

**Aus der Abteilung Anaesthesiologie
(Prof. Dr. med. M. Quintel)
im Zentrum Anaesthesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Einfluss des eNOS T-786C - Polymorphismus
auf Morbidität und Mortalität
kardiochirurgischer Patienten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christian Henker
aus Dresden
Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. J.-M. Hinz

2. Berichterstatter/in:

3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	<u>Stickstoffmonoxid (NO)</u>	1
1.1.1	<u>Das Molekül NO, seine Synthese und Abbau</u>	2
1.1.2	<u>NO-Wirkung und das Herz-Kreislaufsystem</u>	5
1.1.3	<u>NO und kardiochirurgische Eingriffe</u>	11
1.2	<u>Der T-786C – Polymorphismus</u>	16
1.3	<u>Zielsetzung</u>	21
2	<u>Material und Methoden</u>	22
2.1	<u>Studiendesign und Patientenkollektiv</u>	22
2.2	<u>Datensammlung und –definition</u>	22
2.2.1	<u>Allgemeine Patientendaten</u>	23
2.2.2	<u>Präoperative Daten</u>	24
2.2.3	<u>Intraoperative Daten</u>	26
2.2.4	<u>Postoperative-intensivmedizinische Überwachung</u>	27
2.3	<u>Genotypisierung</u>	30
2.3.1	<u>DNA-Isolierung</u>	31
2.3.2	<u>Polymerase-Kettenreaktion</u>	32
2.3.3	<u>Restriktionsverdau</u>	34
2.3.4	<u>Gelelektrophorese</u>	34
2.4	<u>Statistische Analyse</u>	35
3	<u>Ergebnisse</u>	37
3.1	<u>Genotypen- und Allelverteilung</u>	37
3.2	<u>Präoperative Daten</u>	37
3.3	<u>Intraoperative Daten</u>	38
3.4	<u>Postoperative Daten</u>	39
3.5	<u>Mortalität</u>	41
4	<u>Diskussion</u>	42
5	<u>Zusammenfassung</u>	51
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	54
7	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	73
8	<u>Tabellenverzeichnis</u>	74

Abkürzungsverzeichnis

ACVB	Aorto-koronarer Venen-Bypass
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Activator protein 1
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
BGA	Arterielle Blutgasanalyse
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Ca ²⁺	Kalzium
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Cardiac Index
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CPB	Kardiopulmonaler Bypass
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELWI	Extravasaler Lungenwasser-Index
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion
FRC	Funktionelle Residualkapazität
g	Erdbeschleunigung
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HOCM	Hypertrophe Obstruktive Kardiomyopathie
HZV	Herzzeitvolumen
IABP	Intraaortale Ballongegenpulsation
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ITBV	Intrathorakales Blutvolumen
kb	Kilobasen
KHK	Koronare Herzerkrankung
KLF2	Krüppel-like factor 2
LDL	Low-Density-Lipoprotein
MAP	Mittlerer Arterieller Druck

mRNA	Messenger RNA
N ₂	Distickstoff
NfκB	Nuclear factor κB
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO ₃ ⁻	Nitrat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-like 2
NTG	Nitroglycerin
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanionen
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PAP	Pulmonalarterieller Druck
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
pCO ₂	Partieller CO ₂ -Druck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCWP	Pulmonalarterienverschlussdruck
PEEP	Positiv-endexpiratorischer Druck
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PiCCO	Pulscontour Continuous Cardiac Output
pO ₂	Partieller O ₂ -Druck
PVRI	Pulmonaler Widerstand
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Sytem
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNOS	Reactive Nitrogen Oxide Species
RPA1	Replication Protein A1
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SNP	Single Nucleotide - Polymorphismus
SVI	Schlagvolumenindex
SVRI	Systemischer Widerstand
SVV	Schlagvolumenvariation
TIA	Transitorisch Ischämische Attacke
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
ZVD	Zentraler Venendruck

1 Einleitung

1.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Veränderungen des Blutgefäßsystems wie beispielsweise Atherosklerose und Endotheldysfunktionen stellen die häufigsten Ursachen kardiovaskulärer Erkrankungen dar – diese wiederum sind die häufigste Todesursache innerhalb der westlichen Industrienationen (Statistisches Bundesamt 2008). Dem Schutz der Blutgefäße gegen pathologische Einflüsse kommt daher eine immense Bedeutung zu. Die endotheliale Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) innerhalb des Gefäßendothels vermittelt einen solchen Schutzmechanismus und wirkt vasoprotektiv (Mueller et al. 2002, Tesanovic et al. 2010). Eine Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen geht mit einer verminderten Verfügbarkeit des endothelialen NO einher und begünstigt somit Störungen der Endothelintegrität.

Stickstoffmonoxid wurde erstmalig 1980 von Furchgott & Zawadzki beschrieben und zunächst noch unspezifisch als „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet (Furchgott und Zawadzki 1980). Sie bemerkten, dass der Zusatz von Acetylcholin bei isolierten Gefäßpräparaten zur Vasokonstriktion, in vivo dagegen zur Vasodilatation führt. Den Schlüssel zu dieser scheinbar paradoxen Reaktion fanden sie in der Tatsache, dass die innere Auskleidung der Präparate – das Endothel – mechanisch beschädigt war. Demnach musste das Endothel für die Vermittlung der Vasodilatation mitverantwortlich sein. Im weiteren Verlauf ihrer Experimente konnten sie schließlich den vermeintlichen Transmitter zwischen Endothel und der darunter liegenden Gefäßmuskulatur finden – EDRF.

Die genaue biochemische Identifikation des EDRF als NO gelang 1987 unabhängig voneinander durch Palmer et al. und Ignarro et al. (Ignarro et al. 1987; Palmer et al. 1987). Furchgott und Ignarro erhielten für Ihre Arbeiten zusammen mit Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin. Aufgrund seiner Beteiligung an einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie der Neurotransmission, der Blutdruckregulation, Relaxation der glatten Muskulatur und immunologischer Anpassungsreaktionen (Valko et al. 2007), wurde NO zum „Molekül des Jahres 1992“ gewählt (Culotta und Koshland 1992).

1.1.1 Das Molekül NO, seine Synthese und Abbau

Das Endothel kleidet als Grenzschicht das gesamte Gefäßsystem aus und steht somit in direktem Kontakt mit dem Blut und den darin zirkulierenden Zellen. Es verhindert nicht nur das Eindringen dieser Zellen in das umgebende Gewebe, vielmehr kontrolliert es den Blutfluß, die Plättchenaggregation und hat eine Reihe immunologischer und metabolischer Funktionen (Félétou 2011). Viele dieser Aufgaben und auch pathophysiologische Effekte werden durch NO vermittelt und spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und dem Fortschreiten von Gefäßerkrankungen.

Da NO ein gasförmiges freies Radikal ist und somit sehr reaktionsfreudig, muß sowohl der Ort, die Menge als auch der Zeitpunkt seiner Synthese genau kontrolliert werden (Kone et al. 2003). Erschwerend kommt hinzu, dass NO elektrisch neutral und hierdurch sowohl in Wasser als auch in Lipiden löslich ist. Es kann somit frei über Zellmembranen hinaus diffundieren (Chiueh 1999). Es besteht jedoch eine vorzugsweise Anreicherung innerhalb biologischer Membranen (Philippides et al. 2000). Ein essentieller Anteil dieser ist Cholesterin. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass ein erhöhter Cholesterinanteil die Diffusionsrate von NO verringert und auch den Grenzwert für die nachfolgende Aktivierung von Botenstoffen erhöht – die Aktivität von NO also insgesamt verringert wird (Miersch et al. 2008). NO entsteht substratspezifisch aus der halbessentiellen Aminosäure L-Arginin durch enzymatische Umwandlung durch die NO-Synthase (NOS) (Palmer et al. 1988; Schmidt et al. 1988). Wichtige Kofaktoren dieser Reaktionsschritte sind Tetrahydrobiopterin (BH_4) und NADPH/H^+ (Leone et al. 1991; Tayeh und Marletta 1989). Es existieren insgesamt drei Isoformen von NO-Synthasen, alle mit einer gemeinsamen Grundstruktur: nNOS, iNOS und eNOS.

Die erste Isoform der NO-Synthasen wurde aus dem Kleinhirn von Ratten und Schweinen isoliert und dementsprechend als neuronale NOS (nNOS) oder NOS I benannt (Bredt et al. 1990; Garthwaite et al. 1988). Trotz des erstmaligen Nachweises von NO innerhalb des Endothels, ist diese erste Isolierung einer neuronalen Manifestation nicht weiter verwunderlich: NO spielt im Nervensystem ebenfalls eine gewichtige Rolle und wird darüber hinaus unter physiologischen Bedingungen in circa 20mal höheren Leveln produziert, als innerhalb des Blutkreislaufs (Salter et al. 1991, Kunz et al. 2007). Die zweite NO-Synthase, die isoliert und später kloniert werden konnte, wurde in Makrophagen gefunden. Da sie durch proinflammatorische Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide aktiviert wird, das heißt nicht konstitutiv, wurde sie

induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS II) genannt. Diese Induktion bewirkt eine Umsatzrate von L-Arginin zu NO, die um das 10- bis 100fache höher ist, als die der konstitutiven NO-Synthasen; die iNOS weist eine so genannte „high-output“-Kinetik auf (Nathan und Hibbs 1991). Dieser „high-output“ produziert NO in toxischen Mengen und bleibt über Tage hinweg konstant – eine wichtige physiologische Rolle in der Abwehr von Bakterien, Parasiten und Neoplasien, aber auch pathophysiologisch bei der Entstehung der Atherosklerose (Liew und Cox 1991, Hofseth et al. 2003).

Als letzte Isoform wurde die endotheliale NOS isoliert und charakterisiert (eNOS oder NOS III). Diese wird wie auch die nNOS konstitutiv exprimiert und beide sind Kalzium- (Ca^{2+}) und damit auch Calmodulin-abhängig (Bredt und Snyder 1990). Innerhalb eines Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes gebunden, führt eine steigende Ca^{2+} -Konzentration zu einer aktivierenden Konformationsänderung der Synthasen und NO wird nun innerhalb seiner physiologischen „low-output“-Kinetik produziert (Forstermann et al. 1991; Schmidt et al. 1992). Die für die eNOS-Aktivität nötige Ca^{2+} -Freisetzung innerhalb des Endothels kann zum einen durch Agonisten wie Acetylcholin und Bradykinin geschehen, andererseits auch durch mechanische Einflüsse. Im inaktiven Zustand ist die eNOS innerhalb der Membran durch Caveolin-1 verankert (Félétou 2011). Agonisten binden nun an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor an der Zellmembran, welcher nachfolgend die Freisetzung von Ca^{2+} ermöglicht. Entsprechend wird Calmodulin aktiviert, bindet an die eNOS, welche aus den Caveolae freigesetzt wird und NO synthetisiert. Diese Agonisten-bedingte rezeptorgekoppelte NO-Freisetzung über ein second-messenger-System (Dinerman et al. 1993) und die damit verbundene Vasodilatation wurde, wie bereits Eingangs erwähnt, von Furchgott und Zawadzki beobachtet. Eine andere und die wohl wichtigste endogene Möglichkeit der eNOS-Aktivierung stellt die mechanische Belastung des Endothels durch Scherkräfte („shear-stress“) dar. Durch diesen „shear-stress“ wird ebenfalls intrazelluläres Ca^{2+} und die eNOS aus den Caveolae freigesetzt, anschließend phosphoryliert und nach Bindung mit dem notwendigen Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex aktiviert (Cheng et al. 2005; Lamontagne et al. 1992; Rizzo et al. 1998). NO wird nachfolgend synthetisiert und es kommt zur Vasodilatation. Diese Art der eNOS-Aktivierung spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus und damit der Gewebepfusion: sie ermöglicht es dem Endothel, sich selbst vor einer mechanischen Überbelastung zu schützen und gleichzeitig die Perfusion der nachfolgenden Gefäßabschnitte anzupassen. Neben dieser kurzfristigen Distribution erfolgt eine längerfristige und äußerst

differenzierte Anpassung des Endothels an den Blutfluß. Dies geschieht über die Transkription verschiedenster Gene und post-transkriptioneller Modifikationen (siehe nachfolgendes Kapitel).

Der Abbau von NO erfolgt durch Diffusion in das umgebende Gewebe, vor allem in das Lumen und die dort befindlichen Erythrozyten hinein. Diese erfolgt entlang eines gerichteten Konzentrationsgradienten und verkürzt die biologische Halbwertszeit des NO deutlich (Butler et al. 1998). Der eigentliche Abbau innerhalb der Erythrozyten erfolgt durch die Bindung von NO mit der Hämgruppe des Oxy-Hämoglobins (HbO_2); es entsteht ohne enzymatische Katalyse Nitrat (NO_3^-) und Met-Hämoglobin (Hakim et al. 1996; Joshi et al. 2002). NO reagiert aber auch mit Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zu Peroxynitrit (ONOO^-), einem sogenannten „reactive nitrogen oxide species“ (RNOS). Begünstigt wird dies durch den ebenfalls lipophilen Sauerstoff, welcher sich innerhalb von Membranen anreichert (Miller und Sandoval 1999). Diese RNOS üben oxidativen Stress aus und können zur Nitration von Molekülen führen. Vor allem das Peroxynitrit vermittelt die pathophysiologischen Effekte des NO. Erhöhte Konzentrationen von Peroxynitrit wurden bereits bei einer Vielzahl an Krankheiten, wie dem Morbus Alzheimer, der rheumatoiden Arthritis oder der Atherosklerose beobachtet (Squadrito und Pryor 1998, Flammer et al. 2008).

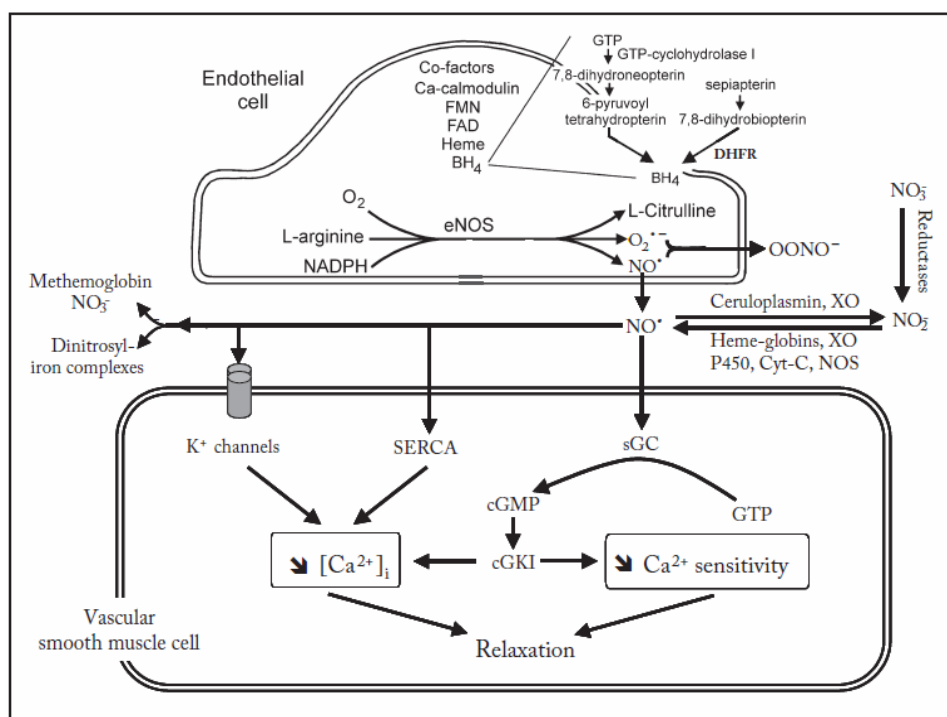


Abbildung 1: Schematische Darstellung der NO-Synthese und Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur (modifiziert nach Félétou 2011, S. 45).

1.1.2 NO-Wirkung und das Herz-Kreislaufsystem

Wie bereits zu Beginn erwähnt, weist NO eine starke Diskrepanz zwischen reinem Botenstoff und potentem Toxin auf. Eine Erklärung liefern die zwei möglichen Reaktionen abhängig von Konzentration und Reaktionspartnern des NO; diese lassen sich in direkte und indirekte - Radikal-vermittelte – Effekte untergliedern.

Direkte Effekte werden durch sehr schnelle Reaktionen mit Häm-Proteinen bei geringen NO-Konzentrationen ($< 1 \mu\text{M}$) vermittelt. Hier wirkt NO neben seiner Funktion als Transmitter vor allem antioxidativ und zellprotektiv im Rahmen seiner „low-output“-Kinetik (Wink und Mitchell 1998). Diese direkte Interaktion geschieht nicht nur mit Oxy-Hämoglobin beim Abbau von NO, sondern auch mit dem wohl wichtigsten Reaktionspartner zur Vermittlung der vasodilatativen und damit vasoprotektiven Eigenschaften des NO, der Guanylatzyklase: NO führt hierbei zur Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase („soluble guanylyl cyclase“, sGC) der glatten Gefäßmuskelzelle durch Konformationsänderung. Die sGC steigert damit ihre Aktivität um das 400-fache und führt zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) (Stone und Marletta 1995). Das entstandene cGMP hat die Funktion eines „second messenger“ und vermittelt die nachfolgende Vasodilatation in den glatten Gefäßmuskelzellen, aber auch die Hemmung der Plättchenaggregation durch verringerte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel (Mueller et al. 2002). Aber nicht nur die Funktion der Thrombozyten wird gehemmt, vielmehr kommt es auch zu deren verringerten Adhäsion an den Gefäßwänden, einer geringeren Vernetzung der Plättchen untereinander und zur Hemmung weiteren Rekrutierens von Thrombozyten (Freedman et al. 1997, Lubos et al. 2009) – NO wirkt hierdurch protektiv auf das Endothel und verhindert somit Thrombosen, Myokardinfarkte und Schlaganfälle. NO hemmt außerdem die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Murad 1997), einer Schlüsselsituation der Gefäßverengung bei KHK und Restenosen nach perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA) (Schwartz 1997), bei der es durch Migration und Proliferation zu einer intimalen Hyperplasie kommen kann. Des Weiteren verhindert NO durch seine direkten antioxidativen Eigenschaften die Oxidation von „Low-Density Lipoproteinen“ (LDL) und die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel; beides initiale Schritte der Entstehung atherosklerotischer Plaques (Khan et al. 1996, Kubes et al. 1991, Lubos et al. 2009).

Eine Plaqueruptur und die nachfolgende Thrombose sind für circa 70% aller Myokardinfarkte verantwortlich (Naghavi et al. 2003). Des weiteren dient NO als Neurotransmitter (Wood und Garthwaite 1994) und wirkt autoregulatorisch-hemmend auf die NO-Synthase selbst im Sinne einer „feedback“-Hemmung (Vickroy und Malphurs 1995).

Indirekte Effekte werden über „reactive nitrogen oxide species“ (RNOS) vermittelt. Diese Reaktionen können nur unter hohen lokalen NO-Konzentrationen ($> 1 \mu\text{M}$), die über einen längeren Zeitraum vorliegen, stattfinden. Diese stark alterierten NO-Mengen werden vor allem während entzündlicher oder ischämischer Prozesse durch die iNOS synthetisiert, aber auch innerhalb des Endothels (Kunz et al. 2010, Wink et al. 2001). Dann kann sich die Formation von Peroxynitrit um das 15.000-fache innerhalb von Membranen erhöhen (Miller und Sandoval 1999). Kommt es zur Bildung von Peroxynitrit, so entstehen im Verlauf Intermediate die zur Oxidation oder Nitration verschiedenster Mikro- und Makromoleküle führen können. Es konnte gezeigt werden, dass durch diese Reaktionen beispielsweise das LDL modifiziert werden kann und es somit schneller zu Bildung atherosklerotischer Plaques und Endotheldysfunktionen kommt (Torres-Rasgado et al. 2007). NO moduliert außerdem über indirekte Effekte die Chemotaxis und Interaktion des Endothels mit proinflammatorischen Zellen (Boger et al. 1996, Lubos et al. 2009), ebenfalls ein initial wichtiger Schritt der atherosklerotischen Pathogenese. Andere Reaktionen des Peroxynitrit führen zum Verlust des Häms aus dem Hämoglobin-Protein. Diese toxische Reaktion spielt eine wichtige Rolle während der so genannten „reperfusion injury“: Nachdem der Blutfluss für einen gewissen Zeitraum zum Stillstand kam, beispielsweise nach einem Schlaganfall oder während eines kardiochirurgischen Eingriffes, herrscht kurzzeitig ein Mangel an Sauerstoff und anderen nutritiven Stoffen. Kommt es anschließend nach der Ischämie zur Reperfusion der betroffenen Gebiete, so führt dies zunächst zu Inflammation und oxidativem Stress – ebenfalls begünstigt durch das ischämisch-bedingt entstehende desoxygenierte Hb. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass Peroxynitrit die Apoptose von Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatter Gefäßmuskulatur beschleunigt und irreversible Schäden innerhalb der mitochondrialen Atmungskette verurascht (Pacher et al. 2007).

