzerkrankung erklärt werden kann, wird demnach in die DCM, HCM, RCM und die nicht klassifizierten Kardiomyopathien eingeteilt (Abbildung 1). Jeweils wird weiter unterteilt, ob eine genetische bzw. familiäre Genese zu Grunde liegt oder ob ein anderer differentialdiagnostischer Subtyp, wie eine entzündliche, eosinophile oder virale Erkrankung, vorliegt.

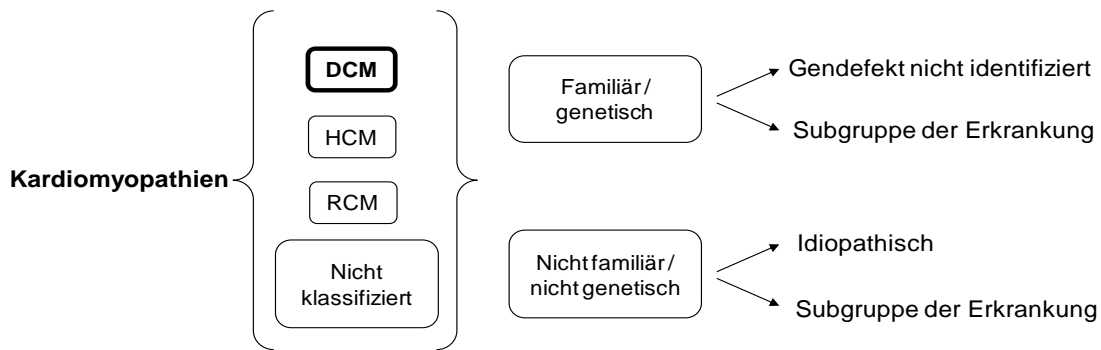


Abbildung 1. Morphologische Klassifikation der Kardiomyopathien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie. Abbildung nach Pankuweit et al. (82).

Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie als häufigste Kardiomyopathieform ist durch eine Dilatation des Herzmuskels, insbesondere des linken Ventrikels einhergehend mit einer eingeschränkten linksventrikulären Ejektionsfraktion, charakterisiert (64). Darüber hinaus kommt es zu einer Störung der diastolischen Funktion mit einer verzögerten, inkompletten Relaxation und reduzierten Dehnbarkeit. Pathologische Korrelate sind eine interstitielle Fibrose und strukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrix.

Überwiegend sind männliche Patienten betroffen. Die Inzidenz liegt bei 6 pro 100.000 Einwohner pro Jahr und die Prävalenz bei 36.5 pro 100.000 Einwohner in Deutschland (66). Häufig läuft die langsam progredient verlaufende Erkrankung zunächst asymptomatisch ab, weshalb von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen wird. Die Ätiologie und Pathologie sind sehr vielfältig. In etwa 20% der Fälle liegt eine familiäre DCM zu Grunde, meist mit einer autosomal dominanten (mit z.B. Erregungsleitungsstörung und Sick-Sinus-Syndrom), seltener X-chromosomal (z.B. durch Mutationen des Dystrophiegens) oder autosomal-rezessiven (z.B. durch Genmutation der Fettsäureoxidation) Vererbung. Häufig tritt eine Kardiomyopathie auch in Folge einer Virusinfektion, vor allem Coxsackie B, Zytomegalie-, Adeno-, Parvovirus B19, seltener nach Infektion mit Bakterien (z.B. *Borrelia burgdorferi*), Protozoen (z.B. *Trypanosoma cruzi*, Chagas Krankheit) auf. Diese inflammatorische Kardiomyopathie kann sich als eine „chronische Myokarditis“ mit Erreger-/Viruspersistenz oder als Autoimmunreaktion ohne Erregerpersistenz manifestieren (82). Darüber hinaus gelten viele andere Systemerkrankungen als Auslöser einer DCM, wie z.B. Kollagenosen, Amyloidosen, Stoffwechselstörungen oder Neoplasien. Ebenso können Medikamente (vor allem Zytostatika wie Doxorubicin u.a. Anthracycline, Phenothiazine, Clozapin, Lithiumcarbonat oder trizyklische Antidepressiva) und andere Noxen (vor allem Alkohol oder Cocain) das Bild einer DCM verursachen. Im letzten Drittel der Schwangerschaft bis 6 Monate nach Entbindung kann die so genannte peripartale

Kardiomyopathie auftreten. Falls die Ursache unbekannt bleibt, spricht man von einer idiopathischen DCM.

Die Symptome der DCM mit Belastungsdyspnoe, Angina pectoris und Palpitationen spiegeln sich vor allem in einer progressiven Linksherzinsuffizienz mit Rhythmusstörungen wider. Nach der Anamnese einschließlich der Familienanamnese ist vor allem die Echokardiographie diagnosewegweisend. Laborchemisch kann die Bestimmung des BNP Spiegels als Herzinsuffizienzparameter sinnvoll sein. Elektrokardiographisch findet man oft einen Linksschenkelblock, Zeichen der Vergrößerung des linken Ventrikels oder Vorhofflimmern. Im Nativ-Röntgen des Thorax ist häufig eine unspezifische Kardiomegalie später auch mit Lungenstauung zu sehen. In der Echokardiographie zeigen sich eine Dilatation beider Ventrikel, eine Hypokinesie der Ventrikelwand bei Einschränkung der systolischen Einwärtsbewegung und eine reduzierte LVEF. Zusätzlich zu einer invasiven Diagnostik mittels Koronarangiographie zum Ausschluss einer ischämischen Ursache, kann mit einer Myokardbiopsie mit anschließend immun-/ histologischer Untersuchung mit Virusdiagnostik oder Nachweis von Auto-Antikörpern die Ursachen einer DCM identifiziert werden.

Die Therapie der DCM zielt wenn möglich zunächst auf die kausale Behandlung der Ursachen ab, das bedeutet beispielweise Alkoholkarenz auf Dauer, Absetzen kardiotoxischer Medikamente oder bei Nachweis von Virusgenom, der Versuch einer Viruselimination. Die weitere Therapie spiegelt sich als Behandlung der Herzinsuffizienz wider, d.h. körperliche Schonung und medikamentöse Therapie mit ACE-Hemmern (Prognose verbessernd, ab NYHA-Stadium I, alternativ AT1-Rezeptorblocker), Betablocker (Prognose verbessernd, ab NYHA-Stadium II, ab Stadium I bei Hypertonie und Zustand nach Myokardinfarkt), Diuretika (ab NYHA-Stadium III, sowie stadienunabhängig bei Hypertonie oder Ödemen) und Aldosteronantagonisten (Prognose verbessernd, ab NYHA-Stadium III, ab Stadium I bei Zustand nach Myokardinfarkt), Herzglykoside (ab NYHA-Stadium III, sowie stadienunabhängig bei Vorhofflimmern) (44). Darüber hinaus kann eine Thromboembolieprophylaxe mit Antikoagulanzen bei niedriger LVEF oder Vorhofflimmern indiziert sein. Zur Sekundärprophylaxe bei Zustand nach Reanimation aufgrund Kammerflattern/-flimmern oder als Primärprophylaxe bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz und schlechter LVEF kann ein implantierbarer Cardioverter-Defibrillator eingesetzt werden (40; 41). Bei einer QRS-Verbreiterung muss die Indikation für eine kardiale Resynchronisationstherapie bei NYHA-Stadium III-IV und erhaltenem Sinusrhythmus und asynchroner Aktion beider Ventrikel durch kompletten Linksschenkelblock diskutiert werden. Bei terminaler Herzinsuffizienz kann der Versuch einer Entlastung des Herzens durch temporären mechanischen Herzersatz unternommen werden. Als Ultima ratio bleibt die Herztransplantation.

Als Komplikationen können die akute Herzinsuffizienz mit Dekompensation, arterielle und pulmonale Embolien infolge intrakardialer Thrombenbildung, ventrikuläre Herzrhythmusstörungen und der plötzliche Herztod auftreten. Die Prognose ist abhängig vom Grad der Herzinsuffizienz, der LVEF und der diastolischen ventrikulären Füllungscharakteristik. Die 10-Jahres-

Überlebensrate liegt bei 10-30% und die jährliche Letalität bei 10% (66). Haupttodesursache ist die progressive Herzinsuffizienz und der plötzliche Herztod aufgrund Herzrhythmusstörungen. Prognostisch ungünstig ist eine LVEF unter 35%, höhergradige ventrikuläre Rhythmusstörungen, sowie ein Linksschenkelblock oder AV-Block.

1.2 Zusammenhang kardiale Erkrankungen und Fettsäuren

1.2.1 Plötzlicher Herztod und n-3 Fettsäuren

Die Risikostratifizierung zur Prävention und Therapie des plötzlichen Herztodes stellt immer noch eine Herausforderung dar, insbesondere in der älteren Bevölkerung. Ungünstige strukturelle und molekulare Veränderungen im Herzen treten im Laufe des Lebens ein, welche die elektrische Instabilität steigern und den plötzlichen Herztod begünstigen. Bei Patienten mit idiopathischer DCM wurde von Grimm et al. (41) in einer prospektiven Studie (Marburg Cardiomyopathy Study) Parameter beschrieben, die das Risiko ventrikulärer Arrhythmien widerspiegeln. Die wichtigsten Risikoprädiktoren für das Auftreten von Arrhythmien waren die reduzierte LVEF und das Fehlen einer Betablocker-Therapie. Signalgemitteltes EKG, Baroreflexsensitivität, Herzfrequenzvariabilität, und T-Wellen-Veränderungen wurden für die Risikostratifizierung von Arrhythmien hingegen als nicht hilfreich beschrieben. Zusätzlich zur linksventrikulären Dilatation ist die Linksherzhypertrophie ein wesentlicher Prädiktor für den plötzlichen Herztod, deren Ursache häufig ein inadäquat behandelter Hypertonus ist. Bei der hypertensiven Herzkrankheit kommt es wie bei der DCM zu einer Myokardfibrose, die eine Myokardischämie begünstigt und daher einen ungünstigen Einfluss auf die synchrone Erregungsausbreitung hat. Während der zunehmenden Verschlechterung der Pumpfunktion erhöht sich das Risiko des plötzlichen Herztodes und ventrikulärer Arrhythmien.

Etablierte Parameter zur kardiovaskulären Risikostratifizierung beziehen sich primär auf die Prävention und Therapie von Hypertonie, Lipidstörungen und Diabetes mellitus. Hinsichtlich der verbleibenden hohen Mortalität und Morbidität von kardiovaskulären Krankheiten, stellt sich die Frage, ob die derzeitige Therapie adäquat ist, vor allem ob es zusätzliche Risiken gibt, deren Bedeutung noch nicht ausreichend berücksichtigt wurden. Die Risiken, welche zurzeit noch nicht adäquat therapiert werden können, schließen Entzündungsreaktionen bei verschiedenen Herzkrankheiten ein (45). Eine prospektive Studie mit den Parametern CRP, Homocystein und Plasma Lipidspiegel zeigte, dass nur der CRP Spiegel signifikant mit dem Risiko vom plötzlichen Herztod assoziiert ist (4). Zusätzlich zu inflammatorischen und ischämischen Ereignissen ist das Risiko vom plötzlichen Herztod und Kammerflimmern erhöht, wenn die kardiale Pumpfunktion kritisch beeinträchtigt wird (41), wobei die Herzgeometrie einen entscheidenden Einfluss hat.

Zusätzlich zu den genannten und zumindest ansatzweise therapierbaren Faktoren wird das Risiko des plötzlichen Herztodes durch eine kardiale Dilatation begünstigt. Die Herzdilatation tritt auch in ungefähr einem Viertel (59) bis einem Drittel (23) von Patienten nach einem Myokardinfarkt auf und geht mit einem hohen Risiko von Arrhythmien einher (35). Während die hypertensive Herzkrankheit und ihre ungünstigen Konsequenzen durch eine strenge antihypertensive Therapie verhindert werden könnte, kann die Dilatation bei Infarktpatienten aufgrund des Verlustes von funktionsfähigem Myokard meist nicht mehr verhindert werden. Ungeachtet der Ätiologie begünstigt die Ventrikeldilatation das Auftreten von Arrhythmien (15) unter anderem durch eine gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit von dehnungsaktivierten Kationenkanälen (33). Die daraus resultierende elektrische Instabilität begünstigt ventrikuläre Tachyarrhythmien auf dem Boden einer Fibrose, lokaler Ischämie und von reduzierten Ionenströmen des „transient outward currents“ I_{to} (84) hypertrophierter Kardiomyozyten. Es wird daher seit Jahren verstärkt nach Risikoparametern gesucht, welche nicht nur ein erhöhtes Risiko inflammatorischer Ereignisse, sondern auch eine gesteigerte elektrische Instabilität beschreiben. Die therapeutischen Optionen zur Verhinderung des plötzlichen Herztodes bleiben jedoch begrenzt. Bei entsprechender Indikation kommen auch ICDs zum Einsatz, wobei aber nicht alle Patienten mit einem Risikofaktor für maligne Arrhythmien mit einem ICD versorgt werden können. Hier kann der automatische externe Defibrillator hilfreich sein, jedoch werden entsprechend geschulte Helfer benötigt, die die Notfälle erkennen, das medizinische Notfallservicesystem aktivieren, eine Defibrillation und eine kardiopulmonale Wiederbelebung durchführen (43). Auch ist die Effektivität von automatischen externen Defibrillatoren in öffentlichen Defibrillator-Programmen dadurch begrenzt, dass der plötzliche Herzstillstand sehr häufig zu Hause auftritt (fast 80% in der Maastrichter Gegend) und nicht auf öffentlichen Plätzen (25). Deshalb wird eine Entwicklung von alternativen Interventionen dringend benötigt, die den ungünstigen Auswirkungen einer elektrischen Instabilität des Herzens entgegenwirken können.

Die bisherigen Schlussfolgerungen hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit einer Anreicherung von Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) in Blutlipiden sind hauptsächlich aus der Verabreichung von Omacor[®] abgeleitet, welches hoch gereinigte EPA (46%) und DHA (38%) Ethylester enthält. Bei einer Verabreichung von 1g Omacor[®]/Tag wurde das relative Risiko von plötzlichem Herztod bei Myokardinfarkt-Patienten in der GISSI-Prevenzione Studie (38) um 45% reduziert. Da die Inzidenz eines zweiten Myokardinfarkts nicht signifikant reduziert war, scheinen Mechanismen einer Plaquestabilisierung nicht beteiligt zu sein. Vielmehr wurde der EPA+DHA Spiegel als identifizierbarer Risikoparameter für schwere Arrhythmiestörungen beschrieben, insbesondere wenn diese mit einem Myokardinfarkt assoziiert sind. In der Physicians' Health Studie waren niedrige Blutspiegel von langkettigen n-3 Fettsäuren mit einem erhöhten Risiko des plötzlichen Todes assoziiert, während Arachidonsäure offensichtlich keinen Einfluss hatte (3). Darüber hinaus war ein Spiegel von 5,0% verglichen mit

3,3% der in Erythrozyten gemessenen Fettsäuren mit einer 70%igen Reduktion des Risikos eines primären Herzstillstandes assoziiert (106).

Da nach einem Myokardinfarkt die Sympathikusaktivität aufgrund der eingeschränkten Herzfunktion gesteigert ist, kommt es als Folge einer Phospholipase A₂ Aktivierung zu einem Anstieg freier Fettsäuren im Myokard und Blut, wobei bevorzugt EPA und DHA aus der inneren Position von Phospholipiden freigesetzt werden. Es werden daher lediglich moderate Effekte bei Patienten mit einem ICD erwartet, da dieser ventrikuläre Tachyarrhythmien höchstwahrscheinlich so rasch beendet, dass EPA und DHA nicht in größerem Umfang freigesetzt werden. Somit wird vermutlich keine ausreichende Konzentration im Umfeld von Kanälen oder Austauschern erreicht. So war in der Studie von Leaf et al. (53) mit ICD Patienten in einer Gruppe mit 2,6g EPA+DHA/Tag und einer Gruppe mit Olivenöl nach 12 Monaten der primäre Endpunkt (Zeit bis zum ersten ICD-Ereignis oder Tod jeglicher Ursache) nur an der Signifikanzgrenze (Risikoreduktion 28%, p=0,057) verändert. Bei Patienten mit einem Beobachtungszeitraum über mindestens 11 Monate und bestätigten Ereignissen war der anti-arrhythmogene Vorteil von EPA und DHA Ethylestern jedoch belegt (Risikoreduktion 38%, p= 0,034).

Eine ältere Vorstellung war, dass die anti-arrhythmogenen Effekte von EPA und DHA aus deren Einbau in Membranphospholipide und damit einhergehende veränderte Membranfluidität zurückzuführen sind. In einer sehr frühen Arbeit wurde mit der „loose patch clamp“-Technik gezeigt (13), dass es keine signifikanten Veränderungen in der Na⁺ Kanalaktivität der Papillarmuskeln von mit Fischöl gefütterten Ratten gibt (27), obwohl der DHA Gehalt der Phospholipide von 9% auf 28% erhöht (2) und die Anzahl der Ischämie-Reperfusionsarrhythmien reduziert war (47).

Demnach kann man postulieren, dass Membran-gebundenes EPA und DHA nicht die Eigenschaften des Na⁺ Kanals beeinflusst. Zu dieser Zeit war nicht bekannt, dass freie Fettsäuren von EPA und DHA eine anti-arrhythmogene Wirkung haben. Freies EPA und DHA wurde während dieser elektrophysiologischen Experimente nicht dem Medium hinzugefügt, welches hinsichtlich späterer Experimente von Leaf et al. (50; 126) nötig gewesen wäre, um hemmende Effekte auf Ionenkanäle beobachten zu können. In einer Serie von detaillierten Studien (50; 126) wurde gezeigt, dass die freien Fettsäuren EPA und DHA, nicht aber membrangebundene Fettsäuren, die Na⁺ Kanal Aktivität hemmen. Zusätzlich waren der kardiale Na⁺-Ca²⁺ Austauscher und der L-Typ Ca²⁺ Kanal gehemmt, was insbesondere das Auftreten von Nachdepolarisationen verhindern könnte. Um inhibitorische Effekte auch auf andere Kanäle, wie den transienten K⁺ Auswärtsstrom, erklären zu können, müssen inhibitorische Effekte, die spezifisch für EPA und DHA aber nicht für einen speziellen Ionenkanal sind, vermutet werden. Auch die Ca²⁺ Freisetzung aus dem intrazellulären Speicher, dem sarkoplasmatischen Retikulum, war gehemmt. Die hemmenden Effekte wurden der Einlagerung von EPA und DHA in die Mikroumgebung von Ionenkanälen mit nachfolgender Konformationsänderung zugeschrieben

(54) . Eine Konsequenz dieses Mechanismus ist, dass eine kritische Konzentration an freiem EPA und DHA erreicht werden muss, um eine adäquate Anzahl von Kanälen zu hemmen.

1.2.2 Herzinsuffizienz und n-3 Fettsäuren

Die dilatative Herzinsuffizienz ist häufig mit einer progressiven Vergrößerung des linken Ventrikels assoziiert. Wenn eine Ventrikeldilatation ohne adäquate Hypertrophie auftritt, steigt die Wandspannung, die mit Volumendaten von kardialem MRT und intraventrikulärem Druck genau bestimmt werden kann (9). Eine erhöhte Wandspannung ist mit einem gesteigerten Serum BNP (10; 11) assoziiert. Die Steigerung der Wandspannung führt zusätzlich durch ein Remodeling der Kardiomyozyten und extrazellulären Matrix zu einer weiteren Beeinträchtigung der Herzfunktion. In der GISSI-HF Studie war die Dilatation des linken Ventrikels in ungefähr einem Drittel der Patienten die Ursache der Herzinsuffizienz (37). Die Verabreichung von 1g Omacor[®]/Tag führte zu einer statistisch signifikanten Lebensverlängerung und Reduktion der Hospitalisierung aufgrund kardiovaskulärer Ursachen (37). Ebenfalls führten ventrikuläre Arrhythmien bei den mit Omacor[®] behandelten Patienten seltener zur ersten Krankenhauseinweisung als bei den mit Placebo behandelten Patienten. Es bleibt jedoch ungeklärt, inwieweit die n-3 Fettsäurespiegel durch die ventrikuläre Dilatation beeinflusst wurden und ob ein ausreichend hoher Spiegel erreicht wurde (91).

Die Veränderungen in Lipiden und Lipidmediatoren während der Progression der Herzinsuffizienz sind bisher wenig verstanden. Insbesondere könnte der Spiegel hoch ungesättigter Fettsäuren verändert sein, wobei nicht nur EPA und DHA, sondern auch die n-6 Fettsäure Arachidonsäure betroffen sein könnte. Da von der Arachidonsäure ausgehend hochwirksame Prostanoid synthetisiert werden und da die Konzentration von Arachidonsäure mit der Prostanoidsynthese korreliert, wird beim Gesunden der Serumspiegel der Arachidonsäure trotz großer Variationen in der Ausgangsfettsäure Linolsäure eng kontrolliert (119). Arachidonsäure beeinflusst auch über eine Reihe von Mechanismen die elektrischen Eigenschaften des Herzmuskels (114). Auch könnte Prostazyklin Ionenkanäle beeinflussen (71). Da die Wirkung auf Ionenkanäle von der Zahl der Doppelbindungen abhängt, müssen vor allem Auswirkungen veränderter Spiegel von EPA und DHA betrachtet werden (126). Im Gegensatz zur Arachidonsäure ist jedoch viel weniger über die Biosynthese von EPA und DHA im Körper bekannt. Es stellt sich daher die Frage, wie der Serumspiegel von hoch ungesättigten Fettsäuren reguliert wird, vor allem ob die Progression der Herzinsuffizienz einen Einfluss hat.

Da in der vorliegenden Arbeit im Serum nicht nur Hauptfettsäuren erfasst, sondern ein komplettes Fettsäureprofil mit ca. 30 verschiedenen Fettsäuren erstellt werden sollte, wird im Folgenden auf die Nomenklatur, die Neusynthese und den Abbau von Fettsäuren eingegangen.

1.3 Fettsäuren

1.3.1 Struktur von Fettsäuren

Fettsäuren kommen im Körper entweder als unveresterte, d.h. freie Fettsäuren oder als Bestandteile von Acylglycerinen, Phosphoglycerinen, Sphingolipiden und Cholesterinestern vor. Der Begriff Fettsäure ist eine Bezeichnung für die Gruppe der Monocarbonsäuren, die aus einer Carboxylgruppe (-COOH) und einer variabel langen Kette aus Kohlenwasserstoffatomen bestehen und entsprechend ihrer Biosynthese aus Acetylresten meist geradzahlig sind. Aufgrund ihrer Kettenlänge lassen sie sich in kurzkettige (4 – 7 C-Atome), mittelkettige (8 – 12 C-Atome) und langkettige (> 12 C-Atome) Fettsäuren, zudem aufgrund des Vorhandenseins von Doppelbindungen in gesättigte und ungesättigte Fettsäuren einteilen (Tabelle 1). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren besitzen mindestens zwei Doppelbindungen. Die Positionsnummer und damit die Einteilung der Doppelbindungen können entweder ausgehend vom Carboxylende mit Hilfe des Kürzels „delta“ (Δ) oder ausgehend vom Methylende mit Hilfe des griechischen Buchstabens „omega“ oder „n“ angegeben werden. Zum Beispiel bedeutet das Kürzel 22:6n-3, dass die Fettsäure eine Kohlenstofflänge von 22 C-Atomen und 6 Doppelbindungen besitzt, wobei sich die erste Doppelbindung an der Positionsnummer 3 ab dem Methylende befindet. Andererseits bezeichnet der Begriff delta3 eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 3 und 4 ab der Carboxylgruppe. Bei Doppelbindungen kann eine cis- oder eine trans-Isomerie auftreten. Als essentielle Fettsäuren bezeichnet man Fettsäuren, die der Mensch und Säugetiere nicht synthetisieren können. Aufgrund des Fehlens eines entsprechenden Enzyms sind alle Fettsäuren essentiell, die mindestens eine Doppelbindung vom 10. C-Atom ab der Carboxylgruppe besitzen. Beispielsweise gehört die n-6 Fettsäure Linolsäure bzw. Δ 9,12-Octadecadiensäure zu den essentiellen Fettsäuren, die durch Dehydrierung und Kettenverlängerung über mehrere Zwischenstufen zur Arachidonsäure übergeführt werden kann.

Wichtige Fettsäurederivate sind Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene, welche aus Arachidonsäure und EPA entstehen und aufgrund der 20 C-Atome auch als Eikosanoide bezeichnet werden. Während gesättigte Fettsäuren gegenüber oxidativem Stress, z.B. Sauerstoff, stabil sind, unterliegen ungesättigte und vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren leicht einer Autoxidation. Es entstehen zunächst allylische Hydroperoxide, die zu Radikalen zerfallen und sich zu stabilen leicht flüchtigen Verbindungen umlagern.

Tabelle 1. Nomenklatur von Fettsäuren. Die in der vorliegenden Arbeit im Serum bestimmten Fettsäuren sind in Fettschrift hervorgehoben.

Kürzel	Trivialname	Formel	Nomenklatur
Gesättigte Fettsäuren:			
4:0	Buttersäure	$C_4H_8O_2$	Butansäure
6:0	Capronsäure	$C_6H_{12}O_2$	Hexansäure
8:0	Caprylsäure	$C_8H_{16}O_2$	Octansäure
10:0	Caprinsäure	$C_{10}H_{20}O_2$	Decansäure
11:0	Undecansäure	$C_{11}H_{22}O_2$	Undecansäure
12:0	Laurinsäure	$C_{12}H_{24}O_2$	Dodecansäure
13:0	Tridecansäure	$C_{13}H_{26}O_2$	Tridecansäure
14:0	Myristinsäure	$C_{14}H_{28}O_2$	Tetradecansäure
15:0	Pentadecansäure	$C_{15}H_{30}O_2$	Pentadecansäure
16:0	Palmitinsäure	$C_{16}H_{32}O_2$	Hexadecansäure
17:0	Margarinsäure	$C_{17}H_{34}O_2$	Heptadecansäure
18:0	Stearinsäure	$C_{18}H_{36}O_2$	Octadecansäure
20:0	Arachinsäure	$C_{20}H_{40}O_2$	Eicosansäure
21:0	Heneicosansäure	$C_{21}H_{42}O_2$	Heneicosansäure
22:0	Behensäure	$C_{22}H_{44}O_2$	Docosansäure
23:0	Tricosansäure	$C_{23}H_{46}O_2$	Tricosansäure
24:0	Lignocerinsäure	$C_{24}H_{48}O_2$	Tetracosansäure
26:0	Cerotinsäure	$C_{26}H_{52}O_2$	Hexacosansäure
28:0	Montansäure	$C_{28}H_{56}O_2$	Octacosansäure
30:0	Melissinsäure	$C_{30}H_{60}O_2$	Triacosansäure

Einfach ungesättigte Fettsäuren:

11:1	11:1n-1c	Undecylensäure	$C_{11}H_{20}O_2$	Cis-delta10-Undecensäure
14:1	14:1n-5c	Myristoleinsäure	$C_{14}H_{26}O_2$	Cis-delta9-Tetradecensäure
15:1	15:1n-5c	Pentadecensäure	$C_{15}H_{28}O_2$	Cis-delta10-Pentadecensäure
16:1	16:1n-7c	Palmitoleinsäure	$C_{16}H_{30}O_2$	Cis-delta9-Hexadecensäure
17:1	17:1n-7c	Heptadecensäure	$C_{17}H_{32}O_2$	Cis-delta10-Heptadecensäure
18:1	18:1n-12	Petroselinensäure	$C_{18}H_{34}O_2$	Cis-delta6-Octadecensäure
18:1	18:1n-9c	Ölsäure	$C_{18}H_{34}O_2$	Cis-delta9-Octadecensäure
18:1	18:1n-9t	Elaidinsäure	$C_{18}H_{34}O_2$	Trans-delta9-Octadecensäure
18:1	18:1n-7c	Vaccensäure (cis)	$C_{18}H_{34}O_2$	Cis-delta11-Octadecensäure
18:1	18:1n-7t	Vaccensäure (trans)	$C_{18}H_{34}O_2$	Trans-delta11-Octadecensäure
20:1	20:1n-9c	Gadoleinsäure	$C_{20}H_{38}O_2$	Cis-delta11-Eicosaensäure
22:1	22:1n-11c	Cetoleinsäure	$C_{22}H_{42}O_2$	Cis-delta11-Docosaensäure
22:1	22:1n-9c	Erucasäure	$C_{22}H_{42}O_2$	Cis-delta13-Docosaensäure
24:1	24:1n-9c	Nervonsäure	$C_{24}H_{46}O_2$	Cis-delta15-Tetracosaensäure

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren:

18:2	18:2n-6c	Linolsäure	$C_{18}H_{32}O_2$	Cis-delta9,12-Octadecadiensäure
18:2	18:2n-6t	Linolelaidinsäure	$C_{18}H_{32}O_2$	Trans-delta9,12-Octadecadiensäure
18:2	18:2n-6t	Rumensäure	$C_{18}H_{32}O_2$	Delta9cis,12trans-Octadecadiensäure
18:3	18:3n-3c	α-Linolensäure	$C_{18}H_{30}O_2$	Cis-delta9,12,15-Octadecatriensäure
18:3	18:3n-6c	γ-Linolensäure	$C_{18}H_{30}O_2$	Cis-delta6,9,12-Octadecatriensäure
18:3	18:3n-6c	Calendulasäure	$C_{18}H_{30}O_2$	Cis-delta8,10,12-Octadecatriensäure
18:3	18:3n-5c	Punicinsäure	$C_{18}H_{30}O_2$	Cis-delta9,11,13-Octadecatriensäure
18:3	18:3n-5c	α -Eleostearinsäure	$C_{18}H_{30}O_2$	Cis-delta9,11,13-Octadecatriensäure
20:2	20:2n-6c	Eicosadiensäure	$C_{20}H_{36}O_2$	Cis-delta11,14-Eicosadiensäure
20:3	20:3n-3c	Eicosatriensäure	$C_{20}H_{34}O_2$	Cis-delta11,14,17-Eicosatriensäure
20:3	20:3n-6c	Dihomo-γ-linolensäure	$C_{20}H_{34}O_2$	Cis-delta8,11,14-Eicosatriensäure

20:3	20:3n-9c	Mead'sche Säure	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	Cis-delta5,8,11-Eicosatriensäure
20:4	20:4n-6c	Arachidonsäure	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Cis-delta5,8,11,14-Eicosatetraensäure
20:5	20:5n-3c	Eicosapentaensäure/ Timnodonsäure	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	Cis-delta5,8,11,14,17- Eicosapentaensäure
22:2	22:2n-6c	Docosadiensäure	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	Cis-delta13,16-Docosadiensäure
22:5	22:5n-3c	Clupanodonsäure	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	Cis-delta7,10,13,16,19- Docosapentaensäure
22:6	22:6n-3c	Docosahexaensäure/ Cervonsäure	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	Cis-delta4,7,10,13,16,19- Docosahexaensäure

1.3.2 Fettsäurestoffwechsel

Da in der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft wird, dass in der Progression der dilatativen Herzinsuffizienz sich das Fettsäureprofil im Serum ändert, wird der Stoffwechsel von Fettsäuren unter dem Gesichtspunkt neuroendokriner Einflüsse dargestellt. In der Progression der Herzinsuffizienz kommt es im Herzen zu einer Verarmung an energiereichen Substraten („an engine out of fuel“) (74) verbunden mit einem gesteigerten Sympathikotonus und einer Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie.

1.3.2.1 Biosynthese gesättigter Fettsäuren

Die Fettsäurebiosynthese wird vor allem an der Acetyl-CoA-Carboxylase und der Fettsäuresynthase reguliert (Abbildung 2). Insulin zusammen mit Glucose ist ein starker Induktor der Fettsäuresynthase. Dies erklärt die starke Zunahme der Fettsäurebiosynthese bei kohlenhydratreicher Ernährung. Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Hormone wie z.B. Katecholamine oder Glucagon, die zu einer Steigerung der cAMP-Konzentration führen, hemmen die Fettsäuresynthase. Die Rate der Fettsäuresynthase wird vor allem von Malonyl-CoA bestimmt, das aus Acetyl-CoA von der Acetyl-CoA Carboxylase gebildet wird. Ein Teil des Acetyl-CoA entsteht durch eine mitochondriale, dehydrierende Decarboxylierung von Pyruvat, welches das Endprodukt der Glykolyse unter anaeroben Bedingungen ist. Da Acetyl-CoA die innere Mitochondrienmembran nicht passieren kann, wird eine Reaktion mit Oxalacetat zu Citrat notwendig, welche im Cytosol wieder rückgängig gemacht wird.

Ein Energiemangel als Folge einer chronischen Ischämie und ein damit verbundener Anstieg von AMP führt zu einer Hemmung der Fettsäuresynthase (31). Die AMP-abhängige Kinase führt zu einer Phosphorylierung und Hemmung der Acetyl-CoA Carboxylase. Ein gesteigerter Sympathikotonus führt ebenfalls über cAMP Einfluss zu einer verstärkten Phosphorylierung der Acetyl-CoA Carboxylase. In einem anabolen Zustand wird dagegen über Insulin die Acetyl-CoA Carboxylase stimuliert und die Aktivität der Fettsäuresynthase gesteigert. Die Lipogenese wird auch dadurch erhöht, dass Insulin die Glucoseaufnahme und die Glycolyse fördert und die Pyruvat-Dehydrogenase von der inaktiven in die aktive Form überführt. Kommt es

als Folge einer Ischämie zu einem Abfall von Malonyl-CoA und damit einer stark gesteigerten Fettsäureoxidation, kann pharmakologisch über eine Hemmung der Malonyl-CoA Decarboxylase der Malonyl-CoA Spiegel gesteigert werden und die kardialen Folgen einer Ischämie/Reperfusion teilweise verringert werden (118).

Die Fettsäuresynthese erfolgt im Cytosol in einem Multienzymkomplex, der Fettsäuresynthase. An das erste Molekül Acetyl-CoA werden sukzessiv Bruchstücke aus zwei Kohlenwasserstoffatomen abstammend vom Malonyl-CoA angehängt. Die nachfolgenden Reaktionen dienen der Verlängerung der Kohlenstoffkette. Vereinfacht dargestellt, kommt es zur Bindung des Malonylrestes von Malonyl-CoA an die Acyl-Carrier-Protein-Domäne der Fettsäuresynthase und Kondensation mit dem Acetyl- bzw. Acylrest. Es erfolgt eine Decarboxylierung, eine Reduktion, eine Dehydratisierung und anschließend eine weitere Reduktion, die den ungesättigten in einen gesättigten Acylrest umwandelt. Der Zyklus beginnt erneut und wiederholt sich bis der Acylrest eine Länge von 16–18 C-Atomen beträgt und durch die Thioesterase-Domäne abgespalten wird (57). Es gibt eine enge Beziehung zwischen Fettsäuresynthese und dem Pentosephosphatweg, der $\text{NADPH}+\text{H}^+$ für die Fettsäuresynthese liefert. Zum jetzigen Zeitpunkt wird die pharmakologische Hemmung der Fettsäuresynthase (49; 61) vor allem in der Tumorthherapie untersucht, könnte aber auch bei pathophysiologischen Zuständen mit gesteigerter Fettsäuresynthese wie Diabetes mellitus und Steatose der Leber von Bedeutung sein. So wurde im Tierversuch gezeigt, dass die Hemmung der Fettsäuresynthase zu einer verminderten Lipogenese der Leber, einer reduzierten Fettsäureoxidation und verbesserten Insulinsensitivität führt (125).