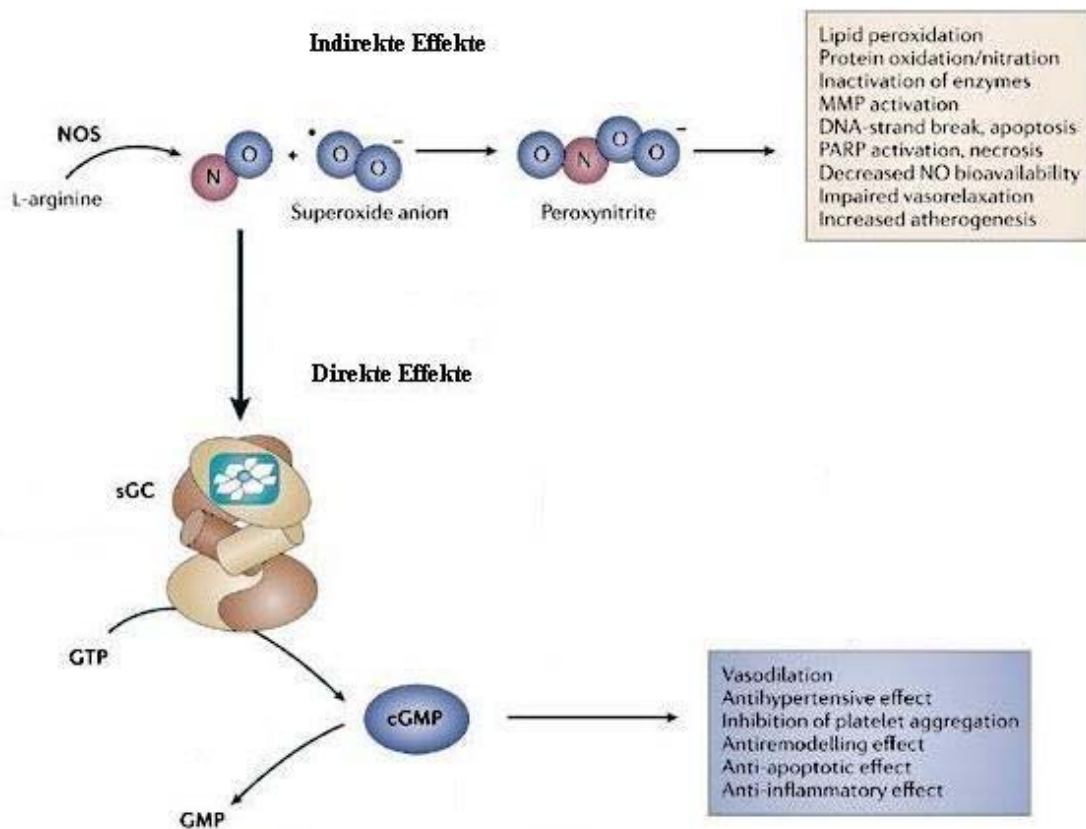


Abbildung 2: Schematische Darstellung der direkten und indirekten NO-Effekte. MMP = Matrix Metalloproteinases, PARP = Poly(ADP-ribose) Polymerase (Modifiziert nach Evgenov et al. 2006, S. 23).

Die wichtige regulierende Bedeutung des NO innerhalb des kardiovaskulären Systems wird durch eine Vielzahl an Zielzellen ermöglicht. Wie bereits erwähnt, spielt vor allem die NO-vermittelte Vasodilatation eine große Rolle innerhalb der physiologischen Autoregulation des gesamten Gefäßsystems. NO wird hierbei kontinuierlich durch das Endothel produziert und freigesetzt. Weitere Distribution von NO zur kurzfristigen Anpassung der Gefäßweite über dieses basale Level hinaus kann sowohl Rezeptor-abhängig als auch –unabhängig erfolgen. Agonisten- und damit Rezeptor-gebundene Stoffe sind beispielsweise Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Adenosin, ADP/ATP, Histamin, Prostacyclin und Thrombin. Eine Rezeptorun-gebundene Aktivierung der eNOS erfolgt über den bereits erwähnten „shear stress“. Sowohl die Genexpression als auch die eigentliche Aktivität der eNOS werden hierbei gesteigert (Chatzizisis et al. 2007). Zur langfristige Distribution durch eine Neusynthese der eNOS besitzt das eNOS-Gen verschiedene Bindungsstellen innerhalb seiner Promotorregion für Transkriptionsfaktoren, die zur Synthese der eNOS bei erhöhter mechanischer

Belastung führen (Nishida et al. 1992; Resnick et al. 1993). Die Aktivierung dieser Promotorelemente erfolgt durch die Transkriptionsfaktoren „Krüppel-like factor 2“ (KLF2) und „nuclear factor erythroid 2-like 2“ (Nrf2) (Boon und Horrevoets 2009). Die eNOS-Synthase ist aber nicht das einzige Gen, welches unter bestimmten „shear stress“ vermehrt exprimiert wird. Es konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Vielzahl an Genen identifiziert werden, welche anti-inflammatorisch und anti-thrombotisch wirken und durch entsprechende Stimuli aktiviert werden (García-Cardena et al. 2001). 70 % dieser spezifischen „gen sets“ werden durch KLF2 und Nrf2 reguliert (Boon und Horrevoets 2009). Das Endothel reagiert jedoch sehr spezifisch auf unterschiedlichen „shear stress“. Diese Erkenntnis ist der Tatsache geschuldet, dass atherosklerotische Läsionen und Plaques sich nur innerhalb bestimmter Gefäßabschnitte bilden. Innerhalb gerade Gefäßabschnitte mit hohem und langanhaltendem (>24 Stunden) „shear stress“, das heißt einem laminarem Fluß ohne Turbulenzen, entstehen diese Läsionen nicht oder nur sehr gering ausgeprägt (Pan 2009). Innerhalb dieser Abschnitte wird vermehrt NO gebildet, Prostaglandin I₂ (PGI₂) sezerniert – einem starken Inaktivator der Gerinnungskaskade (Herschman 1999) - und viele protektive Gene transkribiert und Faktoren freigesetzt.

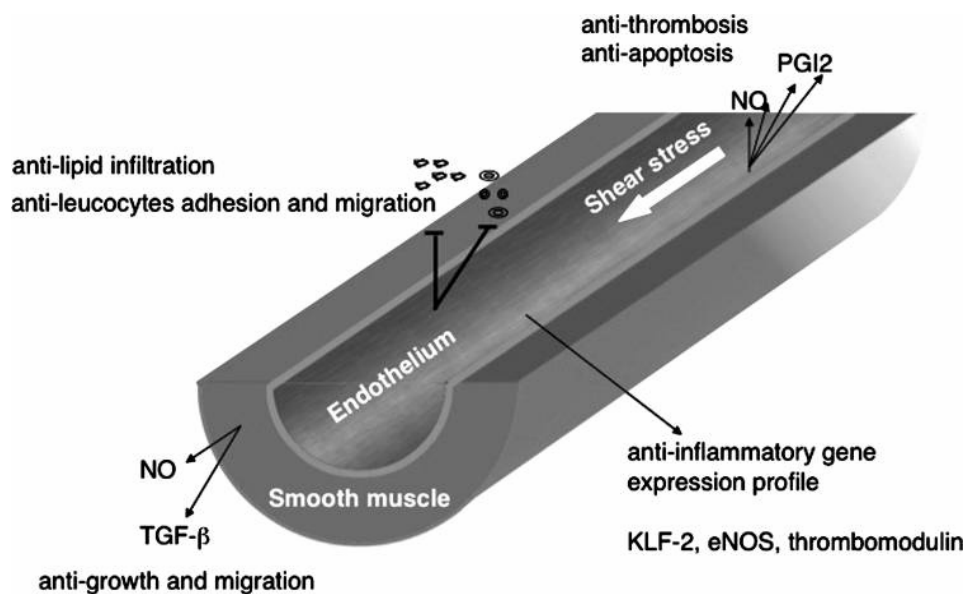


Abbildung 3: Molekulare Mechanismen der Atherosklerose-protektiven Effekte des laminaren „shear stress“. TGF-β = Transforming growth factor β (modifiziert nach Pan 2009, S. 1671).

Zusätzlich zum aus dem Endothel in die Umgebung diffundierenden NO werden also nicht nur eine Vielzahl anderer Faktoren und Gene genutzt um eine Atherosklerose zu verhindern, wie die gesteigerte Transkription der eNOS. Es werden auch gezielt bestimmte Genexpressionen herunterreguliert, insgesamt sogar mehr als aktiviert

werden (García-Cardena et al. 2001). Beispielsweise wird gezielt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen gehemmt, welche durch inflammatorische Reize sonst in die Intima des Gefäßes immigrieren, das Gefäß stenosieren und weitere Entzündungsprozesse einleiten - beides kritische Schritte zur Entstehung atherosklerotischer Plaques. Ebenso gehemmt wird die Expression von Adhäsionsmolekülen welche oxidiertes LDL und Leukozyten in die Gefäßwände migrieren lassen (Pan 2009). Dies geschieht teilweise direkt durch die lokale Wirkung von NO, als auch durch die genannten Transkriptionsfaktoren. Aber nicht nur die Transkription des eNOS- und anderer Gene wird dem „shear stress“ angepasst. Es findet auch eine posttranskriptionelle Regulation über die Stabilität und das Prozessieren der eNOS-mRNA statt (Searles 2006). So erhöht laminarer „shear stress“ nicht nur die Transkription der eNOS, sondern auch die Stabilität der entstandenen mRNA. Die ohnehin relativ lange Halbwertszeit dieser von 10 – 35 Stunden wird nochmals verlängert und ermöglicht es dem Endothel gezielt auf verschiedenste Stimuli zu reagieren (Searles 2006).

Geringere und kurze (< 24 Stunden) endotheliale Scherkräfte und turbulente oder oszillierende Strömungen in der Nähe von Gefäßbifurkationen führen zu gegenteiligen Reaktionen: In diesen Gebieten kommt es zu einer verringerten Bioverfügbarkeit von NO und das Endothel reagiert pro-inflammatorisch und pro-thrombotisch. Diese Strömungsveränderungen werden beispielsweise durch spezielle Zell-Zellverbindungen detektiert (Tzima et al. 2005) und die Transkriptionsfaktoren „activator protein 1“ (AP-1) und „nuclear factor κ B“ (NF κ B) aktiviert (Lan et al. 1994). Durch diese wird die Expression des eNOS-Gens gedrosselt und somit das verfügbare NO langfristig verringert. Dies führt zu einer ebenfalls verminderten Produktion an Prostazyklinen, da NO als Aktivator der COX dient, welche die ebenfalls vasodilatierenden Prostazykline generiert. Es entwickelt sich in diesen Bereichen eine Endotheldysfunktion mit mangelhafter Autoregulation und weiteren pathologischen Folgen. So erhöht sich die Permeabilität des Endothels für oxidiertes LDL und es entstehen durch nachfolgende Migration von Makrophagen und weiteren Entzündungszellen Präkursorformen atherosklerotischer Plaques. Ähnlich den unter laminarem „shear stress“ aktivierten „gen sets“ reagiert das Endothel ebenso spezifisch auf oszillierende oder verlangsamte Strömungen mit der Steigerung und Hemmung bestimmter Genexpressionen. Auch hierbei spielt die posttranskriptionelle Regulation eine Rolle, da beispielsweise die Hypercholesterinämie, oxidiertes LDL oder Hypoxien die Stabilität der eNOS-mRNA

zusätzlich verringern (Searles 2006). Hierdurch können Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose die notwendige Endotheldysfunktion auslösen. In einer klinischen Studie konnte dies gezeigt werden; durch Nikotinabusus, arteriellen Hypertonus, Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus wurde die basale NO-Freisetzung verringert (Quyyumi et al. 1995).

Condition	Expressed genes	Up-regulated genes	Down-regulated genes
Laminar/static	2,684 (23.6%)	65 (0.57%)	140 (1.23%)
Turbulent/static	2,419 (21.2%)	12 (0.11%)	74 (0.65%)
Turbulent/laminar	2,445 (21.5%)	68 (0.6%)	32 (0.28%)

Of 14,836 total array elements on the array set, there were 13,325 unique clones and 11,397 unique genes. Of these genes, 52.3% were named and 47.7% were expressed sequence tags. Percentages in the table are expressed as percent of unique genes.

Abbildung 4: Vergleich der *in vitro* durch verschiedene biomechanische Stimulie (laminare vs. statische, turbulente vs. statische und turbulente vs. laminare Strömung) veränderte Genexpression (modifiziert nach García-Cardena et al. 2001, S. 4479).

Eine weitere sehr wichtige NO-Funktion innerhalb des Kreislaufs ist die Inhibition der Blutgerinnung. NO verhindert nicht nur, synergistisch mit Prostazyklin, direkt die Aggregation von Thrombozyten über die Aktivierung des sGC der Plättchen, NO verhindert außerdem deren Adhäsion am Endothel und deren weiteres Rekrutieren. Atherosklerotische Veränderungen können zu einer Hyperreaktivität von Thrombozyten führen, was nachfolgend Thrombosen und Embolien verursachen kann. Sowohl die Vasoreaktivität als auch die Blutstillung und deren Pathophysiologien spielen somit eine lebenswichtige Rolle innerhalb der vaskulären Homöostase. Das Endothel dient darüber hinaus auch als Hypoxie-Sensor des Kreislaufs. Mitochondrien exprimieren eine eigene NO-Synthase, welche über die Menge des produzierten NO die mitochondriale Atmungskette und ATP-Produktion regulieren kann. NO konkurriert hierbei mit O₂ um dessen Bindungsstelle an der Zytochromoxidase der Atmungskette. Sinkt nun der O₂-Druck ab, so überwiegt nicht nur das kompetitiv hemmende NO und senkt den O₂-Verbrauch der Zelle, es wird außerdem noch Adenosin freigesetzt, welches wiederum die zytosolische NO-Aktivität steigert und zur Vasodilatation und besseren Perfusion des Gewebes führt (Edmunds et al. 2003). Ein weiterer Mechanismus zur lokalen Vasodilatation als Reaktion auf Hypoxien ist die Freisetzung von NO aus Erythrozyten. Die enzymatische Bildung des NO ist hierbei an die O₂-Sättigung des Hämoglobin der Erythrozyten gebunden - sinkt diese bei drohender Gewebehypoxie, steigt die NO-

Synthese (Crawford et al. 2006). NO dient über die Reduktion der Atmungsketten-Aktivität also nicht nur als Hypoxie-Sensor, es senkt darüber hinaus auch den O₂-Verbrauch von Kardiomyozyten. Eine weitere Reduktion des benötigten O₂ erfolgt über die Senkung der Herzfrequenz und myokardiale Relaxation (Fukuda et al. 2008).

1.1.3 NO und kardiochirurgische Eingriffe

Während kardiochirurgischer Eingriffe am offenen Herzen werden der Kreislauf und die Blutoxygenierung mit Hilfe eines kardiopulmonalen Bypass (CPB) aufrechterhalten. Diese mechanische Unterstützung wird durch eine Herz-Lungen-Maschine (HLM) gewährleistet. Um diese an das Blutsystem anzuschließen, muss zunächst eine Kardioplegie herbeigeführt werden. Dies geschieht über die Injektion hyperkaliämischer (kardiopleger) Lösung in die Koronararterien. Sowohl die Kardioplegie als auch der anschließende CPB sind für eine Reihe vasomotorischer Veränderungen verantwortlich, die letztendlich zu einem veränderten vaskulären Widerstand, vaskulärer Permeabilität mit Endorganödemen und einer veränderten Myokardperfusion führen können (Sellke et al. 1996). Es kommt außerdem zu einer veränderten Expression von hunderten von Genen des vaskulären Systems und assoziierter Organe (Ruel et al. 2003). Der Einfluss dieser Veränderungen innerhalb des Gefäßsystems ist immens und unterliegt vielen Einflussfaktoren: Bei bis zu 2,5 % der Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen konnten Koronarspasmen mit temporären ST-Hebungen im EKG nachgewiesen werden (Schena et al. 2007, Skarvan et al. 1984) und noch mehr Patienten erlitten postoperativ kardiale Dysfunktionen (Royster 1993). Diese traten unabhängig vom Alter der Patienten, dem Vorhandensein einer vorbestehenden KHK oder anderen Risikofaktoren für Endotheldysfunktionen auf (Wernovsky et al. 1995). Als Koronarspasmen werden hämodynamisch wirksame Einengungen oder Verschlüsse epikardialer Koronararterien definiert. Diese können zur kritischen Unterbrechung des Blutflusses mit oder ohne bleibende Myokardischämie führen. Weitere mögliche Komplikationen sind Synkopen, Rhythmusstörungen und der plötzliche Herztod. Die Operation mit Hilfe eines CPB ist demnach schon per se eine starke Zäsur in der physiologischen Homöostase des Herz-Kreislauf-Systems.

Während der Kardioplegie und des CPB kommt es zu unterschiedlichen Reaktionen innerhalb der jeweilig betroffenen Organsysteme. Durch den CPB verringert sich der

Gefäßtonus innerhalb der Skelettmuskulatur und die Permeabilität erhöht sich. Die Gefäße des Gehirns, der Lunge und der Mesenterien dagegen zeigen eine veränderte Relaxation mit Hang zum Vasospasmus. Durch die Kardioplegie zeigen die Koronarien ebenfalls eine vasospastische Neigung (Ruel et al. 2004). Verschiedenste Pathomechanismen sind für diese divergierenden Reaktionen verantwortlich:

Durch den Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen der HLM kommt es zu einer Aktivierung sowohl der humoralen als auch der zellulären Bestandteile; diese umfassen beispielsweise die Gerinnungskaskade, die Fibrinolyse, das Komplementsystem und die Leukozyten-, Endothel- und Thrombozytenaktivität (Hsu 1997). Die dadurch freigesetzten und im Serum zirkulierenden aggressiven Mediatoren und proinflammatorischen Zytokine konnten während der extrakorporalen Zirkulation in teilweise höheren Konzentrationen nachgewiesen werden, als während einer Sepsis (Asimakopoulos 1999). Stimuli dieser Aktivierung sind neben den Fremdoberflächen die initiale Hypoxie, der Kontakt mit Thrombin und Endotoxinen, physikalische Manipulationen und operationsbedingte Traumen - direkt durch den chirurgischen Eingriff und die verwendeten Instrumente (z.B. Sauger) oder indirekt über hämodynamisch verursachten „shear stress“. Es kommt zu Endotheldysfunktionen mit zirkulierenden Endothelzellen (Schmid et al. 2006), dem teilweisen Barriereverlust der Gefäßwände und initial zur Vasokonstriktion. Des Weiteren kommt es zur Hämolyse der Erythrozyten und damit zur Freisetzung von Hämoglobin. Da dieses den natürlichen Abbauweg des NO darstellt, wird wiederum dessen vaskuläre Menge reduziert und die Vasokonstriktion verstärkt (De Souza und Spyt 1993).

Als physiologische Antwort auf den peripheren „shear stress“ durch die Vasokonstriktion wird vermehrt NO produziert. Wie bereits beschrieben, kann dies eigenständig durch das Endothel und ohne Botenstoffe geschehen. Aber auch durch den „shear stress“ aktivierte Thrombozyten sezernieren Adenosindiphosphat (ADP) und Serotonin, welches die NO-Antwort auf den steigenden Gefäßdruck durch endotheliale NO-Freisetzung triggert (Borgdorff et al. 2002). Messenger-vermittelte Aktivierungswege der NO-Synthase gibt es zusätzlich durch Bradykinin und Histamin, welche selbst als proinflammatorische Vasodilatoren wirken und die Gefäßpermeabilität erhöhen (Moncada et al. 1991; Yuan et al. 1993). Andere Botenstoffe wie Interleukin-1, Interleukin-6 oder Tumornekrosefaktor- α stimulieren ebenfalls die NO-Produktion, jedoch erst verspätet und entfalten ihre volle Wirkung primär während der postoperativen Phase (Ruvolo et al. 1994). Auch Erythrozyten

sezernieren, wie bereits beschrieben, während des CPB NO (Fischer et al. 2007). Diese besitzen wie das Endothel eine eNOS, die zur Aktivierung in das Zytosol der Erythrozyten transloziert. Diese alterierte periphere NO-Freisetzung verstärkt die bereits bestehende CPB-assoziierte Hypotension (Ruvolo et al. 1995).