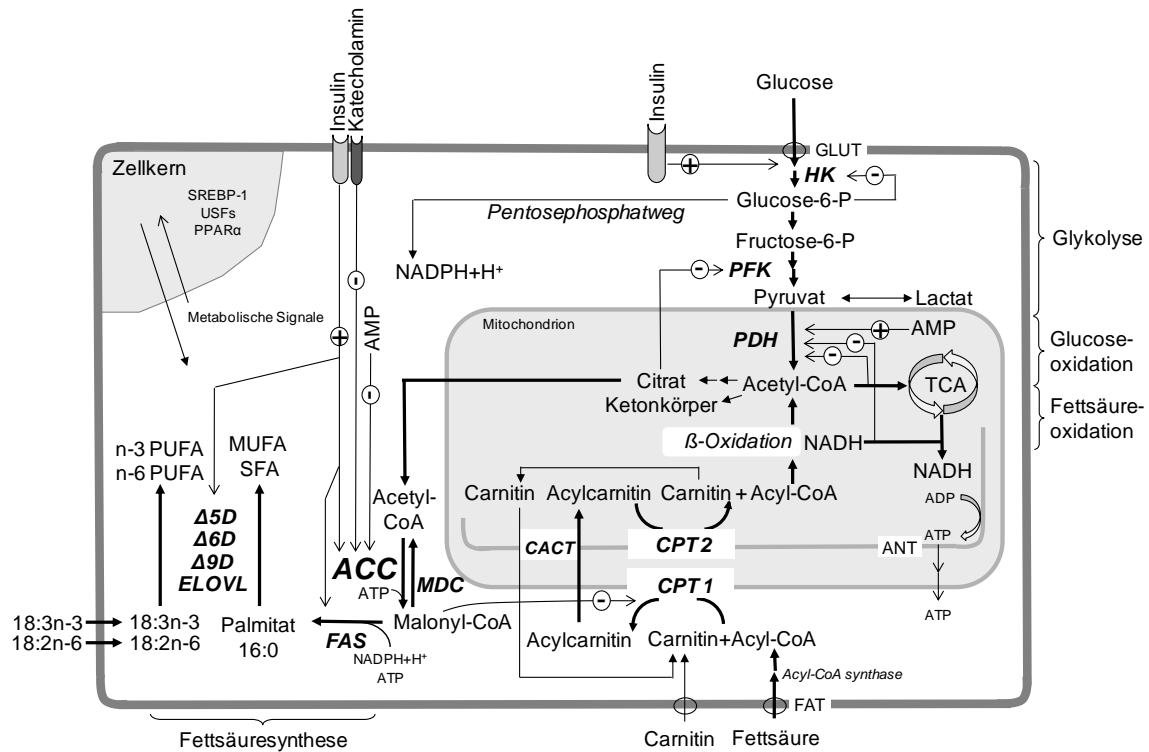


Abbildung 2. Wechselwirkungen zwischen Fettsäure- und Glukosestoffwechsel unter Berücksichtigung von möglichen Auswirkungen einer Herzinsuffizienz (Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, gesteigerter Sympathikotonus, Energiemangel im Herzen). Eine gesteigerte Fettsäureoxidation führt zu einer reduzierten Glukoseoxidation (Randle-Zyklus, Glukose-Fettsäurezyklus), die durch eine Insulinresistenz verstärkt wird. Nur schematisch dargestellt sind metabolische Einflüsse auf die Genexpression (94; 128).

Abkürzungen: GLUT, Glukosetransporter; HK, Hexokinase; PFK, Phosphofruktokinase; PDH, Pyruvatdehydrogenase; FAT, Fettsäuretransporter; CPT, Carnitin-Palmitoyltransferase; CACT, Carnitin/Acylcarnitin-Translokase; TCA, Citratcyclus; ANT, Adenin-Nukleotid-Translokase; FAS, Fettsäuresynthese; ACC, Acetyl-CoA-Carboxylase; MDC, Malonyl-CoA Decarboxylase; $\Delta 5D$, $\Delta 5$ -Desaturase; $\Delta 6D$, $\Delta 6$ -Desaturase; $\Delta 9D$, $\Delta 9$ -Desaturase; ELOVL, elongation of very long chain fatty acids; SREBPs, sterol regulatory element-binding proteins; USFs, upstream stimulatory factors.

1.3.2.2 Biosynthese ungesättigter Fettsäuren

Ungesättigte Fettsäuren sind für den unterschiedlichen Schmelzpunkt von Triacylglyceriden, die Membranfluidität und als Vorläufer für wichtige Signalmoleküle verantwortlich. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren entstehen durch Kettenverlängerung und Desaturierung.

Für die Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren werden Desaturasen benötigt (Abbildung 2 und 3). In tierischen und menschlichen Zellen können lediglich Palmitolein- und Ölsäure gebildet werden, Linol- und Linolensäure als Ausgangsfettsäuren von n-6 (Arachidonsäure) und n-3 (EPA und DHA) hochungesättigten Fettsäuren müssen mit der Nahrung zugeführt werden. Ein erhöhtes Vorkommen der Mead'schen Säure (20:3n-9) kann ein Zeichen eines Mangels an essentiellen Fettsäuren sein (104).

Desaturasen sind Enzymkomplexe, die an das endoplasmatische Retikulum gebunden sind und aus einer NADPH/H⁺-Cytochrom b5-Reduktase, Cytochrom b5 und der eigentlichen Desaturase bestehen. Hierbei kann eine Doppelbindung gebildet werden. In tierischen und menschlichen Zellen kommen jedoch nur $\Delta 9$, $\Delta 6$ und $\Delta 5$ -Desaturasen vor. Diese Desaturasen können nur Doppelbindungen erzeugen, die nicht weiter als 10 C-Atome von der Carboxylgruppe entfernt sind.

$\Delta 9$ -Desaturasen: An den Substraten Palmityl- und vor allem Stearyl-CoA wird durch die so genannten Stearyl-CoA-Desaturasen eine Doppelbindung am C-Atom 9 eingebunden, so dass als Reaktionsprodukte Palmitoleyl-CoA bzw. Oleyl-CoA entstehen. Es gibt vier Isoformen der $\Delta 9$ -Desaturasen, die sich durch unterschiedliche Organverteilungen auszeichnen (101). Ein in der Leber wirksamer Hemmer der Stearyl-CoA-Desaturase hat eine antidiabetische und antidyslipidämische Wirkung (78).

$\Delta 6$ und $\Delta 5$ -Desaturasen: An die bevorzugten Substrate Linoleyl-CoA bzw. Linolenyl-CoA, werden an den C-Atomen 6 bzw. 5 weitere Doppelbindungen eingebaut. Zunächst wird in das Linoleyl-CoA durch die $\Delta 6$ -Desaturase eine neue Doppelbindung eingeführt. Es entsteht $\Delta 6,9,12$ -Octadecatrienoyl-CoA (18:3n-6), welches anschließend um zwei C-Atome zum $\Delta 8,11,14$ -Eikosatrienoyl-CoA (20:3n-6) verlängert wird. Dieser Mechanismus mit Malonyl-CoA als Substrat ähnelt der Fettsäuresynthese, jedoch mit dem Unterschied, dass dieser im endoplasmatischen Retikulum stattfindet und die Substrate als Thioester mit Coenzym A vorliegen. Durch die $\Delta 5$ -Desaturase kann eine weitere Doppelbindung eingefügt werden, wodurch das $\Delta 5,8,11,14$ -Eikosatetraenoyl-CoA, das Arachidonyl-CoA (20:4n-6), gebildet wird. Während EPA (20:5n-3) in geringer Menge ebenfalls durch die $\Delta 6$ und $\Delta 5$ -Desaturase synthetisiert werden kann, erfordert die Synthese von DHA (22:6n-3) nach einer Elongation von 20:5n-3 zu 22:5n-3 und 24:5n-3 eine Desaturierung zu 24:6n-3 gefolgt von einer peroxisomalen β -Oxidation zu 22:6n-3. Eine direkte Konversion von 22:5n-3 durch eine $\Delta 4$ -Desaturase findet nicht statt (121).

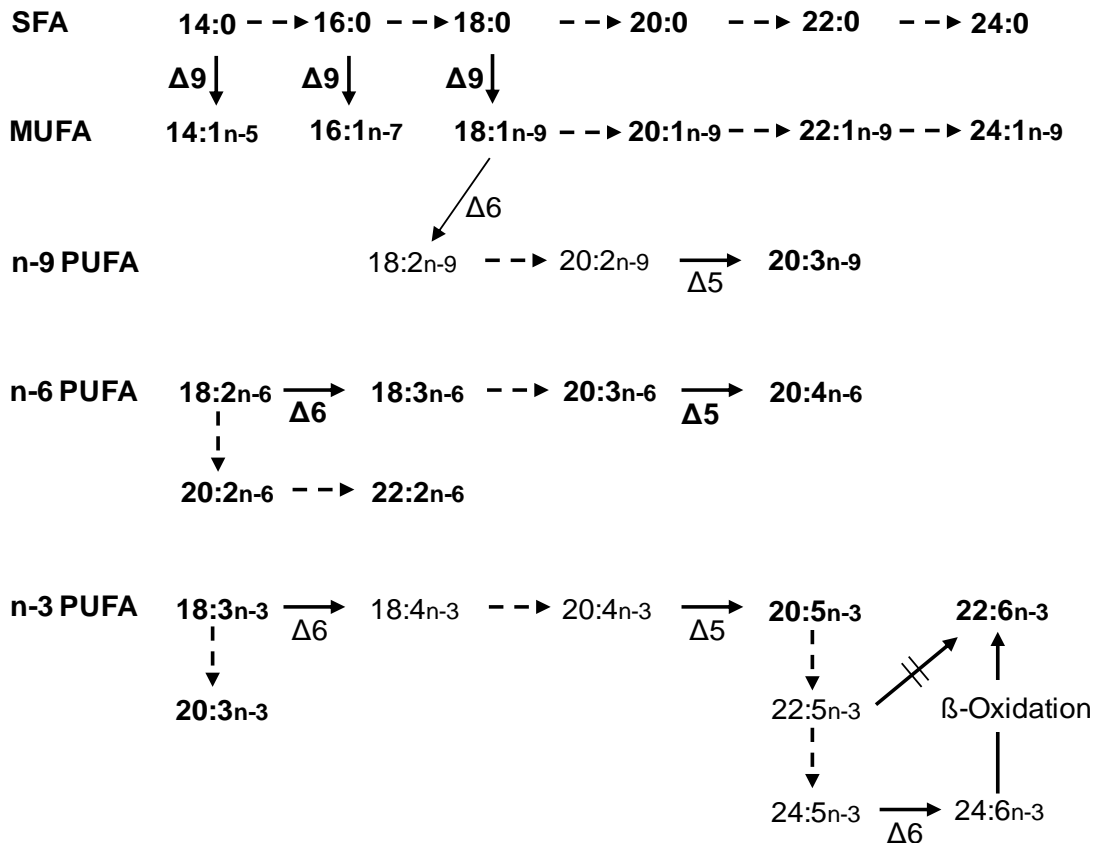


Abbildung 3. Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit bestimmten Fettsäuren (in Fettschrift). Die durchgehenden Pfeile markieren die Bildung einer Doppelbindung durch Desaturasen und unterbrochene Pfeile eine Kettenverlängerung durch Elongasen (123).

1.3.2.3 Fettsäureabbau

Die Speicherung der Fettsäuren erfolgt im Körper als Triglyzeride. Eine Lipolyse in freie Fettsäuren erfolgt unter anderem durch die Hormone Adrenalin, Noradrenalin, Glucagon und ACTH. Freie Fettsäuren werden unter ATP-Verbrauch an Coenzym-A gebunden. Zur Energiegewinnung werden Fettsäuren in der mitochondrialen β -Oxidation abgebaut (Abbildung 2). Da langkettige Fettsäuren die Mitochondrienmembran nicht durchdringen können, müssen sie zunächst durch die Carnitin-Palmitoyltransferase-1 der äußeren Mitochondrienmembran in einen Carnitinester umgewandelt werden (56). Dieses für den Fettsäureabbau geschwindigkeitsbestimmende Enzym wird durch mehrere Mechanismen reguliert: Malonyl-CoA ist ein physiologischer Hemmer, der verhindert, dass gleichzeitig die Fettsäuresynthese über Malonyl-CoA stimuliert wird und Fettsäuren in die Mitochondrien für die β -Oxidation aufgenommen werden. Hohe Spiegel von Malonyl-CoA treten dementsprechend bei gesteigerter

Fettsäurebiosynthese auf. Langkettige Fettsäuren steigern hingegen die Expression der Carnitin-Palmitoyltransferase-1. Hierfür ist auch der Transkriptionsfaktor PPAR α verantwortlich, der durch Fibrate aktiviert werden kann. Schilddrüsenhormone induzieren ebenfalls die Expression der Carnitin-Palmitoyltransferase-1, um den erhöhten Energiebedarf durch Steigerung der β -Oxidation decken zu können.

Eine pharmakologische Hemmung der Carnitin-Palmitoyltransferase-1 durch Etomoxir oder Perhexilin führt zu einer gesteigerten Glucoseoxidation und bewirkt nicht nur im Ischämie/Reperusionsmodell sondern auch bei einer chronischen Druckbelastung des Herzens eine Verbesserung der Herzfunktion (116). Auch könnte ein Teil der Funktionsverbesserung durch β -Blocker auf eine Hemmung der Carnitin-Palmitoyltransferase-1 beruhen (81). Zusätzlich zu Carnitin-Palmitoyltransferase-1 hemmt Etomoxir die Acetyl-CoA Carboxylase und wirkt als schwacher PPAR α Agonist.

An der inneren Mitochondrienmembran wird der Acylrest durch die Carnitin-Palmitoyltransferase-2 wieder auf Coenzym A übertragen. In der mitochondrialen Matrix findet die β -Oxidation der Fettsäuren zu Acetyl-CoA statt, welches in den Citratzyklus eingeschleust wird. Bei stark gesteigerter β -Oxidation entstehen in der Leber aus Acetyl-CoA Ketonkörper als wasserlösliche Derivate der Fettsäuren. Die β -Oxidation der Fettsäuren beginnt mit Acyl-CoA und läuft in vier Einzelreaktionen ab. Zunächst wird durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase Acyl-CoA an den C-Atomen 2 und 3 dehydriert, wobei ein Δ^2 -trans-Enoyl-CoA entsteht. Anschließend entsteht durch die Enoyl-CoA-Hydratase ein L-3-Hydroxyacyl-CoA und durch die L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase ein 3-Ketoacyl-CoA. Im letzten Reaktionsschritt wird durch die 3-Ketoacyl-CoA-thiolase ein Molekül Acetyl-CoA vom 3-Ketoacyl-CoA abgespalten. Die Reaktionsprodukte der β -Oxidation sind ein Acetyl-CoA und ein um zwei C-Atome verkürztes Acyl-CoA, welches erneut durch die β -Oxidation bis zuletzt zu einem Acetyl-CoA gekürzt werden kann. Hemmer der 3-Ketoacyl-CoA-thiolase steigern die Glucoseoxidation und erhöhen die Ischämieschwelle bei Belastung (32). Für die am besten untersuchte Substanz Trimetazidine wurde für Patienten mit idiopathischer DCM gezeigt, dass die Insulinresistenz reduziert und die LVEF verbessert wird (117).

Bei Fettsäuren mit einer ungeraden Zahl von C-Atomen entsteht bei der β -Oxidation am Ende statt einem Acetyl-CoA ein aus drei C-Atomen bestehendes Acyl-CoA, das Propionyl-CoA. Dieses kann nach enzymatischem Umbau als Succinyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust werden. Die ungesättigten Fettsäuren werden durch die Enzyme der β -Oxidation soweit abgebaut, bis ein Δ^3 -cis- oder ein Δ^4 -cis-Enoyl-CoA entsteht. Da in ungesättigten Fettsäuren cis-Doppelbindungen vorliegen, muss die cis-Konfiguration zunächst in eine trans-Konfiguration umgewandelt werden. Das Δ^3 -cis-Enoyl-CoA wird durch eine Δ^3 -cis- Δ^2 -trans-Enoyl-CoA-Isomerase zu Δ^2 -trans-Enoyl-CoA isomerisiert. Hingegen wird das Δ^4 -cis-Enoyl-CoA zum Δ^2 -trans- Δ^4 -cis-Dienoyl-CoA oxidiert und in einer weiteren Reaktion zum Δ^3 -cis-Enoyl-CoA reduziert.

Durch die Isomerase entsteht das Δ^2 -trans-Enoyl-CoA, das durch die Enzyme der β -Oxidation weiter abgebaut werden kann.

Neben der mitochondrialen Fettsäureoxidation findet in den Peroxisomen eine weitere Verstoffwechslung der Fettsäuren statt. Da der größte Teil der Fettsäuren eine gerade Anzahl von C-Atomen aufweist, erfolgt der Abbau ebenfalls in Bruchstücken aus zwei C-Atomen. Prinzipiell ähneln die peroxisomalen Reaktionen denen der mitochondrialen β -Oxidation, allerdings ist nicht die Einschleusung von Acyl-CoA in die Peroxisomen Carnitin-abhängig, sondern der Auswärtstransport von Acyl-CoA Verbindungen (122). Die peroxisomale Acyl-CoA Oxidase katalysiert folgende Reaktion: $\text{Acyl-CoA} + \text{O}_2 \rightarrow \text{trans-}\Delta^2\text{-Enoyl-CoA} + \text{H}_2\text{O}_2$. Das entstehende H_2O_2 wird durch eine entsprechende peroxisomale Katalase eliminiert. Die peroxisomale Fettsäureoxidation ist an der Synthese von DHA beteiligt (29; 108; 109; 121; 122). Wenn es in der Progression der Herzinsuffizienz zu Veränderungen in der peroxisomalen Fettsäureoxidation kommt, könnte dies zu einem veränderten Verhältnis von EPA zu DHA führen. Gegensätzlich zur mitochondrialen β -Oxidation läuft die peroxisomale nur über zwei bis maximal fünf Zyklen und dient somit eher der Verkürzung langkettiger Fettsäuren als dem vollständigen Abbau zu Acetyl-CoA. Eine erhöhte diätetische Lipidzufuhr führt zu einer Vergrößerung der Peroxisomen, sowie zu einer vermehrten Biosynthese von Enzymen der peroxisomalen β -Oxidation.

1.4 Perikardzugang

DCM Patienten haben wegen der erhöhten Wandspannung ein gesteigertes Risiko von malignen Arrhythmien und plötzlichem Herztod. Es ist daher ein längerfristiges Ziel, den Herzbeutel dieser Patienten vor einem elektiven Eingriff für therapeutische Interventionen zu nutzen (68). In Frage kommt hier vor allem die intraperikardiale Verabreichung von Stammzellen (90) oder n-3 Fettsäuren (127). Bei elektiven Eingriffen könnten n-3 Fettsäuren in einer hohen Konzentration in den Herzbeutel eingebracht werden, die bei oraler Verabreichung nicht erreicht werden könnte.

Es wurde daher parallel zu den Bestimmungen der Fettsäuren im Serum von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz versucht, neuartige Instrumente für den Zugang in den normalen Herzbeutel zu entwickeln. Zum jetzigen Zeitpunkt gelingt der sichere Zugang mit einer Nadel nur, wenn eine ausreichende Separation von Perikard und Epikard als Folge eines chronischen Perikardergusses vorhanden ist. Im Folgenden wird zunächst der Stand der Technik hinsichtlich des Zugangs in den Herzbeutel bei Patienten mit Perikarderguss dargestellt. Die Kenntnis des Vorgehens bei einem chronischen Perikarderguss ist entscheidend für die Anforderungen, die an ein Instrument für den Zugang in einen Herzbeutel ohne oder mit nur geringem Perikarderguss gestellt werden.

1.4.1 Perikarderguss

Echokardiographisch kann die Separation des Perikards ab einem Erguss von 15 – 35 ml festgestellt werden, bei größeren Ergüssen kann sich das Herz als „swinging heart“ darstellen. Die Größe der Ergüsse wird eingeteilt in: 1. klein (echofreier Raum in der Diastole <10mm), 2. moderat (10-20mm), 3. groß (>20mm) oder 4. sehr groß (>20mm und Kompression des Herzens). Zur weiteren Diagnostik steht das CT und MRT zur Verfügung. Im Röntgen-Thorax bilden sich große Ergüsse als globale Kardiomegalie mit scharfen Grenzen ab („Bocksbeutelherz“). Auf lateralen Röntgendarstellungen kann die Perikardflüssigkeit als transparente Linie innerhalb des kardioperikardialen Schattens (Halo-Zeichen) zu sehen sein (69).

Ein Perikarderguss kann als transsudative, exsudative, eitrige oder hämorrhagische Form auftreten. Große Ergüsse kommen häufig bei neoplastischer, tuberkulöser, Cholesterinbedingter oder urämischer Perikarditis, einem Myxödem und Parasitosen vor. Sich langsam bildende Ergüsse bleiben lange asymptomatisch, währenddessen schnell zunehmende Ergüsse (vor allem hämorrhagisch, innerhalb von Minuten bis Stunden) sich rasch als Tamponade mit kardialer Kompression manifestieren können. Steigt der intraperikardiale Druck über 20 mmHg, kann es zu einer Asystolie kommen. Massive chronische Perikardergüsse sind selten (2% - 3,5% aller großen Ergüsse). Gekammerte Ergüsse kommen häufiger bei Narbenbildung z.B. postoperativ, posttraumatisch und bei postpurulenter Perikarditis vor.

Diagnostisch können sich elektrokardiographisch eine Niedervoltage, ST-Strecken-Veränderungen und Blockbilder zeigen. Patienten mit symptomatischen Perikardergüssen und lokaler Kompression können unter Dyspnoe, Heiserkeit, Schluckauf oder Übelkeit leiden. Bei Auftreten einer Tamponade kommt es zu einer raschen Beschwerdezunahme mit Angina pectoris, Tachypnoe, Dyspnoe bis hin zur Bewusstlosigkeit. Eine sich zunächst verschleiernde Tamponade kann sich erst mit den Zeichen ihrer Komplikationen (Nierenversagen, abdomineller Plethora, Schockleber und Mesenterialischämie) manifestieren. Bis zu einem Drittel der asymptomatischen Patienten mit großem chronischem Perikarderguss entwickeln eine unerwartete Tamponade.

1.4.2 Perikardpunktion

Die Perikardpunktion erfolgt am häufigsten, um einen hämodynamisch relevanten Perikarderguss unabhängig von seiner Ätiologie zu entlasten. Aufgrund häufig fehlender ätiologischer Diagnose können initial leichtere Perikarditisformen mit nur kleinem Erguss schwere Langzeitkonsequenzen zur Folge haben. Jedoch erfolgt die Perikardpunktion aufgrund der gefürchteten Komplikation der Myokardperforation oft erst im Stadium einer Herztamponade bei ca. 500 ml. Kleinere Ergüsse mit nur 100 ml werden nur in spezialisierten Zentren, wie im Marburger Herzzentrum, punktiert.

Therapeutisch ist die Perikardpunktion bei Ergüssen ohne hämodynamische Kompromittierung ab echokardiographisch >20 mm in der Diastole indiziert. Hämodynamisch relevante Ergüsse und die Herztamponade sind absolute Indikationen (Klasse I Indikation) (69). Darüber hinaus ist eine Perikardpunktion für diagnostische Zwecke bei ungeklärter Ursache (mit Flüssigkeits- und Gewebeanalysen, Perikardioskopie und epikardiale/perikardiale Biopsie mit PCR, Immunzytochemie und Immunhistochemie) anzustreben (Evidenzlevel B, Klasse IIa Indikation).

Die Aortendissektion ist eine absolute Kontraindikation. Relative Kontraindikationen stellen eine nicht korrigierte Koagulopathie, eine medikamentöse Antikoagulation, eine Thrombozytopenie $<50.000/\text{mm}^3$ und kleine, posteriore und gekammerte Ergüsse dar. Bei einer akuten, traumatischen Einblutung, einer purulenten Perikarditis und bei gekammerten Ergüssen scheint eine chirurgische Drainage geeigneter. Bei erfolglosen wiederholten Perikardpunktionen wird eine chirurgische Intervention empfohlen (69).

Die Perikardpunktion wird überwiegend unter Durchleuchtung in einem Herzkatheterlabor mit EKG-Monitoring durchgeführt. Ein direktes EKG-Monitoring der Punktionsnadel stellt jedoch alleinig keine adäquate Sicherungsmaßnahme dar. Eine simultane Rechtsherzangiographie kann die hämodynamische Verbesserung durch den drainierten Erguss nachweisen. Der subxyphoidale Zugang ist der in Deutschland am häufigsten genutzte, hierzu wird eine lange Nadel (Tuohy oder dünnwandige 18-Gauge) in Richtung der linken Schulter unter einem 30° Winkel zur Haut unter ständiger Aspiration gestochen. Diese Strecke liegt extrapleural und umgeht die Mammariaarterien und die perikardialen Arterien. Unter Durchleuchtung mit Halo-Phänomen im lateralen Blickwinkel kann durch das langsam injizierte Kontrastmittel die korrekte Lage dargestellt und ein weicher J-Führungsdraht eingeführt und nach Dilatation gegen einen Anschlusskatheter gewechselt werden. Anteriore Ergüsse >10 mm sind wesentlich einfacher zu punktieren als kleine, posterior lokalisierte Ergüsse. Der kürzeste Weg zur sonographischen Kontrolle stellt der 6./ 7. Intercostalraum in der anterioren Axillarlinie dar. Die Perikardioskopie mit Luft- statt Flüssigkeitsinsufflation ist geeigneter, um die Perikardoberfläche zu inspizieren und um mögliche epi-/perikardiale Biopsien sicher zu entnehmen. Die anschließende Histologie kann die Diagnose bei neoplastischer Perikarditis und Tuberkulose, ferner bei viraler Perikarditis durch die PCR oder die IgG-, IgM- und IgA- und Komplement Fixation ermöglichen (65).

Mögliche Komplikationen der Perikardpunktion sind die Verletzung und Perforation des Myokards und der Koronarien. Darüber hinaus können eine Luftembolie, Pneumothorax und Arrhythmien (vasovagale Bradykardie) auftreten. Echokardiographiestudien zeigten eine Rate von schweren Komplikationen von 1,3-1,6% (69). In einer großen Serie von perkutanen Perikardpunktionen unter Durchleuchtungskontrolle kam es in 0,9% zu kardialen Perforationen, in 0,6% zu schweren Arrhythmien, in 1,1% zu arteriellen Blutungen, in 0,6% zu einem Pneumothorax, in 0,3% zu einer Infektion und in 0,3% zu einer schweren vagalen Reaktion (69).

2 Zielstellung

Die Dilatation des Herzens geht mit einer schlechten Prognose einher. Die Ursachen sind weitgehend unbekannt und es gibt zum jetzigen Zeitpunkt keine spezifische Therapie, um die Progression aufzuhalten. Da als Folge einer Dilatation und damit einhergehender eingeschränkter Herzfunktion und veränderter neuroendokriner Aktivierung auch der Stoffwechsel beeinflusst wird, kann man Veränderungen im Profil von Fettsäuren im Serum annehmen.

Die Entwicklung eines Gaschromatographie-Verfahrens zur Bestimmung eines ausführlichen Fettsäureprofils in kleinen Blutvolumina (ca. 20 µl) von Patienten ist ein Hauptanliegen dieser Arbeit. Es soll das Serum von Patienten mit einer unterschiedlich stark ausgeprägten kardialen Dilatation untersucht werden. Die Frage wird gestellt, ob die insuffiziente und nicht insuffiziente Herzüberbelastung verschiedene Wirkungen auf den Stoffwechsel mehrfach ungesättigter, einfach ungesättigter und gesättigter Fettsäuren hat. Des Weiteren sollen die Einflüsse von geometrischen und funktionellen Parametern des Herzens untersucht werden. Die mögliche Assoziation des Ausmaßes der kardialen Dilatation mit einer Reduktion hoch ungesättigter Fettsäuren wird untersucht und die Hypothese aufgestellt, dass hoch ungesättigte Fettsäuren eine Risikostratifizierung einer kardialen Dilatation ermöglichen.

Weiterführend soll untersucht werden, ob bei einem Rattenmodell mit überbelastetem Herzen Veränderungen im Serumfettsäureprofil auftreten, die vergleichbar mit den Patientendaten sind.

Ebenso sollen Blutspiegel von EPA und DHA bei gesunden Freiwilligen untersucht werden. Bisher stehen lediglich Einbaudaten mit der Dosis von 4 und 8g Omacor[®]/Tag bei Patienten mit inflammatorischer IgA-Nephropathie und Hypertriglyzeridämie zur Verfügung. Um das Ausmaß von beobachteten n-3 Fettsäureveränderungen bei dilatativer Herzinsuffizienz abschätzen zu können, soll 1g Omacor[®]/Tag (840mg EPA und DHA Ethylester) verabreicht und Fettsäuren im Vollblut, Serum und Blutzellen bestimmt werden. Um Omacor[®] von Fischölen (Triglyzeride) unterscheiden zu können, sollen mit dem Gaschromatograph-Massenspektrometer oxidative Abbauprodukte von EPA und DHA nachgewiesen werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Voraussetzungen für einen risikoarmen Zugang in den Herzbeutel bei einer nur geringen Separation von Perikard und Epikard zu schaffen, der mit der seitherigen Methode einer Nadelpunktion als nicht sicher einzustufen ist. Zur Reduzierung von Arrhythmien und der Infarktgröße, wie im Infarkt-Schweinmodell von Xiao et al. (127) gezeigt, könnte DHA in den Herzbeutel appliziert werden.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Mikrobestimmung des Fettsäureprofils mit Gaschromatographie

3.1.1 Extraktion von Lipiden

Lipide können mit einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln extrahiert werden, die gebräuchlichste Methode von Folch et al. (30) erfordert eine Mischung aus Methanol und Chloroform. Die Extraktionsprozedur für 12 Proben und die Umesterung benötigen etwa 3,5 h und erfordern folgende Schritte:

1. Eine Stammlösung aus 10% butyliertem Hydroxytoluol in Methanol wird vorbereitet (kann im Kühlschrank gelagert werden).
2. 5 µl 10% butyliertem Hydroxytoluol werden zu 10 ml Methanol in einen Erlenmeyer Glaskolben pipettiert.
3. Eine Extraktionslösung entsprechend Folch et al. (30) wird durch Mischung von 1 ml Methanol/0,005% butyliertem Hydroxytoluol mit 2 ml Chloroform („Folchlösung“) hergestellt.
4. 290 µl „Folchlösung“ wird zu 200 µl Serum und 10 µl (0,033 mg) C17:0 Standard in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß hinzugefügt und geschüttelt. Im Falle von Vollblut wird ein Ultraschallbad mit Eiswasser für 5 min benutzt.
5. Anschließend erfolgt eine Extraktion in Eiswasser (45 min) unter Verwendung eines Schüttlers, anschließend eine Zentrifugation bei 4°C (15 min, 4000 Umdrehungen/min; Hettich Universal 30RF, Rotor 1412).
6. 200 µl vom Überstand werden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 40 µl einer 0,9% NaCl Lösung gemischt, 5 min geschüttelt und 15 min bei 4000 Umdrehungen/min und 4°C zentrifugiert.
7. Die untere Phase wird abpipettiert, wobei durch einen positiven Druck (leichtes „Blubbern“) verhindert wird, dass die obere Phase in die Pipettenspitze gelangt, wobei nicht mehr als 90% der unteren Phase entnommen werden.
8. Der Extrakt wird in einem Reaktionsgefäß mit einem gasdichten Teflon[®] ausgekleideten Schraubdeckel unter schwachem Stickstoffstrom konzentriert.

3.1.2 Umesterung der Triglyzeride mit Methanol

Eine häufig angewandte Methode, um Methyl ester aus Fettsäuren herzustellen, verwendet wasserfreies Methanol in Anwesenheit des Katalysators Bortrifluorid (14% BF₃, 86% Methanol) bei 60°C - 90°C. Es wurde jedoch berichtet, dass ein selektiver Verlust von mehrfach

ungesättigten Fettsäuren und Artefakt-Peaks auftreten können (34; 111), was auch in den hier beschriebenen Experimenten beobachtet wurde. Deshalb wurde eine Basen-katalysierte Umesterung verwendet, die eine nur schwache Erwärmung erfordert:

1. 0,2 M KOH wird in trockenem Methanol gelöst.
2. Der Rückstand (von obigem 8. Schritt) wird in 750 µl 1:1 Methanol:Toluol gelöst.
3. 750 µl 0,2 M KOH in Methanol wird hinzugefügt und gut geschüttelt.
4. Das Gefäß wird dicht verschraubt und für 15 min auf 35°C erhitzt.
5. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden 1,5 ml einer 4:1 Hexan:Chloroform Mischung hinzugefügt.
6. Durch Hinzufügen von 100 µl 1 M Essigsäure wird die Lösung neutralisiert und der pH-Wert durch Aufbringen kleiner Tropfen auf ein pH-Indikatorpapier kontrolliert.
7. 1,5 ml Quarz-destilliertes Wasser wird hinzugefügt und geschüttelt, bis die obere Phase klar wird.
8. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 2000 Umdrehungen/min für 5 min bei Raumtemperatur.
9. Die obere Phase wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und das Lösungsmittel unter schwachem Stickstoffstrom fast vollständig verdampft.
10. 1 µl der Probe wird in den Gaschromatographen eingespritzt.

3.1.3 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie als Verteilungschromatographie wird als Analysenmethode zur Auftrennung von Gemischen in einzelne chemische Komponenten verwendet. Dabei findet die Gaschromatographie nur bei Komponenten Anwendung, die gasförmig sind oder sich verdampfen lassen (Siedebereich bis ca. 400°C). Der Gaschromatograph besteht aus drei wesentlichen Teilen, dem Injektor, der Trennsäule im Ofen und dem Detektor. Die Probe wird in einem niedrig siedenden Lösungsmittel gelöst und durch ein Septum in den Injektor eingespritzt. Der Injektor wird auf 260°C beheizt, um eine möglichst rasche und vollständige Verdampfung der Probe zu erreichen. Die zu trennenden Fettsäuremethylester werden dann durch das Trägergas (Säulenvordruck bis zu 6 bar) in die Trennsäule transportiert, die sich in einem Ofen mit einer für die Auftrennung erforderlichen Temperatur befindet. In der vorliegenden Arbeit wurde Wasserstoff als Trägergas (mobile Phase) benutzt. Die Quarzglas-Säule (fused silica) ist innen mit einer stationären Phase von Polysiloxanen ausgekleidet. Die eingespritzten Fettsäuremethylester verweilen je nach Polarität unterschiedlich lange an der stationären Phase der Säule. Bei unpolaren Fettsäuren treten ausschließlich Van-der-Waals-Bindungen (Dispersionswechselwirkungen) auf, während bei polaren Substanzen auch polare Wechselwirkungen, z.B. Wasserstoffbrückenbindungen oder Donator-Akzeptor-Bindungen

auftreten können. Am Ende der Säule befindet sich ein Flammenionisationsdetektor, der ein elektronisches Signal erzeugt, wenn eine Substanz die Säule verlässt. Das elektronische Signal wird als Peak registriert und mit Hilfe einer Software integriert und ausgewertet. Die Auftrennung einer Probe dauert 50 min.