Es kann nachfolgend durch diese systemische Hypotension zusammen mit anderen operationsbedingten Komplikationen - Flüssigkeitsverschiebungen, Blutungen oder thromboembolischen Ereignissen – und dem Freisetzen proinflammatorischer Mediatoren zum so genannten „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) kommen (Levy et al. 2003, Panagiotopoulos et al. 2010). Die Inzidenz dieses vasodilatatorischen Schock-Syndroms schwankt zwischen 4% (Tuman et al. 1995) und 44% (Kristof und Magder 1999), abhängig von der Definition des Schock-Syndroms. Die postoperative Mortalität dieser Patienten mit einer schweren CPB-assoziierten Sepsis, das heißt einer SIRS mit nachgewiesener Infektion, liegt zwischen 34 % und 69 % (Michalopoulos et al. 1998). Eine mögliche Infektionsquelle stellt hierbei der Gastrointestinaltrakt dar: Wiederholte Ischämien und Reperfusionen führen zu transienten Minderperfusionen des Splanchnikusgebietes und nachfolgender eingeschränkter Mukosa-Barriere. Diese erhöhte intestinale mikrovaskuläre Permeabilität wurde bereits bei der Initiierung des CPB beschrieben und kann eine bakterielle Translokation verursachen (Cox et al. 1999).

Innerhalb zentraler Organsysteme wie dem Myokard, der Lunge, den Mesenterien und dem Gehirn sinkt im Gegensatz dazu die Aktivität der eNOS durch den CPB. Auslösend hierfür sind unter anderem veränderte Membranpotentiale, Mangel an Substraten und Kofaktoren, veränderte Ca^{2+} -Konzentrationen und Verletzungen von Membranen und damit assoziierten regulatorischen Enzymen und Ionenpumpen (Ruel et al. 2004).

Nach der Kardioplegie und dem damit kurzzeitig vorhandenem Herz-Kreislauf-Stillstand kommt es während der Reperfusion durch den einsetzenden CPB zu oxidativem Stress und einem Mangel an verfügbarem NO. Dieser Mangel wird auch durch eine gedrosselte Produktion von NO durch die eNOS und durch den Kontakt mit aktivierten Komplement-Fragmenten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vermittelt. Ichinose et al. konnten diesen Zusammenhang 2007 tierexperimentell festigen. Sie zeigten, dass eine Überexpression der myokardialen eNOS die durch eine Sepsis verursachte myokardiale Dysfunktion und insgesamt die Mortalität reduzierte. Vor allem die gesteigerte Adhäsion und nachfolgende Migration der genannten Entzündungszellen innerhalb des pulmonalen Gefäßbettes spielt eine entscheidende

Rolle bei der Entstehung der pulmonalen „reperfusion injury“. Experimentelle Studien konnten bereits zeigen, dass sich durch eine präoperative medikamentöse Depletion neutrophiler Granulozyten das Auftreten CPB-assoziiertes pulmonaler Dysfunktionen signifikant verringerte (Gillinov et al. 1994). Unter dieser Prämedikation verringerte sich die pulmonale Vasokonstriktion, die arterielle Oxygenierung stieg, fokale alveoläre Defekte sanken und der Schweregrad eines etwaig entstandenen Lungenödems nahm ebenfalls ab. Da während des CPB die Aktivität der eNOS nicht nur innerhalb der Lunge sinkt, sondern auch im Myokard, wird dort ebenfalls während der Reperusionsphase eine gesteigerte Migration neutrophiler Granulozyten beobachtet. Experimentell ließ sich nachweisen, dass bei einer verringerten Zahl an zirkulierenden Entzündungszellen mit einem deutlich milderem Verlauf der entstehenden myokardialen „reperfusion injury“ zu rechnen ist. So nahm die Größe von entstandenen Infarktarealen ab, während sich gleichzeitig die systolische Ventrikelfunktion verbesserte (Breda et al. 1989). Klinisch konnte dieser Zusammenhang bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden; bei Verwendung eines Leukozytenfilters war die Aktivität der neutrophilen Granulozyten höher als in der Vergleichsgruppe (Bakhtiar et al. 2008). Den tierexperimentellen Nachweis des pathophysiologischen Zusammenhangs zwischen verringerter NO-Menge und der vermehrten Aktivierung von Entzündungszellen und –mediatoren erbrachten Cakir et al. 2003. Sie konnten durch direkte pulmonal-arterielle Infusion eines NO-Derivates den CPB-assoziierten oxidativen Stress und die daraus resultierende pulmonale „reperfusion injury“ deutlich verringern. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass eine durch genetische Alteration ohnehin verringerte eNOS-Aktivität einen starken Einfluss auf die Vasomotorik, Migration proinflammatorischer Zellen, vaskuläre Permeabilität und insgesamt die Endothelfunktion bei kardiochirurgischen Patienten hat.

Die Aktivität der iNOS steigt, im Gegensatz zur eNOS, durch den inflammatorischen Reiz des CPB und der Reperfusion nach Kardioplegie stark an. Dies bezieht sich vor allem auf das Myokard (Tofukuji et al. 1998). Durch die lokale „high-output“-Kinetik der iNOS wirkt das entstehende NO kardial vor allem proinflammatorisch, vasodilatierend und toxisch, da es zu Peroxynitrit reagieren kann. Dieses entsteht postischämisch vermehrt durch das Endothel und aktivierte Leukozyten. Es kommt lokal zu myokardialen Apoptosen und Nekrosen bis hin zum zirkulatorischen Schock (Becker et al. 2000).

Die beschriebenen Koronarspasmen und „reperfusion injuries“ werden größtenteils durch intrazelluläre Ca^{2+} -Akkumulation verursacht. Durch die initiale hyperkaliämische Kardioplegie kommt es zur Depolarisation der myokardialen Endothelzellen. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle öffnen sich infolge dessen, wodurch extrazelluläres Ca^{2+} einströmt und bestehende intrazelluläre Speicher ausgeschüttet werden. Die gestiegene Ca^{2+} -Konzentration erhöht die Sensitivität des kontraktiven Apparates der glatten Muskelzellen. Diese intrazelluläre Überladung mit Ca^{2+} führt zu einem gesteigerten basalen Vasotonus und zu Agonisten-induzierten Vasospasmen während der Reperfusion. Prostaglandine gehören beispielsweise zu diesen Agonisten und werden durch den inflammatorischen Reiz durch den CPB und die Kardioplegie freigesetzt. Außerdem erhöht sich die myokardiale Expression der induzierbaren COX-2, welche die Prostaglandine synthetisiert (Metais et al. 2001).

Tabelle 1: CPB-assoziierte Veränderungen an Zielorganen.

	Skelettmuskulatur, periphere Gefäße	Pulmonal-, Mesenterialgefäße	Cerebral- und Koronarien
Vasotonus	-	+	+
eNOS-Aktivität	-	-	-
iNOS-Aktivität	+	+	+++
Leukozyten-Infiltration	++	+	+
Radikal-Bildung	+	+	+++

Ein weiteres wichtiges regulatorisches Organsystem, welches während kardiochirurgischer Eingriffe beeinflusst wird, stellt die Niere dar. Es konnte gezeigt werden, dass Operationen mit CPB die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Niere, welche als Maß für deren Funktion gilt, negativ beeinflussen und diese folglich sinkt (Lema et al. 1995). Es kommt hierbei zu einer Überexpression der renalen eNOS und nachfolgender toxischer Schädigung durch das produzierte NO (Mazer et al. 2007). Stimuliert wird diese überschießende Reaktion durch die CPB-assoziierte Hypoxie und den gesteigerten „shear stress“.

Aber nicht nur die Nierenfunktion wird durch den CPB negativ beeinträchtigt, vielmehr steigt insgesamt die Mortalität von Patienten mit vorbestehenden Nierenerkrankungen nach kardiochirurgischen Operationen (Chonchol et al. 2007). Somit gilt schon eine moderate Einschränkung der Nierenfunktion als unabhängiger negativer Prädiktor für das klinische Ergebnis nach CPB-assoziierten Operationen.

Unabhängig der durchgeführten Operationen konnte auch innerhalb des renalen Systems ein bestehender Einfluss des NO auf dessen Funktion nachgewiesen werden (Bertocchi et al. 2010, Kon et al. 1990). Bereits basal verringerte Level an verfügbarem NO führen zu renaler mikrozirkulatorischer Hypoperfusion und nachfolgender systemischer Hypertension vermittelt durch das renale Renin-Angiotensin-Aldosteron-Sytem (RAAS) (Zatz und de Nucci 1991). NO reguliert jedoch nicht nur über das RAAS die Mikrozirkulation des afferenten Schenkels des Nephrons, es relaxiert ebenfalls Mesangialzellen; ein weiterer Versuch die GFR zu steigern. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das renale System das sensitivste aller auf NO reagierenden Gefäßsysteme ist (Zou und Cowley 1997). Eine Tierexperimentelle Studie konnte weiterhin nachweisen, dass bei hypertensiv vorgeschädigten Nieren, die Autoregulation der renalen Perfusion und GFR über die Modulation des systemischen Blutdrucks und der Mesangialzellen, stark vom vorhandenen NO abhängig ist und bei plötzlichem Mangel sogar versagt (Kvam et al. 2000). Dies scheint ebenfalls ein möglicher Angriffspunkt für den Einfluss einer alterierten NO-Menge auf das klinische Ergebnis kardiochirurgischer Patienten zu sein.

Die beobachteten Phänomene, sowohl der physiologischen als auch der CPB-assoziierten pathophysiologischen Wirkungen von NO, beziehen sich hierbei fast ausschließlich auf das arterielle Gefäßsystem. Eine weitere kardiochirurgisch bedeutende Studie zeigte, dass die Endothel-vermittelte Gefäßrelaxation in Arterien stärker ausgeprägt ist als in Venen (Luscher et al. 1988). Dies stellt einen Erklärungsansatz für die geringeren Verschlussraten arterieller Bypass-Grafts im Gegensatz zu venösen dar. Eine Alteration der eNOS-Aktivität innerhalb des arteriellen Systems könnte diese jedoch erhöhen und somit das Risiko eines Verschlusses steigern.

1.2 Der T-786C – Polymorphismus

Das menschliche Genom besteht aus circa 3,08 Milliarden Basenpaaren. Von diesen repräsentieren nur wenige Prozent ein Protein kodierendes Gen – insgesamt besitzt der Mensch circa 20.000 – 25.000 Gene (Anonymus 2004). Unter dem Begriff des genetischen Polymorphismus werden Unterschiede einer Nukleotidsequenz homologer Bereiche verstanden. Beträgt die Allelfrequenz der genetischen Variante unter einem Prozent innerhalb einer Population, so spricht man von einer Mutation. Liegt diese über

ein Prozent, gilt diese als Polymorphismus. Die Allelfrequenz unterscheidet sich hierbei teilweise stark innerhalb verschiedener Ethnien. Es treten insgesamt drei Arten von Sequenzvarianten auf: Der „Single Nucleotide - Polymorphismus“ (SNP), der „Various Number Tandem Repeat – Polymorphismus“ (VNTR) und der „Insertions- /Deletions-Polymorphismus“.

Der SNP, oder Punktmutation, ist der häufigste und stabilste Polymorphismus. Er ist gekennzeichnet durch den Austausch einer einzelnen Base innerhalb einer bestimmten DNA-Position. Ein Polymorphismus kann durch die Position des SNPs die Quantität und/oder die Qualität des entstehenden Genproduktes verändern. Liegt der SNP beispielsweise innerhalb der Promotor-Region eines Gens, so verändert sich die Transkriptionsrate und damit die Expression des Gens (van 't Hooft et al. 1999). Posttranskriptionell kann sich ein Polymorphismus auch auf das Spleißen eines Gens, also auf das Herausschneiden der Introns, und auf die Stabilität der entstehenden Messenger-RNA (mRNA) auswirken. Diese Veränderungen verändern maßgeblich die Quantität des Genproduktes. Führt der Austausch jedoch zu einer veränderten Aminosäuresequenz, so kann sich unter Umständen die Qualität und damit auch die Wirkung des Proteins verändern.

Das von uns untersuchte eNOS-Gen liegt auf Chromosome 7q35-36. Es besteht aus 26 Exons mit insgesamt 21 Kilobasen (kb) (Marsden et al. 1993). Die von uns untersuchte Punktmutation T-786C liegt innerhalb der Promotor-Region des eNOS-Gens, die für die Expression des Gens verantwortlich ist. Es handelt sich hierbei um einen einzelnen Basenaustausch, also einen SNP; Thymin (T) wird hierbei gegen Cytosin (C) an Stelle 786 der 5'-flankierenden Region ausgetauscht. Dadurch kommt es zu einer starken Reduktion der Promotor-Aktivität des eNOS-Gens um bis zu 40 % (Nakayama et al. 2000). Diese Reduktion geschieht durch die spezifische Bindung des „Replication Proteins A1“ (RPA1) an das mutierte eNOS-Allel. Das RPA1 ist ein essentielles Protein der DNA-Replikation, -Transkription und -Rekombination; gebunden an die mutierte Promotorregion wirkt es hierbei als Repressor und verringert die gebildete NO-Menge drastisch (Miyamoto et al. 2000). Der von uns untersuchte SNP des eNOS-Gens verringert somit stark die Quantität der entstehenden eNOS. Die physiologische Antwort auf den starken Transkriptionsreiz Hypoxie ist zusätzlich abgeschwächt und verringert somit auch innerhalb von akute hypoxischen Situationen die adäquate Antwort des Endothels auf diese (Rossi et al. 2003).

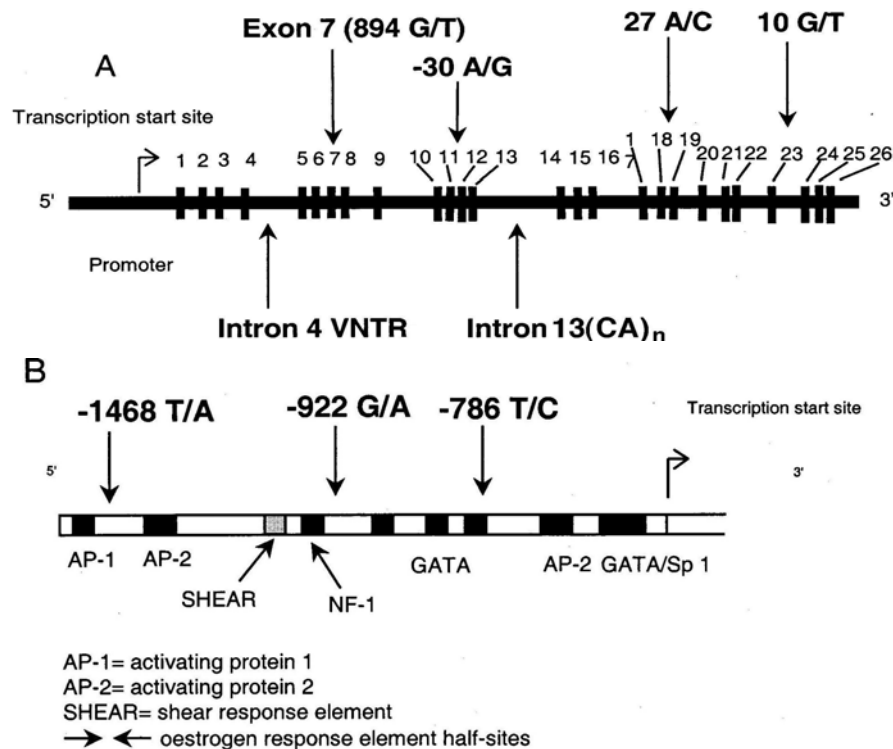


Abbildung 5: Schematische Darstellung des eNOS-Gens. (A) Darstellung des kompletten Gens und Lokalisation ausgewählter Polymorphismen. (B) Promotorbereich des eNOS-Gens mit Lokalisation der dort bekannten SNP-Polymorphismen und Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Modifiziert nach Hingorani 2001, S. 524).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der T-786C-Polymorphismus starke Assoziation mit Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zeigt. So traten innerhalb einer Studie an kaukasischen Patienten beispielsweise vermehrt Myokardinfarkte auf (Dosenko et al. 2006). Die Einschätzung des Polymorphismus als eigenständigen Risikofaktor für Koronarspasmen innerhalb einer japanischen Studie, lag hierbei höher als für den Nikotinabusus (Yoshimura et al. 2000). Auch gilt der Polymorphismus als unabhängiger Risikofaktor einer vasospastischen Re-Attacke nach bereits erfolgtem Vasospasmus (Nishijima et al. 2007). Dies galt auch für Patienten mit bereits prophylaktisch eingesetzter Medikation mit Kalzium-Antagonisten oder Nitraten. Studien mit Patienten kaukasischer Herkunft konnten diese Zusammenhänge bisher nicht festigen, obgleich der T-786C-SNP häufiger bei Kaukasiern als innerhalb japanischer Populationen nachweisbar ist (Jeerooburkhan et al. 2001). Die beschriebene vasospastische Neigung, welche durch den Polymorphismus begünstigt wird, lässt sich nicht nur innerhalb epikardialer Gefäße nachweisen. Eine gefürchtete Komplikation einer subarachnoidalen Blutung nach Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas ist der cerebrale Vasospasmus.

Dieser wird ebenfalls durch den von uns untersuchten Polymorphismus begünstigt (Ko et al. 2008).

Des Weiteren setzt der T-786C-SNP die Sensitivität des Endothels gegenüber „shear-stress“ herab (Cattaruzza et al. 2004). Dies begünstigt beispielsweise den einer Atherosklerose vorausgehenden Endotheldefekt durch eine mechanische Überbelastung der Gefäßwände und stellt einen Risikofaktor für die KHK dar. Ferner besteht eine starke Assoziation ($p < 0.00001$) zwischen dem T-786C - Polymorphismus und einem VNTR-Polymorphismus im Intron 4 (Yoshimura et al. 2000). Dieser gilt, in Verbindung mit einem vorbestehenden Nikotinabusus, als hochsignifikant für die Entwicklung einer KHK. Innerhalb einer tunesischen Studie wurde dieser VNTR auch mit einem vermehrten Auftreten von Myokardinfarkten assoziiert (Jemaa et al. 2007). Ein weiterer klinischer Endpunkt der Atherosklerose, die Karotisstenose, konnte ebenfalls mit dem von uns untersuchten Polymorphismus assoziiert werden. Das homozygote C-Allel ist demnach ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer mittleren bis schweren Arteria carotis interna – Stenose (Ghilardi et al. 2002). Karotisstenosen und -verschlüsse sind für etwa jeden vierten Schlaganfall verantwortlich, in Deutschland entspricht dies etwa 30.000 Patienten pro Jahr (Mudra et al. 2006). Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung einer KHK, eine Verschiebung des LDL-HDL-Gleichgewichts, scheint es aller Wahrscheinlichkeit nach jedoch nicht durch den T-786C-Polymorphismus zu geben (Ciftci et al. 2008).

Klinische Studien konnten bisher ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem T-786C-Polymorphismus und der arteriellen Hypertonie, ebenfalls einem wichtigen Risikofaktor für die Entstehung einer KHK, nachweisen (Tsujita et al. 2001). Generell konnte jedoch gezeigt werden, dass eine plötzliche Inhibition der NO-Synthase mit L-Arginin-Analoga, welche irreversibel die eNOS hemmen, eine Erhöhung des Blutdrucks durch eine verringerte endotheliale Vasodilatation nach sich zieht (Cooke et al. 1991). Auch auf genetischer Ebene konnten, mit Hilfe von Knock-out-Mutationen des eNOS-Gens an Mäusen, dieselben Effekte hervorgerufen werden (Huang et al. 1995). Klinisch hat der von uns untersuchte T-786C-Polymorphismus, genauso wie der oft damit assoziierte VNTR im Intron 4, scheinbar nicht den nötigen Einfluss zur Entstehung eines arteriellen Hypertonus beizutragen (Colomba et al. 2008; Olcay et al. 2006).