Für die Gaschromatographie wurde ein 8610C Gaschromatograph von SRI Instruments (Torrance, CA, USA) benutzt, ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor (Abbildung 4).

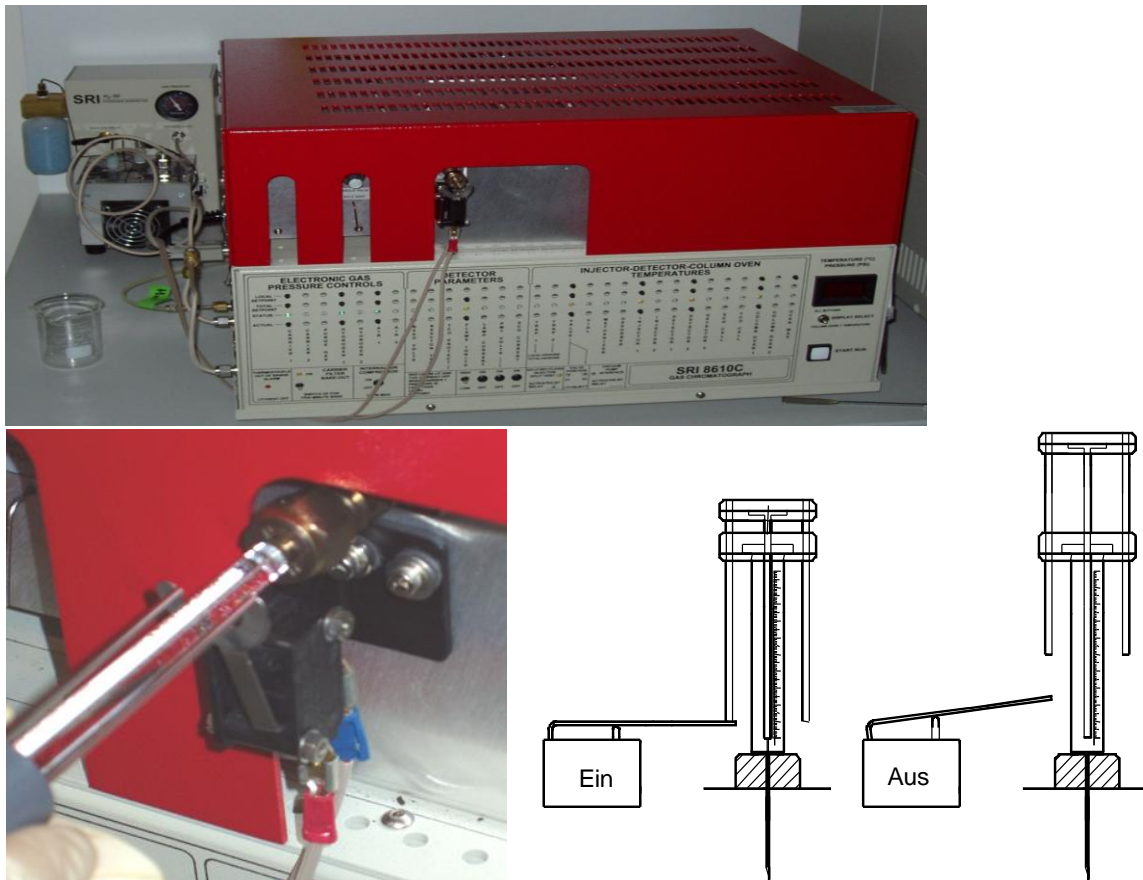


Abbildung 4. Gaschromatograph mit einem für die vorliegende Arbeit entwickelten Mikroschalter, der die Probeninjektion und den Registrierungsbeginn synchronisiert.

Aus Sicherheitsgründen wurde Wasserstoff mit einem H2-50XR Wasserstoff-Generator (50 ml/min, 30 psi/3 bar; SRI Instruments) kontinuierlich in kleiner Menge hergestellt. Für die Datenerfassung und Integration wurde das Peak Simple Chromatography Data System Modell 302 (SRI Instruments) verwendet. Methylester von Fettsäuren wurden auf der SP-2560 fused-silica Kapillarsäule (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm Filmdicke) von Supelco (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) aufgetrennt, für die ein Standard mit 37 Fettsäuremethylester (Supelco F.A.M.E. Mix

C4-C24, Nr. 18919-1AMP) erhältlich ist (Abbildung 5). Die Mead'sche Säure (C20:3n-9) wurde mit dem cis- Δ 5,8,11-Eicosatriensäuremethylester (Sigma-Aldrich, Nr. E6013) identifiziert. Die chromatographischen Bedingungen waren: Säulenofen, 140°C für 5 min, Erhöhung auf 240°C bei einer Rate von 4°C/min, Plateau bei 240°C für 20 min; Injektor 260°C, Detektor 260°C, Trägergas Wasserstoff 1 ml/min, Split 1:10, Brenngas Wasserstoff 30 ml/min, synthetische Luft 300 ml/min.

Um die Datenaufnahme mit der Probeninjektion zu synchronisieren, wurde eine Anordnung benutzt (gemeinsam entwickelt und gebaut mit Herrn E. Schüler, Technische Entwicklungsabteilung der Medizinischen Forschungseinheiten), die mit einem Mikroschalter auf der Vorderseite des Probeninjektionsanschlusses ausgerüstet war (Abbildung 4). Der Hebel des Schalters war U-förmig mit zwei Stahlstäben verbunden. Bei der Probeninjektion wurde der Kontakt des Mikroschalters geschlossen und die Datenerfassung gestartet.

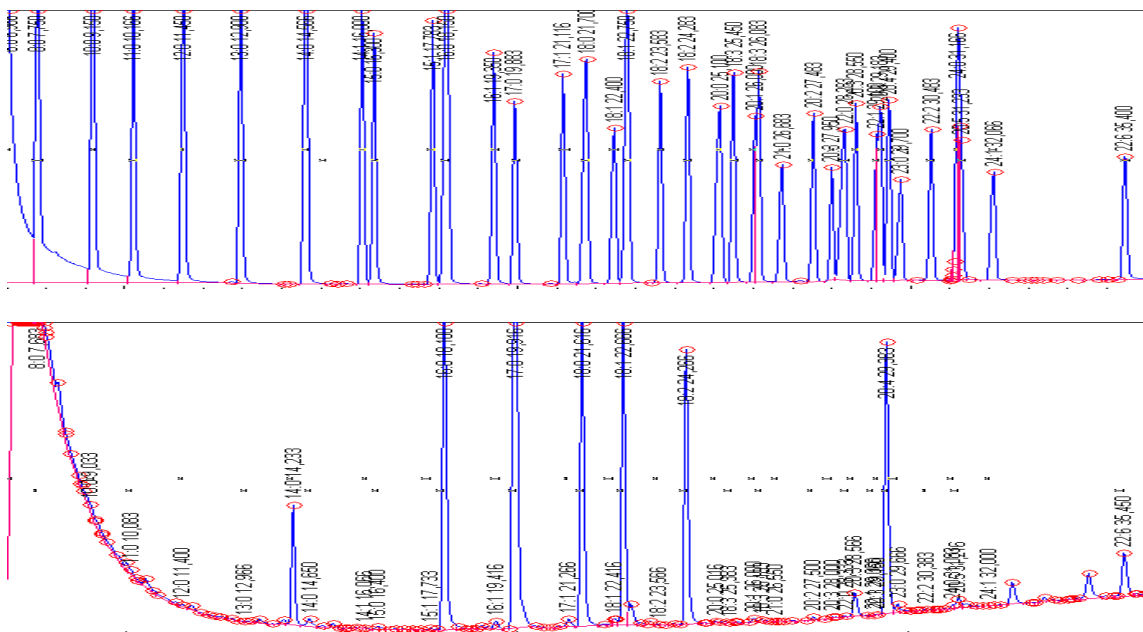


Abbildung 5. (Oben) Gaschromatogramm mit 37 Fettsäuren des Fettsäurestandards Supelco F.A.M.E. Mix C4-C24. Arachinsäure (C20:0), Arachidonsäure (C20:4n-6, cis-5,8,11,14), Behensäure (C22:0), Buttersäure (C4:0), Caprinsäure (C10:0), Capronsäure (C6:0), Caprylsäure (C8:0), Docosadiensäure (C22:2, cis-13,16), Docosahexaensäure (C22:6n-3, cis-4,7,10,13,16,19), Eicosadiensäure (C20:2n-6, cis-11,14), Eicosapentaensäure (C20:5n-3, cis-5,8,11,14,17), Eicosatriensäure (C20:3n-6, cis-8,11,14), Eicosatriensäure (C20:3n-3, cis-11,14,17), Eicosaensäure (C20:1, cis-11), Elaidinsäure (C18:1, trans-9), Erucasäure (C22:1, cis-13), Heneicosansäure (C21:0), Heptadecansäure (C17:0), Heptadecensäure (C17:1, cis-10), Laurinsäure (C12:0), Lignocerinsäure (C24:0), Linolsäure (C18:2n-6 cis-9,12), Linolelaidinsäure (C18:2, trans-9,12), γ -Linolensäure (C18:3n-6, cis-6,9,12), Linolensäure (C18:3n-3, cis-9,12,15),

Myristinsäure (C14:0), Myristoleinsäure (C14:1, cis-9), Nervonsäure (C24:1, cis-15), Ölsäure (C18:1n-9, cis-9), Palmitinsäure (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:1, cis-9), Pentadecansäure (C15:0), Pentadecansäure (C15:1, cis-10), Stearinsäure (C18:0), Tricosansäure (C23:0), Tridecansäure (C13:0), Undecansäure (C11:0). (Unten) Repräsentatives Fettsäureprofil von humanen Blutzellen.

3.1.4 Integration der Fettsäurepeaks

Die Flächen der Fettsäurekomponenten wurden basierend auf den folgenden Regeln berechnet (Abbildung 6):

1. Die Basislinie wird fortlaufend und so gerade wie möglich gezogen, wobei die kleinsten Peaks/Hebungen direkt auf der Basislinie lokalisiert sind bzw. sie ständig berühren. (Pfeil 1).
2. Falls die Basislinie keinen klaren horizontalen Verlauf nimmt, wird die Basislinie dem Verlauf der kleinsten Peaks/Hebungen folgend gezogen (Pfeil 2).
3. Im Falle von sich überschneidenden Peaks wird eine senkrechte lotfällende Linie von der Senke zur Basislinie gezeichnet (Pfeil 3). Die Basislinie wird nicht durch die Senkungspunkte gezogen.

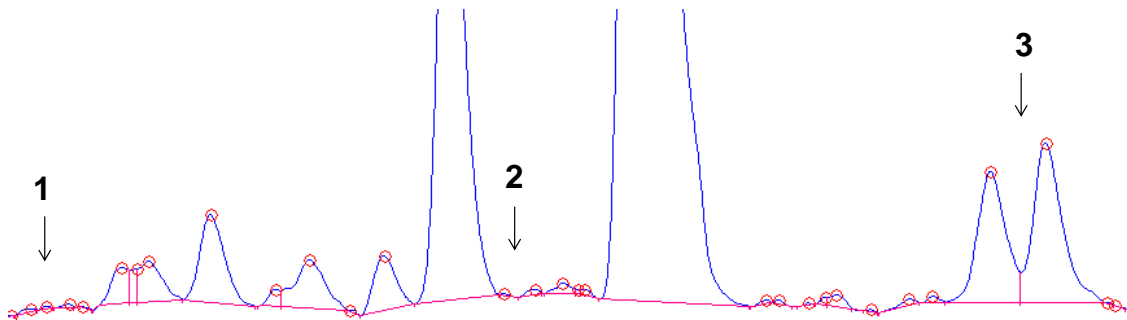


Abbildung 6. Auswertung einer exemplarischen Serumprobe mit Integration der entsprechenden Peaks mit Hilfe der aufgestellten Regeln (Peak Simple Chromatography Data System Modell 302, SRI Instruments).

Befolgt man diese Regeln, wird die Variabilität zwischen zwei auswertenden Personen sehr klein (Abbildung 7). Es sollte erwähnt werden, dass der eigentliche Prozentsatz der Fettsäuren durch die Anzahl der Fettsäuren bestimmt wird, die in die Analyse eingeschlossen werden.

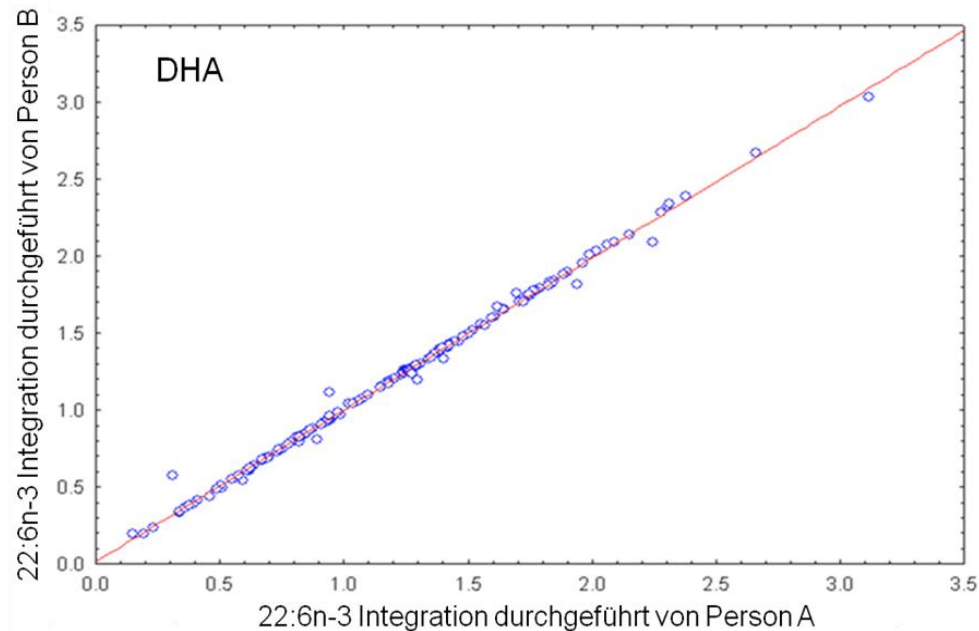


Abbildung 7. Variabilität der prozentualen Werte von DHA in Seren, die von zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet wurden.

3.2 Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz

Bei 308 Patienten mit Kardiomyopathie und Belastungsdyspnoe, typischen thorakalen Beschwerden, Auffälligkeiten im 12-Kanal-Elektrokardiogramm oder positiver Ergometrieuntersuchungen (10; 11) wurden in einer retrospektiven Analyse Serumfettsäuren bestimmt. Die Patienten erhielten eine medikamentöse Standardtherapie für Herzinsuffizienz. N-3 Fettsäurepräparate wurden nicht verabreicht. Zur Bestimmung der hämodynamischen Parameter wurden Links- und Rechtsherzkatheter durchgeführt und die intraventrikulären Drücke mit Hilfe eines Pigtail-Katheters bestimmt. Der Pulmonalarteriendruck und der mittlere Kapillarverschlussdruck wurden mit einem Swan-Ganz-Katheter gemessen.

3.2.1 Echokardiographie und Wandspannung

Die linksventrikulären Diameter (LVEDD, LVESD), die intraventrikuläre Septumwanddicke (IVSD, IVSS), die posteriore Wanddicke (LVPWD, LVPWS) jeweils bei Enddiastole und Endsystole und die LVEF wurden echokardiographisch im apikalen Vierkammer- und parasternalen Langachsenschnitt mittels B-mode bzw. M-mode-Technik ermittelt. Die Parameter wurden zur Körperoberfläche mit der DuBois Gleichung normiert, angegeben mit „l“, z.B. LVEDVI, und mit $(W^{0.425} \times H^{0.725}) \times 0.007184$ (Gewicht W in kg, Körpergröße H in cm) berechnet. Die LV Masse (g) wurde mit der Penn-cube Gleichung von Devereux et al. (26) als $1,04 \times [(LVEDD + IVSD + LVPWD)^3 - LVEDD^3] - 13.6$ (Durchmesser in cm) bestimmt.

Die Wandspannung S (in kPa ausgedrückt) wurde mit den echokardiographischen Daten und dem linksventrikulären Druck als $Pr^2/(2tr+t^2)$ berechnet (9; 10); P beschreibt den intraventrikulären Druck, r den linksventrikulären Innenradius und t die Wanddicke. Um die enddiastolische und endsystolische LV Wandspannung bestimmen zu können, wurde LVEDP bzw. LVESP für P eingesetzt, die Hälfte von LVEDD bzw. LVESD für r und LVPWD bzw. LVPWS für t.

3.2.2 Zeitbereichsanalyse der Herzfrequenzvariabilität

Digitale Aufzeichnungen vom Langzeit-Elektrokardiogramm wurden in einer Teilmenge der Patienten (n=135) analysiert (6; 115). Bei der Zeitbereichsanalyse der Herzfrequenzvariabilität stehen Veränderungen des Abstandes aufeinander folgender Herzschläge bei normalem Sinusrhythmus im Vordergrund. Es wurden Schlag-zu-Schlag Intervalle (Normal-zu-Normal-Intervalle, NN-Intervalle) bestimmt und die Standardabweichung der NN-Intervalle (SDNN) berechnet. Darüber hinaus wurde der SDNN-Index (SDNN-I, Mittelwert der Standardabweichungen der NN-Intervalle aller 5 min Intervalle) und SDANN (Standardabweichung der Mittelwerte der NN-Intervalle aller 5 min Intervalle) bestimmt.

3.3 Bestimmung von Aldehyden in Fischölpräparaten mit Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Messung des Verhältnisses von Masse zu Ladung. Bei bekannter Ladung kann die Masse der Teilchen ermittelt werden. Allgemein besteht ein Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Bei dem verwendeten Ionenfallen MS sind die Ionenquelle und der Analysator eine Einheit.

Der hier benutzte Saturn 2200 GC/MS besteht aus einem CP-3800 Gaschromatograph mit gekoppeltem Varian Saturn 2200 Ionenfallen MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA,

USA), wobei der Gaschromatograph zur Auftrennung der zu untersuchenden Substanzen und die Massenspektrometrie zur Identifizierung der einzelnen Komponenten dient (Abbildung 8). Da eine Kapillarsäule (Varian VF-5ms 30mx25mm ID DF=0.25) mit nur geringem Trägergasfluss verwendet wurde, die das erforderliche Vakuum im MS nicht stört, konnten die beiden Geräte über eine beheizte Transferline direkt miteinander gekoppelt werden. Nach Einspritzung der Proben in die Kapillarsäule über den GC-Injektor gelangten die in der Säule aufgetrennten Moleküle über die Transferline in die Ionenfalle, wo sie ionisiert wurden. Bei der Ionisation einer Substanz fragmentiert diese in ein vorhersehbares Ionenmuster. Aus den Massenzahlen des Molpeaks und eventuell vorhandener Isotopenmustern kann auf die Strukturformel der zu untersuchenden Substanz geschlossen und mit Hilfe einer Massenspektrenbibliothek (z.B. NIST) verglichen werden. Die Ionisierung kann entweder durch eine Elektronenstoßionisation mit einer Energie von 50 - 80 eV oder eine chemische Ionisation erfolgen. Bei der EI werden die Moleküle der Einzelsubstanz stark, bei der CI nur schwach fragmentiert. Bei der EI wird durch den Zusammenstoß der Elektronen mit den Molekülen Energie übertragen und primäre positive Ionen erzeugt. Diese sind jedoch meist sehr instabil und zerfallen ganz oder teilweise zu kleineren geladenen Massenfragmenten. Bei der CI (z.B. Acetonitril) reagieren die aus dem Gas gebildeten Ionen mit dem Analyten. Der Fragmentierungsgrad ist geringer als bei der EI, sodass häufig ein Molpeak und charakteristische Addukte beobachtet werden. Über die Molmasse können vor allem Fettsäuren eindeutig identifiziert werden (72). Die Ionen werden durch einen Elektronenverstärker bzw. Sekundärelektronenvervielfacher detektiert, welcher ein zur Anzahl der Ionen proportionales Signal produziert.

Es sollten Omacor[®] (840 mg EPA+DHA Ethylester) und zwei handelsübliche Fischöle bezüglich ihres Gehaltes an flüchtigen Verbindungen (VOCs) mit der EI untersucht werden. Die chromatographischen Bedingungen waren: 35°C für 3 min, Erhöhung auf 70°C bei einer Rate von 3°C/min, Erhöhung auf 200°C bei einer Rate von 10°C/min, Erhöhung auf 260°C bei einer Rate von 20°C, Plateau bei 260°C für 1 min.

Für die Bestimmung von flüchtigen organischen Verbindungen, die bei der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren entstehen, wurde das Festphasenmikroextraktionsverfahren (SPME) und der Supelco Micro-Extraction Holder 57330-U (75µm Carboxen PDMS; Sigma-Aldrich) eingesetzt.

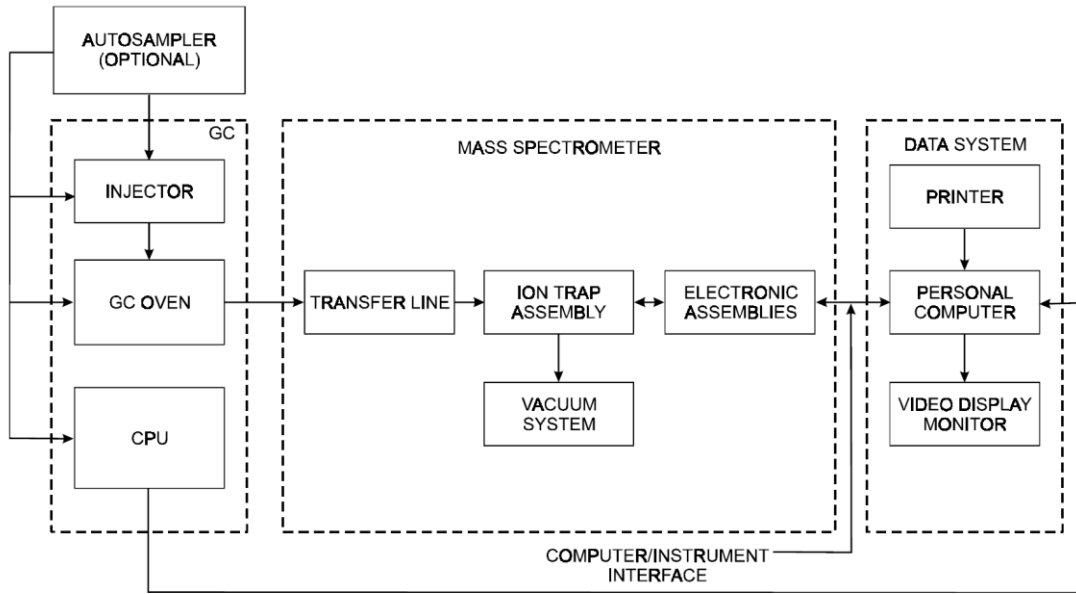


Abbildung 8. Schematischer Aufbau des Saturn 2200 GC/MS (aus Varian Hardware Manual, 03-914978-00:Rev.1).

3.4 Verabreichung von EPA+DHA Ethylestern an gesunde Probanden

Nach Verabreichung von Omacor® (840 mg EPA (46%) und DHA (38%) Ethylester; Solvay Pharma, Hannover; Abbildung 9) als Nahrungsergänzungsmittel an freiwillige, kardial nicht vorerkrankte Probanden wurden die Spiegel der Fettsäuren in Blut bestimmt, wobei ca. 20 µl Blut stets 18 h nach der Einnahme einer Kapsel abgenommen wurden.

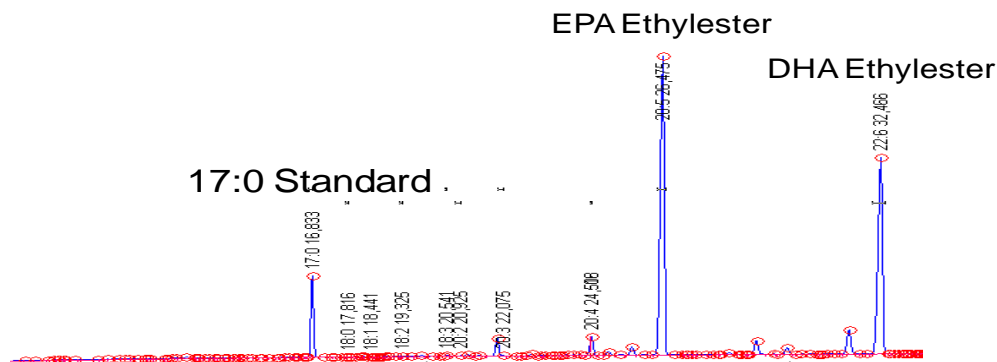


Abbildung 9. Ein repräsentatives Gaschromatogramm von Omacor®, das ohne Derivatisierung in den Gaschromatographen eingespritzt wurde.

In einem ersten Protokoll (9 Personen) wurden die Fettsäuren im Vollblut bestimmt, einmal vor der ersten Kapseleinnahme und 3, 7, 11, 15, 22 und 30 Tage nach täglicher Verabreichung und an Tag 3, 6, 9, 13 und 27 nach Beendigung der Einnahme (97). In einem zweiten Protokoll wurde zweimal mit jeweils 3 Personen und zwischenzeitlicher Pause von 5 Wochen Omacor[®] verabreicht. Die Bestimmung der Fettsäuren wurde in geronnenen Blutzellen und im Serum vorgenommen. Die Blutabnahme fand vor der ersten Verabreichung und an den Tagen 1, 3, 7, 11, 15, 16, 30, 43 nach täglicher Omacor[®]-Einnahme statt. Nach der 44. Einnahme wurde die Verabreichung beendet und anschließend an den Tagen 1, 3, 6, 9, 13, 30 Blut entnommen. Um auch zirkadiane Einflüsse zu untersuchen, wurde Blut auch 3, 6, 9, 18 und 24 Stunden nach der Kapseleinnahme am 1.Tag, 16.Tag und 44.Tag abgenommen. Es waren keine Unterschiede bei EPA und DHA in geronnenen Blutzellen und Vollblut erkennbar.

Vorgehensweise bei der Blutentnahme: Nach Desinfektion des Fingers mit Softasept N (B. Braun, Melsungen) wurde mit einer Stechhilfe Accu-Check Softclix (Roche Diagnostics, Mannheim) in eine Fingerspitze gestochen und ca. 20 µl des entstehenden Blutropfens mit einer Eppendorf-Pipette abpipettiert. Anschließend wurde die Probe in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 40 min auf Eis gestellt. Für die getrennte Untersuchung von Serum und Blutzellen wurde das Blut 20 min bei 5000 Umdrehungen/min und 10°C zentrifugiert. Die zentrifugierte Probe wies 2 getrennte Phasen (untere, Sediment; obere, Serum) auf. Die Proben wurden in einem -70°C Tiefkühlschrank gelagert. Alle Blutentnahmen und die Aufarbeitung wurden von mir durchgeführt.

3.5 Druckbelastung des Herzens bei der Ratte

Uninephrektomierte männliche Ratten (Charles River, Sulzfeld), denen subkutan ein Silikongummi mit Deoxycorticosteronacetat (DOCA; Sigma-Aldrich) mit einem Silikon : DOCA Verhältnis von 3 : 1 und einer Dosis von 1 mg DOCA/g Körpergewicht implantiert wurde (86) und die Trinkwasser mit 1% NaCl erhielten, wurden mit Kontrollratten verglichen (Tabelle 2). Die Kontrollratten bekamen Standardfutter und Leitungswasser. Einer weiteren Gruppe von DOCA-Salz Ratten wurde überkalorisches Futter mit 24% Kokosnussfett (47% der Kalorienaufnahme) und 32% Saccharose (26% der Kalorienaufnahme) verabreicht. Es wurde folgende Gruppeneinteilung vorgenommen: 10 Ratten mit DOCA-Salz Behandlung, 11 Ratten mit DOCA-Salz Behandlung und überkalorischer Fütterung, 8 Kontrollratten. Die Ratten wurden 12 Wochen nach Versuchsbeginn dekapitiert, die Organe rasch entfernt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Fettsäureaufarbeitung aus dem Serum, die Injektion in den Gaschromatographen und die Integration der Fettsäuren wurden von mir durchgeführt.

3.6 Statistische Auswertung

Die Patientendaten wurden von Prof. Dr. P. Alter aus der ORBIS Datenbank zur Verfügung gestellt und von mir nach Überführung in die Access (Microsoft) Datenbank in Statistica (StatSoft, Tulsa, OK, USA) übernommen, dort mit den Serumfettsäurespiegeln zusammengeführt und statistisch ausgewertet. Es wurden von mir alle verfügbaren Akten der 308 Patienten auf Langzeit-EKG Aufzeichnungen durchgesehen und bei 135 Patienten die Herzfrequenzvariabilitätsparameter in Access übertragen. Die Rohdaten des Gaschromatographen wurden getrennt von Frau D. Wagner (CTA) und mir integriert (siehe Abbildung 7), von mir gemittelt und zusammen mit den klinischen Daten statistisch ausgewertet.

Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde zur Überprüfung der Normalverteilung verwendet. Mit der Varianzanalyse (ANOVA) und dem Duncan's multiple range Test erfolgten multiple Vergleiche. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Alle Wahrscheinlichkeitswerte sind zweiseitig. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die Prüfung auf Gleichheit der Varianzen erfolgte mit dem Brown-Forsythe Test (73). Beim Zeitverlauf der Omacor[®] Verabreichung wurden die Repeated measures ANOVA und der Tukey-Kramer multiple comparison test verwendet (GraphPad InStat, San Diego, USA). Mit einer multiplen Regressionsanalyse wurde die Vorhersagewert von verschiedenen Serumfettsäuren für LVEDD beurteilt. Die Receiver operating characteristics Analyse wurde angewandt, um einen geeigneten Cut-off-Punkt für die Variablen zu bestimmen. Der Cut-off-Punkt wurde bei einem Wert von DHA mit der höchsten Genauigkeit festgelegt (minimal falsch negative und falsch positive Ergebnisse, entsprechend dem höchsten Durchschnitt von Sensitivität und Spezifität) (MedCalc, MedCalc Software, Mariakerke, Belgien). Eine 4-Felder-Tafel wurde benutzt, um die Sensitivität, Spezifität und den prädiktiven Wert von Serum DHA zum Ausschluss einer schweren linksventrikulären Dilatation zu berechnen.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz

4.1.1 Korrelationen von Serumfettsäuren

DHA war mit der Vorstufe EPA positiv korreliert ($r=0,48$, $p<0,001$), jedoch nicht mit 18:3n-3 (α -Linolensäure), der Ausgangsfettsäure der n-3 Familie (Abbildung 10). In der n-6 Fettsäurefamilie war Arachidonsäure mit der direkten Vorstufe 20:3n-6 korreliert ($r=0,42$, $p<0,001$) aber nur schwach mit der Ausgangsfettsäure 18:2n-6 ($r=0,18$, $p<0,001$). Große Unterschiede in EPA, DHA und Arachidonsäurespiegel können durch die Ausgangsfettsäuren daher nicht erklärt werden. Die mehrfach ungesättigten n-3 und n-6 Fettsäurefamilien werden aber durch gemeinsame Faktoren beeinflusst, wie aus der Korrelation ($r=0,53$, $p<0,001$) von DHA mit Arachidonsäure (Abbildung 11) gefolgert werden kann.

Die mehrfach ungesättigten n-3 und n-6 Fettsäuren korrelierten wiederum negativ mit einfach ungesättigten n-9 und n-7 Fettsäuren (Abbildung 11). DHA war negativ mit 16:1n-7 und 18:1n-9 korreliert ($r=-0,28$, $p<0,001$ bzw. $r=-0,42$, $p<0,001$). Ebenso war Arachidonsäure negativ mit 16:1n-7 und 18:1n-9 korreliert ($r=-0,38$, $p<0,001$ bzw. $r=-0,44$, $p<0,001$). Bezüglich der Einflüsse der Ausgangsfettsäuren einfach ungesättigter Fettsäuren war 16:1n-7 positiv mit 16:0 korreliert ($r=0,24$, $p<0,001$) und 18:1n-9 negativ mit 18:0 ($r=-0,63$, $p<0,001$). Es muss hierbei berücksichtigt werden, dass die Konzentration von 16:0 im Vergleich zu 18:0 höher war.

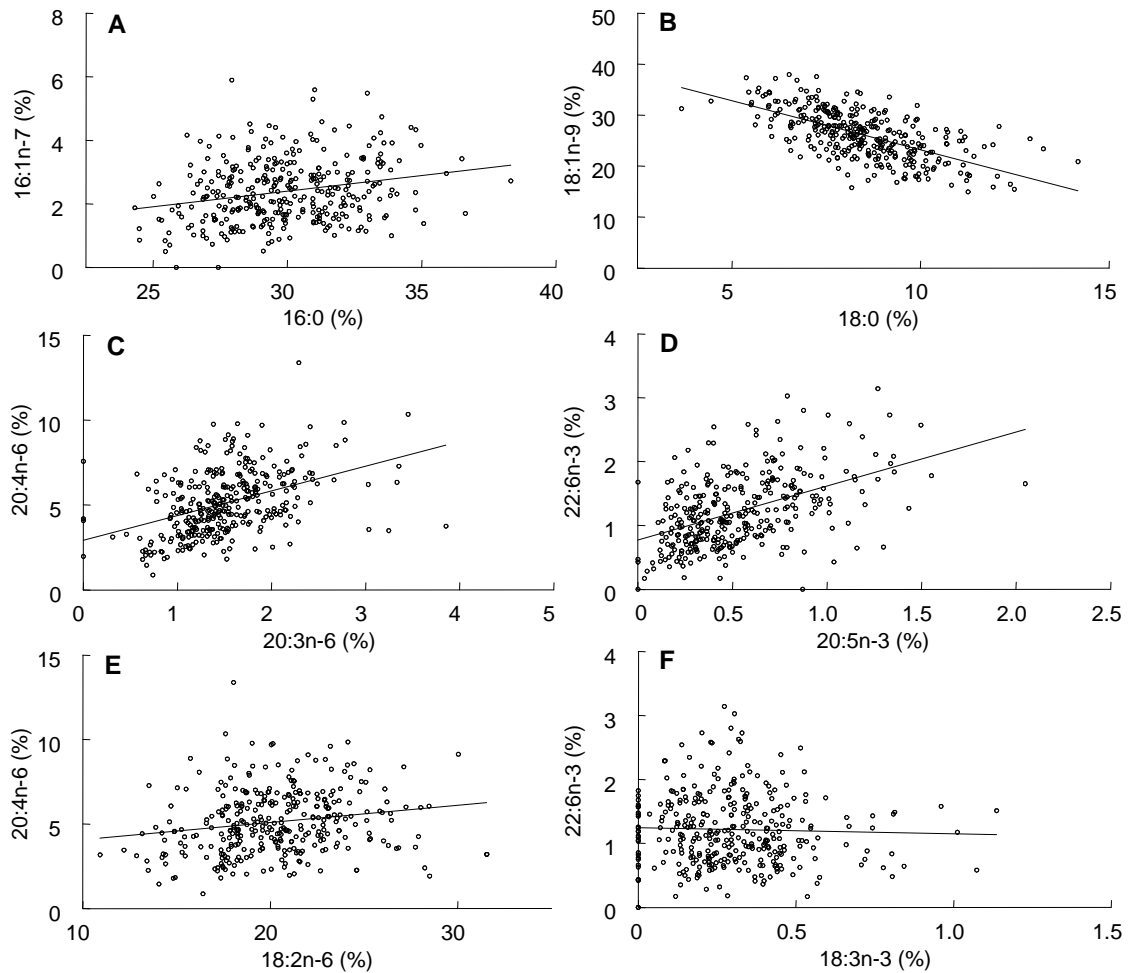


Abbildung 10. Produkt/Vorstufe Beziehungen von Serumfettsäuren (%) bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz. Korrelationen: (A) 16:0 mit 16:1n-7 ($y=-0,54+0,10x$; $r=0,24$; $p<0,001$), (B) 18:0 mit 18:1n-9 ($y=42,43-1,92x$; $r=-0,63$; $p<0,001$), (C) 20:3n-6 mit Arachidonsäure ($y=2,92+1,45x$; $r=0,42$; $p<0,001$), (D) EPA mit DHA ($y=0,77+0,85x$; $r=0,48$; $p<0,001$), (E) 18:2n-6 mit Arachidonsäure ($y=3,07+0,10x$; $r=0,18$; $p<0,001$), (F) 18:3n-3 mit DHA ($y=1,25-0,10x$; $r=-0,03$; ns).

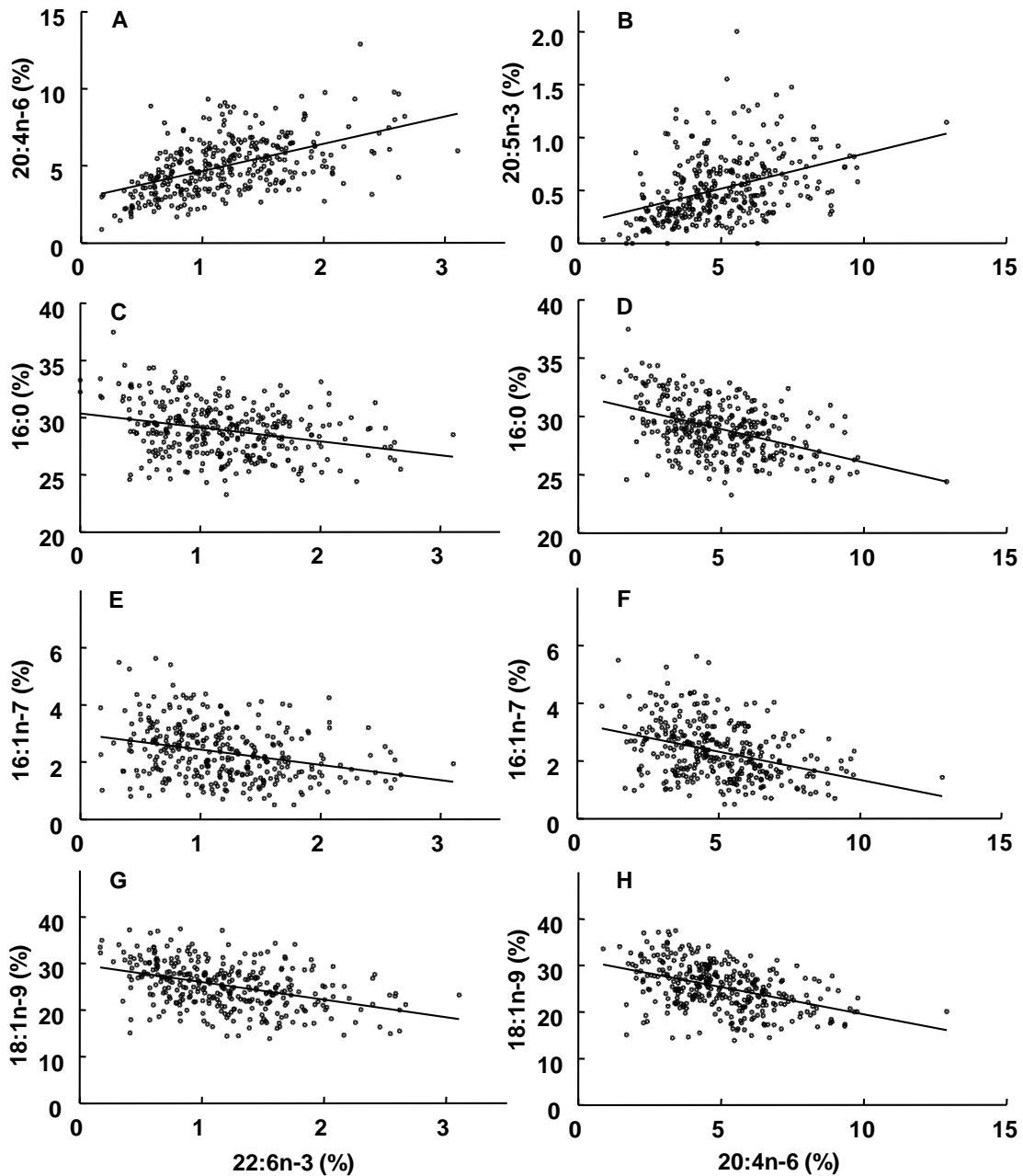


Abbildung 11. Korrelationen von Serumfettsäuren (%), die verschiedenen Fettsäurefamilien angehören, bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz. Korrelationen von DHA mit (A) Arachidonsäure ($y=2,86+1,78x$; $r=0,53$; $p<0,001$), (C) 16:0 ($y=30,38-1,22x$; $r=-0,21$; $p<0,001$), (E) 16:1n-7 ($y=2,92-0,51x$; $r=-0,28$; $p<0,001$) und (G) 18:1n-9 ($y=29,91-3,84x$; $r=-0,42$; $p<0,001$). Korrelationen von Arachidonsäure mit (B) EPA ($y=0,19+0,07x$; $r=0,40$; $p<0,001$), (D) 16:0 ($y=31,77-0,57x$; $r=-0,42$; $p=0,001$), (F) 16:1n-7 ($y=3,30-0,20x$; $r=-0,38$; $p<0,001$) und (H) 18:1n-9 ($y=31,19-1,17x$; $r=-0,44$; $p<0,001$).

4.1.2 Kategorisierung nach LVEDD

Um Einflüsse einer linksventrikulären Dilatation und eingeschränkten Pumpfunktion auf die Fettsäurespiegel beurteilen zu können, wurden die Patienten (Alter 48 ± 12 Jahre; NYHA Klassifikation $2,2 \pm 0,6$; LVEF $31 \pm 10\%$) zunächst nach Tertilen von LVEDD kategorisiert (untere 48-61mm; mittlere 61-68 mm; obere 68-90 mm) (92) (Tabelle 2).

DHA war bei einem LVEDD von 61-68 mm im Vergleich zu 48-61mm reduziert. Eine stärkere Dilatation (68-90 mm) führte zu einer weiteren Abnahme von DHA. EPA war bei einem LVEDD von 68-90 mm verglichen mit 61-68 mm reduziert. Ebenfalls waren mehrfach ungesättigte n-6 Fettsäuren und vor allem Arachidonsäure reduziert (LVEDD 68-90 mm verglichen mit 48-61 mm). Im Gegensatz dazu war 18:1n-9 erhöht (LVEDD 68-90 mm und 61-68 mm vs. 48-61 mm), während gesättigte Fettsäuren und trans-Fettsäuren nicht signifikant verändert waren.

Tabelle 2. Charakteristika und Serumfettsäuren (%) von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz kategorisiert nach Tertilen von LVEDD.

	Tertile 1 (T1) LVEDD = 48-61 mm n = 102	Tertile 2 (T2) LVEDD = 61-68 mm n = 103	Tertile 3 (T3) LVEDD = 68-90 mm n = 103	p Wert
Alter (Jahre)	49,8±11,7	48,5±11,2	46,5±12,7	ns
NYHA Klassifikation	2,2±0,6	2,2±0,7	2,4±0,6	T1 vs T3 <0,01 T2 vs T3 <0,01
LVEF (%)	37,0±8,3	33,1±8,5	23,8±8,8	T1 vs T3 <0,001 T1 vs T2 <0,01 T2 vs T3 <0,001
Gesättigte Fettsäuren gesamt	38,3±2,8	38,2±2,8	38,6±2,8	ns
16:0 (Palmitinsäure)	28,7±2,3	29,0±2,3	29,2±2,4	ns
18:0 (Stearinsäure)	8,4±1,4	8,1±1,4	8,1±1,5	ns
Einfach ungesättigte Fettsäuren gesamt	26,4±5,3	28,4±5,3	28,9±5,1	T1 vs T3 <0,001 T1 vs T2 <0,01
18:1n-9cis (Ölsäure)	23,9±4,8	25,6±4,7	26,1±4,8	T1 vs T3 <0,01 T1 vs T2 <0,05
n-6 mehrfach ungesättigte Fettsäuren gesamt	27,5±4,1	26,2±4,0	25,6±4,3	T1 vs T3 <0,01 T1 vs T2 <0,05
18:2n-6cis (Linolsäure)	20,4±3,2	19,4±3,1	19,3±3,3	T1 vs T3 <0,05 T1 vs T2 <0,05
20:4n-6 (Arachidonsäure)	5,2±1,9	5,0±1,6	4,6±1,8	T1 vs T3 <0,01
n-3 langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren gesamt	1,9±0,8	1,7±0,6	1,5±0,7	T1 vs T3 <0,001 T2 vs T3 <0,01
20:5n-3 (Eicosapentaensäure)	0,53±0,33	0,55±0,29	0,45±0,29	T2 vs T3 <0,05
22 :6n-3 (Docosahexaensäure)	1,34±0,57	1,19±0,48	1,01±0,52	T1 vs T3 <0,001 T1 vs T2 <0,05 T2 vs T3 <0,05
n-3 kurzkettige mehrfach ungesättigte Fettsäure				
18:3n-3 (α-Linolensäure)	0,25±0,17	0,30±0,19	0,29±0,18	ns
Ungesättigte trans-Fettsäuren gesamt	0,18±0,29	0,15±0,16	0,18±0,15	ns
18 :1n-9trans	0,12±0,13	0,12±0,12	0,16±0,12	ns
18 :2n-6trans	0,05±0,26	0,03±0,12	0,03±0,09	ns

Um die Frage zu klären, ob allein über das Fettsäureprofil Aussagen über die Herzfunktion gemacht werden können, wurden die Fettsäuren nach Tertilen stratifiziert. Nur bei DHA (Tabelle 3) wurden signifikante Einflüsse gefunden. In der unteren Tertile (0,01-0,88%) verglichen mit der oberen (1,38-3,11%) war LVEDD vergrößert und die LVEF reduziert. Auch war bereits bei einem Vergleich der mittleren mit der oberen Tertile LVEDD vergrößert. Im multiplen Regressionsmodell für LVEDD war DHA die einzige signifikante Variable (Regressionskoeffizient $\beta = -0,25$, $p < 0,001$).

Tabelle 3. Parameter der kardialen Pumpfunktion und linksventrikulärer Dilatation von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz kategorisiert nach Tertilen von Serum DHA.

	Tertile 1 (T1) DHA = 0,01-0,88%	Tertile 2 (T2) DHA = 0,89-1,37%	Tertile 3 (T3) DHA = 1,38-3,11%	p Wert
	0,63±0,19% n = 102	1,12±0,13% n = 103	1,78±0,36% n = 103	
NYHA Klassifikation	2,2±0,7	2,2±0,6	2,3±0,6	ns
LVEF (%)	29,1±9,9	32,0±10,7	32,9±9,3	T1 vs T3 <0,05 T1 vs T2 <0,05
LVEDD (mm)	67,4±7,5	65,5±7,9	63,2±6,8	T1 vs T3 <0,001 T2 vs T3 <0,05

Zur Überprüfung, ob sich ein Fettsäurespiegel diagnostisch für die Erkennung einer linksventrikulären Dilatation und eingeschränkten Pumpfunktion eignet, wurde eine ROC-Kurven-Analyse durchgeführt (Abbildung 12). Ziel des Testes sollte die Unterscheidungsmöglichkeit sein, ob eine schwere Erkrankung (schwere Dilatation oder schlechte LVEF) vorhanden oder nicht vorhanden ist. Die Güte des Tests wird durch die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) angegeben. Die beste ROC-Kurve ergab sich für LVEDD gegenüber DHA. Die Fläche für die schwere Dilatation (LVEDD > 70 mm) war 0,69 (Standardfehler 0,03, 95% Konfidenzintervall 0,64 – 0,74, $p=0,001$). Basierend auf der ROC-Kurve wurde der optimale Trennwert (Cut-off-Punkt) bei 1,24% DHA gesetzt, um eine schwere Dilatation erkennen zu können. Die Sensitivität war 84%, die Spezifität 48%. Basierend auf einer Prävalenz von 22% der schweren Dilatation in dem hier vorliegenden Patientenkollektiv war der negativ prädiktive Wert für die schwere Dilatation 91% und der positiv prädiktive Wert 31%. Für die anderen Fettsäuren waren die Flächen unter der ROC-Kurve kleiner (Arachidonsäure $\leq 3,96\%$ Cut-off-Punkt, 0,63 AUC; EPA $\leq 0,31\%$ Cut-off-Punkt, 0,58 AUC; Ölsäure > 27,0% Cut-off-Punkt, 0,57 AUC; Linolsäure $\leq 17,4\%$ Cut-off-Punkt, 0,55 AUC).

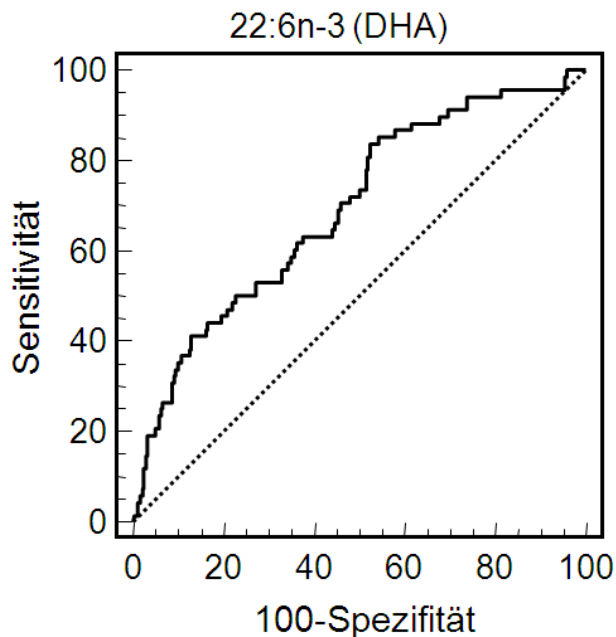


Abbildung 12. ROC-Kurve für Serum DHA Werte von Patienten mit schwerer linksventrikulärer Dilatation (LVEDD > 70mm). Die Fläche unter der ROC-Kurve war 0,69 (Standardfehler 0,03, 95% Konfidenzintervall 0,64 – 0,74, $p=0,001$) bei einem Cut-off-Punkt von 1,24% DHA.

In Abbildung 13 ist links LVEDD gegen DHA im Serum aufgetragen. Die Linien bilden den optimalen Cut-off-Punkt ab, um die Abwesenheit einer schweren linksventrikulären Dilatation (LVEDD > 70 mm, ausgefüllte Kreise) ab einem DHA Wert > 1.24% zu erkennen. Dieser Wert wurde gewählt, um den Wert der Sensitivität und gleichzeitig der Spezifität zu maximieren. Rechts ist die Anzahl der Patienten mit LVEDD ≤ 70 mm oder LVEDD > 70 mm kategorisiert nach DHA ≤ 1,24% oder > 1,24% aufgetragen. Bei einem DHA Wert > 1,24% hatten nur 11 von 68 (von insgesamt 308) Patienten eine schwere Dilatation.

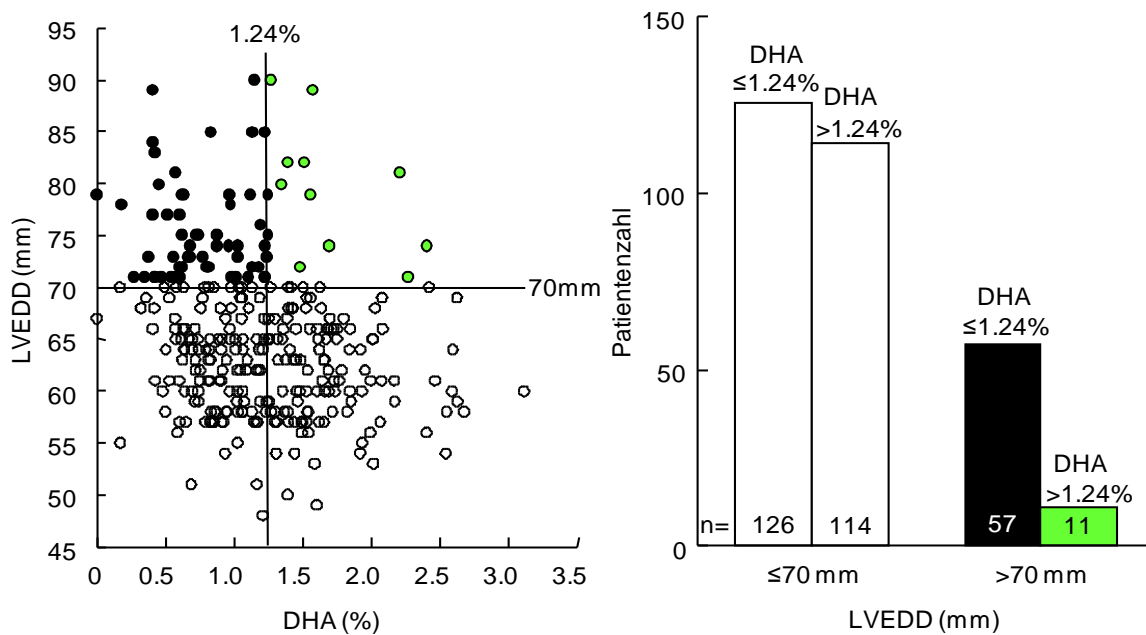


Abbildung 13. (Links) LVEDD aufgetragen gegen Serum DHA. Patienten mit einer DHA Konzentration > 1,24% sind als grün ausgefüllte Punkte dargestellt. (Rechts) Anzahl der Patienten mit LVEDD ≤ 70 mm oder LVEDD > 70 mm kategorisiert nach DHA ≤ 1,24% oder > 1,24%. Bei DHA Wert > 1,24% hatten nur 11 von 68 Patienten eine schwere Dilatation (grüne Säule).

4.1.3 Kategorisierung nach LVEF

Die Patientencharakteristika wurden weiterhin nach Tertilen von LVEF eingeteilt (untere 9-25%, mittlere 26-35%, obere Tertile 36-50%) (93). Die Patienten mit unterschiedlich stark eingeschränkter Pumpfunktion aber weitgehend guter Nierenfunktion wurden entsprechend den Leitlinien behandelt (Tabelle 4).

Tabelle 4. Charakteristika und Medikation von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz kategorisiert nach Tertilen von LVEF.

	Tertile 1 LVEF = 9-25% n = 100	Tertile 2 LVEF = 26-35% n = 101	Tertile 3 LVEF = 36-50% n = 100
Patientencharakteristika			
Alter (Jahre)	47,6±12,2	48,8±11,9	47,9±11,7
Männliche Patienten (%)	81	73	75
Serumkreatinin (mg/dl)	1,13±0,22*	1,07±0,21	1,03±0,24
Body mass index (kg/m ²)	27,2±4,6	27,3±4,4	27,2±3,9
NYHA Klassifikation	2,5±0,6*** ###	2,2±0,6***	2,0±0,6
Medikation der Patienten (%)			
β-Blocker	64	56	55
Diuretika	55	72	56
ACE-Hemmer	89	84	90
ATII-Blocker	8	12	3
Spironolacton	30	22	21
Digitalis	83	74	62
Amiodaron	13	13	12

*p<0,05, ***p<0,001 vs. Tertile 3; ###p<0,001 vs. Tertile 2.

Patienten der unteren LVEF Tertile hatten eine eingeschränkte Pumpfunktion und ein ausgeprägtes Rückwärtsversagen, was sich in einem verringerten systolischen Aortendruck widerspiegelte (Tabelle 5). Der linksventrikuläre endsystolische Druck war ebenfalls reduziert, während der pulmonale und rechtsventrikuläre endsystolische Druck gesteigert waren.

Tabelle 5. Links- und rechtsventrikuläre Drücke von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz kategorisiert nach Tertilen von LVEF.

	Tertile 1 LVEF = 9-25% n = 100	Tertile 2 LVEF = 26-35% n = 101	Tertile 3 LVEF = 36-50% n = 100
Aortendruck (mm Hg)			
Systolisch	119,4±25,5*** #	128,3±29,2	135,2±22,5
Diastolisch	71,0±14,2	72,3±14,1	74,2±11,9
Pulmonaldruck (mm Hg)			
Systolisch	37,5±15,2**	34,7±14,5	30,9±10,9
Diastolisch	17,3±9,9***	15,8±9,2*	12,2±7,6
Verschluss (Wedge) Druck	16,5±11,5*	14,2±9,1	12,7±9,6
Ventrikeldruck (mm Hg)			
LV endsystolisch	123,0±24,9*	126,4±29,9	134,3±24,2
LV enddiastolisch	20,4±10,5	19,0±13,0	17,0±11,9
RV endsystolisch	38,4±14,9*	36,8±13,6	33,8±10,6
RV enddiastolisch	8,7±6,0	7,9±6,5	7,3±5,9

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. Tertile 3; #p<0,05 vs. Tertile 2.

Patienten der unteren und mittleren Tertile hatten auch einen vergrößerten linken Ventrikel (Tabelle 6). Das linksventrikuläre endsystolische und enddiastolische Volumen und die entsprechenden Indices in Bezug auf die Körperoberfläche waren in der unteren und mittleren Tertile verglichen mit der oberen Tertile erhöht. Ebenso war LVEDD vergrößert. Das Schlagvolumen war nicht signifikant beeinflusst, hingegen waren das Herzminutenvolumen und der Herzindex reduziert. Der Vorhofdurchmesser und der E-Punkt/Septum-Abstand war bei Patienten mit reduzierter LVEF vergrößert.

Tabelle 6. Linksventrikuläre Geometrie und Masse von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz kategorisiert nach Tertilen von LVEF.

	Tertile 1 LVEF = 9-25% n = 100	Tertile 2 LVEF = 26-35% n = 101	Tertile 3 LVEF = 36-50% n = 100
Geometrie und Masse			
LV endsystolisches Volumen (ml)	281,0±167,2*** ###	184,2±92,1*	146,7±70,7
LV enddiastolisches Volumen (ml)	391,3±177,6*** ###	289,9±112,9	268,1±104,3
LV endsystolischer Volumenindex (ml/m ²)	139,9±81,6*** ###	94,7±46,9*	74,5±37,4
LV enddiastolischer Volumenindex (ml/m ²)	194,8 ± 85,6*** ###	148,7±56,9	135,3±53,3
LVEDD (mm)	70,9±8,0*** ###	64,1±5,0***	60,8±5,3
Linker Vorhofdurchmesser (mm)	44,7±7,7***	43,4±8,3*	39,7±8,6
E-Punkt/Septum-Abstand (mm)	18,9±7,8*** #	15,7±5,2*	12,6±6,5
LV Masse (g)	381,1±117,8*	354,3±112,6	338,4±101,8
LV Massenindex (g/m ²)	192,4±56,2*	178,9±52,1	171,1±50,0
Pumpfunktion			
LV Schlagvolumen (ml)	110,3±71,4	105,7±49,7	121,3±57,4
LV Schlagvolumenindex (ml/m ²)	54,9±34,1	54,1±24,7	60,8±27,9
Herzminutenvolumen (l/min)	4,1±1,2**	4,4±1,1	4,7±1,4
Herzindex (l/min/m ²)	2,1±0,6**	2,2±0,6	2,4±0,6
LVEF (%)	19,7±4,4*** ###	31,5±3,4***	42,8±3,4

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. Tertile 3; #p<0,05, ###p<0,001 vs. Tertile 2.

Die linksventrikuläre systolische und diastolische Wandspannung war bei Patienten mit niedriger LVEF erhöht (Tabelle 7). Obwohl die linksventrikuläre Masse erhöht war, konnte die Dilatation nicht kompensiert werden und es kam zu einem Anstieg der Wandspannung. Der Herzfrequenzvariabilitätsparameter SDNN war in der unteren verglichen mit der oberen Tertile reduziert. SDNN war auch bei einer diastolischen Wandspannung >4 kPa reduziert (p=0,016). Die weiteren Herzfrequenzparameter waren nicht signifikant verändert.

Tabelle 7. Herzfrequenzvariabilitätsparameter und linksventrikuläre Wandspannung von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz kategorisiert nach Tertilen von LVEF.

	Tertile 1 LVEF = 9-25% n = 100	Tertile 2 LVEF = 26-35% n = 101	Tertile 3 LVEF = 36-50% n = 100
Herzfrequenzvariabilitätsparameter			
EKG Aufnahmezeit (h)	21,1±2,2	21,8±1,5	21,4±1,8
RR Mittelwert (ms)	803,1±145,0	809,8±136,6	851,0±141,8
SDNN (ms)	125,8±74,0*	133,4±70,4	163,9±76,1
SDNN index (ms)	85,7±74,5	88,5±66,0	115,0±76,9
SDANN (ms)	86,1±45,2	95,8±59,0	107,9±42,3
Linksventrikuläre Wandspannung			
Endsystolisch (kPa)	13,9±5,5* #	10,9±5,0	11,0±3,5
Enddiastolisch (kPa)	4,0±2,6**	3,4±2,5	2,7±1,9

*p<0,05, **p<0,01 vs. Tertile 3; #p<0,05 vs. Tertile 2.

Die Summe der gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren, ebenso die Palmitin- und Ölsäure waren in der unteren Tertile verglichen mit der oberen erhöht (Tabelle 8).

Tabelle 8. Gesättigte und einfach ungesättigte Serumfettsäuren von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz.

Fettsäuren (%)	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
	LVEF = 9-25% n = 100	LVEF = 26-35% n = 101	LVEF = 36-50% n = 100
Gesättigte gesamt	40,3±3,0*	39,7±2,7	39,3±3,5
14:0 (Myristinsäure)	0,73±0,55*	0,73±0,56	0,57±0,50
15:0	0,22±0,11*	0,23±0,11*	0,19±0,11
16:0 (Palmitinsäure)	30,5±2,5**	30,0±2,2	29,6±2,5
18:0 (Stearinsäure)	8,48±1,67	8,41±1,37	8,58±1,51
20:0 (Arachinsäure)	0,012±0,020	0,012±0,018	0,011±0,020
21:0	0,011±0,037	0,005±0,017	0,006±0,017
22:0 (Behensäure)	0,097±0,082	0,111±0,083	0,100±0,065
23:0	0,121±0,372	0,112±0,360	0,157±0,506
24:0 (Lignocerinsäure)	0,080±0,136	0,109±0,168	0,126±0,183
Einfach ungesättigte gesamt	30,0±4,7* [#]	28,5±5,2	28,5±5,6
14:1n-5	0,042±0,041	0,041±0,047	0,035±0,056
15:1n-5	0,006±0,020	0,006±0,013	0,006±0,013
16:1n-7 (Palmitoleinsäure)	2,48±0,99	2,43±0,96	2,29±1,06
17:1n-7	0,31±0,62	0,27±0,39	0,30±0,43
18:1n-9cis (Ölsäure)	26,9±4,4 [†]	25,5±4,7	25,7±5,0
18:1n-9trans	0,17±0,13** [#]	0,13±0,13	0,11±0,11
20:1n-9	0,090±0,137*	0,075±0,120	0,050±0,077
22:1n-9	0,006±0,012	0,004±0,006	0,007±0,013
24:1n-9 (Nervensäure)	0,005±0,016	0,002±0,006	0,005±0,014

*p<0,05, **p<0,01 vs. Tertile 3; [#]p<0,05 vs. Tertile 2; [†]p=0,050 vs. Tertile 3.

Bei Patienten der unteren Tertile war die Summe der langkettigen n-3 und n-6 Fettsäuren, DHA und Arachidonsäure im Vergleich zur mittleren und oberen Tertile reduziert (Tabelle 9). EPA war nur im Vergleich zur oberen Tertile reduziert. Die Mead'sche Säure (20:3n-9) war nicht signifikant verändert.

Tabelle 9. Mehrfach ungesättigte n-3, n-6 und n-9 Serumfettsäuren von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz.

Fettsäuren (%)	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
	LVEF = 9-25% n = 100	LVEF = 26-35% n = 101	LVEF = 36-50% n = 100
n-3 langkettige PUFA gesamt	1,52±0,76*** ##	1,81±0,74	1,91±0,70
20:3n-3	0,014±0,082	0,007±0,011	0,009±0,020
20:5n-3 (EPA)	0,45±0,29***	0,53±0,31	0,59±0,32
22:6n-3 (DHA)	1,06±0,56** ##	1,27±0,56	1,31±0,54
n-3 kurzkettige PUFA			
18:3n-3 (α-Linolensäure)	0,30±0,19	0,28±0,19	0,27±0,19
n-6 PUFA gesamt	25,9±4,0** ##	27,8±4,5	27,8±4,2
18:2n-6cis (Linolsäure)	19,8±3,2	20,7±3,4	20,3±3,3
18:3n-6 (γ-Linolensäure)	0,18±0,29	0,16±0,13	0,16±0,13
20:2n-6	0,17±0,10	0,19±0,08	0,18±0,08
20:3n-6 (dihomo-γ-Linolensäure)	1,44±0,52	1,57±0,59	1,53±0,51
20:4n-6 (Arachidonsäure)	4,33±1,61*** ###	5,17±1,89	5,63±1,70
22:2n-6	0,009±0,024	0,006±0,014*	0,015±0,028
n-9 PUFA			
20:3n-9 (Mead'sche Säure)	0,11±0,11	0,12±0,09	0,12±0,13

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. Tertile 3; ##p<0,01, ###p<0,001 vs. Tertile 2.

Bedeutsam ist, dass das Verhältnis von 20:4n-6/20:3n-6 in der unteren verglichen mit der oberen LVEF Tertile reduziert war (Tabelle 10). Es kann daher auf eine verringerte Aktivität der Δ 5-Desaturase bei Herzinsuffizienz geschlossen werden. Die Aktivitäten der Δ 6 und Δ 9-Desaturase waren nicht signifikant verändert. In der unteren LVEF Tertile war auch das Verhältnis von n-6/n-3 ungesättigten Fettsäuren gesteigert.

Tabelle 10. Verhältnis der Serumfettsäuren von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz kategorisiert nach Tertilen von LVEF.

Fettsäureverhältnis	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
	LVEF = 9-25%	LVEF = 26-35%	LVEF = 36-50%
	n = 100	n = 101	n = 100
16:1n-7cis/16:0 (delta9-Desaturase)	0,08±0,03	0,08±0,03	0,08±0,04
18:1n-9cis/18:0 (delta9-Desaturase)	3,4±1,2	3,2±1,0	3,2±1,1
18:3n-6/18:2n-6 (delta6-Desaturase)	0,009±0,01	0,008±0,006	0,008±0,006
20:4n-6/20:3n-6 (delta5-Desaturase)	3,2±1,3**	3,5±1,4	3,9±1,4
n-6 PUFA/n-3 PUFA	16,3±6,0**	15,1±5,8	13,9±4,8
HUFA/(16:0+18:1)	0,10±0,04***###	0,13±0,05	0,14±0,05
DHA/EPA	3,0±1,8	3,0±1,8	2,7±1,7

p<0,01, *p<0,001 vs. Tertile 3; ###p<0,001 vs. Tertile 2.

Da eine LVEF \leq 30% häufig als Maß für eine stark eingeschränkte Pumpfunktion verwendet wird, wurden Patienten mit einer LVEF \leq 30% unterteilt abhängig davon, ob eine schwere Dilatation (LVEDD >70 mm) vorliegt (Abbildung 14). Unter den 154 Patienten mit einer LVEF \leq 30% hatten 56 Patienten eine LVEDD >70 mm. Bei diesen Patienten war DHA signifikant reduziert verglichen mit Patienten mit einer LVEDD \leq 70 mm, unabhängig davon ob LVEF \leq 30% oder >30% war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass DHA primär durch Faktoren beeinflusst wird, die mit einer linksventrikulären Dilatation assoziiert sind. Hingegen war der Arachidonsäurespiegel bei einer LVEF \leq 30% verglichen mit einer LVEF >30% reduziert, obwohl LVEDD \leq 70 mm war. Eine starke Dilatation reduzierte die Arachidonsäure weiter. Dies kann auf die niedrigere LVEF dieser Gruppe (LVEF 19,9±5,7% bei LVEDD >70 mm, verglichen mit LVEF 24,7±5,0% bei LVEDD \leq 70 mm) zurückgeführt werden. Da lediglich 9 Patienten mit einer LVEDD >70 mm eine LVEF >30 hatten, konnten Einflüsse einer starken Dilatation bei LVEF >30 nicht beurteilt werden. In den Spiegeln von einfach ungesättigten und gesättigten Fettsäuren wurden keine statistisch signifikanten Veränderungen beobachtet.