Lediglich die Kombination von drei eNOS-Polymorphismen (SNP Asp298, VNTR 4a, SNP T-786C) konnte als suszeptibler Marker für die Entstehung einer arteriellen Hypertonie identifiziert werden (Sandrim et al. 2006). Der T-786C-Polymorphismus

scheint demnach nicht die alleinige Pathogenität zu besitzen eine langfristig bestehende Vasokonstriktion hervorzurufen. Besteht jedoch bereits ein manifester Hypertonus, so zeigt sich auch die Wirkung des T-786C–SNP deutlicher: Patienten mit vorbestehenden Hypertonus und Nachweis des T-786C–Polymorphismus zeigten eine deutlich verschlechterte renale Autoregulation ihrer GFR nach Substitution von Natrium (Dengel et al. 2007). Diese renale Beeinträchtigung verstärkt wiederum den Hypertonus. Diese spezifischen Kombinationen von Sequenzvarianten werden als Haplotyp bezeichnet. Erst dieser bestimmt das fertige Genprodukt, beispielsweise durch die Interaktion verschiedener SNPs, und letztlich auch den resultierenden Phänotyp.

Eine weitere Manifestation des T-786C–Polymorphismus wurde mit dem Diabetes mellitus Typ-2 und dessen Komplikationen, wie etwa eine mikroangiopathische Nephropathie, identifiziert (Ezzidi et al. 2008). Der Diabetes mellitus zählt zusammen mit der Hypercholesterinämie, der arteriellen Hypertonie und dem Nikotinabusus zu den kausalen Risikofaktoren für die Entstehung einer KHK. Das pathophysiologische Korrelat bildet hierbei die Atherosklerose. Ein möglicher Einfluss auf die Entstehung und den Schweregrad einer KHK und vor allem dessen Folgen lässt sich daher anhand der bisherigen Studien postulieren. Eine weitere Studie zu etwaig bestehenden Risikofaktoren und der Entstehung einer KHK zeigte dies ebenfalls: Die protektiven Effekte mäßigen Konsums von Rotwein werden laut dieser vor allem durch die gesteigerte Aktivität der eNOS vermittelt (Leighton et al. 2006). Des Weiteren zeigten eNOS-Knock-out-Mäuse eine ähnliche Gruppierung an Risikofaktoren wie KHK-Patienten. Somit scheint insgesamt eine Korrelation zwischen der Entstehung und den Folgen atherosklerotischer Veränderungen und dem von uns untersuchten Polymorphismus T-786C des eNOS-Gens auf vielfältige Weise zu bestehen. Der direkte klinische Einfluss des Polymorphismus wurde jedoch, im Gegensatz zu den zahlreichen Studien zur Entstehung verschiedenster Risikofaktoren, kaum untersucht. So gibt es lediglich eine Studie über den möglichen klinischen Einfluss des Polymorphismus unter kardiochirurgischen Patienten. Diese konnte keinerlei Korrelation zwischen postoperativ aufgetretenen hämodynamischen Unregelmäßigkeiten und dem untersuchten Polymorphismus finden (Liakopoulos et al. 2006).

Weitere Studien liegen nur zum Einfluss des Polymorphismus auf das klinische Ergebnis nach koronarer Stent-Implantation vor. Demnach ist die „In-Stent Restenose“ homozygoter Allelträger signifikant höher ($p = 0,028$), als innerhalb der Wildtyp-Gruppe (Gomma et al. 2002). Eine andere Studie zeigte ein ebenfalls erhöhtes Risiko für

homozygote Träger des T-786C–Polymorphismus innerhalb eines Jahres nach Stent-Implantation einen Myokardinfarkt zu erleiden oder sogar zu versterben (Gorchakova et al. 2003).

1.3 Zielsetzung

Eine Vielzahl an Studien konnte bereits Zusammenhänge zwischen dem eNOS T-786C - Polymorphismus und verschiedenen Krankheitsbildern des Herz-Kreislaufsystems nachweisen. Diese Studien bezogen sich jedoch vor allem auf die Pathogenese dieser Erkrankungen und sicherten deren vermehrtes Auftreten oder beschleunigtes Voranschreiten bei Nachweis des Polymorphismus.

Es gibt demnach nur sehr wenige valide Daten zu möglichen direkten Effekten des Polymorphismus, beispielsweise während durchgeführter Operationen. Solche Ergebnisse könnten den unmittelbaren Einfluss des Polymorphismus genauer charakterisieren und seinen Stellenwert innerhalb akuter Anpassungsreaktionen an Operationen einordnen. Kardiochirurgische Patienten eignen sich vor allem für solch eine Studie, da eine gemeinsame Endstrecke der Polymorphismus-assoziierten Atherosklerose durch die degenerativ-sklerotischen KHK und degenerative Klappenvitien besteht.

Ziel unserer Studie ist es somit nachzuweisen, inwieweit ein direkter Einfluss des Polymorphismus auf das klinische Ergebnis kardiochirurgischer Patienten besteht. Somit ließe sich auch ableiten, ob der genannte Polymorphismus genug Pathogenität zeigt, um beispielsweise als eigenständiger Risikofaktor einer gesteigerten Mortalität nach Operation zu gelten. Dies könnte nicht nur als präoperative Screeningmethode von Bedeutung sein, vielmehr könnte die durch den Polymorphismus verminderte Menge an NO Ziel weiterer pharmakologischer Studien und perioperativer Therapien werden. Des Weiteren könnte die Studie eine Basis für nachfolgende Arbeiten bieten, um die komplexe Bandbreite der Auswirkungen des Polymorphismus noch genauer darzustellen.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

Die prospektive Studie umfasste insgesamt 500 kardiochirurgische Patienten kaukasischer Herkunft. Alle wurden innerhalb des Studienzeitraums April 2006 bis Mai 2007, durch eine HLM unterstützt, innerhalb der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) (Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. F.A. Schöndube) operiert. Die durchgeführten Operationen umfassten Klappenvitien-, Bypass- oder Kombinationseingriffe. Hierbei wurden sowohl elektive als auch dringliche und Notfalloperationen eingeschlossen. Die postoperative Überwachung und Datensammlung erfolgte auf den Intensivstationen 0117 und 0118 des Zentrums für Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin der Universitätsmedizin Göttingen (Direktor: Prof. Dr. med. M. Quintel). Patienten älter als 80 Jahre und solche mit vorbekannten Neoplasien wurden ausgeschlossen. Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Georg-August-Universität Göttingen geprüft und bestätigt. Die Patientenaufklärung erfolgte mündlich und schriftlich. Nicht einwilligungsfähige Patienten wurden eingeschlossen, sofern der mutmaßliche Wille zur Teilnahme an der Studie durch die nächsten Angehörigen ermittelt werden konnte. Darunter zählten auch gerichtlich bestellte Betreuer. Die Aufklärung umfasste die Studienziele, eine Blutentnahme zur Ermittlung des vorliegenden Polymorphismus, die Erhebung, Auswertung und Speicherung der Patientendaten und die Freiwilligkeit der Teilnahme. Erst nach der schriftlichen Einwilligung erfolgten Blutentnahme und Datenerhebung.

2.2 Datensammlung und –definition

Während der postoperativen intensivmedizinischen Überwachung gesammelte Daten wurden innerhalb einer Datenbank gespeichert. Diese wurde eigens für die Studie auf der Basis von Microsoft[®] Access und der Programmiersprache Microsoft[®] Visual Basic programmiert (Microsoft[®] - Redmond, USA). Sie genügt dem Standard für relationale

Datenbanken und die hohe Qualität der Daten wurde durch stete interne Kontrollen gewährleistet. Die Daten selbst wurden in 4 Gruppen unterteilt:

1. Allgemeine Patientendaten
2. Präoperative Daten
3. Intraoperative Daten
4. Postoperative-intensivmedizinische Überwachung.

Die Datenerhebung selbst, als auch die Auswertung dieser erfolgte durch mehrere Doktoranden innerhalb der Arbeitsgruppe und für mehrere Fragestellungen.

2.2.1 Allgemeine Patientendaten

Die allgemeinen Patientendaten umfassten neben den persönlichen Daten - Name, Adresse, Geburtsdatum, Geschlecht, Größe und Gewicht – auch eine studienspezifische Patientennummer zur Anonymisierung. Des Weiteren wurde der Zeitpunkt der stationären Aufnahme innerhalb der UMG, der Operation und der postoperative Aufnahme auf den Intensivstationen erfasst. Ebenso Verlegungszeitpunkt von den Intensivstationen, Normalpflegestationen, der Entlassungszeitpunkt aus dem UMG und der eventuelle Todeszeitpunkt. Zur etwaigen späteren Nachverfolgung der Patienten wurden außerdem die betreuenden Hausärzte erfasst.

The screenshot shows a software interface for entering patient data. The main window is titled 'Stammdaten Patient'. It contains several input fields and buttons. On the left, there are fields for 'Studien-Nr.' (19), 'Patienten-Nr.' (10982981), 'Risikogruppe' (Herzungenmaschin), 'Station' (0118), 'Bettenplatz' (A3), 'Name', 'Vorname', 'Geschlecht' (männlich), 'Geburtsdatum' (24.06.1939), 'Strasse', 'PLZ', 'Ort', 'Telefon', 'Größe [cm]' (180), 'Gewicht [kg]' (80), '1. Visite durch' (Milenovic), 'SAPS II' (31), 'APACHE II' (24), and 'Euroscore' (12). On the right, there are buttons for 'KH Aufnahme', 'ICU Aufnahme', 'ICU Entlassung', 'KH Entlassung', and 'Tod', each with 'Datum' and 'Uhrzeit' fields. A sidebar on the right has buttons for 'Hausarzt', 'Risikofaktoren', 'HK-/Echo-Befund', 'Vormedikation', 'Intra-OP THG', 'Visite', and 'Gene'. At the bottom, there are checkboxes for 'Einwilligung vorhanden' and 'Blutentnahme durchgeführt'. The status bar at the bottom shows 'Datensatz: 19 von 520'.

Abbildung 6: Eingabemaske „Allgemeine Patientendaten“.

2.2.2 Präoperative Daten

Die präoperative Datenerhebung erfolgte anhand von selbst innerhalb des UMG gewonnenen Untersuchungen, durch einweisende Krankenhäuser beziehungsweise fremd- und eigenanamnestische Befunde. Studienrelevant waren Daten zur kardialen Anamnese und persönliche Risikofaktoren.

2.2.2.1 Risikofaktoren

- Positive Familienanamnese: Stattgehabter Myokardinfarkt oder andere kardiologische Ereignisse eines Verwandten 1. Grades.
- Arterieller Hypertonus: Systolische Blutdruckwerte von > 140 mm Hg und/oder diastolische Blutdruckwerte von > 90 mm Hg, bzw. die Einnahme von Antihypertensiva.
- Hyperlipoproteinämie: Serumcholesterinkonzentration von > 240 mg/dl (nüchtern), bzw. die Einnahme von Statinen.
- Nikotinabusus: Als Raucher galten alle Patienten, die über einen Zeitraum von 6 Monaten geraucht hatten.
- Diabetes mellitus: Blutzuckerwerte bei zwei Blutentnahmen >140 mg/dl, bzw. Einnahme von oralen Antidiabetika oder Insulinpflichtigkeit.
- Niereninsuffizienz: Anamnestische Diagnose bzw. durchgeführte Nierenersatzbehandlung.
- pAVK (periphere Arterielle Verschlusskrankheit): Anamnestische Diagnose.
- Zerebrale Ereignisse: Stattgehabter Schlaganfall, transitorisch ischämische Attacke (TIA), prolongierte reversible Ischämie mit neurologischem Defizit (PRIND).
- COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease): Anamnestische Diagnose, bzw. Einnahme von Bronchodilatoren und/oder permanente O₂-Gabe.
- Pulmonale Hypertonie: Bei einer Herzkatheteruntersuchung oder im Herzecho festgestellte pulmonale Hypertonie (pulmonal-arterieller Mitteldruck > 20 mmHg in Ruhe oder > 30 mmHg unter Belastung).
- Herzinsuffizienz: Einteilung nach NYHA-Grad der New York Heart Association.

- Koronare Herzerkrankung (KHK): Stattgehabter Myokardinfarkt, ggf. mit PTCA oder Bypass-Operation, positiver Herzkatheterbefund für koronare Herzkrankheit oder Herzklappenvitium.
- Angina pectoris: Anamnestischer Befund als Leitsymptom einer Koronarinsuffizienz.

2.2.2.2 Vormedikation

Zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie wurden alle hämodynamisch relevanten und dem Risikoprofil der Studie entsprechenden Medikamente erfasst. Hierzu gehörten:

- β -Blocker
- ACE-Hemmer
- Weitere Antihypertensiva
- Koronartherapeutika
- Lipidsenker
- Antidiabetika
- Diuretika
- Bronchodilatoren
- Antiarrhythmika
- Antikoagulanzen, innerhalb der letzten 6 Monate eingenommen.

2.2.2.3 Herzkatheter- / Echokardiografiebefunde

Bei allen Patienten wurde präoperativ eine Herzkatheteruntersuchung und/oder eine transthorakale Echokardiografie zur Indikationsstellung einer Operation durchgeführt. Diese Daten wurden ebenso wie frühe Untersuchungen, von uns erfasst. Die Daten der Herzkatheteruntersuchungen umfassten die Stenose des betroffenen Koronargefäß, eine präoperative Versorgung mit einem Stent eines der Koronargefäße und eine bereits nachweisbare In-Stent-Stenose. Hierbei wurde ebenfalls der Grad des Re-Verschluss angegeben. Wurde bereits eine frühere Bypass-Operation durchgeführt (ACVB, Aorto-coronarer Venen-Bypass), so wurde das operativ versorgte Gefäß und eine etwaige In-ACVB-Stenose dokumentiert.

Die transthorakale Echokardiografie lieferte Daten über bestehende Klappenvitien und –insuffizienzen. Darüber hinaus wurde die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF in %) als Maß für die Herzfunktion ermittelt.

Abbildung 7: Eingabemaske „Kardiale Anamnese“.

Wir errechneten mit den gewonnenen präoperativen Daten anschließend den individuellen Euroscore für jeden Patienten. Dieser Risikoscore für Herzoperationen weist einen hohen prädiktiven Wert für die postoperative Letalität herzchirurgischer Patienten auf, nicht jedoch für deren postoperative Morbidität (Toumpoulis et al. 2005). Errechnet wird dieser durch Einbeziehung individueller patientenbezogener Daten (Alter, Geschlecht und vorbekannte Erkrankungen), kardiale Historie des Patienten und die Operation betreffende Angaben (Notfalleingriff, Kombinationseingriffe, thorakaler Aorteneingriff und Postinfarkt-Ventrikelseptumdefekt). Anschließend erfolgt anhand des Ergebnis die Einordnung in drei Risikogruppen: geringes Operationsrisiko (Euroscore 1 – 2), mittleres (Euroscore 3 – 5) und hohes individuelles Operationsrisiko (Euroscore \geq 6).

2.2.3 Intraoperative Daten

Die intraoperativen Daten wurden anhand der Narkose- und Operationsprotokolle erstellt und umfassten folgende Daten:

- Zeitpunkt und Dringlichkeit des Eingriffs (elektiv, dringlich oder Notfall-OP). Als dringlich wurden Patienten eingestuft, deren Operation zeitnah innerhalb einer Woche nach Hospitalisierung stattfand. Als Notfall galten Operation die sofort und außerhalb des normalen Operationsplans, z.B. nachts, durchgeführt wurden.
- Dauer des CPB über die Herz-Lungen-Maschine und Dauer der Aortenklammzeit (= Ischämiezeit).
- Den durchgeführten chirurgischen Eingriff: alleinige Bypass-OP (Art und Anzahl der verwendeten Grafts), alleinige Klappen-OP (Art (mechanische oder biologische) und Anzahl der eingesetzten Klappen) oder Kombinationseingriff von Bypass mit Klappenersatz bzw. Klappenrekonstruktion.
- Zusätzliche notwendige Eingriffe wie Resektion bei hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM), Ersatz bzw. Teilersatz des Aortenbogens, ASD/VSD-Verschlüsse sowie gefäßchirurgische Interventionen an der Arteria carotis interna (Karotis-TEA).
- Medikamentöse Therapie über die Dauer des CPB durch die Herz-Lungen-Maschine: Nitroglycerine, Nitropusside, NO, Kortison, Aprotinin (z.B. Trasylol[®]), Tranexamsäure, Adrenalin (z.B. Suprarenin[®]), Enoximon (z.B. Perfan[®]), Noradrenalin (z.B. Arterenol[®]), Levosimedan und Amiodaron (z.B. Cordarex[®]).
- Notwendige intraoperative Interventionen wie Reanimation, kurzzeitige Versorgung mittels eines Herzschrittmachers oder einer IABP (Intraaortale Ballongegenpulsation) zur Unterstützung der kardialen Pumpleistung.
- Etwaig verwendete Blutprodukte wie Erythrozytenkonzentrate, Frischplasmen oder Thrombozytenkonzentrate (Angabe in ml).

2.2.4 Postoperative-intensivmedizinische Überwachung

Die postoperative Überwachung der kardiochirurgischen Patienten erfolgte auf den Intensivstationen 0117 / 0118 des Zentrums Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin des UMG. Hämodynamische Messwerte wurden über die routinemäßig benutzten bettseitigen Monitoring-Systeme der Intensivstation elektronisch gespeichert, so dass die Daten der Patienten täglich retrospektiv über 24 Stunden ausgewertet werden

konnten. Bei kontinuierlichen Messwerten wie „Herzfrequenz“ oder „arterielle Blutdruckwerte“ wurden die Messwerte als täglicher Mittelwert erfasst.

- Elektrokardiogramm (EKG): Die für die Studie verwendeten Daten aus dem EKG waren die Herzfrequenz und der Herzrhythmus.
- Arterielle Blutdruckmessung: entweder nicht-invasiv mit Hilfe einer Blutdruckmanschette nach Riva-Rocci oder invasiv durch eine arterielle Kanülierung der Arteria radialis. Abgelesen wurde der systolische, der diastolische und der mittlere arterielle Druck (MAP).
- Zentraler Venendruck (ZVD): Blutdruckmessung innerhalb der oberen Hohlvene (Vena cava superior) als Maß für die rechtsventrikuläre Vorlast des Herzens. Gemessen wird der ZVD invasiv über einen zentralen Venenkatheter (ZVK) oder einen Pulmonalkatheter.
- Pulmonalkatheter (Swan-Ganz-Katheter): Perkutan über eine zentrale Vene durch den rechten Vorhof und die rechte Herzkammer in den Stamm der Arteria pulmonalis vorgeschobener Thermistorkatheter. Dieser misst die vorherrschenden Drücke im rechten Herzvorhof und in der Pulmonalarterie (PAP), den Pulmonalarterienverschlussdruck (PCWP = Wedge-Druck) und das Herzzeitvolumen (HZV). Weitere Daten sind der systemische Widerstand (SVRI) und der pulmonale Widerstand (PVRI) gemessen in $\text{dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{cm}^{-5}$.
- Pulscontour Continuous Cardiac Output (PiCCO, Pulsion Medical Systems – München, Deutschland): Diese gering invasive Methode zur kontinuierlichen Messung des HZV basiert auf der Pulskonturanalyse. Dies geschieht kontinuierlich durch Verwendung des transpulmonalen HZV, der Herzfrequenz, der Fläche unterhalb der aortalen Druckkurve, der Compliance der Aorta und der Form der Druckkurve. Zur initialen Kalibrierung wird zentralvenös ein Kältebolus appliziert und die sich ergebende Temperaturverlaufskurve durch einen arteriellen Thermodilutionskatheter registriert. Das angeschlossene Gerät berechnet hieraus kontinuierlich das Pulscontour-HZV mit Hilfe der Stewart-Hamilton-Gleichung, das intrathorakale Blutvolumen (ITBV) und den extravasalen Lungenwasser-Index (ELWI) als Vorlastparameter des Herzens. Außerdem ermittelt das PiCCO-System den Schlagvolumenindex (SVI), die Schlagvolumenvariation (SVV) und den Cardiac Index (CI). Dieser stellt die kardiale Auswurfleistung in Relation zur Körperoberfläche.

- Medikation: Alle hämodynamisch relevanten Medikamente und deren verabreichte Menge wurden über 24 Stunden erfasst:
Adrenalin (z.B. Suprarenin[®]), Noradrenalin (z.B. Arterenol[®]), Dobutamin, Enoximon (z.B. Perfan[®]), Vasopressin, Levosimendan, Kortison, Amiodaron, (z.B. Cordarex[®]), Nitroglycerin.

Interventionelle Therapien, die während der intensivmedizinischen Überwachung notwendig wurden, umfassten Herzschrittmacher-Therapie, IABP-Implantation, Kardioversion und extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO).