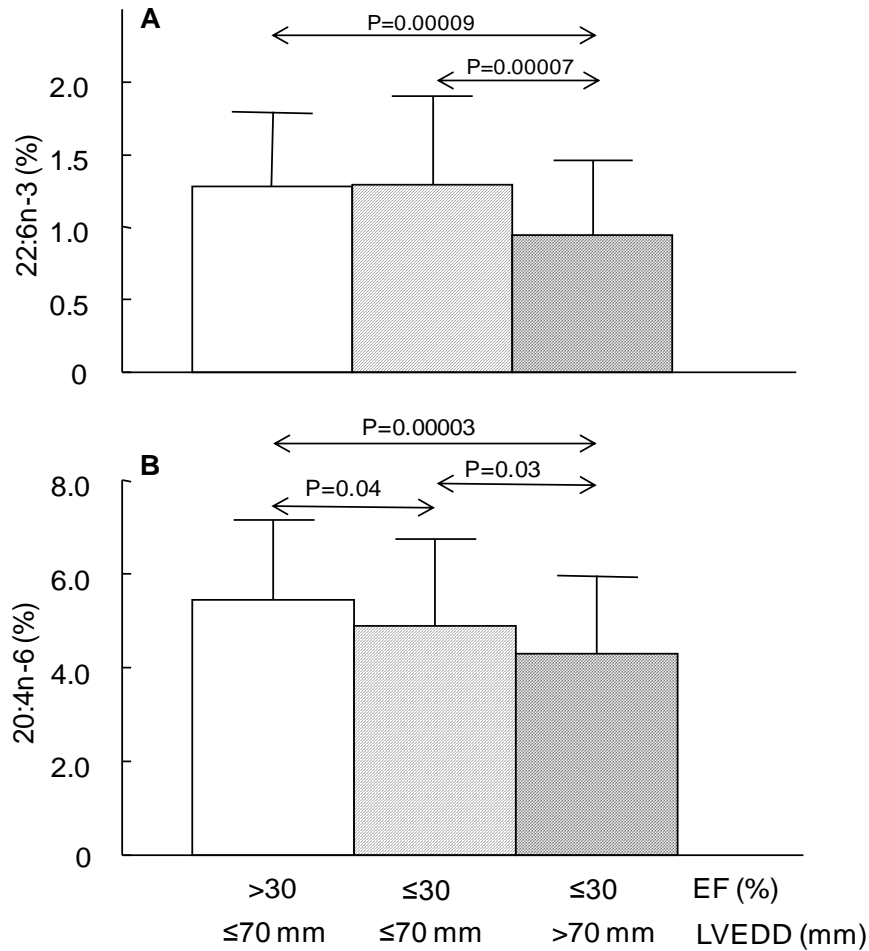


Abbildung 14. (A) DHA und (B) Arachidonsäure von Patienten ohne schwere Ventrikeldilatation (LVEDD ≤70 mm) mit unterschiedlicher Pumpfunktion (LVEF >30% oder LVEF ≤30%) und Patienten mit schwerer Ventrikeldilatation (LVEDD >70 mm). Die entsprechenden LVEF und LVEDD Werte waren: (offener Balken) 40,4±4,7%, 60,8±4,5 mm; (schräg-schraffierter Balken) 24,7±5,0%, 64,4±4,4 mm; (kreuz-schraffierter Balken) 19,9±5,7%, 76,6±5,6 mm.

Da LVEDD und linker Vorhofdurchmesser miteinander korrelieren ($r=0,361$, $p<0,00001$), wurde der linke Vorhofdurchmesser ebenfalls nach Tertilen stratifiziert. Mit Zunahme des linken Vorhofdurchmessers verringerte sich DHA (<40 mm, $1,27 \pm 0,56\%$; ≥40 mm, $1,14 \pm 0,52\%$; >52 mm, $0,97 \pm 0,48\%$, $p=0,015$ vs. <40 mm).

Da eine niedrige DHA Konzentration auch nicht kardiale Ursachen haben kann, insbesondere eine verringerte diätetische DHA Aufnahme, wurde auch eine Stratifizierung nach DHA durchgeführt. Der linke Vorhofdurchmesser war in der unteren ($43,9 \pm 7,7$ mm; 0,17%-0,92% DHA) und mittleren ($43,4 \pm 9,4$ mm; 0,93%-1,42% DHA) Tertile verglichen mit der oberen ($40,2 \pm 8,0$ mm; 1,43%-3,14% DHA) Tertile von DHA signifikant ($p<0,025$) vergrößert. Ein

niedriger DHA Spiegel ging somit nicht nur mit einer Dilatation des linken Ventrikels sondern auch des linken Vorhofs einher.

Zusammenfassend zeigt es sich, dass eine dilatative Herzinsuffizienz zu reduzierten hochungesättigten n-6 (Arachidonsäure) und n-3 (EPA und DHA) Fettsäuren führt, während gesättigte (Palmitinsäure) und einfach ungesättigte (Ölsäure) Fettsäuren ansteigen (Abbildung 15). Ein entscheidender Beitrag zu diesem „HUFA Mangel“ kann aus der reduzierten $\Delta 5$ -Desaturase Aktivität kommen.

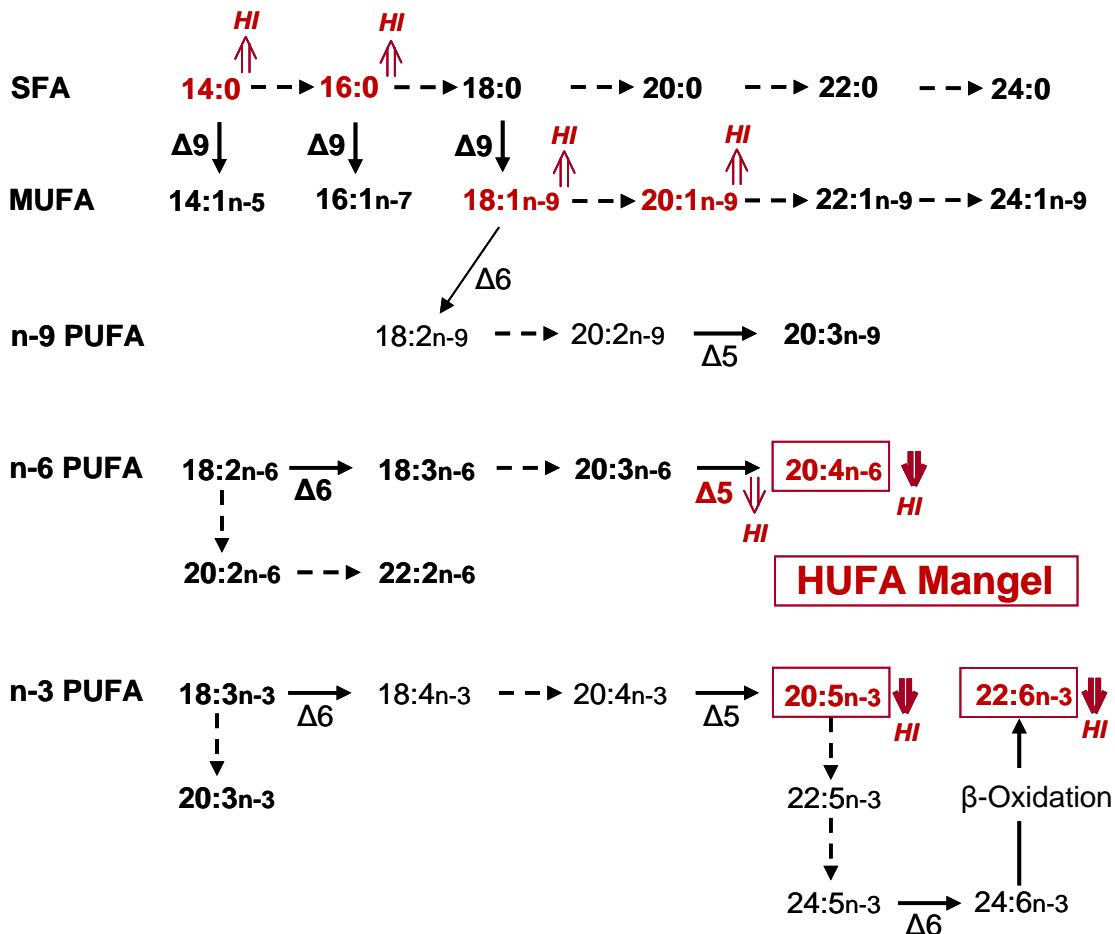


Abbildung 15. Schematische Darstellung der Veränderungen im Fettsäureprofil bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz und LVEF $\leq 25\%$ (unterste LVEF Tertile): Rote Aufwärtspfeile (Anstieg der Fettsäurespiegel) und rote Abwärtspfeile (Abnahme der Fettsäurespiegel oder der $\Delta 5$ -Desaturase Aktivität) stellen statistisch signifikante Veränderungen dar. Der Begriff „HUFA Mangel“ kennzeichnet eine Abnahme der hoch ungesättigten Fettsäuren EPA, DHA und Arachidonsäure.

4.2 Bestimmung von oxidativen Abbauprodukten von n-3 Fettsäuren mit Massenspektrometrie

Die Bestimmung von flüchtigen organischen Verbindungen (VOCs) erfolgte mit dem beschriebenen Massenspektrometer und dem Festphasenmikroextraktionsverfahren (SPME). In der Probe des Fischöls A und B mit jeweils ca. 300mg EPA+DHA/g wurden VOCs, repräsentiert durch 1-Penten-3-ol und 2-Ethylfuran, gefunden (Abbildung 16). Quantifiziert wurden diese Veränderungen durch eine Flächenintegration der jeweiligen Peaks (Ionenströme): Fischöl A 763 bzw. 308; Fischöl B 194 bzw. 397. Im Vergleich dazu hatte Omacor[®] nur 44 bzw. 0. Anhand des Fragmentierungsmusters konnten die VOCs mit der NIST-Bibliothek überprüft werden (Abbildung 17).

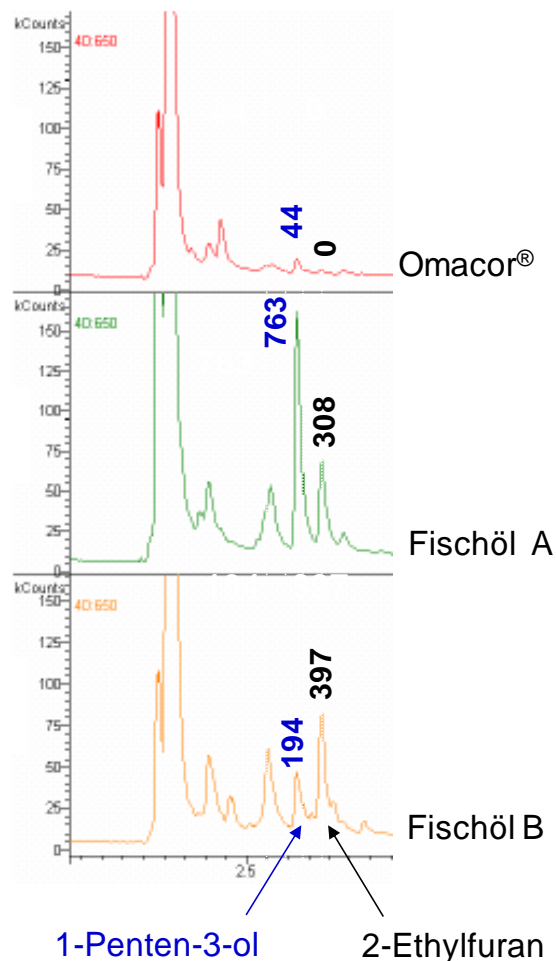


Abbildung 16. Gaschromatogramm von Omacor[®] und zwei Fischölen. Die flüchtigen organischen Verbindungen wurden mit dem Festphasenmikroextraktionsverfahren bestimmt. Die Flächen sind in willkürlichen Einheiten angegeben.

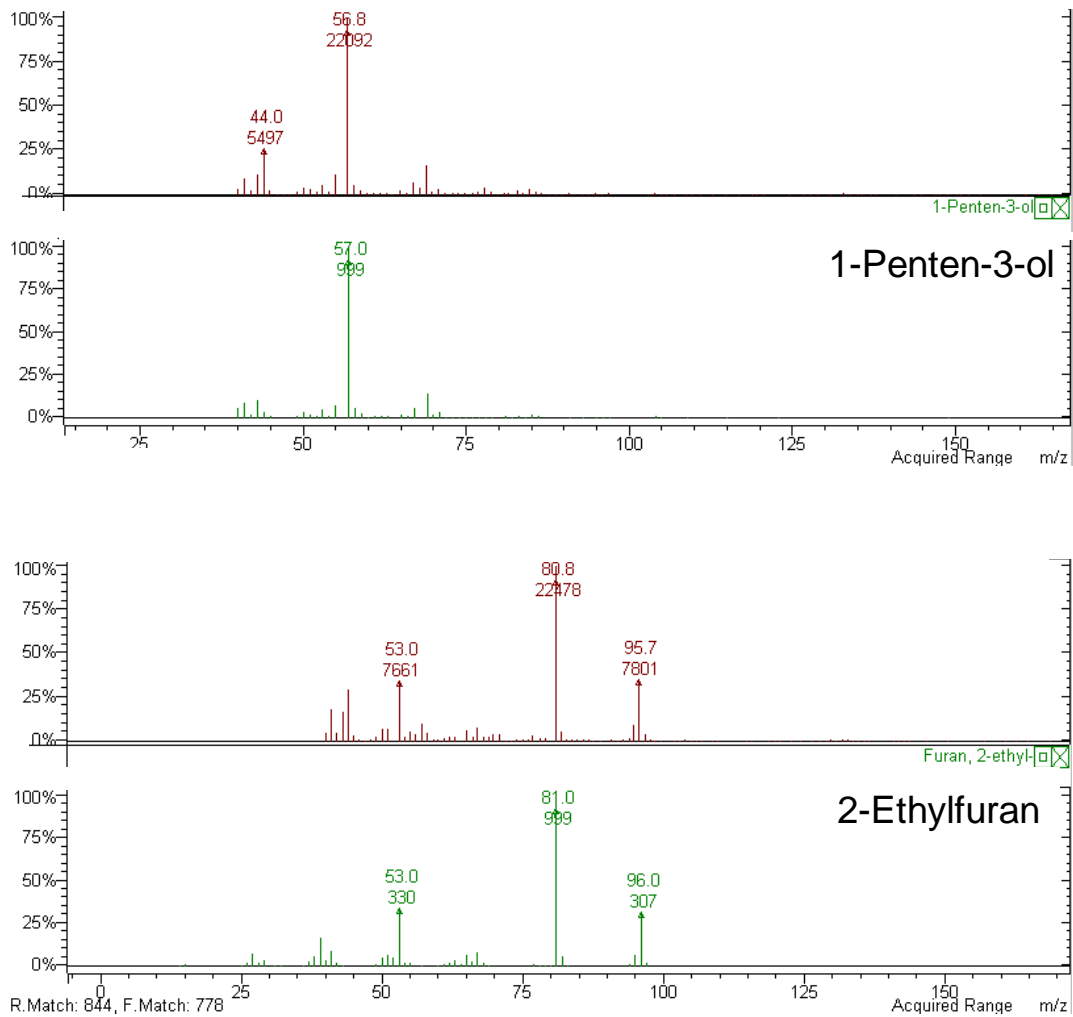


Abbildung 17. Durch die Kopplung des Gaschromatographen mit dem Massenspektrometer steht für jeden Punkt des Chromatogramms ein Massenspektrum zur Verfügung. Hier dargestellt das Massenspektrum für den Peak von 1-Penten-3-ol und 2-Ethylfuran. Die Fragmentierungsmuster von 1-Penten-3-ol und 2-Ethylfuran (beobachtetes Spektrum jeweils oberer Teil der Abbildung) stimmen mit den Verbindungen in der Bibliothek des National Institute of Standards and Technology überein (jeweils unterer Teil der Abbildung).

4.3 Verabreichung von EPA+DHA Ethylestern an gesunde Probanden

Um das Ausmaß der Abnahme von EPA und DHA bei dilatativer Herzinsuffizienz und um einen Zusammenhang zwischen epidemiologischen Studien zum Einfluss von EPA und DHA auf den plötzlichen Herztod (3; 106) und den mit Omacor[®] durchgeführten GISSI-Studien (37; 38) herstellen zu können, wurde geprüft, wie stark EPA und DHA im Blut durch 1g Omacor[®]/Tag gesteigert wird (93). Es wurde 1g Omacor[®]/Tag (840 mg EPA+DHA Ethylester) als Nahrungsergänzungsmittel gesunden Freiwilligen verabreicht. Weiterhin wurde mit diesem Versuch die quantitative Bestimmung von Fettsäuren in kleinen Blutvolumina etabliert. Fettsäuren wurden im Serum, geronnenen Blutzellen und Vollblut bestimmt (Abbildung 18). Ca. 15 Tage nach Verabreichung wurde ein Plateauwert von EPA und DHA im Vollblut erreicht, welcher durch weitere tägliche Verabreichung bis zu 43 Tagen nicht weiter gesteigert wurde. Hierfür wurde Blut jeweils 18 h nach Kapsleinnahme entnommen. Eine signifikante EPA Zunahme wurde auch 3, 6, 9, 18 und 24 h nach der 16. und 44. Kapsleinnahme beobachtet. Diese Daten zeigen, dass die Abnahme von DHA bei Patienten mit stark eingeschränkter LVEF (9-25%) etwa 25% und bei Patienten mit schwerer Dilatation (LVEDD >70 mm) etwa 33% der maximalen Zunahme, die nach der 16. und 44. Omacor[®] Einnahme erzielt wurde, entspricht. Dies zeigt, dass die in der vorliegenden Arbeit bei Herzinsuffizienz und Dilatation beobachteten Mechanismen einen deutlichen Einfluss auf hoch ungesättigte Fettsäuren haben.

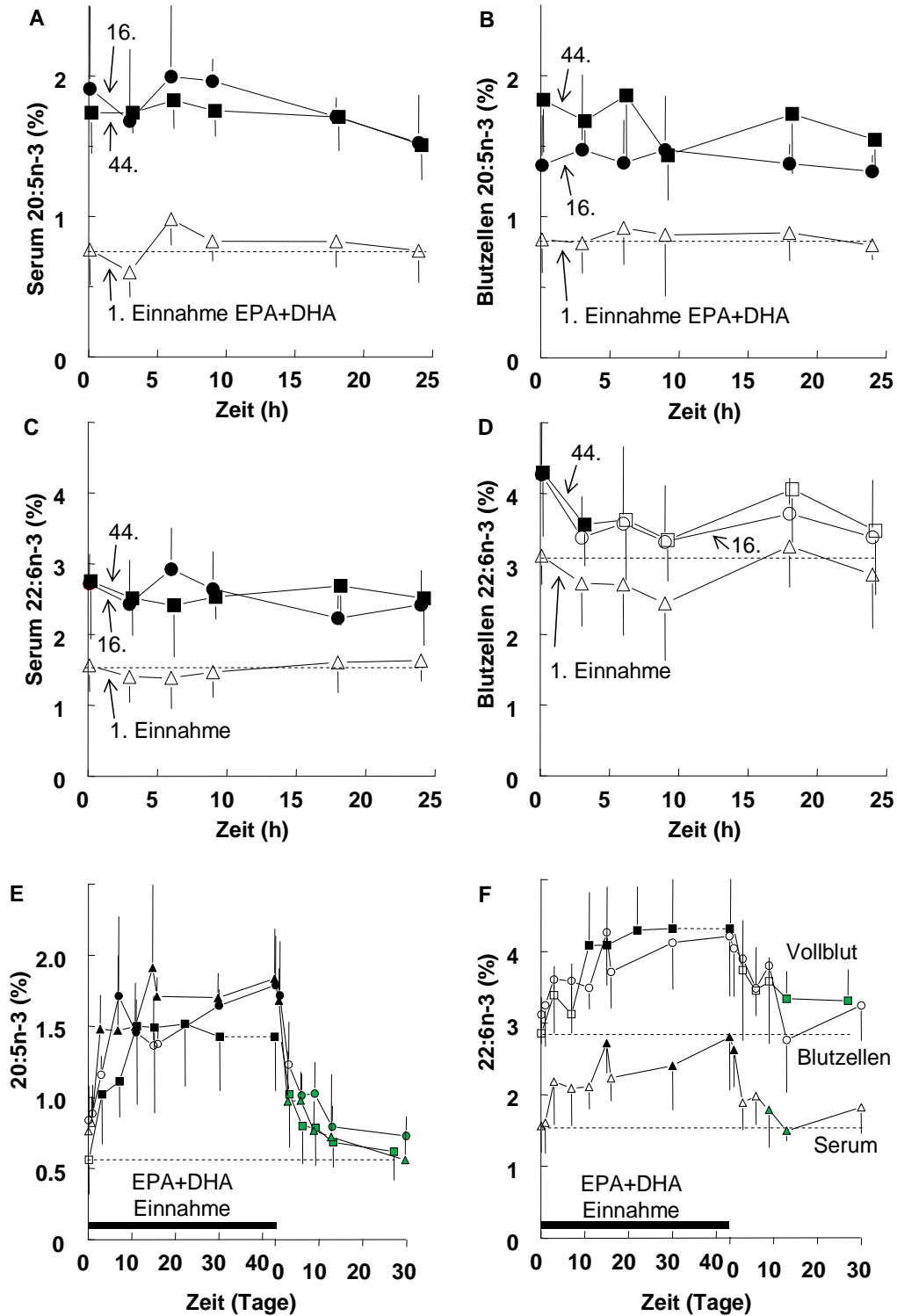


Abbildung 18. Blutspiegel von EPA und DHA nach täglicher Verabreichung von Omacor® (460 mg EPA und 380 mg DHA) bei gesunden Freiwilligen. In (A), (B), (C) und (D) sind die EPA und DHA 24h-Spiegel nach der 1., 16. und 44. Einnahme dargestellt, wobei Blut vor und 3, 6, 9, 18 und 24 h nach Kapseleinnahme abgenommen wurde. Vergleiche (ANOVA mit Duncan's multiple

range test) wurden zwischen Blutspiegeln der 1., 16. und 44. Einnahme durchgeführt ($p < 0,05$, markiert durch ausgefüllte Symbole in A, B, C und D). In (E) und (F) wurden die Spiegel von Serum (Δ) und Blutzellen (\circ) 18h nach Einnahme bestimmt. Erhöhte ($p < 0,05$) Spiegel von EPA (E) und DHA (F) verglichen mit Spiegeln vor der ersten Verabreichung sind durch ausgefüllte Symbole markiert (Repeated-measures ANOVA mit Tukey-Kramer multiple-comparison-test). Nach Beendigung der Einnahme beziehen sich die Vergleiche auf die Zeit nach der letzten Kapseleinnahme ($p < 0,05$, markiert durch grün ausgefüllte Symbole, repeated measures ANOVA mit Tukey-Kramer multiple-comparison-test). Zum Vergleich sind auch Vollblutwerte (\square) gezeigt.

4.4 Nicht insuffiziente Druckbelastung bei DOCA-Salz Ratten

Um Mechanismen, die zu einer Abnahme hoch ungesättigter Fettsäuren und Zunahme von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren führen, zu charakterisieren, wurden Ratten mit einer Druckbelastung untersucht (93). Die DOCA-Salz Ratten hatten als Folge der Hypertonie eine kardiale Hypertrophie von 25% (Tabelle 11).

Tabelle 11. Gewichtscharakteristika der Ratten mit druckbelasteten linken Ventrikel

	Körpergewicht (g)	Herzgewicht (mg)
Kontrollen (n=8)	394 ± 28	1124 ± 92
DOCA-Salz (n=10)	342 ± 24*	1405 ± 136*
DOCA-Salz/Fett+Saccharose (n=11)	322 ± 34*	1447 ± 194*

* $p < 0,001$ gegen Kontrollratten.

Bei Ratten mit einer DOCA-Salz Hypertonie und 25% linksventrikulärer Hypertrophie wurden ebenfalls im Serum Fettsäuren bestimmt. Die Veränderungen in Hauptfettsäuren sind in Abbildung 19 dargestellt. Besonders erwähnenswert ist die Zunahme von DHA, während EPA und Arachidonsäure nicht signifikant verändert waren. Auch gab es keine Unterschiede bei 16:0, 18:1n-9 und 18:2n-6. Die Veränderungen bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz können daher nicht allein einer Überbelastung des Herzens und auch nicht ungünstigen Einflüssen, die ein extrazelluläres Remodeling mit Fibrosierung bewirken, zugeordnet werden. Um Einflüsse von adrenerger Überaktivität und Insulinresistenz abzuschätzen, wurde DOCA-Salz-Ratten Futter mit 24% Kokosnussfett / 32% Saccharose verabreicht. EPA und DHA waren verringert, während Arachidonsäure unverändert blieb. 16:0 und 18:1n-9 waren gesteigert. Dies spiegelt sich auch in einer negativen Korrelation zwischen Arachidonsäure und 18:1n-9 wider. Darüber hinaus war

18:2n-6 reduziert. Die inverse Beziehung von mehrfach und einfach ungesättigten Fettsäuren ähnelt den Veränderungen im Serum von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz. Es sollte aber betont werden, dass DHA nicht unter die Werte von Kontrollen reduziert war und Arachidonsäure nicht verändert war. Die deutlich reduzierten 18:2n-6 und 18:3n-3 Spiegel der hypertensiven Ratten gehen mit einer Zunahme von 20:3n-9 (Mead'sche Säure) einher (nicht gezeigt), die ein Marker eines 18:2n-6 und 18:3n-3 Mangels ist (104).

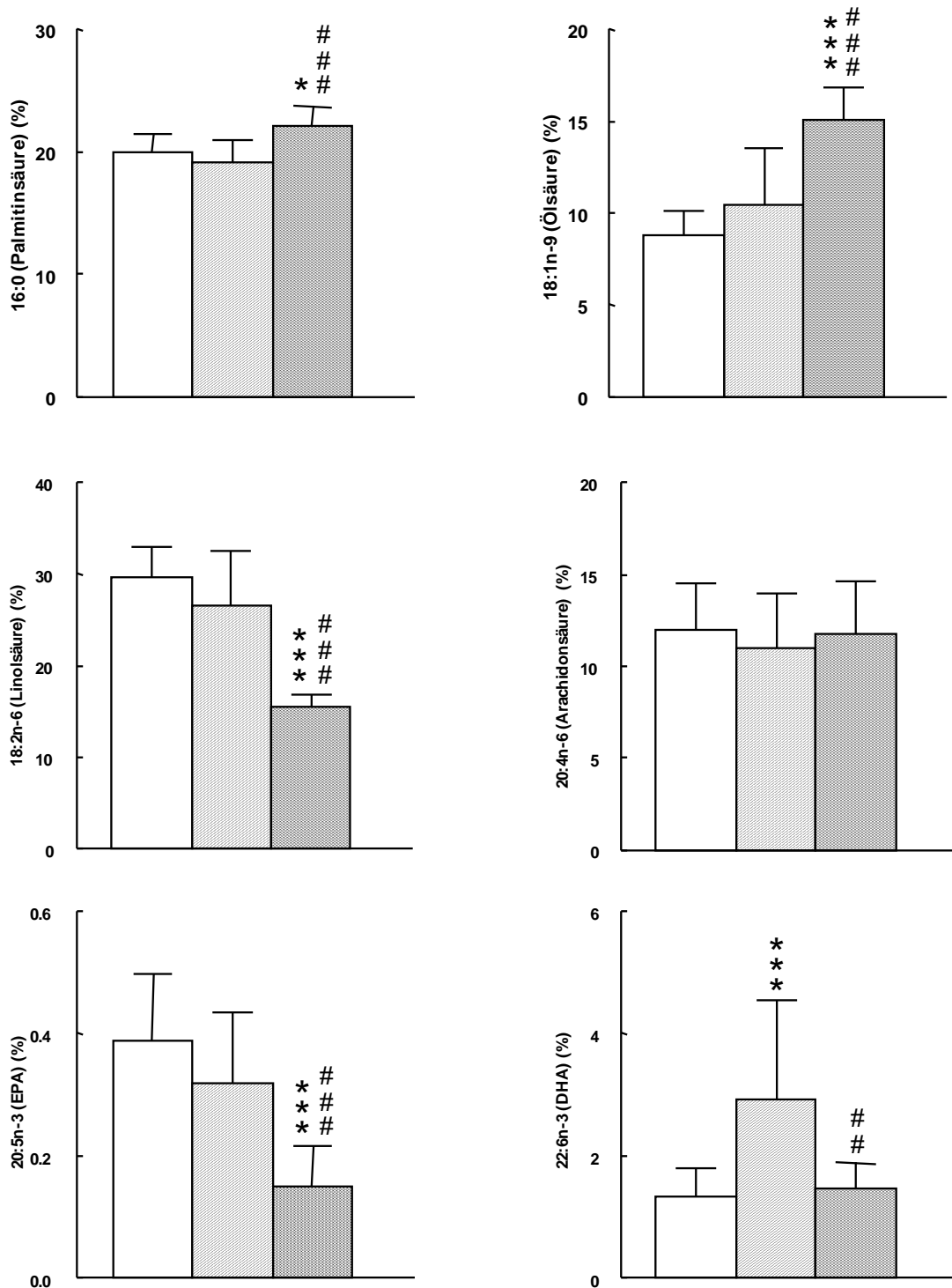


Abbildung 19. Serumfettsäuren von Kontrollratten (Balken offen), Ratten mit DOCA-Salz Hypertonie (schräg schraffiert) und Ratten mit DOCA-Salz Hypertonie und Fütterung von 24% Kokosnussfett / 32% Saccharose (kreuz schraffiert). Statistische Vergleiche wurden mit ANOVA und Duncan's multiple range test gemacht.

*p<0,05, ***p<0,001 vs. Kontrollgruppe; ##p<0,01, ###p<0,001 vs. DOCA-Salz Ratten mit Standardfutter.

4.5 Perikardzugang und intraperikardiale Navigation

Die Grundidee des neuartigen Instruments für den subxiphoidalen Perikardzugang bestand in einer Unterdruck-vermittelten kontrollierten Anheftung des Perikards an einen Ansaugkopf mit visueller und/oder akustischer Überwachung des Unterdruckanstiegs (Abbildung 20). Das Perikard wird nach Anheftung („Attacher“) vom Epikard abgehoben („Lifter“), wobei die Öffnung des Ansaugkopfes durch flexible Klemmen so eingengt wird, dass das Gewebe zusätzlich zum Unterdruck festgehalten und ein eventueller Vakuumverlust bzw. eine Leckage verhindert wird. Durch die Anhebung des Perikards entsteht lokal eine zeltartige Höhle, in die mit der außerhalb des Ansaugkopfes angebrachten Nadel mit einem adäquaten Sicherheitsabstand zum Epi- bzw. Myokard eingestochen wird. Eine Nadelführung („Sicherheitssteg“) soll eine Verletzung des Myokards ausschließen. Es besteht die Möglichkeit durch ein Endoskop/Fiberskop die Perikardoberfläche vor der Punktion zur Findung einer möglichst fettfreien Stelle zu begutachten. Im Falle einer Fettablagerung kann z.B. mit einer „optischen Zange“ das Fett stumpf entfernt werden, bevor der AttachLifter zum Einsatz kommt.

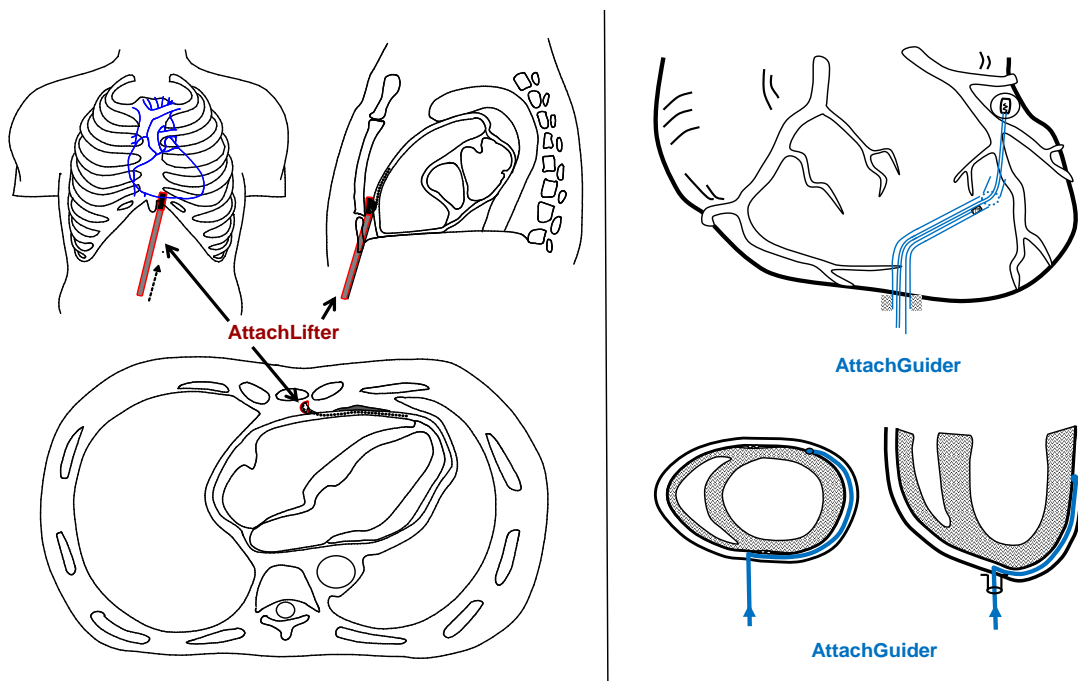


Abbildung 20. (Links) Subxiphoidaler Perikardzugang mit dem AttachLifter.
(Rechts) intraperikardiale Navigation mit dem AttachGuider.

4.5.1 AttachLifter

Bei dem von Comedicus Inc. (Columbia Heights, MN, USA) entwickelten Instrument PerDUCER[®] erfolgte die Ansaugung des Perikards manuell mit einer Spritze, um anschließend im Ansaugkopf in den Herzbeutel einstecken zu können (62). Die Voraussetzung für einen erfolgreichen Herzbeutelzugang ist, dass das angesaugte Perikard den Ansaugkopf nicht komplett ausfüllt. Der Zugang in den Herzbeutel war mit dem PerDUCER[®] in der in Marburg von Prof. Dr. B. Maisch durchgeführten Studie allerdings bei nur 2 von 6 Patienten erfolgreich (67). Die Ursache hierfür liegt vermutlich darin, dass der für die Ansaugung erforderliche Unterdruck nur manuell mittels einer Spritze erzeugt wird und dass eine Leckage ohne eine entsprechende Unterdruckkontrolle rasch zu einer ungenügenden aber nicht erkennbaren Gewebeanheftung führen kann. Ebenso stellt ein verdicktes Perikard ein Problem dar, da dieses den Ansaugkopf vollständig ausfüllen kann und die Nadel bzw. der Führungsdraht somit nicht in den Herzbeutel gelangt.

Wir entwickelten deshalb den AttachLifter mit dem Ziel in einen Herzbeutel unabhängig der Perikarddicke oder dem Vorliegen eines Perikardergusses zu gelangen (Patent WO 2008/071367). Zunächst wird das Instrument durch den standardisierten subxyphoidalen Zugangsweg an das Perikard angelegt. Anschließend wird das Perikard durch einen Unterdruck (ca. 500 mmHg) im Ansaugkopf angeheftet. Die erfolgreiche Anheftung des Perikards resultiert in einem Unterdruckanstieg, welcher durch mehrere Methoden angezeigt werden kann. Flexible Klemmen an der Öffnung des Ansaugkopfes ermöglichen eine bessere Abdichtung, so dass das Gewebe verlässlich festgehalten wird (Abbildung 21).

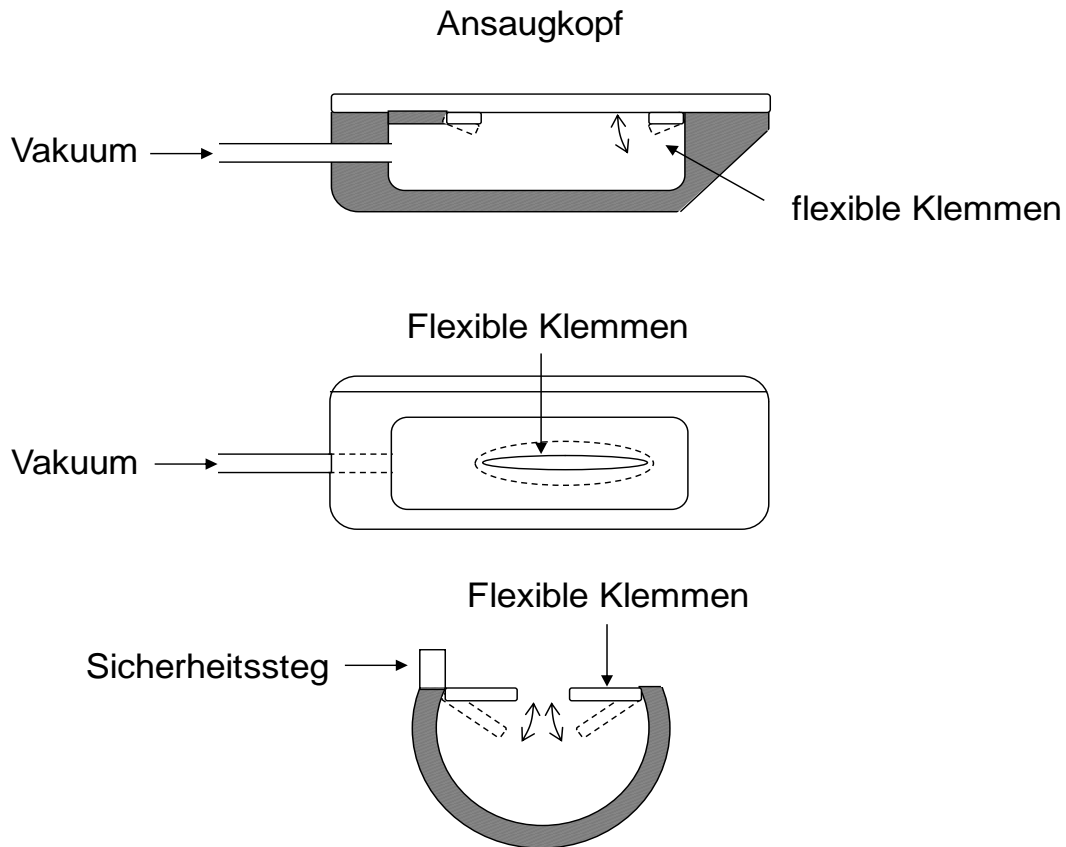


Abbildung 21. Ansaugkopf des AttachLifters mit flexiblen Klemmen.

Der Ansaugkopf wird anschließend um ca. 90° im Uhrzeigersinn gedreht. Die außerhalb des Vakuumkanals befindliche Nadel wird in das entstehende „Zelt“ und somit in den Herzbeutel gestochen. Eine sogenannte Nadelführung (Sicherheitssteg) verhindert, dass die Nadel beim Vorschieben das Epikard verletzen kann (Abbildung 22). Im Gegensatz zum PerDUCER® wird das Perikard (normale Dicke (0.7-2.8 mm) beim AttachLifter daher außerhalb des Ansaugkopfes durchstochen, während das Perikard vom Epikard abgehoben ist. Der AttachLifter erfordert eine elektrische oder manuelle Unterdruckpumpe (ca. 500 mmHg). Eine elektronische Einheit mit beispielsweise akustischem Signal erkennt über einen Anstieg des Unterdrucks die erfolgreiche Gewebefixierung. Auch sollte ein Endoskop zur Beurteilung der erfolgreichen Gewebefixierung verwendet werden. Anschließend kann die Nadel mit innenliegendem Führungsdraht sicher in den Herzbeutel vorgeschoben werden.

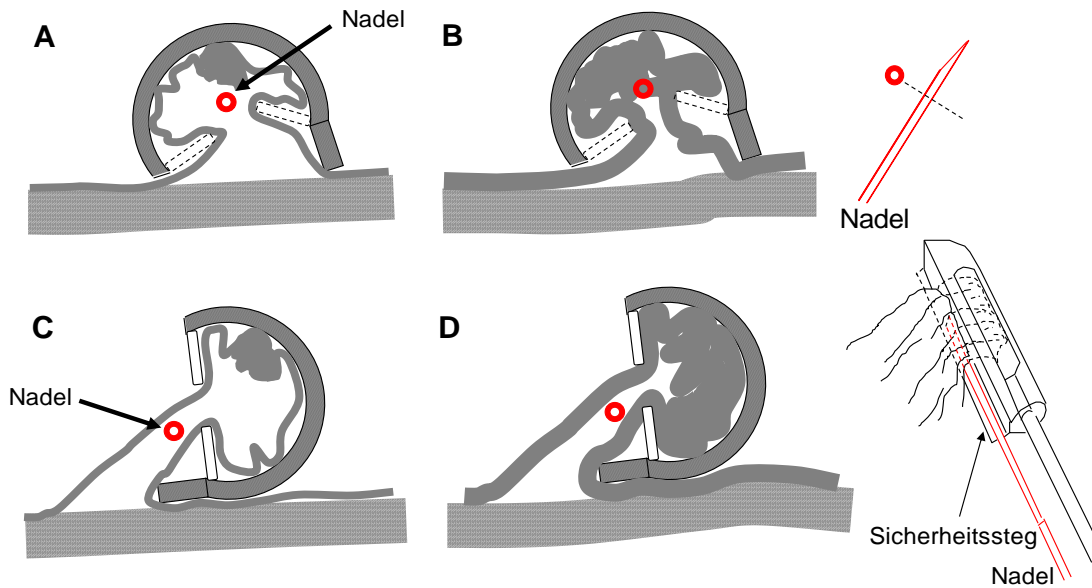


Abbildung 22. (A) und (B): Perikardzugang mit einem hypothetischen Instrument, bei dem sich die Nadel im Ansaugkopf befindet (ähnlich dem PerDUCER®); ein verdicktes Gewebe könnte, wie in (B) gezeigt, den Ansaugkopf ausfüllen und den Perikardzugang verhindern. (C) und (D): beim AttachLifter befindet sich die perforierende Nadel außerhalb des Ansaugkopfes und ein Perikardzugang ist auch bei verdicktem Perikard (D) möglich.

Der AttachLifter wurde bei Kadaverherzen von Schweinen (Abbildung 23, vorliegende Arbeit) (90) und bei lebenden Schweinen erfolgreich eingesetzt.

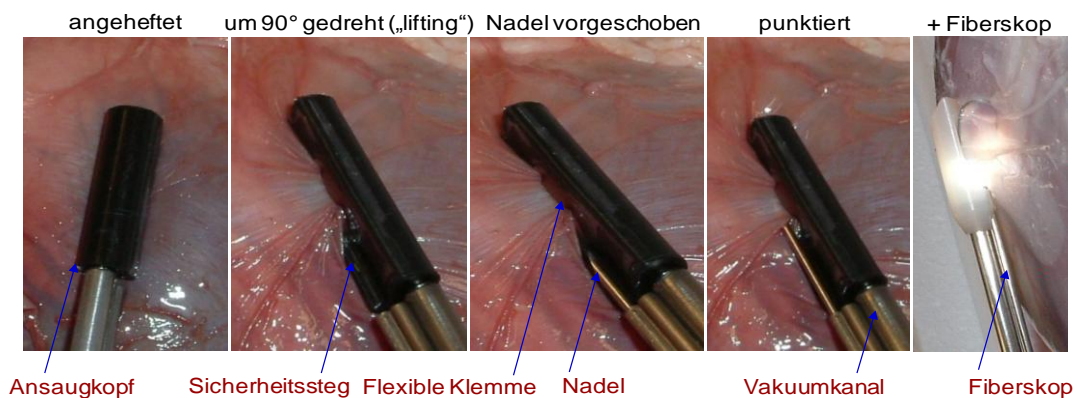


Abbildung 23. Perikardzugang mit dem AttachLifter beim Kadaverherzen des Schweins.

Im Falle eines sehr stark verdickten Gewebes, bei dem man zunächst nicht in den Herzbeutel gelangt, wird die Nadel im Gewebe belassen und der Ansaugkopf weiter im Uhrzeigersinn bis zu einer spürbaren Anspannung gedreht (5). Anschließend wird ein relativ steifer Führungsdraht, der sich senkrecht zur gedrehten Achse befindet, durch das nun festgeklemmte und verdickte Perikardgewebe in den Herzbeutel eingeführt. Im Gegensatz zum etablierten Verfahren mit einer Tuohy Nadel wird das Perikard weitgehend tangential zur Herzoberfläche durchstoßen. Auch dieses Vorgehen reduziert das Risiko einer transmuralen Verletzung des Myokards.

4.5.2 AttachGuider

Der minimal invasive Zugang in den normalen Herzbeutel kann für eine Ablation von epikardialen Tachykardien und eine epikardiale Schrittmacherimplantation für die Resynchronisationstherapie genutzt werden. Epikardiale Schrittmacherelektroden könnten nach intraperikardialer Navigation mit Nachweis einer ausreichenden Funktionsverbesserung implantiert werden. Im Gegensatz zur Minithorakotomie benötigt diese Prozedur keine Einlungen-Beatmung und Vollnarkose. Auch wenn Weiterentwicklungen notwendig sind, könnte ein solches Verfahren für CRT-Patienten mit einem nicht adäquaten Koronarsinus-Schrittmacher eine Alternative bieten.

Zwar sind zur Führung von Instrumenten in Hohlräumen bereits mehrere Instrumente beschrieben, wie beispielsweise flexible Endoskope, jedoch ist für diese stets eine abweisende Wand zur Führung erforderlich. Der AttachGuider (DE 10 2005 057 479.3 und PCT/DE 2006/002116) wurde entwickelt, um eine gezielte Bewegung innerhalb eines Hohlraums ohne abweisende Wand zu ermöglichen (Abbildung 24). Dies wurde bei Kadaverherzen des Schweins getestet. Durch zwei getrennte „Mittel“, d.h. einer inneren und einer äußeren „Wandung“ des Instruments (Abbildung 24), kann mittels einer Ablenkmöglichkeit durch eine abwechselnde, unterdruckvermittelte Anheftung eine gezielte Steuerung und Bewegung erzielt werden (2, Unterdruck nicht vorhanden; 2a, Unterdruck vorhanden und Gewebe angeheftet). Die Abbildung 20 (rechts) zeigt exemplarisch die Situation der Navigation übertragen auf das Herz mit der Möglichkeit einer Ablation oder Elektrodenimplantation nach zuvoriger Findung des geeignetsten Ortes (68). Die Ablation von epikardialen Arrhythmien (107) und die epikardiale Elektrodenimplantation sind wegen der steigenden Inzidenz der chronischen Herzinsuffizienz von großer Bedeutung.

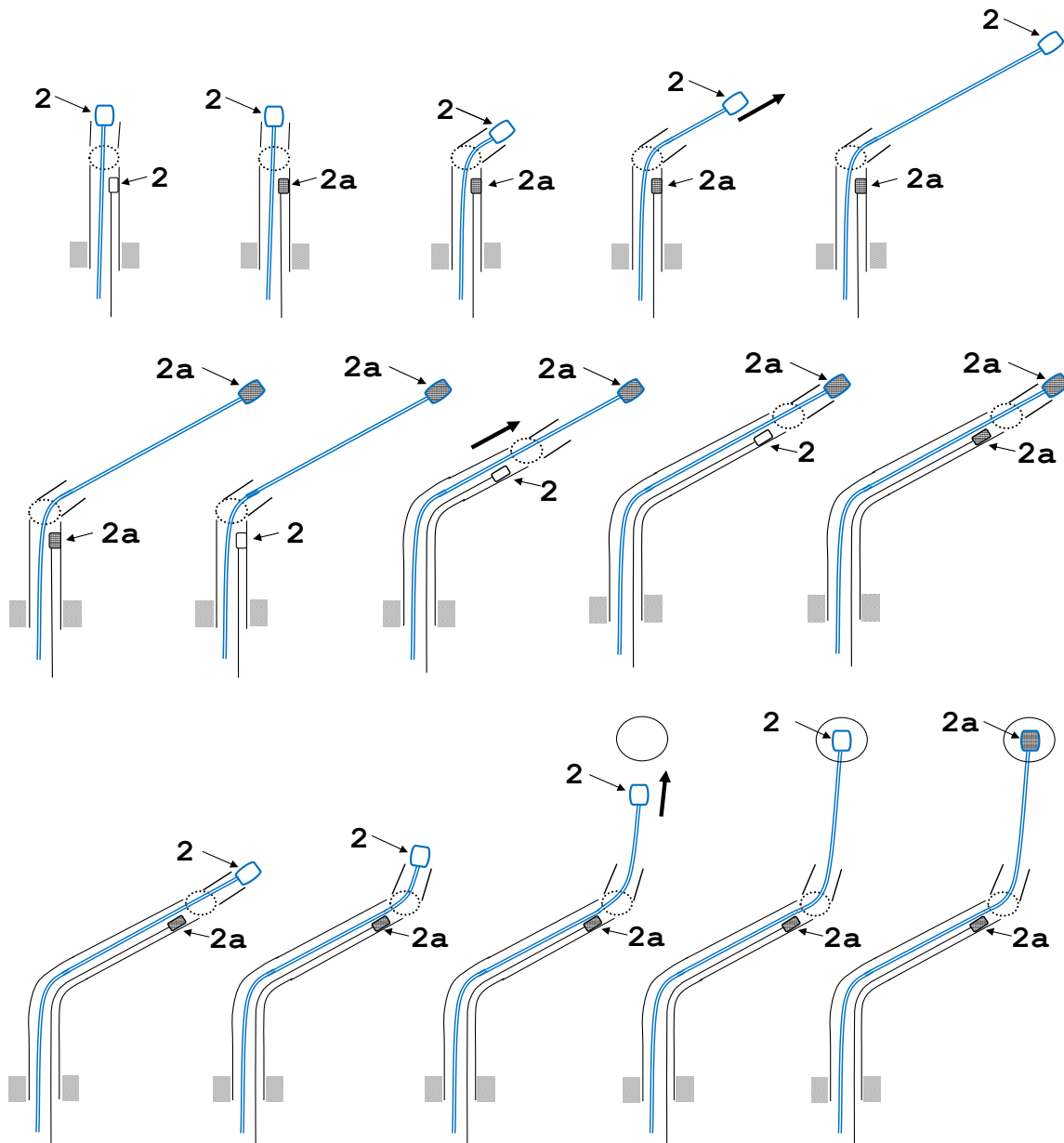


Abbildung 24. Schematisches Vorgehen einer intraperikardialen Navigation mit dem AttachGlider. Die gezielte Bewegung erfolgt durch abwechselndes Anheften des äußeren und inneren (blau) Fortbewegungsmittels. Wenn der äußere Ansaugkopf (2) angeheftet ist (ausgedrückt durch "a" für "attached") wird das innere Fortbewegungsmittel vorgeschoben. Entsprechend wird das äußere Fortbewegungsmittel vorgeschoben, wenn das innere Fortbewegungsmittel angeheftet (2a) ist.

4.5.3 Patent-Entwicklung

Der AttachLifter und der AttachGuider wurden in der Klinik für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie (Prof. Dr. B. Maisch) entwickelt. Die Patentanmeldungen (WO 2007/062632 AttachGuider und WO 2008/071367 AttachLifter) erfolgten durch die TransMIT GmbH (Dr. P. Stumpf; Gießen). Für den AttachLifter wurde am 17.10.2011 das europäische Patent erteilt. Bei der erfinderischen Tätigkeit, Entwicklung und Erprobung habe ich maßgeblich mitgewirkt. Bei beiden Patentanmeldungen bin ich als Miterfinder genannt.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

Fettsäureprofile wurden mit der Gaschromatographie und einem Flammenionisationsdetektor bestimmt. Es handelt sich hier um ein etabliertes Verfahren mit einer guten Präzision. Die Intra-Assay Varianz wurde für DHA durch Doppelbestimmungen von 6 Proben ermittelt. Der mittlere Variationskoeffizient lag bei 3,7% (2,0-5,1%). Die Inter-Assay Varianz wurde anhand von Dreifachmessungen einer Probe, die an 4 verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, berechnet. Der mittlere Variationskoeffizient lag bei 2,9% (1,2-7,4%).

Die untersuchten Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz wurden nicht im Rahmen einer prospektiven Studie untersucht und es kann deshalb nicht eindeutig belegt werden, dass ein niedriger Serum DHA Spiegel kausal an der kardialen Dilatation und der eingeschränkten Herzfunktion beteiligt ist. Es wird vorgeschlagen, in einer prospektiven Studie die Hypothese zu prüfen, dass niedrige DHA Spiegel die Dilatation fördern. Da EPA und DHA eine anti-inflammatorische Wirkung haben, könnten durch verminderte Spiegel Entzündungsvorgänge gefördert werden, die z.B. über TNF- α zum Einwandern von Mastzellen in das Myokard mit anschließendem Abbau von Extrazellulärmatrix und Dilatation führen (48).

Da Serumfettsäuren hauptsächlich in der Leber gebildet werden, ist zu vermuten, dass es Zusammenhänge von Herz- und Leberfunktion gibt, die aber in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden. Auch sollte geprüft werden, inwieweit es zu Veränderungen in der Expression und Aktivität von Enzymen des Fettsäurestoffwechsels bei der Herzinsuffizienz kommt.

Die Instrumente zum minimal invasiven Perikardzugang (AttachLifter) wurden bisher bei Kadaverherzen (vorliegende Arbeit) und an lebenden Schweinen erfolgreich geprüft. Eine CE-Zertifizierung ist auch wegen des kürzlich erteilten EU-Patentes in Bearbeitung. Der AttachGuider wurde bisher nur am Kadaverherzen geprüft.

5.2 Fettsäurekorrelationen bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz

In der vorliegenden Arbeit waren bei herzinsuffizienten Patienten hoch ungesättigte n-3 (EPA, DHA) und n-6 (Arachidonsäure) Fettsäuren negativ mit gesättigten und einfach ungesättigten (n-9 und n-7) Fettsäuren korreliert. Als Erklärung für diese Korrelationen könnte man annehmen, dass die Ausgangsfettsäuren von EPA, DHA und Arachidonsäure bei den Patienten stark variierten. Da jedoch keine signifikanten oder nur schwache Korrelationen mit den essentiellen Ausgangsfettsäuren α -Linolensäure und Linolsäure beobachtet wurden, müssen andere Faktoren berücksichtigt werden. Die diätetische Aufnahme konnte ebenfalls keinen großen Einfluss haben, da EPA, DHA und Arachidonsäure miteinander korrelierten, obwohl sie

aus unterschiedlichen Nahrungsquellen (EPA und DHA aus Fisch (95; 97), Arachidonsäure aus tierischen Nahrungsmitteln) kommen. Man könnte annehmen, dass die Variation von 18:1n-9 auf einer unterschiedlich hohen Einnahme von 18:1n-9 reichen Nahrungsmitteln wie Olivenöl beruht. Die Korrelationen von 18:1n-9 mit 16:1n-7, welches vorwiegend endogen produziert wird, sprechen jedoch dagegen. Vielmehr gibt es Zusammenhänge mit der kardialen Geometrie und Funktion.

5.3 Fettsäurespiegel mit Kategorisierung nach LVEDD und LVEF

Zunächst wurde der Einfluss einer ventrikulären Dilatation untersucht. Unter den Veränderungen der Fettsäurefamilien war die Abnahme von DHA die markanteste und wurde bereits bei Patienten mit moderater Dilatation beobachtet (92). Ein DHA Spiegel von $>1,24\%$ war als Cut-off-Wert ein starker Prädiktor für die Abwesenheit einer schweren Dilatation. Der Wert des Testes, der ein Kompromiss zwischen moderater Spezifität aber vorteilhafter Sensitivität darstellt, sollte im Kontext anderer klinischen Tests, die schwere, potenziell lebensbedrohliche Krankheiten ausschließen, gesehen werden. Ein Beispiel ist der D-Dimere Test, um eine Thrombembolie mit hohem negativ prädiktiven Wert (97%) und hoher Sensitivität (92%) nahezu ausschließen zu können, wobei die Spezifität (36%) und der positiv prädiktive Wert (14%) aber niedrig sind (102).

Im Rahmen einer erweitert klinischen Überwachung der Progression einer linksventrikulären Dilatation bei Herzinsuffizienz könnte ein diagnostischer Algorithmus mit dem DHA Serumspiegel als neuem Biomarker und der Echokardiographie empfohlen werden. Der Test könnte dann von großem Nutzen sein, wenn eine Langzeitüberwachung der Progression der ventrikulären Dilatation notwendig ist, die Echokardiographie jedoch nicht zur Verfügung steht oder regelmäßige Kontrollechokardiographien nicht praktikabel sind. Der Biomarker könnte eine schwere Dilatation bei Herzinsuffizienzpatienten ausschließen und zum Screening einer schweren Dilatation bei kardiovaskulären Risikopatienten nützlich sein. Wir schlagen vor, diesen Parameter in zukünftige, prospektive Herzinsuffizienzstudien zur Untersuchung des Zeitverlaufs einer linksventrikulären Dilatation einzuschließen. Ob die Veränderungen der hoch ungesättigten Fettsäuren, vor allem von DHA, eine Auswirkung der Dilatation des linken Ventrikels sind oder ob sie die Dilatation fördern, sollte auch in weiteren Studien geprüft werden. Da bei Ratten die Verabreichung von EPA und DHA in einer hohen Dosis die ventrikuläre Dilatation verringerte (18), könnte man schlussfolgern, dass ein niedriger DHA Spiegel die Dilatation fördert. Die molekularen Mechanismen, die zur Abnahme von hoch ungesättigten Fettsäuren und Zunahme von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren führen, sind aber noch weitgehend unbekannt. In Frage kommen eine ausgeprägte Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, eine gesteigerte Sympathikusaktivität und ein Anstieg von BNP.

Eine signifikante Reduktion von EPA, DHA und Arachidonsäure trat nicht nur bei Patienten mit dilatativem linken Ventrikel sondern auch bei Patienten mit stark reduzierter LVEF auf. Auch war das Verhältnis von n-6 HUFA/n-3 HUFA erhöht. In früheren Arbeiten wurde bereits postuliert, dass die heutige westliche Ernährung mit einem n-6 zu n-3 Verhältnis von ca. 15:1 einen negativen Einfluss auf verschiedene Organfunktionen hat, wobei ein Verhältnis von 1:1 bis 4:1 angestrebt werden sollte (105). Auch war in der Lyon Heart Studie ein n-6 zu n-3 Verhältnis von 4:1 mit einer 70% Reduktion der Gesamtmortalität assoziiert (24).

Die Abnahme von hoch ungesättigten Fettsäuren trägt sehr wahrscheinlich zur Progression der Herzinsuffizienz bei, vor allem da dem Herzen die Elongase zur Synthese von DHA aus 18:3n-3 fehlt (46) und es DHA aus dem Blut aufnehmen muss. Ein verringerter Gehalt an EPA und Arachidonsäure könnte in einer verringerten Produktion von Eikosanoiden, vor allem von Prostazyklin (80), resultieren. Darüber hinaus könnte die Expression von Genen beeinflusst sein, die für die Fettsäuresynthese und -oxidation erforderlich sind (12; 110) und zu weiteren metabolischen Veränderungen führen (110). Von Bedeutung sind auch Einflüsse auf Ionenkanäle (71; 126). Weiterhin könnten Wirkungen des n-3 Fettsäuren GPR120 Rezeptors (79) vermindert sein. Da er die Insulinsensitivität steigert und anti-inflammatorische Wirkungen hat, könnten niedrige EPA und DHA Spiegel die Insulinresistenz und Entzündungsvorgänge bei der Herzinsuffizienz fördern. Es ist noch nicht geklärt, ob eine Dosis von 1g EPA+DHA/Tag bei Patienten mit Herzdilatation ausreichend ist, um einen adäquaten Spiegel zur Risikoreduktion des plötzlichen Herztodes zu erreichen. Man könnte annehmen, dass die offenbar geringere Wirksamkeit von 1g Omacor[®]/Tag in der GISSI-HF Studie (37) im Vergleich zur GISSI-Prevenzione Studie (38) bei der Verhinderung des plötzlichen Herztodes durch den geringeren DHA Spiegel bei Patienten mit Herzdilatation verursacht wurde. Zudem könnte vermutet werden, dass bei Herzinsuffizienzpatienten die ischämische Freisetzung von hoch ungesättigten Fettsäuren aus Zellmembranen im Gegensatz zu Patienten mit Myokardinfarkt einen geringeren Beitrag liefert.

Um das Ausmaß der beobachteten Reduktion von EPA und DHA bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz beurteilen zu können, wurde eine Testreihe mit gesunden Probanden durchgeführt. Diese erhielten wie auch in der GISSI-Prevenzione (38) und GISSI-HF (37) Studie 1g Omacor[®]/Tag. Die Fettsäurespiegel von EPA und DHA waren im Serum, Vollblut und Blutzellen erhöht. Nach ca. 15 Tagen wurde ein Plateauwert und nach dem Absetzen nach ca. 10 Tagen wieder die Ausgangswerte erreicht. Die Abnahme von DHA bei schwerer linksventrikulärer Dilatation entsprach etwa 33% der Zunahme, die nach der 16. und 44. Einnahme von Omacor[®] beobachtet wurde. Folglich haben Mechanismen, die mit einer Herzinsuffizienz einhergehen, einen maßgeblichen Einfluss auf EPA und DHA.

Bereits nur geringe Abnahmen von EPA und DHA können mit einem erhöhten Risiko schwerer Arrhythmien und des plötzlichen Herztodes assoziiert sein. In der Physicians' Health Studie (3) standen bei Personen ohne kardiovaskulärer Vorerkrankung hoch ungesättigte n-3

Fettsäuren im Vollblut in einem inversen Verhältnis zum Risiko des plötzlichen Herztodes. Bei am plötzlichen Herztod verstorbenen Personen war die Summe langkettiger mehrfach ungesättigter n-3 Fettsäuren signifikant von $5,24 \pm 1,32\%$ auf $4,82 \pm 1,31\%$ reduziert. DHA war von $2,38 \pm 0,78\%$ auf $2,12 \pm 0,65\%$ vermindert, während EPA von $1,84 \pm 0,53\%$ auf $1,72 \pm 0,59\%$ nur nicht signifikant verringert war. Um Vergleiche dieser Werte mit den vorliegenden Daten ziehen zu können, muss berücksichtigt werden, dass der DHA Spiegel im Vollblut höher ist als im Serum, da die Erythrozytenmembran im Vergleich zum Plasma mehr DHA enthält. Während bei den Patienten der Physicians' Health Studie der plötzliche Herztod als erste Manifestation einer kardiovaskulären Erkrankung auftrat, ist das Risiko bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz bereits deutlich erhöht. Die beobachtete Abnahme von EPA und DHA könnte das Risiko weiter steigern. Es wird daher empfohlen, die Progression der Dilatation bei chronischer Herzinsuffizienz zu kontrollieren, um ungünstigen Konsequenzen entgegenwirken zu können. Eine Verabreichung von EPA und DHA könnte daher einen nützlichen Effekt haben, insbesondere bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz und/oder Dilatation. Bei der GISSI-HF Studie (37) war die tägliche Einnahme von 1g Omacor[®] verglichen mit Placebo mit einer signifikanten Risikoreduktion des Todes und der Hospitalisierung aufgrund einer kardiovaskulären Erkrankung assoziiert. Die Frage, ob klinische Endpunkte bei Patienten mit reduzierter Herzfunktion und Dilatation durch eine höhere Dosis von EPA und DHA verbessert werden können, um „stark lipolytischen“ Organen wie dem Herzen (39) gerecht zu werden, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

5.4 Erhöhte Wandspannung in Zusammenhang mit veränderter Herzfrequenzvariabilität

In Übereinstimmung mit Alter et al. (7; 8) war die enddiastolische Wandspannung $>4\text{kPa}$ mit einer reduzierten Herzfrequenzvariabilität (SDNN) assoziiert ($p=0,045$), während andere Herzfrequenzparameter zwar richtungsweisend aber nicht signifikant verändert waren. Diese Veränderung könnte durch eine autonome Dysfunktion verursacht sein. Als Folge einer erhöhten linksventrikulären Wandspannung waren die Serum BNP Spiegel gesteigert (10; 11). Während eine lineare Korrelation zwischen linksventrikulärer enddiastolischer Wandspannung und BNP beobachtet wurde, wurden die höchsten linksventrikulären Wandspannungen bei Patienten mit stark reduziertem SDNN ($< 75\text{ ms}$) beobachtet. Ein Anstieg von BNP fördert die Lipidmobilisation aus dem Fettgewebe, steigert den Spiegel nicht veresterter Fettsäuren und könnte daher insgesamt einen Beitrag zur Insulinresistenz liefern (17). Wenn gleichzeitig die Synthese nicht gesteigert wird, würde man eine Verminderung insbesondere von DHA erwarten, welches nur in geringer Menge aus 18:3n-3 synthetisiert wird (83). Ob ein erhöhtes BNP in direktem Zusammenhang mit veränderten Fettsäurespiegeln steht, erfordert weitere Untersuchungen.

In der vorliegenden Studie basiert die Wandspannungsberechnung auf Echokardiographiedaten, die verglichen mit MRT-Volumendaten hohe Wandspannungswerte unterschätzt (10). Dies könnte die Beobachtung erklären, dass DHA erst bei hoher enddiastolischer Wandspannung signifikant reduziert war. Da die kardiale Dilatation sehr wahrscheinlich mit einer Sympathikusaktivierung assoziiert ist (7; 8), ergeben sich mehrere Einflüsse auf den Fettsäurestoffwechsel. Der Fettsäureumsatz könnte erhöht sein, was bei einer nicht gesteigerten Syntheserate zu einem reduzierten Spiegel vor allem von hoch ungesättigten Fettsäuren führt. Insbesondere die Phospholipase A₂ könnte aktiviert werden, die bevorzugt mehrfach ungesättigte Fettsäuren von der mittleren (sn-2) Position der Phospholipide freisetzt, welche anschließend verstoffwechselt werden können. Auch dieser Mechanismus könnte zur Reduktion von EPA, DHA und Arachidonsäure beitragen.

5.5 Veränderung der Fettsäuredesaturasen bei gesteigerter Sympathikusaktivität

Veränderte neuroendokrine Einflüsse, die mit einer erhöhten Sympathikusaktivität und Insulinresistenz/Hyperinsulinämie assoziiert sind, könnten zu Expressions- oder Aktivitätsveränderungen vor allem von Desaturasen führen (Abbildung 25 und 26). Bei den Patienten der unteren LVEF Tertile war das 20:4n-6/20:3n-6 Verhältnis reduziert und es kann auf eine verminderte Δ 5-Desaturase Aktivität (Abbildung 25 C) geschlossen werden. Keine Veränderungen wurden bei den Verhältnissen 18:3n-6/18:2n-6 (Δ 6-Desaturase) und 16:1/16:0 (Δ 9-Desaturase) (Abbildung 25 A,B) beobachtet. Da 16:0 gesteigert war und da diese Fettsäure ein direktes Produkt der Fettsäuresynthese ist (Abbildung 2), könnte auf eine gesteigerte Fettsäuresynthese in der Leber geschlossen werden. Vermutlich ist die Leber bei DCM Patienten von der Insulinresistenz (103; 124) nicht betroffen.

Eine Konsequenz des veränderten Fettsäureprofils bei dilatativer Herzinsuffizienz ist, dass es zu einer Abnahme von Fettsäuren mit mehreren Doppelbindungen und einer im Vergleich zu gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren stark abgewinkelten Konformation kommt (Abbildung 27).

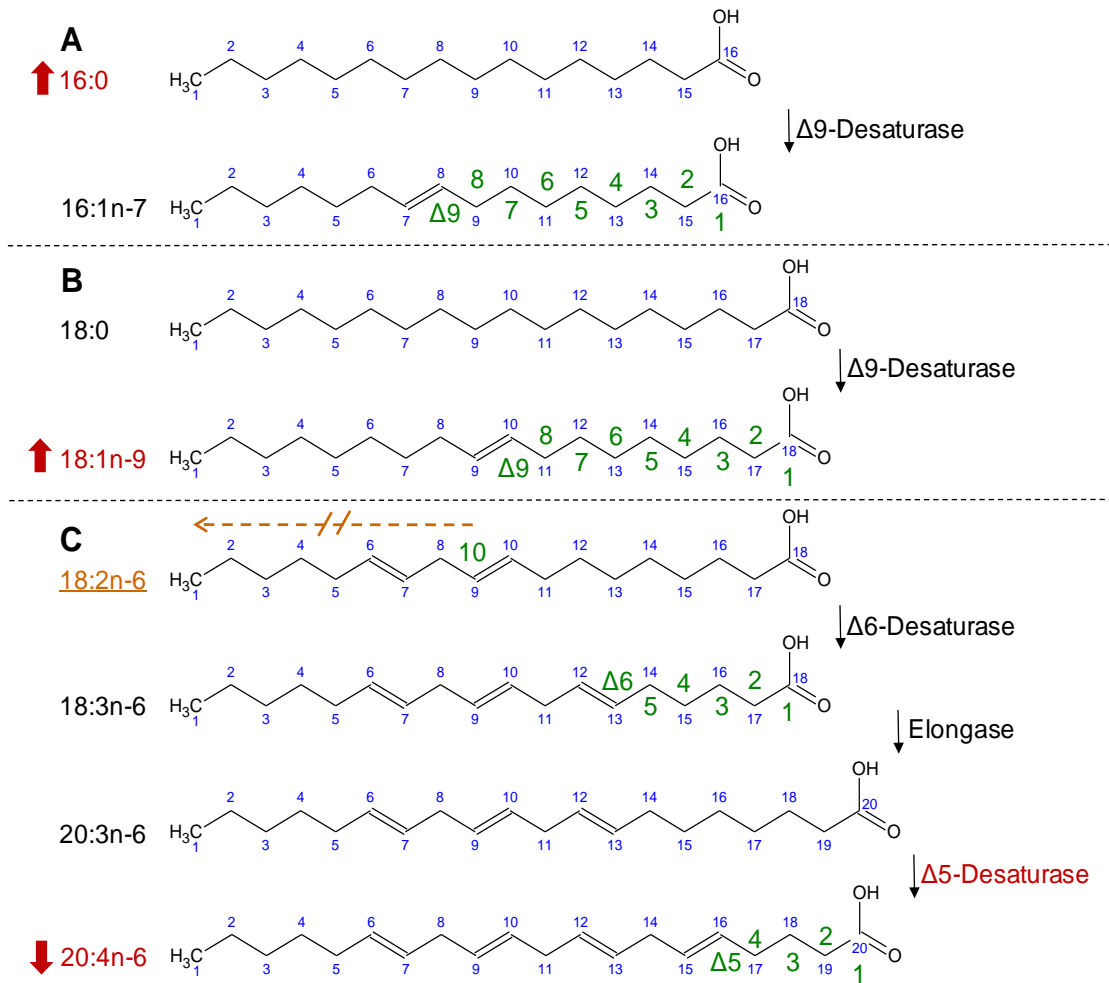


Abbildung 25. Synthese (A) der einfach ungesättigten 16:1n-7 (Palmitoleinsäure), (B) der einfach ungesättigten 18:1n-9 (Ölsäure) und (C) mehrfach ungesättigter n-6 Fettsäuren. Die Veränderungen bei Patienten mit LVEF ≤ 25% sind rot dargestellt. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome in blau folgt der n-Nomenklatur, die beim Methylende beginnt. Die Benennung der Desaturasen folgt der Nomenklatur, die am Carboxylende beginnt (in grün). Da der Mensch und Säugetiere keine Doppelbindung nach C10 (unterbrochener Pfeil nach links) einführen können, ist Linolsäure (18:2n-6, unterstrichen) eine essentielle Fettsäure.