Der pulmonale Status wurde ebenfalls jeden Tag individuell erhoben und umfasste:

- Beatmungsart: spontan, nicht-invasiv, invasive.
- Beatmungsdrücke: Fraktion des eingeatmeten Sauerstoffs (F_iO_2), positiv endexpiratorischer Druck (PEEP), Plateaudruck, Tidalvolumen, Atemfrequenz.
- pH: ermittelt durch arterielle Blutgasanalysen (BGA).
- Lungenbefund: partieller CO_2 -Druck (P_aCO_2), partieller O_2 -Druck (P_aO_2), P_aO_2/F_iO_2 -Verhältnis (nur bei invasiver oder nicht-invasiver Beatmung), Compliance, Infiltrate innerhalb der vier Quadranten einer Röntgenübersichtsaufnahme der Lunge, Lung-Injury-Score (Murray et al. 1988). Für diesen werden die Anzahl der Infiltrate, Zeichen einer Hypoxämie, der PEEP-Wert und die Compliance der Lunge addiert und durch die Anzahl der ermittelten Werte dividiert. Ein Score $> 2,5$ deutet auf eine schwere Lungenschädigung hin.

Weitere Daten wurden aus allen durchgeführten Blutentnahmen gewonnen und umfassten das gesamte Spektrum an laborchemischen Befunden. Ebenso wurden alle notwendigen Substitutionen von Blutbestandteilen und Re-Operationen erfasst:

- Substitution von Erythrozytenkonzentraten, Frischplasmen, PPSB, Fibrinogen, Tranexamsäure, Albumin.
- Nachblutung, die einer chirurgischen Versorgung bedarf, aufgetreten nach Verlassen des Operationssaals.
- Myokardinfarkt, welcher sich perioperativ manifestiert, typische EKG-Zeichen besitzt der zu einem relevanten Anstieg der Herzenzyme führt (CK, CK-MB, Troponin T), kombiniert mit hämodynamischen Auswirkungen und Nachweis im Herzecho.

- Sternale Wundinfektion, die eine erneute operative Versorgung erforderte.

Die Mortalität wurde als innerhalb des Krankenhausaufenthaltes festgestellter Tod, gleich welcher Ursache, definiert.

Als weitere Beurteilungssysteme wurden der SAPS II- und der APACHE-Score für die Dauer der intensivmedizinischen Überwachung ermittelt.

- SAPS II (Simplified Acute Physiology Score): Der SAPS II ist ein Punktwert, welcher den Zustand eines Patienten während der intensivmedizinischen Überwachung angibt. Die dafür nötigen Daten werden innerhalb der ersten 24 Stunden auf der Intensivstation gesammelt und addiert (Le Gall et al. 1993).
- APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation): Dieser Punktwert ermittelt die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Patienten während seines Aufenthalts auf der Intensivstation. Der APACHE II setzt sich aus drei Datengruppen zusammen, deren Punktwerte addiert werden: APACHE-Score, Alterspunkte und Chronische Erkrankungen. Die erforderlichen Daten wurden ebenfalls innerhalb der ersten 24 Stunden des intensivmedizinischen Aufenthalts gesammelt. Ähnlich dem SAPS II-Score dient jeweils der schlechteste gemessene Wert, also der am weitesten von der physiologischen Norm abweichende, als Eingabe (Knaus et al. 1985).

2.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der einzelnen Patienten erfolgte aus 5 ml Vollblut, die postoperativ durch Blutentnahme aus einem zentralvenösen oder arteriellen Katheter gewonnen wurde. Das Vollblut wurde EDTA-gepuffert und anschließend bei -20 °C gefroren und für die weitere Bearbeitung konserviert. Die Polymorphismusanalyse erfolgte anschließend in drei Schritten: DNA-Isolierung, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese.

2.3.1 DNA-Isolierung

Die genomische DNA wurde aus dem peripheren Blut mit Hilfe eines DNA - Mini-Kits (Qiagen® - Hilden, Deutschland) isoliert. Die Isolierung erfolgte hierbei nach den Angaben und mit den innerhalb des Kits enthaltenen Lösungen des Herstellers.

Hierzu wurden zunächst 200 µl EDTA- Blut und 20 µl Proteinkinase-K in ein Eppendorf-Cup pipettiert und gemischt. Dies ermöglicht die Lyse der Leukozyten und damit die Freisetzung der DNA. Anschließend wurden 200 µl AL-Buffer hinzugegeben und das Gemisch wurde für 15 Sekunden in einem MS2-Minishaker (schütt-biotec GmbH – Göttingen, Deutschland) gevortext. Nach dieser Prozedur wurde die Lösung über Nacht bei 56 C° inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gemisch mit 200 µl 100%igem Ethanol zur Fällung der DNA vermischt. Das entstandene Lysat wurde nun auf die Säule eines Collection-Tubes geladen und eine Minute lang bei 6.000 x g (Vielfaches der Erdbeschleunigung) abzentrifugiert. Dabei bindet die durch die Lyse freigesetzte DNA an die im Tube befindliche Silica-Membran, während die restlichen Zellbestandteile abzentrifugiert werden.

Die an die Membran innerhalb der Säule gebundene DNA wird nun gewaschen, um eventuelle Restkontaminationen zu entfernen, und zur Trocknung nochmals zentrifugiert. Um die an die Membran gebundene und gewaschene DNA zu eluieren, wird diese mit 50µl Puffer (Buffer AE) für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgt die letzte Zentrifugation für eine Minute bei 6.000 x g. Die eluierte DNA ist jetzt überwiegend 50 kb lang und kann direkt zur weiteren Amplifizierung mittels DNA verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

In unserem Fall folgte anschließend eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge am Spektralphotometer BioMate™ 5 (Thermo Scientific – Milford, USA). Dies diente dem Nachweis von akzidentiellen Verunreinigungen des Templates durch Proteine und gewährleistete die erforderliche Reinheit und nötige Konzentration der Template-DNA.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion, PCR) dient der selektiven Vervielfältigung (Amplifizierung) eines Genabschnitts *in vitro*. Ausgehend von einem isolierten DNA-Extrakt wird hierbei nur ein bestimmtes, maximal etwa 3.000 Basenpaare (3 kbp) langes DNA-Fragment zyklisch amplifiziert.

Bei jeder PCR wurde neben den Patientenproben eine Negativkontrolle hinzugefügt, die anstatt der isolierten DNA Wasser enthielt. Mit Hilfe dieser Kontrolle lassen sich Kontaminationen mit fremder DNA bei der anschließenden Gel-Elektrophorese ausschließen. Der PCR-Prozess selbst besteht aus einer Anzahl von circa 30 Zyklen, wobei jeder bestenfalls eine Verdopplung der vorhandenen DNA-Menge bedeutet. Jeder einzelne Zyklus besteht hierbei aus drei Schritten:

1. Denaturierung („melting“)

Die isolierte Doppelstrang-DNA (dsDNA) wird auf 94-96 °C erhitzt, um die Einzelstränge, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden, zu trennen.

2. Primerhybridisierung („primer annealing“)

Nach Auftrennung der DNA wird die Temperatur wieder gesenkt, so dass die für die gesuchte DNA-Sequenz spezifischen Primer an die Einzelstränge binden können. Diese Primer sind für das gesuchte DNA-Anfangsstück zum jeweiligen Einzelstrang komplementär („forward and reverse primer“).

3. Elongation

Die zugesetzte hitzestabile Taq – DNA – Polymerase katalysiert nun die Verlängerung der von den Primern markierten DNA-Sequenzen mit freien Nucleotiden (Desoxynucleosidtriphosphat = dNTP). Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang wodurch ein komplementärer Strang hybridisiert wird. Die beiden Primer sind dabei so zu wählen, dass sie sich an Strang beziehungsweise Gegenstrang der zu amplifizierenden DNA-Sequenz anlagern. Die beiden Primer werden hierbei nicht wieder abgelöst und bilden den Anfang des neuen Einzelstrangs.

Durch Wiederholung dieses dreistufigen Zyklus ist eine exponentielle Amplifikation der gewählten DNA-Sequenz möglich. Zur Durchführung der PCR wurde ein Standard-Master-Mix erstellt. Dieser enthält alle für die Amplifizierung nötigen Substanzen und umfasste jeweils ein Gesamtvolumen von 25 µl, worauf 1 µl auf die isolierte DNA entfielen.

Ansatz Master Mix für 1 Probe:

- | | |
|-------------------------|-----------|
| • 10× Puffer | 2,5 µl |
| • Primer sense | 10,5 µl |
| • Primer Antisense | 0,5 µl |
| • dNTPs | 1,25 µl |
| • Taq-Polymerase | 0,2 µl |
| • HPLC-H ₂ O | 19,05 µl. |

Entspricht 24 µl des Master-Mix; dieser wird nun gut gemischt und anzentrifugiert. Danach wird 1 µl des DNA-Templates (entspricht 50 ng) hinzugefügt. Die Negativ-Kontrolle wird mit 1 µl HPLC- H₂O zum gleichen Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt.

Primerstammlösung (Biomers.net[®] - Ulm, Deutschland)

- T-786C Sense: lyophilisiert in 385 µl HPLC-H₂O (=100 pmol)
- T-786C Antisense: lyophilisiert 181 µl HPLC-H₂O (=100 pmol)

Verdünnung auf 10 pmol (1:10): 10 µl 100 pmol Primer + 90 µl HPLC-H₂O

Die Amplifikation der DNA wurde mit einem Mastercycler (Eppendorf[®] - Hamburg, Deutschland) in 30 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA fand bei 94°C und einer Laufzeit von 1 Minute statt. Bei 58°C wurden die Primer hybridisiert. Die Elongation der Primer durch die Taq-Polymerase fand bei 72°C und einer Laufzeit von 2 Minuten statt. Zusätzlich erfolgte eine „Vorlaufzeit“ von 5 Minuten bei 94°C sowie eine „Nachlaufzeit“ von 5 Minuten bei 72°C.

Für die Analyse des T-786C-SNPs wurde ein 657 Basenpaare langes Fragment der Promotorregion (GenBank[™] Accession No. D26607; -1113 bis -456) mittels PCR amplifiziert (forward primer 5'-GAGTCTGGCCAACACAAATCC-3', reverse primer 5'-GACCTCTAGGGTCAT-GCAGGT-3').

2.3.3 Restriktionsverdau

Um die nun amplifizierte DNA einem Genotyp zuweisen zu können, nutzt man die unterschiedliche Länge von zerschnittenen DNA-Sequenzen homologer Chromosomen, welche als verschiedene Restriktionsfragmentmuster sichtbar werden - den Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). Mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease werden die DNA-Sequenzen anhand einer spezifischen Erkennungssequenz geschnitten. Die von uns verwendete Endonuklease HpaII besitzt eine selektive Bindungsstelle für die C-Typ – Promotorregion des amplifizierten eNOS-Genabschnittes. Sie schneidet also bei einem durch den Polymorphismus durchgeführten Basenaustausch von Tyrosin durch Cytosin an Stelle 786 bp. Somit entstehen verschiedene Längen des Amplifikats, je nach Genotyp des untersuchten Patienten. Sichtbar werden diese durch die anschließende Gelelektrophorese.

2.3.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Das Gel dient dabei als Trägersubstanz: Die Moleküle des Gels bilden ein engmaschiges Netz, welches die zu trennenden DNA-Fragmente bei ihrer Wanderung innerhalb eines elektrischen Feldes behindert. Da DNA negativ geladen ist, wandert sie innerhalb eines elektrischen Feldes zum positiven Pol. Die einzelnen Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer spezifischen elektrischen Ladungen und vor allem aber ihrer Größe unterschiedlich schnell innerhalb des Gels. Nach einiger Zeit sind die verschiedenen Fragmente an unterschiedlichen Stellen im Gel einzeln nachweisbar und können mit Hilfe von Ethidiumbromid gefärbt und somit sichtbar gemacht werden. So entstehen typische Abfolgen von Banden der verschieden langen DNA-Fragmente.

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 3% Agarose-Gel (MetaPhor-Agarose der Firma Biozym[®] Scientific GmbH – Hessisch Oldendorf, Deutschland). Hierzu wurden 3 g des Agarose-Gels mit 100 ml eines 1fach TAE-Puffers (0,04 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA) gemischt. 80 ml wurden daraus entnommen und mit 8 µl Ethidiumbromid (Merck[®] KGaA – Darmstadt, Deutschland) vermischt.

Elektrophoretisch aufgetrennt wurde das PCR-Produkt bei 100 Volt, bis eine hinreichende Trennung erreicht war. Die Geltasche wurde mit 1 μ l Loadingbuffer (Carl Roth[®] GmbH + Co. KG – Karlsruhe, Deutschland) und 6 μ l der DNA-Probe beladen. Des Weiteren wurde ein Längenstandard von 100 bp (Carl Roth[®] GmbH + Co. KG – Karlsruhe, Deutschland) sowie eine Negativkontrolle, welche keine DNA beinhaltet, aufgetragen. Dann erfolgte für eine halbe Stunde das Anlegen des elektrischen Felds über dem Gel. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht, was eine genau Detektion der einzelnen Banden möglich macht.

Die fotografische Erfassung erfolgte in einem UV-Transilluminator (Biometra[®] biomedizinische Analytik GmbH – Göttingen, Deutschland) mit Hilfe einer CCD-Kamera und einer anschließenden computergestützten Auswertung (BioDocAnalyse Biometra[®] biomedizinische Analytik GmbH – Göttingen, Deutschland).

Die Patienten wurden schließlich nach ihrem Genotyp in drei Gruppen eingeteilt: TT (Wildtyp), TC (heterozygot für den Polymorphismus) und CC (homozygot für den Polymorphismus).

2.4 Statistische Analyse

Vor Studienbeginn wurde eine „A priori - Poweranalyse“ durchgeführt. Diese gibt Aufschluss darüber, mit welcher Chance bei einer Studie ein Effekt tatsächlich nachgewiesen werden kann – in unserem Falle ein signifikanter Unterschied der Mortalität zwischen den einzelnen Gruppen. Hierüber lässt sich der optimale Stichprobenumfang ermittelt, um valide Ergebnisse produzieren zu können. Um eine Studien-Power von 80 % (0,80) und eine Signifikanz von $p < 0,05$ (5%) zu erreichen, wurde eine Patientenzahl (n) von 500 errechnet.

Für die deskriptive Statistik wurden ordinalskalierte Werte als Mittelwert mit Standardabweichung $\pm s$ ausgedrückt. Zur Testung der Normalverteilung dieser, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt. Kategoriale Daten wurden in Prozentangaben ausgedrückt.

Zur Testung von Unterschieden innerhalb der verschiedenen Gruppen wurde für kategoriale Daten der Pearson-Chi-Quadrat-Test herangezogen. Mit Hilfe des χ^2 -Tests wurde die Hypothese über das Bestehen oder Nichtbestehen (Nullhypothese) eines

Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen überprüft. Ordinalskalierte Daten wurden durch den Kruskal-Wallis-Test überprüft.

Multivariate Varianzanalysen (multivariate analysis of variance, MANOVA) erfolgten für die Morbidität und Mortalität. Um den Alphafehler bei multiplen Testungen nicht zu kumulieren, wurden die multivarianten Analysen nach Bonferroni korrigiert.

Die Genotypenverteilungen des T-786C-Polymorphismus wurde mit einem χ^2 -Anpassungstest mit der erwarteten Verteilung innerhalb der normalen Bevölkerungen laut dem Hardy-Weinberg-Gesetz berechnet. Dieses besagt, dass in einer großen Population mit zufälliger Paarung und ohne populationsverändernde Einflüsse das Allelverhältnis eines gegebenen Genortes und die Genotypen konstant bleiben.

$$\begin{aligned} p^2 + 2pq + q^2 &= 1 & p &= \text{relative Häufigkeit des Allels } A \\ p + q &= 1 & q &= \text{Allelfrequenz des komplementären Allels } a \end{aligned}$$

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Programms SPSS (Statistical Program for Social Sciences for Windows, SPSS Inc. - Chicago, USA) angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypen- und Allelverteilung

Die in unserer Studienpopulation ermittelte Genotypenverteilung des eNOS T-786C – Polymorphismus entsprach nicht dem Hardy – Weinberg – Äquilibrium für die Genotypenverteilung und Allelfrequenz.

Tabelle 2: Genotypen- und Allelverteilung.

Variable	Wildtyp (TT)	Heterozygot (TC)	Homozygot (CC)
<i>Genotypenverteilung</i>	<i>n = 208 (41,6%)</i>	<i>n = 256 (51,2%)</i>	<i>n = 36 (7,2%)</i>
	T-Allel	C-Allel	
<i>Allelfrequenz</i>	<i>n = 672 (67,2 %)</i>	<i>n = 328 (32,8 %)</i>	

Die zu erwartende Genotypenverteilung wäre für TT $n = 226$ (45,2%), für TC $n = 220$ (44%) und für CC $n = 54$ (10,8%).

3.2 Präoperative Daten

Der Altersdurchschnitt und die Geschlechterverteilung waren innerhalb der drei Gruppen vergleichbar. Auch die Risikofaktoren waren bei allen Patienten ähnlich häufig vorbestehend. Einzig homozygote Träger des C-Allel besaßen eine höhere Prävalenz einer pAVK ($p = 0,03$) als heterozygote Träger oder die Wildtyp-Form.

Bei der präoperativen Medikation nahmen die homozygoten C-Allelträger mehr β -Blocker ($p = 0,004$) und ACE-Hemmer ($p = 0,0003$) ein. Träger des Wildtyp-Allels dagegen erhielten mehr Antiarrhythmika ($p = 0,006$) präoperativ. Die anschließend durchgeführte Multivarianzanalyse zeigte hierbei keinen Einfluss der verschiedenen präoperativ verabreichten Medikamente auf die Mortalität. Der ermittelte Euroscore verwies ebenfalls auf kein erhöhtes operatives Risiko einer bestimmten Allelgruppe.

Tabelle 3: Präoperative Daten.

Variable	TT (n = 208)	TC (n = 256)	CC (n = 36)	p-Wert
<i>Alters- und Geschlechtsverteilung</i>				
Alter (Jahre)	66,7 ± 10,9	67,9 ± 10,5	68,0 ± 8,7	0,908
Geschlecht (♂/♀)	141 / 67	157 / 99	25 / 11	0,28
<i>Risikofaktoren</i>				
BMI (kg/m ²)	27,0 ± 4,5	28,5 ± 4,7	28,2 ± 4,4	0,06
Nikotinabusus	80 (38%)	74 (29%)	13 (36%)	0,09
Arterieller Hypertonus	151 (73%)	182 (71%)	29 (81%)	0,49
Hyperlipoproteinämie	105 (50%)	114 (45%)	22 (61%)	0,12
Diabetes mellitus	59 (28%)	82 (32%)	13 (36%)	0,53
Positive Familienanamnese	37 (18%)	39 (15%)	3 (8%)	0,33
Ejektionsfraktion (%)	54,0 ± 14,1	52,0 ± 15,3	52,5 ± 15,9	0,89
Niereninsuffizienz	23 (11%)	36 (14%)	9 (25%)	0,07
pAVK	16 (8%)	13 (5%)	6 (17%)	0,03
Zerebrale Ereignisse	24 (12%)	35 (14%)	7 (19%)	0,41
Pulmonale Hypertonie	14 (7%)	22 (9%)	4 (11%)	0,59
COPD	18 (9%)	18 (7%)	4 (11%)	0,63
<i>Präoperative Medikation</i>				
β-Blocker	123 (59%)	164 (64%)	29 (81%)	0,004
ACE-Hemmer	99 (48%)	134 (52%)	30 (83%)	<0,001
Koronartherapeutika	40 (19%)	45 (18%)	8 (22%)	0,76
Antiarrhythmika	14 (7%)	3 (1%)	2 (6%)	0,006
Diuretika	86 (41%)	94 (37%)	19 (53%)	0,15
Lipidsenker	113 (54%)	104 (41%)	21 (58%)	0,05
Antidiabetika	37 (18%)	47 (18%)	10 (28%)	0,35
Weitere Antihypertensiva	51 (25%)	55 (21%)	5 (14%)	0,33
Bronchodilatoren	9 (4%)	5 (2%)	1 (3%)	0,32
Antikoagulanzen	145 (70%)	171 (67%)	21 (58%)	0,38
<i>Euroscore</i>	5 ± 4	6 ± 4	5 ± 4	0,09

3.3 Intraoperative Daten

Die intraoperativ erhobenen Daten zeigten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den drei Allelgruppen. Die Operationszeiten und Arten der Eingriffe waren bei allen drei Gruppen vergleichbar verteilt. Die Ergebnisse sind in absoluten Zahlen angegeben und für die jeweilige Allelgruppe in Prozente aufgeschlüsselt.

Tabelle 4: Intraoperative Daten.