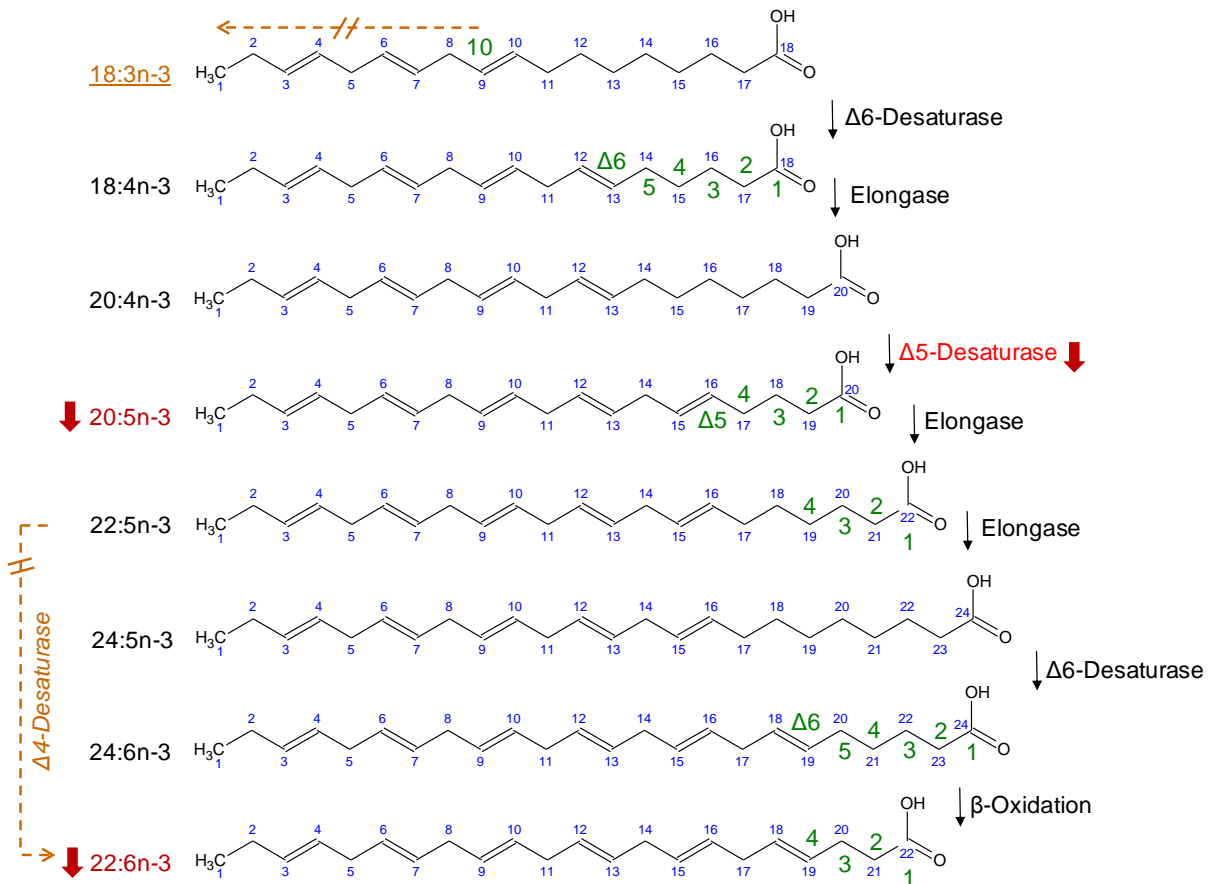


Abbildung 26. Synthese hoch ungesättigter n-3 Fettsäuren. Die Veränderungen bei Patienten mit LVEF $\leq 25\%$ sind rot markiert. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome in blau folgt der n-Nomenklatur, die beim Methylende beginnt. Die Benennung der Desaturasen folgt der Nomenklatur, die am Carboxylende beginnt (in grün). Da der Mensch und Säugetiere keine Doppelbindung nach C10 (unterbrochener Pfeil nach links) einfügen können, ist α -Linolensäure (18:3n-3, unterstrichen) eine essentielle Fettsäure. Eine direkte Umwandlung von 22:5n-3 in 22:6n-3 durch eine $\Delta 4$ -Desaturase findet nicht statt (unterbrochener Pfeil nach unten).

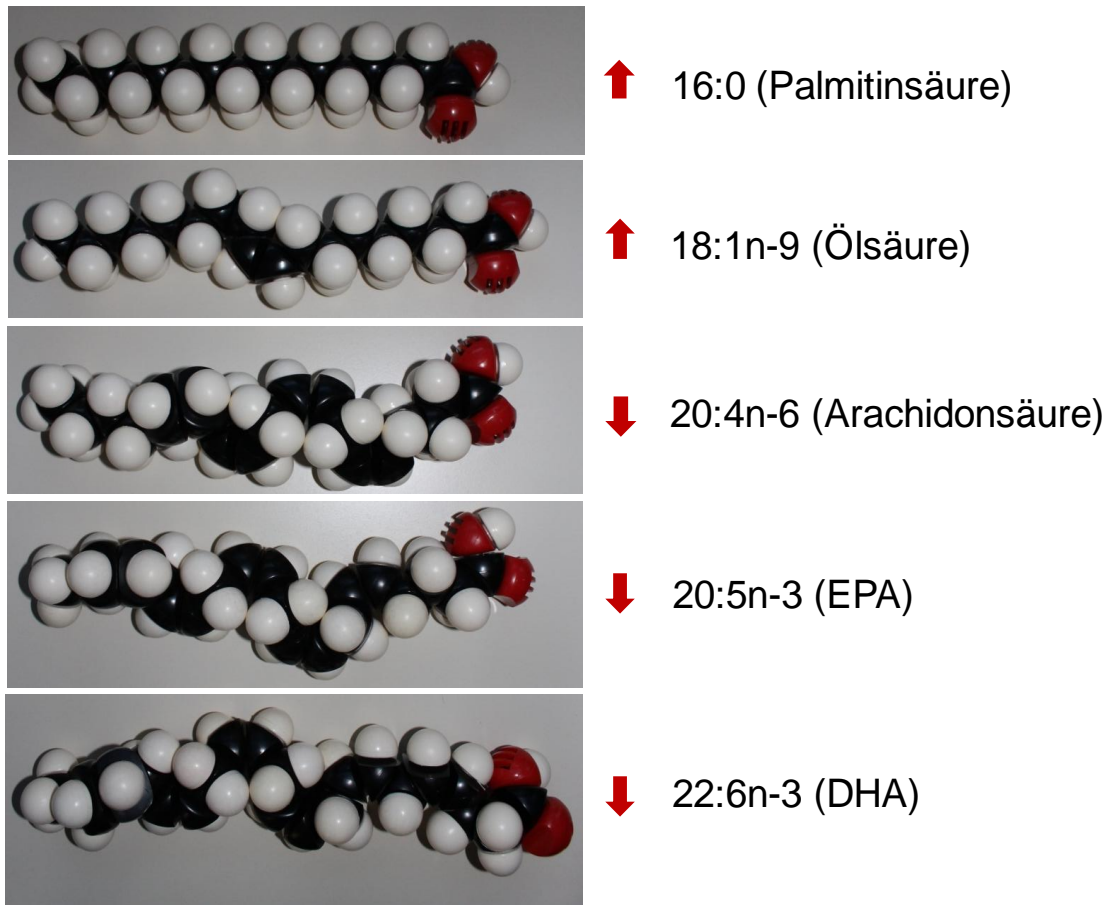


Abbildung 27. Die CPK Atommodelle verdeutlichen, dass cis-Doppelbindungen zu einer abgewinkelten Struktur führen. Ein Teil der biologischen Wirkung von hoch ungesättigten Fettsäuren wird auf diese sterischen Effekte unter anderem in Membranen zurückgeführt. Ein „HUFA Mangel“ bei dilatativer Herzinsuffizienz führt einer relativen Abnahme von Fettsäuren mit einer abgewinkelten Konformation. Die roten Pfeile markieren signifikante Veränderungen in Serumfettsäuren bei dilatativer Herzinsuffizienz.

5.6 Nicht insuffiziente kardiale Druckbelastung bei DOCA-Salz Ratten

Um Mechanismen aufzuklären, die zu einer Abnahme von hoch ungesättigten und Zunahme von gesättigten und einfach gesättigten Fettsäuren führen, wurden Ratten mit einer kardialen Druckbelastung untersucht. Die DOCA-Salz Hypertonie bei uninephrektomierten Ratten wurde gewählt, da diese mit nur einer moderaten linksventrikulären Hypertrophie, aber einem ungünstigen Remodeling der extrazellulären Matrix wie der Fibrose (60) assoziiert ist, ähnlich wie bei DCM Patienten (19). Es war ein überraschendes Ergebnis, dass DHA im Serum gesteigert war. Da die dilatative Herzinsuffizienz mit einer Sympathikusaktivierung und Insulinresistenz einhergeht (103; 124), verabreichten wir den DOCA-Salz Ratten Futter mit 24% Fett und 32%

Saccharose, das einen Anstieg der Sympathikusaktivität verursachen und mit metabolischen Veränderungen wie Hyperinsulinämie und Insulinresistenz assoziiert sein kann (89; 99; 100). EPA und DHA waren vermindert, während 16:0 und 18:1n-9 gesteigert waren. Im Vergleich zu Kontrollratten war aber DHA nicht reduziert und Arachidonsäure war auch nicht verändert. Dieses Experiment legt daher nahe, dass bei Patienten mit stark eingeschränkter Pumpfunktion eine gesteigerte Sympathikusaktivität oder Insulinresistenz einen Beitrag zu den inversen Korrelationen der mehrfach und einfach ungesättigten Fettsäuren liefert.

Das Argument, dass alleinig die Fütterung von Kokosnussfett schon einen großen Einfluss auf das Fettsäureprofil hat, wurde bereits in einer Studie widerlegt, die zeigte, dass die Zufütterung von 10% Kokosnussfett die kardiale Fettsäurezusammensetzung nicht signifikant verändert (98).

5.7 α -Linolensäure als Ausgangsfettsäure von EPA und DHA

Da α -Linolensäure (18:3n-3) die Vorstufe von EPA und DHA ist, wird häufig empfohlen, diese in Pflanzen vorkommende essentielle Fettsäure in größeren Mengen mit der Nahrung aufzunehmen, wobei man aber berücksichtigen muss, dass der α -Linolensäure Gehalt in Pflanzenölen stark variiert: ca. 57% in Perilla Öl, ca. 56% in Leinöl, ca. 8% in Rapsöl, ca. 7% in Walnussöl, ca. 1% in Olivenöl und ca. 0,5% in Sonnenblumenöl (95). Im Rattenversuch wurde gezeigt, dass eine Zufütterung von Leinöl zwar den Spiegel von α -Linolensäure in der Aorta steigert, nicht aber den Spiegel von EPA und DHA (96). Hingegen reduzierte eine erhöhte Aufnahme von α -Linolensäure geringfügig den Arachidonsäurespiegel und steigerte die Prostazyklin Produktion, die über das stabile Abbauprodukt $\text{PGF}_{1\alpha}$ bestimmt wurde. Da Prostazyklin die Plättchenaggregation hemmt und eine Reihe zytoprotektiver Wirkungen besitzt, ist davon auszugehen, dass α -Linolensäure über diesen Weg zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion führt.

Bei Personen mit einer hohen Aufnahme gesättigter Fettsäuren zeigte sich, dass die Umbaurate von α -Linolensäure bei 6% für EPA und 3,8% für DHA liegt (36). Hingegen war bei einer Ernährung mit mehrfach n-6 ungesättigten Fettsäuren der Umbau um 40 - 50% reduziert. Bei Frauen im gebärfähigen Alter wurde im Vergleich zu gleichaltrigen Männern ein erhöhter Umbau von α -Linolensäure in EPA (21%) und DHA (9%) gefunden (21). Die höhere Synthesekapazität scheint wichtig zu sein, um die Bedürfnisse des Fetus und Neugeborenen während der Schwangerschaft und Stillzeit decken zu können. Für die Sekundärprävention des Myokardinfarktes kann α -Linolensäure aber nicht in der Menge zu EPA und DHA umgesetzt werden, die in der GISSI Prevenzione Studie (38) verabreicht wurde. Auch wenn die Konversionsrate von EPA aus α -Linolensäure generell eher niedrig ist (83) und in der vorliegenden Arbeit DHA nicht signifikant mit α -Linolensäure korreliert war, könnte die

Verabreichung von α -Linolensäure zur Steigerung der endogenen EPA und DHA Synthese trotzdem von Bedeutung sein (58). Dabei muss auch bedacht werden, dass die Verabreichung von α -Linolensäure nicht in allen Organen zu erhöhten EPA und DHA Spiegel führt (88). Hinsichtlich der bei den Patienten reduzierten Arachidonsäurespiegel stellt sich die Frage, ob sie vollständig durch EPA ersetzt werden sollte, vor allem da nicht alle aus Arachidonsäure stammenden Eikosanoide pro-inflammatorische Wirkungen haben (22). In diesem Zusammenhang ist auch von Bedeutung, dass verabreichtes DHA in EPA konvertiert werden kann (120).

5.8 Anti-arrhythmogene Effekte hoch ungesättigter Fettsäuren

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass 1g Omacor[®]/Tag den EPA+DHA Spiegel im Vollblut gesunder Probanden von 3,5% auf 5,7% erhöht. Besitzt dieser Anstieg eine protektive Wirkung, wie aus epidemiologischen Studien in Bevölkerungen mit einem unterschiedlichen EPA und DHA Blutgehalt gefolgert werden kann (Abbildung 28)? Kann dieser Anstieg teilweise die Befunde der GISSI Prevenzione (38) und GISSI-HF (37) Studie erklären? Die Studien von Albert et al. (3) und Siscovick et al. (106) zeigen eine deutliche Risikoreduktion des plötzlichen Herztodes bei Personen, die ungefähr 3% mehr EPA+DHA als Personen der Quartile mit dem niedrigsten EPA+DHA Spiegel haben. Offenbar ist 6% EPA+DHA ein Zielspiegel zur Prävention des plötzlichen Herztodes. Dieser Zielspiegel würde auch mit den vorliegenden Daten übereinstimmen, die zeigen, dass 1g Omacor[®]/Tag den EPA+DHA Spiegel von 3,5% auf 5,7% steigert. Die 1g Omacor[®]/Tag Dosis ist die gleiche Dosis wie die der GISSI Prevenzione Studie (38), in der das Risiko der Gesamtmortalität, der kardiovaskulären Mortalität und des plötzlichen Herztodes reduziert war. Ebenfalls war in der Physicians' Health Studie der Vollblutspiegel der langkettigen n-3 Fettsäuren negativ mit dem Risiko des plötzlichen Herztodes assoziiert (3). Verglichen mit Männern, deren Vollblutspiegel von langkettigen mehrfach ungesättigten n-3 Fettsäuren in der untersten Quartile (2,12-4,32%) lag, war das relative Risiko des plötzlichen Herztodes signifikant geringer bei Männern mit Spiegeln in der dritten (5,20-6,07%; angepasstes relatives Risiko: 0,19) und der vierten Quartile (6,08-10,2%; angepasstes relatives Risiko: 0,10). Die Studie von Siscovick et al. (106) zeigte eine Risikoreduktion des primären Herzstillstandes bei einer Erhöhung der EPA+DHA Spiegel. Verglichen mit dem EPA+DHA Spiegel in Erythrozyten von 3,3% (Mittelwert der untersten Quartile) war der Spiegel von 5,0 % (Mittelwert der dritten Quartile) mit einer 75%igen Risikoreduktion des primären Herzstillstandes assoziiert. Basierend auf der Physicians' Health Studie, der Studie von Siskovick et al. und den vorliegenden Daten bezüglich des EPA+DHA Spiegels nach 1g Omacor[®]/Tag, kann die Risikoreduktion des plötzlichen Todes, wie sie in der GISSI Prevenzione Studie beobachtet wurde, durch eine Zunahme des EPA+DHA Spiegels auf bis zu ungefähr 6% erklärt werden. Eine

Zunahme auf 10,3% EPA+DHA durch Verabreichung von 4g Omacor[®]/Tag hatte keinen weiteren signifikanten Einfluss auf die Prognose von kardialen Ereignissen trotz signifikanter Triglyzeridsenkung (75; 76). Diese interessante Studie von Nilsen et al. wurde allerdings in Norwegen durchgeführt, wo der EPA+DHA Ausgangswert höher ist als in Ländern mit weniger Fischkonsum, einschließlich bei den von uns untersuchten Probanden. Hieraus könnte man folgern, dass ein hoher EPA+DHA Spiegel von 8-10% zur Prävention des plötzlichen Herztodes nicht erforderlich ist.

In einer kürzlich erschienenen Studie (77) mit Patienten mit DCM wurde eine Dosis von 5g Omacor[®]/Tag über einen Monat und anschließend 2g/Tag über 11 Monate verabreicht. Der EPA+DHA Plasmaspiegel stieg von $1.76 \pm 0.50\%$ auf $4.31 \pm 0.83\%$, die linksventrikuläre systolische Funktion wurde verbessert und LVEDD reduziert. Dabei bleibt jedoch offen, ob der EPA+DHA Spiegel vor und nach der Verabreichung vom Schweregrad der kardialen Dysfunktion und der ventrikulären Geometrie abhing und ob die Herzfunktion dadurch verbessert wurde, dass 2g anstatt 1g/Tag verabreicht wurden. Es sollte daher bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz untersucht werden, inwieweit EPA und DHA nach Kompensation eines HUFA Mangels die Herzfunktion weiter verbessern können. Weitere Arbeiten sind vor allem notwendig um zu klären, warum bei Patienten mit relativ guter Pumpfunktion und mit in der Mehrheit nicht vorhandenem HUFA Mangel die Verabreichung von EPA und DHA wesentliche klinische Endpunkte anscheinend nicht verbesserte (16; 52; 85). Es sollte auch geprüft werden, in welchem Ausmaß der Schutz, der mit einem bestimmten EPA+DHA Spiegel assoziiert ist, durch die Pathophysiologie schwerer Arrhythmieerkrankungen beeinflusst wird. So könnte man erwarten, dass es Unterschiede in der klinischen Wirksamkeit bei Patienten mit Reentry-Tachyarrhythmien ohne schwere ischämische Ereignisse und bei Patienten mit Tachyarrhythmien nach Myokardinfarkt mit Sympathikusaktivierung und Freisetzung von EPA und DHA aus Membranen gibt. Auch sollte geprüft werden, inwieweit EPA und DHA beim Menschen unterschiedliche anti-arrhythmogene Wirkungen haben. So beobachtete McLennan bei Ratten, dass bei niedriger Dosierung (<0,5% in der Nahrung) nur DHA aber nicht EPA Ischämie-induzierte kardiale Arrhythmien hemmt (68).

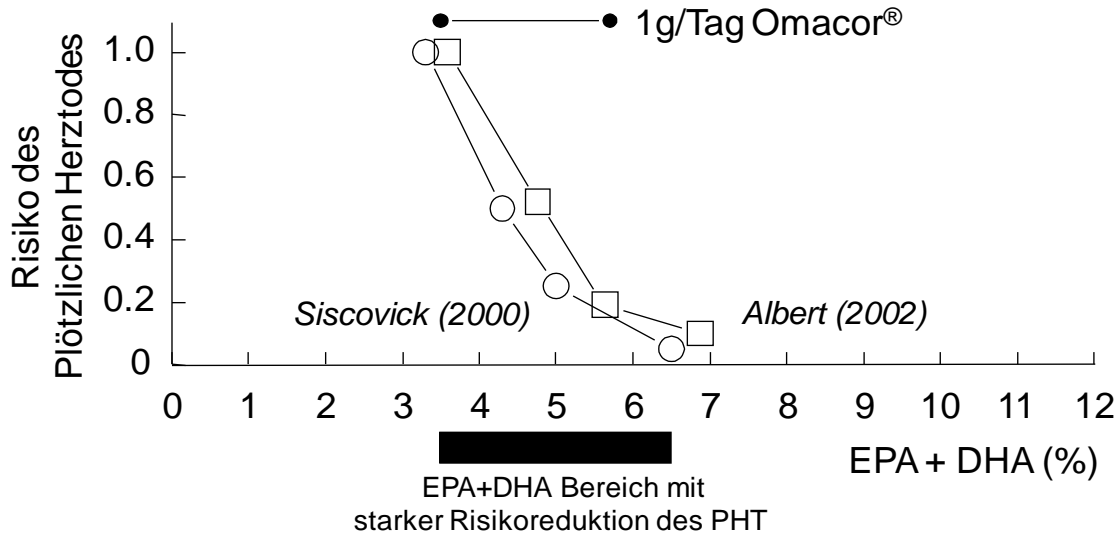


Abbildung 28. Risiko des plötzlichen Herztodes (PHT) bezogen auf den EPA+DHA Spiegel und Steigerung von EPA+DHA durch 1g Omacor®/Tag. Die EPA+DHA Spiegel von Albert et al. (3) in Vollblut und von Siscovick et al. (106) in Erythrozyten wurden vergleichend aufgetragen (95).

5.9 n-3 Fettsäuren und Standardmedikation bei eingeschränkter Herzfunktion

Von besonderem Interesse ist bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung ein Vergleich der Risikoreduktion durch n-3 Fettsäuren mit bereits etablierten Interventionen. In einer Metaanalyse von 97 Studien mit 137.140 Personen in der antilipidämischen Interventionsgruppe und 138.976 Personen in der Kontrollgruppe waren verglichen mit der Kontrollgruppe die Risikoverhältnisse für die Gesamtmortalität 0,87 für Statine, 1,00 für Fibrate, 0,84 für Austauschharze, 0,96 für Niacin, 0,77 für n-3 Fettsäuren und 0,97 für die Ernährung (113). Das Mortalitätsrisiko war jedoch lediglich durch Statine und n-3 Fettsäuren signifikant reduziert. Diese Metaanalyse schloss vermutliche Effekte von α -Linolensäure mit ein, weshalb angenommen wurde, dass ein Hauptbeitrag von EPA und DHA stammt. Aus primären und sekundären Präventionsstudien wurde gefolgert, dass der „Omega-3 Index“ (EPA+DHA in Erythrozyten) ein neuartiger, physiologisch relevanter, leicht modifizierbarer, unabhängiger und klassifizierbarer Risikofaktor für den tödlichen Ausgang der koronaren Herzkrankheit ist und einen bedeutenden klinischen Nutzen haben könnte (42). Angesichts der gegenwärtigen Evidenz wurde empfohlen, die Bestimmung des Fettsäureprofils in die Liste der zu untersuchenden Parameter aufzunehmen, insbesondere bei Patienten nach Myokardinfarkt. Da lediglich ca. 20 μ l Vollblut zur Bestimmung eines Profils von mehr als 35 Fettsäuren benötigt werden, würde nur selten eine zusätzliche Blutentnahme erforderlich sein. Durch Kontrollen des EPA+DHA Spiegels könnten

Patienten identifiziert werden, die ein erhöhtes Risiko des plötzlichen Herztodes unabhängig von ihrer vorliegenden Erkrankung haben. Von besonderer Bedeutung wäre die Bestimmung bei Patienten mit einer reduzierten LVEF, da diese eine noch größere Risikoreduktion nach Verabreichung von 1g Omacor[®]/Tag aufweisen (38). Weiterhin kann ein angestrebter EPA+DHA Blutspiegel im zeitlichen Verlauf überwacht werden.

5.10 Unterschiede in n-3 Fettsäurepräparaten

Fettsäuren mit mehreren Doppelbindungen werden in Gegenwart von Sauerstoff leicht oxidiert. Es entstehen dabei primär instabile und sekundär stabile Oxidationsprodukte. Zu den primären Oxidationsprodukten zählen Hydroperoxide und andere Peroxide, die zu oxidativem Stress im Körper führen. Zu den sekundären Oxidationsprodukten zählen Aldehyde, Ketone, Alkohole, Furane und Alkane. Für die in der vorliegenden Arbeit gestellte Fragestellung, in welchem Umfang EPA und DHA im Blut durch eine orale Zufuhr gesteigert werden kann, standen mehrere Präparate als Nahrungsergänzungsmittel zur Auswahl. Omacor[®] weist im Gegensatz zu Fischölen sehr niedrige Spiegel von oxidativen Abbauprodukten auf. Dies ist für 1-Penten-3-ol und 2-Ethylfuran gezeigt (Abbildung 29). Für 1-Penten-3-ol sind die oxidativen Abbauewege von DHA bereits gut dokumentiert (55).

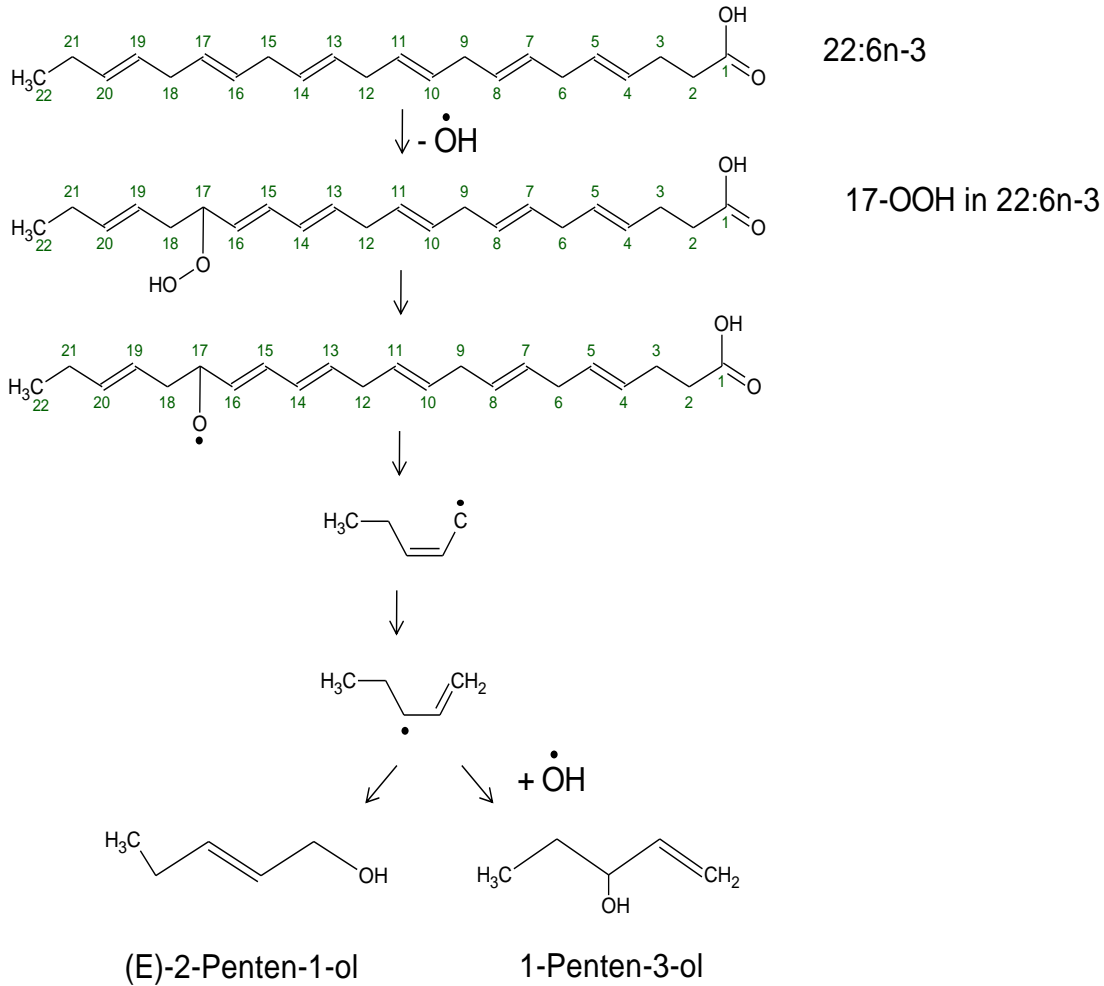


Abbildung 29. Autoxidation von DHA zu 1-Pentenol-3-ol (in der vorliegenden Arbeit mit GC/MS nachgewiesen) und (E)-2-Penten-1-ol (nach Lee H et al, 2003) (55).

5.11 Risikoarme Perikardpunktion und intraperikardiale Navigation

Das Ziel, ein Instrument zu entwickeln, um in einen Herzbeutel ohne Perikarderguss, wie beispielsweise bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz, zu gelangen, wurde bereits bei der Entwicklung des PerDUCERS[®] durch die Firma Comedicus Inc. verfolgt. Da das Perikard physiologischerweise nur wenige Millimeter vom darunterliegenden Epikard getrennt ist (20), ist der Zugang mit der Nadel nicht sicher. Deshalb wird ein Instrument benötigt, das vor der Punktion den Abstand von Perikard zu Epikard vergrößert, so dass man sicher in den lokal künstlich vergrößerten Herzbeutel gelangt. Dieses Verfahren wäre vor allem für weniger erfahrene Untersucher eine sichere Alternative zur Nadel bei der Ergussdrainage. Die Prozedur sollte weiterhin minimal invasiv sein, d.h. ohne

Lungendeflation und Vollnarkose und auch bei verdicktem, relativ steifem Perikard wie bei infektiösen Erkrankungen anwendbar sein.

Im US-Patent 6,162,195 wurde der benötigte tangentielle Zugang zum Herzen und die Anheftung des Perikards beschrieben (Abbildung 30). Dieses Instrument (PerDUCER[®]) wurde in zahlreichen Schweineversuchen erfolgreich eingesetzt. Bei Patienten mit Myoperikarditis und kleinem (132±49 ml) Perikarderguss (67) gelang der Zugang in den Herzbeutel aber nur bei 2 von 6 Personen. Die Gründe hierfür können vielfältig sein.

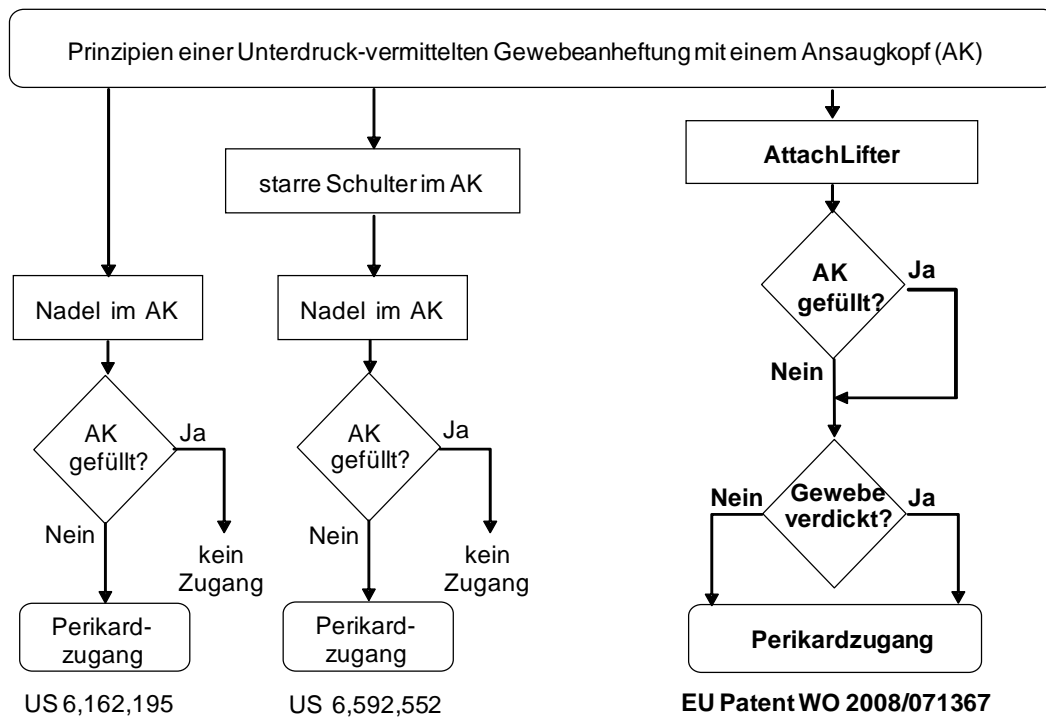


Abbildung 30. Unterschiede zwischen PerDUCER[®] (US 6,162,195; modifiziert in US 6,592,552) und AttachLifter (WO 2008/071367) hinsichtlich Perikardanheftung und Perikardpunktion.

Einerseits kann die Ursache darin liegen, dass der manuell mit einer Spritze erzeugte Unterdruck nicht ausreichend hoch war und eine unbemerkte kleine Leckage zur Ablösung des Perikards führte, andererseits kann das Perikard bei Patienten im Vergleich zu Schweinen lokal dicker sein, so dass der Ansaugkopf komplett mit Gewebe ausgefüllt war und somit die Nadel nur in das Gewebe und nicht in den außerhalb des Ansaugkopfes liegenden Herzbeutelraum gelangen konnte. Auch das Anbringen einer starren Schulter in der Ansaugöffnung (US Patent 6,592,552) kann unserer Meinung nach den Perikardzugang nicht erleichtern. Das Ausmaß der perikardialen Dicke kann lokal unterschiedlich sein und kann präinterventionell nur schwer

abgeschätzt werden (20).