Variable	TT <i>n</i> = 208	TC <i>n</i> = 256	CC <i>n</i> = 36	<i>p</i> -Wert
Operationszeitpunkt				
Elektiv (<i>n</i> = 396)	162 (78%)	203 (79%)	31 (86%)	0,9
Dringlich (<i>n</i> = 41)	17 (8%)	22 (1%)	2 (56%)	0,8
Notfall (<i>n</i> = 63)	29 (14%)	31 (12%)	3 (8%)	0,6
Eingriffe				
Bypass-OP (<i>n</i> = 251)	109 (52%)	123 (48%)	19 (53%)	0,72
Klappen-OP (<i>n</i> = 107)	43 (21%)	56 (22%)	8 (22%)	0,91
kombinierter Eingriff (<i>n</i> = 101)	38 (18%)	55 (21%)	8 (22%)	0,61
andere Eingriffe (<i>n</i> = 41)	23 (11%)	18 (7%)	0 (0%)	0,31
Operationszeiten				
Kardioplegie-Zeit (min.)	86 ± 38	92 ± 42	82 ± 24	0,23
CPB (min.)	131 ± 54	145 ± 81	129 ± 39	0,30

3.4 Postoperative Daten

Verglichen mit den beiden anderen Allelgruppen, zeigten die C-Allelträger eine signifikant erniedrigte Compliance ($p = 0,01$) der Lunge, einen insgesamt höheren Lung-Injury-Score ($p = 0,02$) und einen niedrigeren PEEP-Wert ($p = 0,01$). Alle anderen die Lungenfunktion betreffenden Messwerte wiesen keine relevanten Unterschiede bezüglich der drei Genotypgruppen auf (P_aO_2/F_iO_2 , P_aCO_2 , pH arteriell, Lungeninfiltrate).

Bei den hämodynamischen Untersuchungsergebnissen zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Deutliche Unterschiede ergaben sich bei der postoperativen Medikation für die inotropen Wirkstoffe Adrenalin ($p = 0,05$) und Noradrenalin ($p = 0,03$), so wie für das vasodilatierende Nitroglycerin ($p = 0,01$). Die Substitution dieser erfolgte am Häufigsten innerhalb der heterozygoten TC-Allelgruppe. Verabreichte Blutprodukte zeigten wie die beiden postoperative ermittelten Scores (APACHE II, SAPS II) gleiche Verteilungen. Die postoperative Komplikation der sternalen Wundinfektion zeigte eine Tendenz zur Gruppe der homozygoten C-Allelträger ($p = 0,05$), nicht jedoch die anderen aufgetretenen postoperativen Komplikationen wie Myokardinfarkt, Nachblutung, IABP- oder ECMO-Implantation; ebenso nicht die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus.

Tabelle 5: Postoperative Daten.

Variable	TT <i>n</i> = 208	TC <i>n</i> = 256	CC <i>n</i> = 36	<i>p</i> -Wert
<i>Lungenfunktion</i>				
PaO ₂ /FiO ₂	262 ± 107	255 ± 91	246 ± 130	0,25
PEEP (mbar)	7 ± 2	8 ± 3	6 ± 1	0,01
PaCO ₂ (mmHg)	40 ± 4,4	40 ± 4,8	40 ± 5	0,61
pH arteriell	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,0	7,4 ± 0,0	0,99
Compliance (ml/mbar)	51 ± 22	43 ± 20	40 ± 13	0,01
Infiltrate (Quadrant)	1,2 ± 0,8	1,3 ± 0,8	1,4 ± 0,8	0,12
Lung-injury-Score	1,2 ± 0,7	1,4 ± 0,7	1,5 ± 0,7	0,02
<i>Hämodynamik</i>				
Herzfrequenz (1/min.)	81,7 ± 13,2	83,3 ± 13	80 ± 10	0,48
MAP (mmHg)	80,5 ± 8,9	80 ± 9	77 ± 8	0,10
ZVD (mmHg)	11 ± 3	12 ± 4	11 ± 3	0,14
PCWP (mmHg)	15 ± 4	14 ± 4	14 ± 5	0,63
mittlerer PAP (mmHg)	25 ± 10	26 ± 5	25 ± 5	0,19
CI (l/min./m ²)	2,9 ± 0,9	3,07 ± 2,9	2,8 ± 0,7	0,89
SVRI (dyn*s*m ⁻² *cm ⁻⁵)	977 ± 471	978 ± 365	869 ± 227	0,64
PVRI (dyn*s*m ⁻² *cm ⁻⁵)	210 ± 184	218 ± 158	171 ± 70	0,70
<i>Medikation</i>				
Adrenalin (mg/d)	1,4 ± 5,4	10,9 ± 128,8	1,3 ± 3,4	0,05
Noradrenalin (mg/d)	1,1 ± 4,3	4,0 ± 17,6	2,2 ± 10,6	0,03
Levosimendan (mg/d)	0,1 ± 0,6	0,04 ± 0,7	0	0,65
Enoximon (mg/d)	10,5 ± 66,7	28 ± 196	25,3 ± 1,1	0,47
Dobutamin (mg/d)	4,9 ± 28,9	15,5 ± 67,6	22,4 ± 80,4	0,16
Nitroglycerin (mg/d)	8 ± 22	14 ± 33	6,9 ± 19,2	0,01
Amiodaron (mg/d)	74 ± 315	60 ± 234	16 ± 83	0,69
Kortison (mg/d)	18 ± 181	59 ± 385	4 ± 24	0,07
Vasopressin (iU/d)	0	0,3 ± 3,0	0	0,14
<i>Verabreichte Blutprodukte</i>				
Erythrozytenkonzentrate (ml/d)	207 ± 486	299 ± 688	202 ± 556	0,15
Frischplasma (ml/d)	46 ± 349	102 ± 664	50 ± 303	0,31
PPSB (iU/d)	7 ± 104	0	0	0,82
<i>Scores</i>				
APACHE II	15 ± 6	16 ± 7	15 ± 5	0,43
SAPS II	25 ± 7	25 ± 7	25 ± 7	0,22
<i>Postoperative Komplikationen</i>				
Nachblutung	2 (1%)	10 (4%)	4 (11%)	0,07
Myokard Infarkt	1 (0%)	1 (0%)	0 (0%)	0,21
Sternale Wundinfektion	0 (0%)	1 (0%)	1 (3%)	0,05
IABP	12 (6%)	22 (1%)	3 (8%)	0,50
ECMO	0 (0%)	1 (0%)	0 (0%)	0,50
<i>Aufenthaltsdauer</i>				
Intensivstation (d)	8 ± 16	8 ± 13	5 ± 8	0,07
Krankenhaus (d)	26 ± 22	25 ± 20	21 ± 12	0,71

3.5 Mortalität

Die Analyse der Sterblichkeit der untersuchten Patienten zeigte insgesamt eine Mortalitätsrate von 8,2 % ($n = 41$). Eine erhöhte Sterblichkeit spezifischer Allelträger konnte nicht festgestellt werden ($p = 0,15$). Eine weiterhin durchgeführte Subgruppen-Analyse ergab eine erhöhte Sterblichkeitsrate für elektiv durchgeführte Operationen von 6,6 % ($n = 26$). Diese war ebenfalls gleichmäßig auf alle drei Allelgruppen verteilt. Dringlich erfolgte Operationen wiesen ein ähnliches Bild auf ($p = 0,71$). Die homozygoten C-Allelträger zeigten innerhalb dieser Mortalitätsvariablen zwar erhöhte Werte, doch sind diese im Vergleich nicht signifikant ($p > 0,05$).

Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch eine deutlich erhöhte Mortalität ($p = 0,014$) der homozygoten C-Allelträger, die einer Notfall-Operation unterzogen werden mussten.

Tabelle 6: Mortalitätsraten.

	TT	TC	CC	
Variable	$n = 208$	$n = 256$	$n = 36$	<i>p</i> -Wert
Mortalität				
Insgesamt 8,2 % ($n = 41$)	15 (7%)	20 (8%)	6 (17%)	0,15
Elektiv-OP 6,6 % ($n = 26$)	8 (4%)	14 (5%)	4 (11%)	0,25
Dringliche OP 14 % ($n = 6$)	2 (1%)	4 (2%)	0 (0%)	0,71
Notfall-OP 14 % ($n = 9$)	5 (2%)	2 (1%)	2 (6%)	0,014

4 Diskussion

Ziel der Studie war es, den unmittelbaren Einfluss des T-786C-Polymorphismus des eNOS-Gens bei kardiochirurgischen Operationen mit Hilfe eines kardiopulmonalen Bypass zu untersuchen. Die von uns erhobenen Ergebnisse zeigen hierbei einen signifikanten Zusammenhang zwischen homozygoten Trägern des C-Allels und einer erhöhten postoperativen Sterblichkeit nach kardiochirurgischen Operationen mit CPB.

Wie bereits Eingangs erwähnt, spielt NO eine essentielle Rolle innerhalb der Regulation der kardiovaskulären Homöostase. Defekte der NO-Funktion führen folglich zu Endotheldysfunktionen mit schwerwiegenden Konsequenzen (Quyyumi et al. 1995). So wurden mehrere Gen-Polymorphismen der eNOS, welche für die basale vaskuläre NO-Produktion verantwortlich ist, bereits mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht. Daher gilt das eNOS-Gen auch als Suszeptibilitätsgen: Diese Gene erhöhen bei vorhandenen Mutationen oder Polymorphismen die Empfänglichkeit für spezifische Erkrankungen. Der von uns untersuchte T-786C-Polymorphismus innerhalb der Promotor-Region des eNOS-Gens verringert beispielsweise die Expression der eNOS und kann die Grundlage für verschiedenste Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems bilden; Atherosklerose, Koronarspasmen und Myokardinfarkte sind mögliche Folgen dieser verringerten basalen NO-Sekretion (Miyamoto et al. 1998; Rossi et al. 2003).

Die Geschlechter- und Altersverteilung unseres Patientenkollektivs zeigte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Allelgruppen, was eine vergleichbare Studienpopulation zugrunde legt. Auch die durchgeführten operativen Eingriffe und die Dringlichkeit dieser waren zwischen den Gruppen ähnlich verteilt, wie auch die CPB- und Kardioplegie-Zeiten. Die verabreichten Blutprodukte zeigten keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen, ähnlich den postoperativen Komplikation, welche wiederum zu analogen Verhältnissen innerhalb aller drei Gruppen auftraten. Der beobachtete T-786C-Polymorphismus hatte somit zumindest auf die durchgeführten operativen Verfahrensweisen keinerlei signifikanten Einfluss und die drei Allelgruppen der Studie stellen sich als sehr homogen verteilt dar.

Die Genotypenverteilung unserer Studienpopulation entsprach nicht dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium. Dieses Gleichgewicht geht von einer idealen und sehr großen Population aus, in welcher ein konstanter Genpool vorherrscht. Dies bedeutet, dass Einflussfaktoren wie Mutation, Selektion, Im- und Emmigration nicht berücksichtigt werden – es findet innerhalb dieses mathematischen Modells also keine Evolution statt. Die Anzahl unserer Studienkollektivs könnte also ein Grund für das Abweichen vom theoretischen Gleichgewicht sein, da die ideale Population so groß gewählt ist, dass einzelne genetische Veränderung praktisch keine Auswirkungen haben. Auch entsprach das Studienkollektiv präselektionierten Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, also ebenfalls nicht der Normalbevölkerung. Der Einschluß der Patienten erfolgte zufällig in die Studie – in Abhängigkeit der Ein- und Ausschlußkriterien – wodurch sich eine Diskrepanz erklären ließe. Die Berechnung des Hardy-Weinberg-Äquilibriums erfolgte außerdem für kaukasische Patienten. Unser Patientenkollektiv könnte demnach durch Patienten anderer Herkunft beeinflusst worden sein. Auch war durch das unizentrische Studiendesign das Patientenkollektiv auf den Großraum Göttingen beschränkt.

Die präoperativ ermittelten Risikofaktoren zeigten, bis auf die pAVK, ebenso vergleichbare Risikoprofile für alle Allelträger. Das signifikant erhöhte Auftreten der pAVK bei CC-Allelträger ($p = 0,03$) steht hierbei im Einklang mit anderen Studien, da die Atherosklerose, die für circa 90 % der pAVK-Fälle verantwortlich ist, durch eine basal verminderten NO-Synthese entstehen kann (Boger et al. 1997, Lubos et al. 2009). Als initial für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen des Gefäßsystems gilt die Endothelschädigung. Dieser folgt die Expression von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Mediatoren. Es kommt zur Anlagerung und Migration von Leukozyten und Lipoprotein-Partikeln in den subendothelialen Raum der Intima. Diese Präkursorformen atherosklerotischer Plaques sind unter physiologischen Bedingungen durch die basale NO-Liberation hemmbar (Quyyumi 1998).

Andere durch atherosklerotische Veränderungen verursachte Krankheitsbilder, wie stattgehabte Schlaganfälle oder eine bereits existente Niereninsuffizienz, traten jedoch nicht vermehrt innerhalb der CC-Allelträger auf. Dies bestätigt ebenfalls die Ergebnisse anderer Studien: Sie zeigten den Zusammenhang zwischen anderen eNOS-Polymorphismen (VNTR-Polymorphismus im Intron 4, Glu298Asp-Mutation auf Exon 7) und der Entstehung von schweren Nierenschäden (Nagase et al. 2003) – für den von

uns untersuchten Polymorphismus ergab sich jedoch bisher kein Zusammenhang. Zur Entstehung von Schlaganfällen scheint generell keine spezifischen Assoziation mit bestimmten Polymorphismen zu bestehen (Grewal et al. 2007). Lediglich die Karotisstenose, welche zu Schlaganfällen führen kann, ist mit dem untersuchten Polymorphismus assoziiert (Ghilardi et al. 2002).

Die präoperativ verabreichten Medikamente zeigten signifikante Unterschiede zwischen den drei Allelgruppen. So erhielten die homozygoten C-Allelträger durchschnittlich mehr β -Blocker ($p = 0,004$), ACE-Hemmer ($p = 0,0003$) und Lipidsenker ($p = 0,05$). Dies ist konkordant mit den, zwar nicht signifikant, aber im Durchschnitt doch erhöhten Auftretens der präoperativen Risikofaktoren arterieller Hypertonus (80,6 % innerhalb der homozygoten C-Allelträger, 72,6 % innerhalb der Wildtypen; $p = 0,49$) und Hyperlipoproteinämie (61,1 % der homozygoten C-Allelträger, 50,5 % der Wildtypen; $p = 0,12$). Antiarrhythmika hingegen wurden stärker bei Wildtyp-Allelträgern präoperativ ermittelt ($p = 0,006$). Dies lässt sich weder mit dem von uns untersuchten Polymorphismus noch mit den ermittelten präoperativen Risikofaktoren in Einklang bringen. Es bleibt also fraglich, in wie fern diese Daten eine eigene Entität an Erkrankung widerspiegeln.

Bei den von uns ermittelten Lungenfunktions-Parametern zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl in der pulmonalen Compliance ($p = 0,01$), den Lung-Injury-Scores ($p = 0,02$), als auch dem PEEP ($p = 0,01$) der einzelnen Gruppen. Die insgesamt in allen Gruppen verringerte Compliance, also die geringere Rückstellkraft der Lunge, deutet auf einen pathologischen Verlust der Integrität des Lungengewebes hin. Dies ist jedoch teilweise der maschinellen Beatmung zu schulden, da diese die funktionelle Residualkapazität (FRC) verändert. Infolge dessen steigt der pulmonale Gefäßwiderstand (PVRI) und die gemessene Compliance nimmt ab. Die isolierte Signifikanz der erniedrigten Compliance der CC-Allelträger gegenüber den anderen beiden Gruppen lässt sich aber nur schwer erklären. Andere Studien zeigten lediglich, dass *in vitro* erhöhte Beatmungsvolumina und -zyklen der maschinellen Beatmung zu einer vermehrten NO-Freisetzung in das alveoläre Kompartiment der Lunge führen (Hammerschmidt et al. 2003). Das dehnungsabhängig aus Alveolarmakrophagen freigesetzte NO dient der anti-apoptischen Autoprotektion alveolärer Typ-II-Zellen; es kommt sonst zur belastungsinduzierten Apoptose der Zellen. Der Einfluss auf die

Compliance der Lunge bei verringerter NO-Distribution bleibt somit jedoch weiterhin offen, zumal andere Studien vor allem den Einfluss auf das vaskuläre Kompartiment der Lunge nachweisen konnten – der gemessene PVRI würde infolge dessen steigen. Der von uns ermittelte PVRI war jedoch bei keiner spezifischen Allelgruppe signifikant erhöht, obgleich durchgehend außerhalb physiologischer Werte (PVRI unter Ruhebedingungen: $67 \pm 23 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{cm}^{-5}$). Der Lung-Injury-Score ($1,49 \pm 0,70$) war in der Gruppe der homozygoten Allelträger erhöht und deutete auf eine moderate bis milde Schädigung der Lunge hin (Score 0,1 – 2,5), ein akutes Lungenversagen (Score $> 2,5$) mit Einfluss auf die Mortalität wurde jedoch nicht beobachtet. Dieses „Acute Respiratory Distress Syndrom“ (ARDS) wurde bereits in anderen Studien als eher seltene Komplikation bei CPB-Operation mit einer wahrscheinlichen Mortalität von circa 15 % beobachtet; meistens traten nur geringgradige Lungenschädigungen auf (Milot et al. 2001). Auch der für die heterozygoten Allelträger erhöhte PEEP-Wert ($8 \pm 3 \text{ mbar}$) scheint kein direkter Prädiktor für eine Polymorphismus-assoziierte stärkere Anfälligkeit für pulmonale Komplikationen nach CPB-Operationen zu sein.

Generell zeigen diese Daten trotz der nur milden Lungenschädigung insgesamt einen möglichen Einfluss des T-786C–Polymorphismus auf die Lungenfunktion und stehen im Einklang mit anderen Studien, die bereits Auswirkungen einer verminderten NO-Distribution auf die Lunge beobachteten (Berger et al. 2005).

Die postoperativ erhobenen invasiven hämodynamischen Messwerte zeigten keine Unterschiede zwischen den drei Allelgruppen; alle Werte waren im Mittel ähnlich verteilt und zeigen zumindest innerhalb der Akutsituation des intensivmedizinischen Aufenthaltes nach kardiochirurgischen Eingriffen keinen Einfluss des Polymorphismus. Bei den verabreichten Medikamenten zeigten sich teils starke Unterschiede innerhalb der drei Gruppen: Die signifikant höchsten Dosen pro Tag an Adrenalin ($p = 0,05$), Noradrenalin ($p = 0,03$) und Nitroglycerin ($p = 0,01$) erhielten die heterozygoten Allelträger. Alle anderen Dosierungen der von uns untersuchten Medikamente waren ähnlich auf alle Patienten des Kollektivs verteilt. Boeken et al. postulierte 1999 einen Zusammenhang zwischen präoperativ verabreichten ACE-Hemmern und einem perioperativ erhöhten Bedarf an Katecholaminen. Dieser entstehe durch die veränderte Mikrozirkulation und Inflammation und dem nachfolgenden „SIRS“ (Boeken et al. 1999). Die homozygoten Allelträger unserer Studie zeigten eine deutlich vermehrte Einnahmen von ACE-Hemmern präoperativ ($p = 0,0003$), doch den höchsten

perioperativen Verbrauch an Katecholaminen zeigten die heterozygoten Allelträger (Adrenalin $p = 0,05$ / Noradrenalin $p = 0,03$). Die genannte Studie unterschied jedoch nicht zwischen Trägern bestimmter Polymorphismen und somit ist die Gruppenverteilung und damit auch die Verteilung bereits vorbehandelter Patienten nicht vergleichbar. Ein möglicher Einfluss des Polymorphismus könnte trotzdem bestehen, da die heterozygoten Träger insgesamt mehr ACE-Hemmer erhielten als beispielsweise die Träger des Wildtyp-Allels. Somit bleibt es auch fraglich, wie groß der Einfluss eines einzelnen kranken Allels auf den Phänotyp des Patienten ist ohne den Haplotyp zu berücksichtigen. Die Studie von Liakopoulos et al. (2006) zeigte diesen erhöhten Bedarf an inotropen Medikamenten ebenfalls nicht, obgleich dort auch kein erhöhter Bedarf an ACE-Hemmern nachweisbar war. Dies mag daran liegen, dass die genannte Studie die heterozygoten und homozygoten Allelträger innerhalb einer Gruppe zusammenfasste, lediglich elektive Bypass-Patienten einschloss und insgesamt eine geringere Fallzahl aufwies. Dies könnte für unsere Studie bedeuten, dass eventuell nicht nur die ACE-Medikation signifikant innerhalb der Polymorphismus-Träger erhöht bliebe, sondern nun auch der Katecholaminbedarf signifikant für diese Gruppe erhöht wäre. Somit könnten wir formal zwar die beschriebene Studie bestätigen, der Einfluss des untersuchten Polymorphismus bleibt jedoch weiterhin fraglich. Einzig der mit der Langzeiteinnahme von ACE-Hemmern verbundene Abfall des SVRI und des MAP konnte gezeigt werden. Zwar insgesamt nicht signifikant (SVRI $p = 0,64$ / MAP $p = 0,10$), doch sind SVRI und der MAP der homozygoten Träger erniedrigt.