Die potentiellen Anwendungsmöglichkeiten eines Instrumentes, das einen kontrollierten, sicheren intraperikardialen Zugang ermöglicht, sind vielfältig (68). Bei einem Perikarderguss könnte solch ein Instrument den Erguss drainieren und die Verabreichung von kardial wirksamen Medikamenten in hoher Dosis unter Umgehung des systemischen Kreislaufs und damit verbundener Nebenwirkungen ermöglichen. Im Gegensatz zum bisherigen Vorgehen mit der Tuohy-Nadel wäre das Risiko der Epi/Myokardverletzung deutlich reduziert. Wegen der fortgeschrittenen Diagnostikmöglichkeiten und Therapieoptionen würde heute bereits ein moderater Erguss eine klare Indikation zur Diagnostik sein, um eine zielgerichtete Therapie einleiten zu können. Auch könnten Präparate, die Stickstoffmonoxid freisetzen und bei Schweinen die Lumenverengung nach Koronarangioplastie reduzieren (14), mit dem Ziel einer Reduktion von Restenosen (US Patent 5,650,447) in den Herzbeutel instilliert werden. Eine peri-interventionelle Applikation von Stickstoffmonoxid-Donatoren könnte auch das Risiko des Auftretens des no-reflow Phänomens während einer PTCA verringern (51).

Ebenfalls könnten intraperikardial EPA und DHA verabreicht werden, um maligne Arrhythmien und die Infarktgröße zu reduzieren (127), oder es könnten verschiedenartige Stammzellen zur Myokardregeneration verwendet werden (90). Weiterhin könnte es ein Stand-by Gerät bei z.B. Ablationen sein, um bei der Komplikation einer Herzwandperforation mit Tamponadeentwicklung eine sichere Drainage durchzuführen.

Die Herzfunktion hängt in starkem Maße von der koordinierten Erregung der beiden Herzkammern ab. Im Falle von Leitungsstörungen werden Verfahren benötigt, mit denen asynchrone Bewegungen der beiden Ventrikel wieder synchronisiert werden können. Durch die Resynchronisationstherapie mit biventrikulärem Pacing bei Patienten mit Linksschenkelblock und Erregungsverzögerung kann die Herzfunktion verbessert werden (41). Die bisherigen Methoden umfassen einerseits einen interventionellen Zugang, andererseits einen offenen, chirurgischen Zugang. Die derzeitige Standardprozedur der interventionellen Implantation der Elektroden über den Koronarsinus muss sich jedoch an die anatomischen Gegebenheiten mit entsprechenden Einschränkungen halten. Hingegen handelt es sich bei der linksseitigen Thorakotomie, die zwar sehr gute Langzeitergebnisse der implantierten epikardialen Elektroden (63) vorweisen kann, um einen größeren offen chirurgischen Eingriff mit entsprechender Morbidität.

Laut Steinberg et al. (112) könnte der klinische Misserfolg des Koronarsinuszugangs, wenn alle Patienten mit primär nicht möglicher Implantation und Elektrodendysfunktion während des Follow-ups eingeschlossen werden, ca. 50% betragen. Auch aus diesem Grund wurde nach einer neuen Technik einer intraperikardialen Navigation zur Findung einer optimalen Funktionsverbesserung gesucht und der AttachGuider entwickelt, welcher nach entsprechender Weiterentwicklung für schätzungsweise mindestens 15-20% der Patienten mit nicht optimaler Koronarsinussonde für die epikardiale Elektrodenimplantation zum Einsatz kommen könnte. Auch könnte der AttachGuider eine gezieltere Führung von Ablationskathetern ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Im Serum von Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz war der Spiegel hoch ungesättigter Fettsäuren signifikant reduziert („HUFA Mangel“). N-3 und n-6 Fettsäuren waren negativ mit gesättigten und einfach ungesättigten (n-9 und n-7) Fettsäuren korreliert. Da keine oder nur schwache Korrelationen mit den Ausgangsfettsäuren α -Linolensäure und Linolsäure beobachtet wurden, wurden Einflüsse der eingeschränkten Herzfunktion untersucht. Bei der Kategorisierung der Patienten nach LVEDD war ein stark dilatierter linker Ventrikel (LVEDD 69-90 mm) mit einer signifikanten Abnahme der Serumspiegel von EPA, DHA und Arachidonsäure und einer Zunahme von 18:1n-9 assoziiert. DHA und Arachidonsäure waren ebenso bei Patienten mit dilatiertem linkem Vorhof reduziert. Ein DHA Serumspiegel $>1.24\%$ hatte bei einer Sensitivität von 84% einen negativ prädiktiven Wert von 91%, um eine starke Dilatation (LVEDD >70 mm) auszuschließen. Eine erhöhte enddiastolische Wandspannung (>4 kPa) war mit einer reduzierten Herzfrequenzvariabilität (SDNN) assoziiert. Da LVEDD von LVEF beeinflusst wird, wurden die Patienten auch nach Tertilen von LVEF stratifiziert. Eine erniedrigte LVEF (9-25% vs. 26-35%) war mit verringerten EPA, DHA und Arachidonsäurespiegeln und einer Zunahme von 16:0 und 18:1n-9 assoziiert.

Da eine erniedrigte DHA Konzentration auch nicht kardiale Ursachen haben kann, wurde eine Stratifizierung nach DHA vorgenommen. LVEDD und der linke Vorhofdurchmesser waren in der unteren und mittleren verglichen mit der oberen Tertile von DHA vergrößert. Während eine nicht zur Herzinsuffizienz führende Druckbelastung des Herzens diese Veränderungen nicht auslösen kann, könnten Sympathikusaktivierung und assoziierte metabolische Veränderungen wie Insulinresistenz und Hyperinsulinämie einen Beitrag liefern. Hierfür sprechen auch die Fettsäureänderungen bei druckbelastenden, nicht herzinsuffizienten DOCA-Salz Ratten, bei denen diätetisch eine Insulinresistenz ausgelöst wurde.

Die Reduktion von hoch ungesättigten Fettsäuren wird als ungünstig bei der Progression der Herzinsuffizienz eingestuft und es wird vorgeschlagen, die EPA und DHA Substitution als Therapieform vor allem bei dilatativer Herzinsuffizienz in einer klinischen Studie zu prüfen.

In Ergänzung zu den Fettsäureuntersuchungen bei Patienten mit dilatativer Herzinsuffizienz wurden neuartige Instrumente für den Zugang in den normalen Herzbeutel (AttachLifter) und die intraperikardiale Navigation (AttachGuider) mitentwickelt. Mit dem AttachLifter wird eine sichere Gabe von Medikamenten in den Herzbeutel ermöglicht, beispielsweise könnten intraperikardial verabreichte hochungesättigte n-3 Fettsäuren zukünftig als potentielle Antiarrhythmika angewendet werden und in der Herzinsuffizienztherapie von Nutzen sein. Für den AttachLifter wurde bereits das europäische Patent erteilt, die klinische Prüfung steht noch aus.

7 Abkürzungsverzeichnis

Δ , delta

AUC, area under curve

AK, Ansaugkopf

ANOVA, Varianzanalyse

ARVCM, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

BNP, brain natriuretic peptide

CI, chemische Ionisation

CRP, C-reaktives Protein

CRT, kardiale Resynchronisationstherapie

DCM, dilatative Kardiomyopathie

DHA, Docosahexaensäure

DOCA, Desoxycorticosteron-Acetat

EI, Elektronenstoßionisation

EKG, Elektrokardiogramm

EPA, Eicosapentaensäure

HCM, hypertrophe Kardiomyopathie

HUFA, highly unsaturated fatty acid, hoch ungesättigte Fettsäure (EPA, DHA, Arachidonsäure)

GC, Gaschromatograph

ICD, implantierbarer Cardioverter-Defibrillator

IVSD, intraventrikuläre diastolische Septumwanddicke

IVSS, intraventrikuläre systolische Septumwanddicke

LVEDD, linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser

LVESD, linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser

LV, linker Ventrikel

LVEF, linksventrikuläre Ejektionsfraktion

LVPWD, linksventrikuläre posteriore Wanddicke, enddiastolisch

LVPWS, linksventrikuläre posteriore Wanddicke, endsystolisch

MS, Massenspektrometer

MUFA, monounsaturated fatty acid, einfach ungesättigte Fettsäure

n, omega

NIST, National Institute of Standards and Technology

NYHA, New York Heart Association

PPAR α , Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- α

PUFA, polyunsaturated fatty acid, mehrfach ungesättigte Fettsäure

RCM, restriktive Kardiomyopathie

ROC, Receiver operating characteristics

RR, Zeit zwischen zwei RR-Zacken im EKG

RV, rechter Ventrikel

SDANN, Standardabweichung der Mittelwerte der NN-Intervalle aller 5 min Intervalle

SDNN, Standardabweichung der Intervalle zwischen normalen Sinusschlägen (NN-Intervalle)

SDNN-I, Mittelwert der Standardabweichungen der NN-Intervalle aller 5 min Intervalle

SDANN, Standardabweichung der Durchschnitte aller NN-Intervalle der 5 min-Abstände

SFA, saturated fatty acid, gesättigte Fettsäure

SPME, solid phase microextraction

VOCs, volatile organic compounds

8 Literaturnachweis

1. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 44: 672-673, 1980.
2. **al Makedessi S, Sweidan H & Jacob R.** n-3 versus n-6 fatty acid incorporation into the phospholipids of rat heart sarcolemma. A comparative study of four different oil diets. *J Mol Cell Cardiol* 26: 23-9, 1994.
3. **Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC & Ma J.** Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med* 346: 1113-1118, 2002.
4. **Albert CM, Ma J, Rifai N, Stampfer MJ & Ridker PM.** Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation* 105: 2595-2599, 2002.
5. **Alter P, Figiel JH, Rupp TP, Bachmann GF, Maisch B & Rominger MB.** MR, CT and PET imaging in pericardial disease. *Heart Fail Rev* in press.
6. **Alter P, Grimm W, Vollrath A, Czerny F & Maisch B.** Heart rate variability in patients with cardiac hypertrophy--relation to left ventricular mass and etiology. *Am Heart J* 151: 829-836, 2006.
7. **Alter P, Rupp H, Rominger MB, Czerny F, Vollrath A, Klose KJ & Maisch B.** A new method to assess ventricular wall stress in patients with heart failure and its relation to heart rate variability. *Int J Cardiol* 139: 301-3, 2010.
8. **Alter P, Rupp H, Rominger MB, Czerny F, Vollrath A, Klose KJ & Maisch B.** Depression of heart rate variability in patients with increased ventricular wall stress. *Pacing Clin Electrophysiol* 32 Suppl 1: S26-S31, 2009.
9. **Alter P, Rupp H, Rominger MB, Klose KJ & Maisch B.** A new methodological approach to assess cardiac work by pressure-volume and stress-length relations in patients with aortic valve stenosis and dilated cardiomyopathy. *Pflügers Arch* 455: 627-636, 2008.
10. **Alter P, Rupp H, Rominger MB, Vollrath A, Czerny F, Figiel JH, Adams P, Stoll F, Klose KJ & Maisch B.** B-type natriuretic peptide and wall stress in dilated human heart. *Mol Cell Biochem* 314: 179-191, 2008.
11. **Alter P, Rupp H, Rominger MB, Vollrath A, Czerny F, Klose KJ & Maisch B.** Relation of B-type natriuretic peptide to left ventricular wall stress as assessed by cardiac magnetic resonance imaging in patients with dilated cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol* 85: 790-799, 2007.
12. **Ander BP, Dupasquier CM, Prociuk MA & Pierce GN.** Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol* 8: 164-172, 2003.
13. **Antoni H, Bocker D & Eickhorn R.** Sodium current kinetics in intact rat papillary muscle: measurements with the loose-patch-clamp technique. *J Physiol* 406: 199-213, 1988.

14. **Baek SH, Hrabie JA, Keefer LK, Hou D, Fineberg N, Rhoades R & March KL.** Augmentation of intrapericardial nitric oxide level by a prolonged-release nitric oxide donor reduces luminal narrowing after porcine coronary angioplasty. *Circulation* 105: 2779-2784, 2002.
15. **Berger R, Huelsman M, Strecker K, Bojic A, Moser P, Stanek B & Pacher R.** B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation* 105: 2392-2397, 2002.
16. **Bianconi L, Calo L, Mennuni M, Santini L, Morosetti P, Azzolini P, Barbato G, Biscione F, Romano P & Santini M.** n-3 polyunsaturated fatty acids for the prevention of arrhythmia recurrence after electrical cardioversion of chronic persistent atrial fibrillation: a randomized, double-blind, multicentre study. *Europace* 13: 174-181, 2011.
17. **Birkenfeld AL, Boschmann M, Moro C, Adams F, Heusser K, Franke G, Berlan M, Luft FC, Lafontan M & Jordan J.** Lipid mobilization with physiological atrial natriuretic peptide concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3622-3628, 2005.
18. **Brandle M & Jacob R.** Effects of a diet rich in Omega-3 fatty acids on left ventricular geometry and dynamics in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 61: 177-181, 1990.
19. **Brilla CG, Rupp H & Maisch B.** Effects of ACE inhibition versus non-ACE inhibitor antihypertensive treatment on myocardial fibrosis in patients with arterial hypertension. Retrospective analysis of 120 patients with left ventricular endomyocardial biopsies. *Herz* 28: 744-753, 2003.
20. **Bull RK, Edwards PD & Dixon AK.** CT dimensions of the normal pericardium. *Br J Radiol* 71: 923-925, 1998.
21. **Burdge GC & Wootton SA.** Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr* 88: 411-420, 2002.
22. **Calder PC.** Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 91: 791-795, 2009.
23. **de Kam PJ, Nicolosi GL, Voors AA, van den Berg MP, Brouwer J, van Veldhuisen DJ, Barlera S, Maggioni AP, Giannuzzi P, Temporelli PL, Latini R & van Gilst WH.** Prediction of 6 months left ventricular dilatation after myocardial infarction in relation to cardiac morbidity and mortality. Application of a new dilatation model to GISSI-3 data. *Eur Heart J* 23: 536-542, 2002.
24. **de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P & Delaye J.** Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 343: 1454-1459, 1994.
25. **de Vreede-Swagemakers JJ, Gorgels AP, Dubois-Arbouw WI, van Ree JW, Daemen MJ, Houben LG & Wellens HJ.** Out-of-hospital cardiac arrest in the 1990's: a population-based study in the Maastricht area on incidence, characteristics and survival. *J Am Coll Cardiol* 30: 1500-1505, 1997.

26. **Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I & Reichek N.** Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 57: 450-458, 1986.
27. **Eickhorn R, Isensee H, Jacob R & Antoni H.** No obvious influence of dietary fatty acid intake on cardiac sodium current of the rat. *Pflügers Arch* 420 (suppl 1): 334, 1992.
28. **Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kuhl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L & Keren A.** Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 29: 270-276, 2008.
29. **Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PA, Zhang Z, Reddy JK, Spector AA & Wanders RJ.** Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 42: 1987-1995, 2001.
30. **Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957.
31. **Folmes CD & Lopaschuk GD.** Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. *Cardiovasc Res* 73: 278-287, 2007.
32. **Fragasso G, Spoladore R, Cuko A & Pallosi A.** Modulation of fatty acids oxidation in heart failure by selective pharmacological inhibition of 3-ketoacyl coenzyme-A thiolase. *Curr Clin Pharmacol* 2: 190-196, 2007.
33. **Franz MR, Cima R, Wang D, Profitt D & Kurz R.** Electrophysiological effects of myocardial stretch and mechanical determinants of stretch-activated arrhythmias. *Circulation* 86: 968-978, 1992.
34. **Fulk WK & Shorb MS.** Production of an artifact during methanolysis of lipids by boron trifluoride-methanol. *J Lipid Res* 11: 276-277, 1970.
35. **Gaudron P, Kugler I, Hu K, Bauer W, Eilles C & Ertl G.** Time course of cardiac structural, functional and electrical changes in asymptomatic patients after myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact. *J Am Coll Cardiol* 38: 33-40, 2001.
36. **Gerster H.** Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res* 68: 159-173, 1998.
37. **Gissi-Hf Investigators.** Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372: 1223-1230, 2008.
38. **GISSI-Prevenzione Investigators.** Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI- Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 354: 447-455, 1999.
39. **Goldberg IJ, Eckel RH & Abumrad NA.** Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res* 50 Suppl: S86-S90, 2009.

40. **Greenberg H, Case RB, Moss AJ, Brown MW, Carroll ER & Andrews ML.** Analysis of mortality events in the Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial (MADIT-II). *J Am Coll Cardiol* 43: 1459-1465, 2004.
41. **Grimm W, Christ M, Bach J, Muller HH & Maisch B.** Noninvasive arrhythmia risk stratification in idiopathic dilated cardiomyopathy: results of the Marburg Cardiomyopathy Study. *Circulation* 108: 2883-2891, 2003.
42. **Harris WS & von Schacky C.** The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med* 39: 212-220, 2004.
43. **Hazinski MF, Idris AH, Kerber RE, Epstein A, Atkins D, Tang W & Lurie K.** Lay rescuer automated external defibrillator ("public access defibrillation") programs: lessons learned from an international multicenter trial: advisory statement from the American Heart Association Emergency Cardiovascular Committee; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; and the Council on Clinical Cardiology. *Circulation* 111: 3336-3340, 2005.
44. **Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA & Erdmann E.** [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94: 488-509, 2005.
45. **Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schonian U & Maisch B.** The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz* 25: 279-285, 2000.
46. **Igarashi M, Ma K, Chang L, Bell JM & Rapoport SI.** Rat heart cannot synthesize docosahexaenoic acid from circulating alpha-linolenic acid because it lacks elongase-2. *J Lipid Res* 49: 1735-1745, 2008.
47. **Isensee H & Jacob R.** Differential effects of various oil diets on the risk of cardiac arrhythmias in rats. *J Cardiovasc Risk* 1: 353-359, 1994.
48. **Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Stewart JA, Jr., Murray DB & Chancey AL.** Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. *Cardiovasc Res* 69: 657-665, 2006.
49. **Johansson P, Wiltschi B, Kumari P, Kessler B, Vornrhein C, Vonck J, Oesterheld D & Grininger M.** Inhibition of the fungal fatty acid synthase type I multienzyme complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12803-12808, 2008.
50. **Kang JX, Xiao YF & Leaf A.** Free, long-chain, polyunsaturated fatty acids reduce membrane electrical excitability in neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3997-4001, 1995.
51. **Klein LW, Kern MJ, Berger P, Sanborn T, Block P, Babb J, Tommaso C, Hodgson JM & Feldman T.** Society of cardiac angiography and interventions: suggested management of the no-reflow phenomenon in the cardiac catheterization laboratory. *Catheter Cardiovasc Interv* 60: 194-201, 2003.

52. **Kowey PR, Reiffel JA, Ellenbogen KA, Naccarelli GV & Pratt CM.** Efficacy and safety of prescription omega-3 fatty acids for the prevention of recurrent symptomatic atrial fibrillation: a randomized controlled trial. *JAMA* 304: 2363-2372, 2010.
53. **Leaf A, Albert CM, Josephson M, Steinhaus D, Kluger J, Kang JX, Cox B, Zhang H & Schoenfeld D.** Prevention of fatal arrhythmias in high-risk subjects by fish oil n-3 fatty acid intake. *Circulation* 112: 2762-2768, 2005.
54. **Leaf A, Xiao YF, Kang JX & Billman GE.** Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Ther* 98: 355-377, 2003.
55. **Lee H, Kizito SA, Weese SJ, Craig-Schmidt MC, Lee Y, Wei C-I & An H.** Analysis of Headspace Volatile and Oxidized Volatile Compounds in DHA-enriched Fish Oil on Accelerated Oxidative Storage. *J Food Science* 68: 2169-2177, 2003.
56. **Lee K, Kerner J & Hoppel CL.** Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex. *J Biol Chem* 286: 25655-25662, 2011.
57. **Leibundgut M, Maier T, Jenni S & Ban N.** The multienzyme architecture of eukaryotic fatty acid synthases. *Curr Opin Struct Biol* 18: 714-725, 2008.
58. **Leyva DR, Zahradka P, Ramjiawan B, Guzman R, Aliani M & Pierce GN.** The effect of dietary flaxseed on improving symptoms of cardiovascular disease in patients with peripheral artery disease Rationale and design of the FLAX-PAD randomized controlled trial. *Contemp Clin Trials* 32: 724-30, 2011.
59. **Loboz-Grudzien K, Kowalska A, Brzezinska B, Sokalski L & Jaroch J.** Early predictors of adverse left ventricular remodelling after myocardial infarction treated by primary angioplasty. *Cardiol J* 14: 238-245, 2007.
60. **Loch D, Hoey A, Morisseau C, Hammock BO & Brown L.** Prevention of hypertension in DOCA-salt rats by an inhibitor of soluble epoxide hydrolase. *Cell Biochem Biophys* 47: 87-98, 2007.
61. **Lupu R & Menendez JA.** Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Curr Pharm Biotechnol* 7: 483-493, 2006.
62. **Macris MP & Igo SR.** Minimally invasive access of the normal pericardium: initial clinical experience with a novel device. *Clin Cardiol* 22: I36-I39, 1999.
63. **Mair H, Schütz A, Warncke K, Schmöckel M, Nollert G, Brömsen J & Reichart B.** Epicardial leads are superior to coronary sinus leads in biventricular pacing. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon* V220 (abstract): 2003.
64. **Maisch B, Noutsias M, Ruppert V, Richter A & Pankuweit S.** Cardiomyopathies: classification, diagnosis, and treatment. *Heart Fail Clin* 8: 53-78, 2012.
65. **Maisch B, Pankuweit S, Karatolios K & Ristic AD.** Invasive techniques--from diagnosis to treatment. *Rheumatology (Oxford)* 45 Suppl 4: iv32-iv38, 2006.

66. **Maisch B & Portig I.** Entzündliche Herzerkrankungen. In: *Innere Medizin - Classen/Diehl/Kochsiek*, edited by Berdel WE, Böhm M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K and Schmiegel W. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2004.
67. **Maisch B, Ristic AD, Rupp H & Spodick DH.** Pericardial access using the PerDUCER and flexible percutaneous pericardioscopy. *Am J Cardiol* 88: 1323-1326, 2001.
68. **Maisch B, Ristic AD, Seferovic PM & Tsang T.S.M.** *Interventional Pericardiology*. Springer, 2011.
69. **Maisch B, Seferovic PM, Ristic AD, Erbel R, Rienmuller R, Adler Y, Tomkowski WZ, Thiene G & Yacoub MH.** Guidelines on the diagnosis and management of pericardial diseases executive summary; The Task force on the diagnosis and management of pericardial diseases of the European society of cardiology. *Eur Heart J* 25: 587-610, 2004.
70. **Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE & Young JB.** Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-1816, 2006.
71. **Meves H.** Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br J Pharmacol* 155: 4-16, 2008.
72. **Michaud AL, Diau GY, Abril R & Brenna JT.** Double bond localization in minor homoallylic fatty acid methyl esters using acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 307: 348-360, 2002.
73. **Myers JL & Well AD.** *Research design and statistical analysis*. New York: Taylor & Francis Inc, 2002.
74. **Neubauer S.** The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 356: 1140-1151, 2007.
75. **Nilsen DW, Albrektsen G, Landmark K, Moen S, Aarmland T & Woie L.** Effects of a high-dose concentrate of n-3 fatty acids or corn oil introduced early after an acute myocardial infarction on serum triacylglycerol and HDL cholesterol. *Am J Clin Nutr* 74: 50-56, 2001.
76. **Nilsen DW & Harris WS.** n-3 Fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 79: 166, 2004.
77. **Nodari S, Triggiani M., Campia U, Manerba A, Milesi G, Cesana BM, Gheorghide M & Dei Cas L.** Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on left ventricular function and functional capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 57: 870-879, 2011.
78. **Oballa RM, Belair L, Black WC, Bleasby K, Chan CC, Desroches C, Du X, Gordon R, Guay J, Guiral S, Hafey MJ, Hamelin E, Huang Z, Kennedy B, Lachance N, Landry F, Li CS, Mancini J, Normandin D, Poci A, Powell DA, Ramtohol YK, Skorey K, Sorensen D, Sturkenboom W, Styhler A, Waddleton DM, Wang H, Wong S, Xu L & Zhang L.** Development of a liver-targeted stearoyl-CoA desaturase (SCD) inhibitor (MK-8245) to establish a therapeutic window for the treatment of diabetes and dyslipidemia. *J Med Chem* 54: 5082-5096, 2011.

79. **Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM & Olefsky JM.** GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142: 687-698, 2010.
80. **Ohkubo T, Jacob R & Rupp H.** Swimming changes vascular fatty acid composition and prostanoid generation of rats. *Am J Physiol* 262: R464-R471, 1992.
81. **Panchal AR, Stanley WC, Kerner J & Sabbah HN.** Beta-receptor blockade decreases carnitine palmitoyl transferase I activity in dogs with heart failure. *J Card Fail* 4: 121-126, 1998.
82. **Pankuweit S, Richter A, Ruppert V & Maisch B.** [Classification of cardiomyopathies and indication for endomyocardial biopsy revisited]. *Herz* 34: 55-62, 2009.
83. **Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA & Salem N, Jr.** Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res* 42: 1257-1265, 2001.
84. **Qin D, Zhang ZH, Caref EB, Boutjdir M, Jain P & el Sherif N.** Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res* 79: 461-473, 1996.
85. **Rauch B, Schiele R, Schneider S, Diller F, Victor N, Gohlke H, Gottwik M, Steinbeck G, Del Castillo U, Sack R, Worth H, Katus H, Spitzer W, Sabin G & Senges J.** OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction. *Circulation* 122: 2152-2159, 2010.
86. **Rhaleb NE, Peng H, Alfie ME, Shesely EG & Carretero OA.** Effect of ACE inhibitor on DOCA-salt- and aortic coarctation-induced hypertension in mice: do kinin B2 receptors play a role? *Hypertension* 33: 329-334, 1999.
87. **Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I & Nordet P.** Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-842, 1996.
88. **Rodriguez-Leyva D, Dupasquier CM, McCullough R & Pierce GN.** The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Can J Cardiol* 26: 489-496, 2010.
89. **Rupp H & Maisch B.** Radiotelemetric characterization of overweight-associated rises in blood pressure and heart rate. *Am J Physiol* 277: H1540-H1545, 1999.
90. **Rupp H, Rupp TP, Alter P, Jung N, Pankuweit S & Maisch B.** Intrapericardial procedures for cardiac regeneration by stem cells: need for minimal invasive access (AttachLifter) to the normal pericardial cavity. *Herz* 35: 458-465, 2010.
91. **Rupp H, Rupp TP, Alter P & Maisch B.** N-3 polyunsaturated fatty acids and statins in heart failure. *Lancet* 373: 378-379, 2009.
92. **Rupp H, Rupp TP, Alter P & Maisch B.** Inverse shift in serum polyunsaturated and monounsaturated fatty acids is associated with adverse dilatation of the heart. *Heart* 96: 595-598, 2010.

93. **Rupp H, Rupp TP, Alter P & Maisch B.** Mechanisms involved in the differential reduction of omega-3 and omega-6 highly unsaturated fatty acids by structural heart disease resulting in "HUFA deficiency". *Can J Physiol Pharmacol* 90: 55-73, 2012.
94. **Rupp H, Rupp TP & Maisch B.** Fatty acid oxidation inhibition with PPARalpha activation (FOXIB/PPARalpha) for normalizing gene expression in heart failure? *Cardiovasc Res* 66: 423-426, 2005.
95. **Rupp H, Rupp TP, Wagner D, Alter P & Maisch B.** Microdetermination of fatty acids by gas chromatography and cardiovascular risk stratification by the "EPA+DHA level". *Herz* 31 Suppl 3: 30-49, 2006.
96. **Rupp H, Turcani M, Ohkubo T, Maisch B & Brilla CG.** Dietary linolenic acid-mediated increase in vascular prostacyclin formation. *Mol Cell Biochem* 162: 59-64, 1996.
97. **Rupp H, Wagner D, Rupp T, Schulte LM & Maisch B.** Risk stratification by the "EPA+DHA level" and the "EPA/AA ratio" focus on anti-inflammatory and antiarrhythmogenic effects of long-chain omega-3 fatty acids. *Herz* 29: 673-685, 2004.
98. **Rupp H, Wahl R & Hansen M.** Influence of diet and carnitine palmitoyltransferase I inhibition on myosin and sarcoplasmic reticulum. *J Appl Physiol* 72: 352-360, 1992.
99. **Rupp H, Wahl R, Maisch B & Hansen M.** Characterization of sucrose-induced changes in cardiac phenotype. *Pflugers Arch* 445: 32-39, 2002.
100. **Samane S, Christon R, Dombrowski L, Turcotte S, Charrouf Z, Lavigne C, Levy E, Bachelard H, Amarouch H, Marette A & Haddad PS.** Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism* 58: 909-919, 2009.
101. **Sampath H & Ntambi JM.** The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1243: 47-53, 2011.
102. **Schrecengost JE, LeGallo RD, Boyd JC, Moons KG, Gonias SL, Rose CE, Jr. & Bruns DE.** Comparison of diagnostic accuracies in outpatients and hospitalized patients of D-dimer testing for the evaluation of suspected pulmonary embolism. *Clin Chem* 49: 1483-1490, 2003.
103. **Shah A & Shannon RP.** Insulin resistance in dilated cardiomyopathy. *Rev Cardiovasc Med* 4 Suppl 6: S50-S57, 2003.
104. **Siguel EN, Chee KM, Gong JX & Schaefer EJ.** Criteria for essential fatty acid deficiency in plasma as assessed by capillary column gas-liquid chromatography. *Clin Chem* 33: 1869-1873, 1987.
105. **Simopoulos AP.** The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 56: 365-379, 2002.
106. **Siscovick DS, Raghunathan TE, King I, Weinmann S, Wicklund KG, Albright J, Bovbjerg V, Arbogast P, Smith H, Kushi LH, Cobb LA, Copass MK, Psaty BM, Lemaitre R, Retzlaff B,**

- Childs M, & Knopp RH.** Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA* 274: 1363-1367, 1995.
107. **Sosa E & Scanavacca M.** Images in cardiovascular medicine. Percutaneous pericardial access for mapping and ablation of epicardial ventricular tachycardias. *Circulation* 115: e542-e544, 2007.
108. **Sprecher H.** An update on the pathways of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2: 135-138, 1999.
109. **Sprecher H, Luthria DL, Mohammed BS & Baykousheva SP.** Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 36: 2471-2477, 1995.
110. **Stanley WC, Recchia FA & Lopaschuk GD.** Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: 1093-1129, 2005.
111. **Stavarache C, Vinatoru M & Maeda Y.** Ultrasonic versus silent methylation of vegetable oils. *Ultrason Sonochem* 13: 401-407, 2006.
112. **Steinberg JS & Derose JJ.** The rationale for nontransvenous leads and cardiac resynchronization devices. *Pacing Clin Electrophysiol* 26: 2211-2212, 2003.
113. **Studer M, Briel M, Leimenstoll B, Glass TR & Bucher HC.** Effect of different antilipidemic agents and diets on mortality: a systematic review. *Arch Intern Med* 165: 725-730, 2005.
114. **Talavera K, Staes M, Janssens A, Droogmans G & Nilius B.** Mechanism of arachidonic acid modulation of the T-type Ca²⁺ channel alpha1G. *J Gen Physiol* 124: 225-238, 2004.
115. **Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology.** Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 93: 1043-1065, 1996.
116. **Turcani M & Rupp H.** Etomoxir improves left ventricular performance of pressure- overloaded rat heart. *Circulation* 96: 3681-3686, 1997.
117. **Tuunanen H, Engblom E, Naum A, Nagren K, Scheinin M, Hesse B, Juhani Airaksinen KE, Nuutila P, Iozzo P, Ukkonen H, Opie LH & Knuuti J.** Trimetazidine, a metabolic modulator, has cardiac and extracardiac benefits in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 118: 1250-1258, 2008.
118. **Ussher JR & Lopaschuk GD.** Targeting malonyl CoA inhibition of mitochondrial fatty acid uptake as an approach to treat cardiac ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 104: 203-210, 2009.
119. **Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M & Andersson A.** Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci* 967: 183-195, 2002.
120. **von Schacky C & Weber PC.** Metabolism and effects on platelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in humans. *J Clin Invest* 76: 2446-2450, 1985.
121. **Voss A, Reinhart M, Sankarappa S & Sprecher H.** The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem* 266: 19995-20000, 1991.

122. **Wanders RJ.** Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab* 83: 16-27, 2004.
123. **Wang Y, Botolin D, Christian B, Busik J, Xu J & Jump DB.** Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res* 46: 706-715, 2005.
124. **Witteles RM, Tang WH, Jamali AH, Chu JW, Reaven GM & Fowler MB.** Insulin resistance in idiopathic dilated cardiomyopathy: a possible etiologic link. *J Am Coll Cardiol* 44: 78-81, 2004.
125. **Wu M, Singh SB, Wang J, Chung CC, Salituro G, Karanam BV, Lee SH, Powles M, Ellsworth KP, Lassman ME, Miller C, Myers RW, Tota MR, Zhang BB & Li C.** Antidiabetic and antisteatotic effects of the selective fatty acid synthase (FAS) inhibitor platensimycin in mouse models of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5378-5383, 2011.
126. **Xiao YF, Sigg DC & Leaf A.** The antiarrhythmic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids: modulation of cardiac ion channels as a potential mechanism. *J Membr Biol* 206: 141-154, 2005.
127. **Xiao YF, Sigg DC, Ujhelyi MR, Wilhelm JJ, Richardson ES & Izzo PA.** Pericardial delivery of omega-3 fatty acid: a novel approach to reducing myocardial infarct sizes and arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2212-H2218, 2008.
128. **Zarain-Herzberg A & Rupp H.** Therapeutic potential of CPT I inhibitors: cardiac gene transcription as a target. *Expert Opin Investig Drugs* 11: 345-356, 2002.

9 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Alter, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bien, Boudriot, Cetin, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Eilers, Feuser, Gerdes, Görg, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Herrmann-Lingen, Hertl, Hilt, Jungclas, Kern, Kill, Klenk, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Lenz, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Oertel, Plant, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schrader, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Weiler, Werner, Westermann, Wulf.

10 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zur Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. B. Maisch** (Klinik für Innere Medizin - Schwerpunkt Kardiologie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg) für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Herrn Prof. Dr. H. Rupp** für die Bereitstellung der analytischen Verfahren (Gaschromatographie und GC/ Massenspektrometrie) und bei **Frau Daniela Wagner** (CTA) für die gaschromatographische Messung der Serum Fettsäuren aus den Blutproben der Patienten und Probanden und bei **Herrn Lars Kläning** für das Kooperationsprojekt DOCA-Salz Hypertonie bei Ratten.

Den **Probanden** möchte ich für die Bereitschaft der Einnahme von Omacor[®] als Nahrungsergänzungsmittel mit anschließender Blutentnahme meinen Dank aussprechen.

Den Technischen Werkstätten der Medizinischen Forschungseinheiten, insbesondere **Herrn E. Schüler** und **Herrn H. Schön**, danke ich für die technische Mitentwicklung der Instrumente AttachLifter und AttachGuider und für die Anordnung für die zeitliche Synchronisierung der Probeninjektion mit der Erfassung der Gaschromatographie-Daten. Herrn Prof. Dr. H. Rupp danke ich zudem für die Koordination bei der Herstellung des AttachLifters und AttachGuiders. **Herrn Dr. P. Stumpf**, TransMIT Gießen, gilt der Dank für die Möglichkeit bei der Abfassung der Patentanmeldungen mitwirken zu können.