Den höchsten Verbrauch gegenüber den anderen Allelgruppen an Nitroglycerin (NTG) zeigten wiederum die heterozygoten Träger (14 ± 33 mg/d, $p = 0,01$). Dies scheint ebenfalls erstaunlich, da der T-786C – Polymorphismus generell zu einer verringerten NO-Produktion führt. Demnach müssten die homozygoten Allelträger basal die geringste NO-Produktion und damit den höchsten Bedarf daran besitzen. Ein möglicher Grund für diese Divergenz könnte die CPB-assoziierte Hypotension sein. Die durch den Kontakt mit der HLM und der Kardioplegie freigesetzten proinflammatorischen und vor allem vasodilatierenden Mediatoren führen zu einer starken Hypotension, getriggert durch die lokal überschießende Aktivität der myokardialen iNOS (Tofukuji et al. 1998). Der gemessene SVRI und der MAP der homozygoten Träger waren stets niedriger, als die der beiden anderen Gruppen, was auf eine stärkere Vasodilatation hinweist. Eine tierexperimentellen Studie konnte bereits zeigen, dass unter hypoxischen Bedingungen schon eine geringe Menge an NO zur Vasodilatation der Arteriolen und damit zu einer

relativ starken Senkung des MAP und CI führt (Dias-Junior et al. 2006). Diese in Zusammenhang mit den präoperativ distribuierten ACE-Hemmern stehende Vasodilatation könnte ein möglicher Grund für einen geringeren Bedarf an NTG erklären. Jedoch erklärt dies nicht die gesteigerte Distribution von NTG der TC-Allelträger, da diese auch durchschnittlich am meisten inotrope Substanzen erhielten. Demnach bräuchten die heterozygoten Träger eine verringerte Vorlast durch gesteigertes venöses „pooling“ des Blutes durch das NTG, zusätzlich zur gesteigerten Pumpleistung durch die Katecholamine – insgesamt würde also eine schwächere Herzleistung bestehen und die Mortalität sollte in dieser Gruppe höher sein. Einzig tierexperimentelle Studien von Quyyumi et al. (1998) zeigten einen möglichen Zusammenhang zwischen verwendeten ACE-Hemmern und einer nachfolgend erhöhten Bioverfügbarkeit an NO: Durch die verminderte Produktion an Angiotensin-II erhöht sich die Bradykinin-Aktivität, welche wiederum die Endothelfunktion verbessert. Des Weiteren wird die Bildung von toxischen Metaboliten des oxidativen Stress verringert, welche als Scavenger für NO dienen können.

Bezüglich der postoperativ ermittelten APACHE II- und SAPS II-Scores zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Somit scheint auch hierbei eine vergleichbare Patientenverteilung bezüglich der postoperativen intensivmedizinischen Situation zu bestehen.

Insgesamt zeigten sich die von uns ermittelten Mortalitätsraten im Rahmen der allgemeinen Krankenhaus-Mortalität kardiochirurgischer Patienten (Osswald et al. 1999). Somit ist auch hierbei eine Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten mit anderen Instituten und Studien gegeben. Die generell erhöhten Mortalitäts-Werte für Patienten nach dringlichen oder Notfall-Operationen sind konkordant mit anderen Studien, die bereits zeigen konnten, dass nicht-elektiv durchgeführte kardiochirurgische Operationen einen Risikofaktor für die perioperative Sterblichkeit darstellen (Sergeant et al. 2003). Einzig die Mortalität der homozygoten C-Allelträger zeigte in der Subgruppe der Notfall-Operationen eine deutliche Signifikanz ($p = 0,0144$). Bei zwei Todesfällen von insgesamt drei Patienten dieser Gruppe stellt dies eine Mortalität von 66,7 % dar.

Anhand eines murinen *in-vitro*-Modells zeigten Ichinose et al. (2007) die protektiven Eigenschaften der eNOS: Eine Überexpression der myokardialen eNOS im Rahmen eines septischen Schocks reduzierte die durch die Sepsis verursachte myokardiale

Dysfunktionen und senkte damit die Mortalität (Ichinose et al. 2007). Demnach könnte die durch den Polymorphismus verringerte NO-Menge für die gesteigerte Mortalität verantwortlich sein. Da es sich jedoch um keine klinischen und nicht an Menschen gewonnenen Daten handelt, bleibt die einfache Übertragung dieser auf unsere Studie fraglich. Ein weiterer möglicher Einflussfaktor der gesteigerten Mortalität stellt die erhöhte Rate an renalen Vorerkrankungen der homozygoten Allelträger dar. Diese ist zwar nicht statistisch signifikant ($p = 0,07$), jedoch fast doppelt so hoch als in den beiden anderen Gruppen. Es konnte bereits klinisch gezeigt werden, dass eine vor der CPB-Operation bestehende Niereninsuffizienz die Mortalität der Patienten steigert (Chonchol et al. 2007). Auch die Antwort auf den stärksten Transkriptionsreiz der eNOS, die Hypoxie, ist durch den von uns untersuchten Polymorphismus abgeschwächt (Rossi et al. 2003). Diese verminderte Antwort auf einen akuten O₂-Mangel könnte ebenfalls entscheidenden Einfluss nehmen. Gerade die Subgruppe der Notfallpatienten, welche akute Ischämien erlitten, ist besonders anfällig für eine mangelnde Reaktion des Endothels auf eine plötzliche Ischämie. Somit bleibt fraglich inwieweit der Polymorphismus alleinig die beschriebenen Ergebnisse erklärt.

Wie bereits erwähnt, lassen sich die von uns ermittelten Ergebnisse nur teilweise in das Gefüge der bisherigen Publikation über den klinischen Einfluss des eNOS-Polymorphismus T-786C einfügen. Diese Inkonsistenz zieht sich leider durch fast alle klinischen Studien zum Einfluss von NO. Es gibt eine Vielzahl an Publikationen zu den einzelnen eNOS-Polymorphismen und dem Auftreten eines arteriellen Hypertonus und ebenso viele, die einen Zusammenhang widerlegen können (Tsujita et al. 2001).

Unsere Studie zeigte zwar eine signifikant erhöhte Sterblichkeit der homozygoten Allelträger, jedoch nur innerhalb der Subgruppe der Notfall-Patienten. Allgemein war die Mortalität vergleichbar mit den anderen Gruppen. Die geringe Patientenzahl innerhalb der Notfallgruppe ($n = 3$) ist zwar statistisch signifikant, aber aufgrund dessen auch angreifbar. Es bleibt außerdem fraglich, inwieweit die einzelnen Notfall-Patienten und die Schwere ihrer Erkrankung vergleichbar sind. Auch die Dauer und Art des Transports, die Abhängigkeit von Tageszeiten und personeller Besetzung der zuständigen Rettungsdienste und des chirurgischen Personals haben einen gewichtigen Einfluss auf die Mortalität. Die Vergleichbarkeit mit anderen Studien und deren Ergebnissen ist ebenso kritisch zu hinterfragen, da beispielsweise die Studie um Liakopoulos et al. (2006) eine viel geringere Patientenzahl einschloss ($n = 105$) und die

heterozygoten und homozygoten Allelgruppen zusammenfügte. Des Weiteren wurden bei der genannten Studie lediglich Patienten nach elektiven Bypass-Operationen eingeschlossen und der Beobachtungszeitraum umfasste nur die ersten 24 Stunden postoperativ.

Die eingeschränkte Schlussfolgerung dieser Studie, der Polymorphismus habe keinen klinischen Einfluss, wurde zwar durch uns bestätigt – die elektiven Operation spiegeln dies ebenfalls wider – die signifikante Mortalität der homozygoten Notfall-Operationen bleibt jedoch bestehen. Auch die beiden erwähnten Studien zur Restenose-Rate beziehungsweise vermehrten Auftreten von Myokardinfarkten und erhöhter Sterblichkeit nach Stent-Implantation unterstützen unsere Studienergebnisse. Auch die Verteilung der Allele zeigt zumindest einen generellen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und der Notwendigkeit eines kardiochirurgischen Eingriffs durch bestehende Erkrankungen. Fasst man die Gruppe der heterozygoten und homozygoten Allelträger zusammen, so stellen diese 58 % aller von uns untersuchten kardiochirurgischen Patienten dar.

Eine weitere Einschränkung unserer Studie besteht durch den untersuchten Einfluss eines einzelnen Polymorphismus auf eine ausgewähltes Kollektiv. Es existieren eine Vielzahl an Polymorphismen und Mutationen innerhalb des eNOS-Gens, alle mit unterschiedlichsten Auswirkungen auf die Expression und Distribution des Genproduktes. Allein für die Promotorregion des eNOS-Gens, innerhalb welcher der von uns untersuchte Polymorphismus liegt, konnten bereits drei verschiedene SNPs identifiziert werden (Wang und Wang 2000). Die eingangs erwähnte starke Assoziation des T-786C-SNP mit dem VNTR in Intron 4 des eNOS-Gens spiegelt diese mögliche synergistische Wirkung der einzelnen Polymorphismen beispielhaft wider. Der genannte VNTR konnte bereits mit einer erhöhte Rate an Myokardinfarkten (Jemaa et al. 2007), primärer arterieller Hypertonie (Moe et al. 2006) und dem vermehrten Auftreten einer KHK (Yoshimura et al. 2000) assoziiert werden. Es bleibt somit fraglich, ob ein einzelner Basenaustausch schon genügt, um die Mortalität standardisierter chirurgischer Eingriffe zu steigern. Somit erscheint die Untersuchung des kompletten Haplotyps der einzelnen Patienten sinnvoller. Des Weiteren sollten immer auch vorbestehende Risikofaktoren mit einbezogen werden, da diese klinische Manifestationen von Polymorphismen teilweise erst sichtbar machen. So konnte eine erhöhte Inzidenz einer manifesten KHK beim Nachweis des VNTR in Intron 4 in Kombination mit dem

Risikofaktor Nikotinabusus nachgewiesen werden (Yoshimura et al. 2000). In unsere Studie gelang dieser Nachweis nicht für den untersuchten Polymorphismus.

Die Beeinträchtigung durch den CPB ist ebenfalls schwierig von genetischen Normvarianten zu trennen, da dieser interindividuellen Schwankungen unterliegt – möglicherweise wiederum durch die verschiedenen Polymorphismen und ihre Wechselwirkungen beeinflusst. Weitere Einschränkungen der Studie bestehen durch die Beschränkung auf Patienten kaukasischer Herkunft und der insgesamt geringen Anzahl an CC-Allelträgern. Der Studienzeitraum war außerdem auf die Dauer des Krankenhausaufenthaltes begrenzt ohne weitere Nachuntersuchungen. Der Nachweis verschiedenster Grunderkrankungen, vermittelt durch den T-786C – Polymorphismus, bedingt oftmals eine Pathogenese von mehreren Jahren, wie im Beispiel der Atherosklerose. Folglich wäre eine Nachverfolgung über einen größeren Zeitraum aussagekräftiger und müsste insgesamt auch mehr Patienten einschließen. Auch die verwendeten statistischen Tests können die Ergebnisse der Studie beeinflusst haben. Die Problematik des multiplen Testens besteht beispielsweise in der Kumulation des α -Fehlers und Inkonsistenz der Ergebnisse mit widersprüchlichen Aussagen. Zur Vermeidung der α -Fehlerinflation korrigierten wir daher nach Bonferroni um das Signifikanzniveau anzupassen. Aber auch diese Methode hat ihre Schwächen und es kann zum Verlust von Signifikanzen kommen.

5 Zusammenfassung

Die Atherosklerose stellt mit ihren Folgeerkrankungen wie der arteriellen Hypertonie, KHK und zerebralen Insulten die häufigste Todesursache innerhalb der westlichen Industrieländer dar. Die drei häufigsten Todesursachen sind hierbei rein kardialer Genese (chronische ischämische Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz) und sind im Jahr 2007 für 22,3% aller innerhalb Deutschlands aufgetretenen Todesfälle verantwortlich gewesen. Dem Verständnis um die Pathogenese dieser Erkrankungen kommt demnach eine immense Bedeutung zu, nicht nur im Hinblick auf mögliche Therapieansätze, sondern auch hinsichtlich deren Prävention und der Einschätzung verschiedenster Risikofaktoren.

Zur Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen des Gefäßsystems und der daraus resultierenden Endotheldysfunktion tragen verschiedenste Faktoren bei; es handelt sich somit um eine polygenetische und multifaktorielle Erkrankung. Neben habituellen, umweltbedingten und demographischen Einflussfaktoren rücken genetische Normvarianten zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Studien. Genpolymorphismen stellen hierbei eine nicht beeinflussbare Disposition für verschiedenste Erkrankungen dar. Der von uns untersuchte T-786C-Polymorphismus des eNOS-Gens konnte bereits mit verschiedensten Erkrankungen des Gefäßsystems, wie der Atherosklerose, in Verbindung gebracht werden. Durch den genannten Polymorphismus kommt es zu einem einzelnen Basenaustausch von Thymin durch Cytosin innerhalb der Promotorregion des eNOS-Gens. Dies führt zu einer stark reduzierten Expression des Gens und somit einer verminderten Distribution an Stickstoffmonoxid. Dieses spielt eine entscheidende Rolle innerhalb der Integrität des Endothels durch seine vasodilatierenden, antithrombotischen und antiproliferativen Eigenschaften.

Es wird jedoch kontrovers diskutiert, inwiefern dieser Polymorphismus alleinig oder in Kombination mit anderen Polymorphismen und Risikofaktoren für die Entstehung atherosklerotisch bedingter Erkrankungen wie beispielsweise Myokardinfarkten oder der arteriellen Hypertonie mitverantwortlich ist. Über die unmittelbare Einflussnahme des Polymorphismus nach und während invasiver medizinischer Eingriffe wie perkutaner Koronarinterventionen und Bypass-Operationen gibt es darüber hinaus nur sehr wenige und ebenfalls widersprüchliche Studien.

Ziel unserer Studie war es somit, den Einfluss des T-786C–Polymorphismus auf kardiochirurgische Patienten zu untersuchen, um bestehende Studien und deren Ergebnisse zu überprüfen.

An 500 Patienten, welche alle mit Hilfe eines kardiopulmonalen Bypasses operiert wurden, untersuchten wir den Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Polymorphismus, seiner Ausprägung (heterozygot versus homozygot) und der aufgetretenen perioperativen Mortalitätsrate. Die Datensammlung umfasste sowohl prä-, intra- als auch postoperative Daten während des Krankenhausaufenthaltes. Zur Genanalyse wurde allen Patienten postoperativ Blut entnommen. Aus diesem wurde anschließend die genomische DNA isoliert, amplifiziert und durch nachfolgende Gelelektrophorese der jeweils vorherrschende Alleltyp dargestellt. Es stellten sich hierbei folgende Genotypen dar: TT-homozygote Träger im Sinne des Wildtyps (208 Patienten / 41,6%), TC-heterozygote Träger des Polymorphismus (256 Patienten / 51,2%) und CC-homozygote Polymorphismusträger (36 Patienten / 7,2%). Anschließend folgte eine statistische Auswertung der gewonnenen Daten. Diese diente der Korrelation zwischen etwaig gesteigerter Mortalitätsrate und dem Auftreten des untersuchten Polymorphismus.

Die von uns durchgeführte Studie zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem homozygoten Auftreten des T-786C–Polymorphismus und einer erhöhten perioperativen Sterblichkeit. Dieser besteht jedoch nur innerhalb der Subgruppe der Notfall-Patienten. Für elektiv oder dringlich durchgeführte Operationen konnte keine statistische Korrelation hergestellt werden. Im Bezug auf andere bereits publizierte Studien bleibt die Auswirkung des untersuchten Polymorphismus somit weiterhin kontrovers. Auch andere Ergebnisse der Studie widersprechen hierbei vorbestehenden Studien.

Trotz eines erhöhten Auftretens von Todesfällen innerhalb der homozygoten Merkmalsträger bleibt der klinische Einfluss des Polymorphismus als unabhängiger Risikofaktor fraglich. Zur weiteren Charakterisierung von genetischen Einflussgrößen auf die perioperative Mortalität müssten beispielsweise synergistische Effekte mehrerer Polymorphismen untersucht werden. Es existiert eine Vielzahl an Studien zu einzelnen Polymorphismen des eNOS-Gens und deren Assoziation untereinander, jedoch nur sehr

wenige zu Polymorphismus-Konstellationen und individuellen Haplotypen. Diese könnten zusammen mit vorbestehenden Risikofaktoren eine vielseitigere Sicht auf die Auswirkungen genetischer Normvarianten ermöglichen.

Der von uns untersuchte T-786C – Polymorphismus eignet sich demnach nicht als präoperative Screeningmethode zur Abschätzung der perioperativen Mortalität einzelner Patienten. Dafür ist der alleinige Einfluss des Polymorphismus zu gering und die Verteilung von hetero- und homozygoten Allelträgern innerhalb kardiochirurgischer Patientenkollektive zu weit gestreut.

6 Literaturverzeichnis

- Anonymus (2004): "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." *Nature* 431(7011): 931-945.
- Asimakopoulos G (1999): "Mechanisms of the systemic inflammatory response." *Perfusion* 14(4): 269-277.
- Bakhtiary F, Moritz A, Kleine P, Dzemali O, Simon A, Ackermann H, Martens S (2008): "Leukocyte depletion during cardiac surgery with extracorporeal circulation in high risk patients." *Inflamm Res* 57(12): 577-85.
- Becker BF, Kupatt C, Massoudy P, Zahler S (2000): "Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion." *Z Kardiol* 89 Suppl 9: IX/88-91.
- Berger MM, Hesse C, Dehnert C, Siedler H, Kleinbongard P, Bardenheuer HJ, Kelm M, Bartsch P, Haefeli WE (2005): "Hypoxia impairs systemic endothelial function in individuals prone to high-altitude pulmonary edema." *Am J Respir Crit Care Med* 172(6): 763-767.
- Bertocchi C, Schmid M, Hasslacher J, Dunzendorfer S, Patsch JR, Joannidis M (2010): "Differential effects of NO inhibition in renal epithelial and endothelial cells in mono-culture vs. co-culture conditions." *Cell Physiol Biochem* 26(4-5): 669-78.
- Boeken U, Feindt P, Mohan E, Zimmermann N, Micek M, Kalweit G, Gams E (1999): "Post-perfusion syndrome and disturbed microcirculation after cardiac surgery: the role of angiotensin-converting-enzyme inhibitors." *Thorac Cardiovasc Surg* 47(6): 347-351.
- Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC (1996): "The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications." *Atherosclerosis* 127(1): 1-11.

- Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC (1997): "Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease." *Circulation* 95(8): 2068-2074.
- Boon RA, Horrevoets AJ (2009): "Key transcriptional regulators of the vasoprotective effects of shear stress." *Hamostaseologie*. Jan;29(1):39-40, 41-3.
- Borgdorff P, Fekkes D, Tangelder GJ (2002): "Hypotension caused by extracorporeal circulation: serotonin from pump-activated platelets triggers nitric oxide release." *Circulation* 106(20): 2588-2593.
- Breda MA, Drinkwater DC, Laks H, Bhuta S, Corno AF, Davtyan HG, Chang P (1989): "Prevention of reperfusion injury in the neonatal heart with leukocyte-depleted blood." *J Thorac Cardiovasc Surg* 97(5): 654-665.
- Bredt DS, Snyder SH (1990): "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2): 682-685.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990): "Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide." *Nature* 347(6295): 768-770.
- Butler AR, Megson IL, Wright PG (1998): "Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature." *Biochim Biophys Acta* 1425(1): 168-176.
- Cakir O, Oruc A, Eren S, Buyukbayram H, Erdinc L, Eren N (2003): "Does sodium nitroprusside reduce lung injury under cardiopulmonary bypass?" *Eur J Cardiothorac Surg* 23(6): 1040-1045.
- Cattaruzza M, Guzik TJ, Slodowski W, Pelvan A, Becker J, Halle M, Buchwald AB, Channon KM, Hecker M (2004): "Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease." *Circ Res* 95(8): 841-847.

- Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH (2007): "Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior." *J Am Coll Cardiol* 49(25): 2379-2393.
- Cheng C, van Haperen R, de Waard M, van Damme LC, Tempel D, Hanemaaijer L, van Cappellen GW, Bos J, Slager CJ, Duncker DJ, et al. (2005): "Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique." *Blood* 106(12): 3691-3698.
- Chiueh CC (1999): "Neuroprotective properties of nitric oxide." *Ann N Y Acad Sci* 890: 301-311.
- Chonchol MB, Aboyans V, Lacroix P, Smits G, Berl T, Laskar M (2007): "Long-term outcomes after coronary artery bypass grafting: preoperative kidney function is prognostic." *J Thorac Cardiovasc Surg* 134(3): 683-689.
- Ciftci C, Melil S, Cebi Y, Ersoz M, Cagatay P, Kilicgedik M, Duman BS (2008): "Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease." *Lipids Health Dis* 7: 5.
- Colomba D, Duro G, Corrao S, Argano C, Di Chiara T, Nuzzo D, Pizzo F, Parrinello G, Scaglione R, Licata G (2008): "Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular damage in hypertensive subjects: an Italian case-control study." *Immun Ageing* 5: 4.
- Cooke JP, Rossitch E, Jr., Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ (1991): "Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator." *J Clin Invest* 88(5): 1663-1671.
- Cox CS, Jr., Allen SJ, Brennan M (1999): "Analysis of intestinal microvascular permeability associated with cardiopulmonary bypass." *J Surg Res* 83(1): 19-26.

- Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, Schechter AN, Darley-USmar VM, Kerby JD, Lang JD, Jr., Kraus D, et al. (2006): "Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation." *Blood* 107(2): 566-574.
- Culotta E, Koshland DE, Jr. (1992): "NO news is good news." *Science* 258(5090): 1862-1865.
- Dengel DR, Brown MD, Ferrell RE, Reynolds TH, Supiano MA (2007): "A preliminary study on T-786C endothelial nitric oxide synthase gene and renal hemodynamic and blood pressure responses to dietary sodium." *Physiol Res* 56(4): 393-401.
- De Souza AC, Spyt TJ (1993): "Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass." *Ann Thorac Surg* 56(2): 397-398.
- Dias-Junior CA, Gladwin MT, Tanus-Santos JE (2006): "Low-dose intravenous nitrite improves hemodynamics in a canine model of acute pulmonary thromboembolism." *Free Radic Biol Med* 41(12): 1764-1770.
- Dinerman JL, Lowenstein CJ, Snyder SH (1993): "Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease." *Circ Res* 73(2): 217-222.
- Dosenko VE, Zagorij VY, Lutay YM, Parkhomenko AN, Moibenko AA (2006): "Allelic polymorphism in the promoter (T-->C), but not in exon 7 (G-->T) or the variable number tandem repeat in intron 4, of the endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with acute coronary syndrome in the Ukrainian population." *Exp Clin Cardiol* 11(1): 11-13.
- Edmunds NJ, Moncada S, Marshall JM (2003): "Does nitric oxide allow endothelial cells to sense hypoxia and mediate hypoxic vasodilatation? In vivo and in vitro studies." *J Physiol* 546(Pt 2): 521-527.

- Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP (2006): "NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential." *Nat Rev Drug Discov* 5(9):755-68.
- Ezzidi I, Mtiraoui N, Mohamed MB, Mahjoub T, Kacem M, Almawi WY (2008): "Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T>C gene variants with diabetic nephropathy." *J Diabetes Complications* 22(5): 331-338.
- Féléto M (2011): "The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators." San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease.
- Fischer UM, Schindler R, Brixius K, Mehlhorn U, Bloch W (2007): "Extracorporeal circulation activates endothelial nitric oxide synthase in erythrocytes." *Ann Thorac Surg* 84(6): 2000-2003.
- Flammer AJ, Sudano I, Hermann F, Gay S, Forster A, Neidhart M (2008): "Angiotensin-converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis." *Circulation* 117(17): 2262–9.
- Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F (1991): "Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5): 1788-1792.
- Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD (1997): "Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment." *J Clin Invest* 100(2): 350-356.
- Fukuda N, O-Uchi J, Kurihara S (2008): "Neuronal NO synthase-derived NO: a novel relaxing factor in myocardium?" *Circ Res* 102(2): 148-150.

- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980): "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* 288(5789): 373-376.
- García-Cardena G, Comander J, Anderson KR, Blackman BR, Gimbrone MA Jr. (2001): „Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype.” *Proc Natl Acad Sci USA*. Apr 10;98(8):4478-85.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988): "Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain." *Nature* 336(6197): 385-388.
- Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Bernini M, Turri O, Massaro F, Guagnellini E, Scorza R (2002): "Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene." *Clin Chem* 48(7): 989-993.
- Gillinov AM, Redmond JM, Zehr KJ, Wilson IC, Curtis WE, Bator JM, Burch RM, Reitz BA, Baumgartner WA, Herskowitz A, et al. (1994): "Inhibition of neutrophil adhesion during cardiopulmonary bypass." *Ann Thorac Surg* 57(1): 126-133.
- Gomma AH, Elrayess MA, Knight CJ, Hawe E, Fox KM, Humphries SE (2002): "The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis." *Eur Heart J* 23(24): 1955-1962.
- Gorchakova O, Koch W, von Beckerath N, Mehilli J, Schomig A, Kastrati A (2003): "Association of a genetic variant of endothelial nitric oxide synthase with the 1 year clinical outcome after coronary stent placement." *Eur Heart J* 24(9): 820-827.
- Grewal RP, Dutra AV, Liao YC, Juo SH, Papamitsakis NI (2007): "The intron 4c allele of the NOS3 gene is associated with ischemic stroke in African Americans." *BMC Med Genet* 8: 76.

- Hammerschmidt S, Schiller J, Kuhn H, Meybaum M, Gessner C, Sandvoss T, Arnold K, Wirtz H (2003): "Influence of tidal volume on pulmonary NO release, tissue lipid peroxidation and surfactant phospholipids." *Biochim Biophys Acta* 1639(1): 17-26.
- Herschman HR (1999): "Function and regulation of prostaglandin synthase 2." *Adv Exp Med Biol.* 469:3-8.
- Hingorani AD (2001): "Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000." *Atherosclerosis* 154(3): 521-527.
- Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC (2003): "Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med* 34(8): 955–68.
- Hsu LC (1997): "Biocompatibility in cardiopulmonary bypass." *J Cardiothorac Vasc Anesth* 11(3): 376-382.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995): "Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase." *Nature* 377(6546): 239-242.
- Ichinose F, Buys ES, Neilan TG, Furutani EM, Morgan JG, Jassal DS, Graveline AR, Searles RJ, Lim CC, Kaneki M, et al. (2007): "Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 prevents myocardial dysfunction in murine models of septic shock." *Circ Res* 100(1): 130-139.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987): "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24): 9265-9269.
- Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P, Humphries SE, Hingorani AD (2001): "Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease." *Hypertension* 38(5): 1054-1061.

- Jemaa R, Kallel A, Ben Ali S, Omar S, Chabrak S, Elasmı M, Haj Taieb S, Sanhaji H, Feki M, Mechmeche R, et al. (2007): "Association of a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in Tunisian patients." *Clin Chem Lab Med* 45(11): 1476-1480.
- Joshi MS, Ferguson TB, Jr., Han TH, Hyde DR, Liao JC, Rassaf T, Bryan N, Feelisch M, Lancaster JR, Jr. (2002): "Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10341-10346.
- Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1996): "Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(17): 9114-9119.
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985): "APACHE II: a severity of disease classification system." *Crit Care Med* 13(10): 818-829.
- Ko NU, Rajendran P, Kim H, Rutkowski M, Pawlikowska L, Kwok PY, Higashida RT, Lawton MT, Smith WS, Zaroff JG, et al. (2008): "Endothelial nitric oxide synthase polymorphism (-786T->C) and increased risk of angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." *Stroke* 39(4): 1103-1108.
- Kon V, Harris RC, Ichikawa I (1990): "A regulatory role for large vessels in organ circulation. Endothelial cells of the main renal artery modulate intrarenal hemodynamics in the rat." *J Clin Invest.* 85(6):1728-33.
- Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY (2003): "Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide." *Am J Physiol Renal Physiol.* Aug;285(2):F178-90.

- Kristof AS, Magder S (1999): "Low systemic vascular resistance state in patients undergoing cardiopulmonary bypass." *Crit Care Med* 27(6): 1121-1127.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991): "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11): 4651-4655.
- Kunz A, Park L, Abe T, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Iadecola C (2007): "Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species." *J Neurosci* 27(27): 7083-93.
- Kvam FI, Ofstad J, Iversen BM (2000): "Role of nitric oxide in the autoregulation of renal blood flow and glomerular filtration rate in aging spontaneously hypertensive rats." *Kidney Blood Press Res* 23(6): 376-384.
- Lamontagne D, Pohl U, Busse R (1992): "Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed." *Circ Res* 70(1): 123-130.
- Lan Q, Mercurius KO, Davies PF (1994): "Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress." *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 15;201(2):950-6.
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F (1993): "A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study." *JAMA* 270(24): 2957-2963.
- Leighton F, Miranda-Rottmann S, Urquiaga I (2006): "A central role of eNOS in the protective effect of wine against metabolic syndrome." *Cell Biochem Funct* 24(4): 291-298.
- Lema G, Meneses G, Urzua J, Jalil R, Canessa R, Moran S, Irrarrazaval MJ, Zalaquett R, Orellana P (1995): "Effects of extracorporeal circulation on renal function in coronary surgical patients." *Anesth Analg* 81(3): 446-451.

- Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S (1991): "Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline." *J Biol Chem* 266(35): 23790-23795.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003): "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." *Intensive Care Med* 29(4): 530-538.
- Liakopoulos OJ, Dorge H, Popov AF, Schmitto JD, Cattaruzza M, Schoendube FA (2006): "Influence of eNOS gene polymorphisms (894G/T; - 786C/T) on postoperative hemodynamics after cardiac surgery." *Thorac Cardiovasc Surg* 54(4): 233-238.
- Liew FY, Cox FE (1991): "Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide." *Immunol Today* 12(3): A17-21.
- Lubos E, Handy DE, Loscalzo J (2009): "Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis." *Front Biosci* 13: 5323-44.
- Luscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von Segesser L, Yang ZH, Turina M, Gradel E, Weber E, et al. (1988): "Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts." *N Engl J Med* 319(8): 462-467.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT (1993): "Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene." *J Biol Chem* 268(23): 17478-17488.
- Mazer CD, Briet F, Blight KR, Stewart DJ, Robb M, Wang Z, Harrington AM, Mak W, Li X, Hare GM (2007): "Increased cerebral and renal endothelial nitric oxide synthase gene expression after cardiopulmonary bypass in the rat." *J Thorac Cardiovasc Surg* 133(1): 13-20.

- Metais C, Bianchi C, Li J, Simons M, Sellke FW (2001): "Serotonin-induced human coronary microvascular contraction during acute myocardial ischemia is blocked by COX-2 inhibition." *Basic Res Cardiol* 96(1): 59-67.
- Michalopoulos A, Stavridis G, Geroulanos S (1998): "Severe sepsis in cardiac surgical patients." *Eur J Surg* 164(3): 217-222.
- Miersch S, Espey MG, Chaube R, Akarca A, Tweten R, Ananvoranich S, Mutus B (2008): "Plasma membrane cholesterol content affects nitric oxide diffusion dynamics and signaling." *J Biol Chem*. Jul 4;283(27):18513-21.
- Miller MJ, Sandoval M (1999): "Nitric Oxide. III. A molecular prelude to intestinal inflammation." *Am J Physiol* 276(4 Pt 1): G795-799.
- Milot J, Perron J, Lacasse Y, Letourneau L, Cartier PC, Maltais F (2001): "Incidence and predictors of ARDS after cardiac surgery." *Chest* 119(3): 884-888.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, et al. (1998): "Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension." *Hypertension* 32(1): 3-8.
- Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, et al. (2000): "Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina." *Hum Mol Genet* 9(18): 2629-2637.
- Moe KT, Lim ST, Wong P, Chua T, DeSilva DA, Koh TH, Wong MC, Chin-Dusting J (2006): "Association analysis of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with primary hypertension in a Singapore population." *J Hum Hypertens* 20(12): 956-963.

- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991): "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* 43(2): 109-142.
- Mudra H, Buchele W, Mathias K, Schuler G, Sievert H, Theiss W (2006): "Interventional treatment of extracranial carotid stenoses: current status, requirements and indications." *Vasa* 35(2): 125-131.
- Mueller S, Gewaltig MT, Kojda G (2002): "[Vasoprotection through vascular nitric oxide. Molecular basis of antiatherosclerotic actions]." *Med Monatsschr Pharm* 25(2): 45-51.
- Murad F (1997): "What are the molecular mechanisms for the antiproliferative effects of nitric oxide and cGMP in vascular smooth muscle?" *Circulation* 95(5): 1101-1103.
- Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR (1988): "An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome." *Am Rev Respir Dis* 138(3): 720-723.
- Nagase S, Suzuki H, Wang Y, Kikuchi S, Hirayama A, Ueda A, Takada K, Oteki T, Obara M, Aoyagi K, et al. (2003): "Association of eNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases." *Mol Cell Biochem* 244(1-2): 113-118.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhater MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT (2003): "From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I." *Circulation*. Oct 7;108(14):1664-72.

- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Mizuno Y, Harada E, Nakamura S, Ito T, et al. (2000): "T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis." *Am J Cardiol* 86(6): 628-634.
- Nathan CF, Hibbs JB, Jr. (1991): "Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity." *Curr Opin Immunol* 3(1): 65-70.
- Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ (1992): "Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase." *J Clin Invest* 90(5): 2092-2096.
- Nishijima T, Nakayama M, Yoshimura M, Abe K, Yamamuro M, Suzuki S, Shono M, Sugiyama S, Saito Y, Miyamoto Y, et al. (2007): "The endothelial nitric oxide synthase gene -786T/C polymorphism is a predictive factor for reattacks of coronary spasm." *Pharmacogenet Genomics* 17(8): 581-587.
- Olçay A, Ekmekci CG, Ozbek U, Sezer M, Barcin C, Arslan E, Boztosun B, Nisanci Y (2006): "Negative association of endothelial nitric oxide gene polymorphism with hypertension in Turkish patients: effect of eNOS polymorphism on left ventricular hypertrophy." *Cardiovasc Ultrasound* 4: 33.
- Osswald BR, Blackstone EH, Tochtermann U, Thomas G, Vahl CF, Hagl S (1999): "The meaning of early mortality after CABG." *Eur J Cardiothorac Surg* 15(4): 401-407.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007): "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." *Physiol Rev.* Jan;87(1):315-424.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987): "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* 327(6122): 524-526.

- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988): "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." *Nature* 333(6174): 664-666.
- Pan S (2009): "Molecular mechanisms responsible for the atheroprotective effects of laminar shear stress." *Antioxid Redox Signal*. Jul;11(7):1669-82.
- Panagiotopoulos I, Palatianos G, Michalopoulos A, Chatzigeorgiou A, Prapas S, Kamper EF (2010): "Alterations in biomarkers of endothelial function following on-pump coronary artery revascularization." *J Clin Lab Anal* 24(6): 389-98.
- Philippides A, Husbands P, O'Shea M (2000): "Four-dimensional neuronal signaling by nitric oxide: a computational analysis." *J Neurosci*. Feb 1;20(3):1199-207.
- Quyyumi AA (1998): "Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease." *Am J Med* 105(1A): 32S-39S.
- Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO, 3rd (1995): "Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis." *J Clin Invest* 95(4): 1747-1755.
- Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. (1993): "Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(10): 4591-4595.
- Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE (1998): "In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association." *J Biol Chem* 273(52): 34724-34729.
- Rossi GP, Taddei S, Viridis A, Cavallin M, Ghiadoni L, Favilla S, Versari D, Sudano I, Pessina AC, Salvetti A (2003): "The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients." *J Am Coll Cardiol* 41(6): 938-945.

- Royster RL (1993): "Myocardial dysfunction following cardiopulmonary bypass: recovery patterns, predictors of inotropic need, theoretical concepts of inotropic administration." *J Cardiothorac Vasc Anesth* 7(4 Suppl 2): 19-25.
- Ruel M, Bianchi C, Khan TA, Xu S, Liddicoat JR, Voisine P, Araujo E, Lyon H, Kohane IS, Libermann TA, et al. (2003): "Gene expression profile after cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest." *J Thorac Cardiovasc Surg* 126(5): 1521-1530.
- Ruel M, Khan TA, Voisine P, Bianchi C, Sellke FW (2004): "Vasomotor dysfunction after cardiac surgery." *Eur J Cardiothorac Surg* 26(5): 1002-1014.
- Ruvolo G, Greco E, Speziale G, Tritapepe L, Marino B, Mollace V, Nistico G (1994): "Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass." *Ann Thorac Surg* 57(4): 1055-1057.
- Ruvolo G, Speziale G, Greco E, Tritapepe L, Mollace V, Nistico G, Marino B (1995): "Nitric oxide release during hypothermic versus normothermic cardiopulmonary bypass." *Eur J Cardiothorac Surg* 9(11): 651-654.
- Salter M, Knowles RG, Moncada S (1991): "Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases." *FEBS Lett* 291(1): 145-149.
- Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE (2006): "Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus." *Atherosclerosis* 189(1): 241-246.
- Schmid FX, Floerchinger B, Vudattu NK, Eissner G, Haubitz M, Holler E, Andreesen R, Birnbaum DE (2006): "Direct evidence of endothelial injury during cardiopulmonary bypass by demonstration of circulating endothelial cells." *Perfusion* 21(3): 133-137.

- Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F, Bohme E (1988): "Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide." *Eur J Pharmacol* 154(2): 213-216.
- Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U, Murad F (1992): "Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases." *Cell Calcium* 13(6-7): 427-434.
- Schwartz SM (1997): "Smooth muscle migration in vascular development and pathogenesis." *Transpl Immunol* 5(4): 255-260.
- Searles CD (2006): "Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression." *Am J Physiol Cell Physiol*. Nov;291(5):C803-16.
- Sellke FW, Boyle EM, Jr., Verrier ED (1996): "Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the pathophysiology of vasomotor dysfunction." *Ann Thorac Surg* 62(4): 1222-1228.
- Sergeant P, Meyns B, Wouters P, Demeyere R, Lauwers P (2003): "Long-term outcome after coronary artery bypass grafting in cardiogenic shock or cardiopulmonary resuscitation." *J Thorac Cardiovasc Surg* 126(5): 1279-1286.
- Skarvan K, Graedel E, Hasse J, Stulz P, Pfisterer M (1984): "Coronary artery spasms after coronary artery bypass surgery." *Anesthesiology* 61(3): 323-327.
- Squadrito GL, Pryor WA (1998): "Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide." *Free Radic Biol Med* 25(4-5): 392-403.
- Statistisches Bundesamt (2008): "Sterbefälle insgesamt 2007 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)." <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/>

destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt,templateId=renderPrint.psml(Abrufdatum Nov. 2008)

- Stone JR, Marletta MA (1995): "The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane." *Biochemistry* 34(50): 16397-16403.
- Tayeh MA, Marletta MA (1989): "Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor." *J Biol Chem* 264(33): 19654-19658.
- Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE (2010): "Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 30(8): 1606-13.
- Tofukuji M, Stahl GL, Agah A, Metais C, Simons M, Sellke FW (1998): "Anti-C5a monoclonal antibody reduces cardiopulmonary bypass and cardioplegia-induced coronary endothelial dysfunction." *J Thorac Cardiovasc Surg* 116(6): 1060-1068.
- Torres-Rasgado E, Fouret G, Carbonneau MA, Leger CL (2007): "Peroxynitrite mild nitration of albumin and LDL-albumin complex naturally present in plasma and tyrosine nitration rate-albumin impairs LDL nitration." *Free Radic Res* 41(3): 367-375.
- Toumpoulis IK, Anagnostopoulos CE, Swistel DG, DeRose JJ, Jr. (2005): "Does EuroSCORE predict length of stay and specific postoperative complications after cardiac surgery?" *Eur J Cardiothorac Surg* 27(1): 128-133.
- Tsujita Y, Baba S, Yamauchi R, Mannami T, Kinoshita M, Yamamoto R, Katsuya T, Higaki J, Ogihara T, Ogata J, et al. (2001): "Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study." *J Hypertens* 19(11): 1941-1948.

- Tuman KJ, McCarthy RJ, O'Connor CJ, Holm WE, Ivankovich AD (1995): "Angiotensin-converting enzyme inhibitors increase vasoconstrictor requirements after cardiopulmonary bypass." *Anesth Analg* 80(3): 473-479.
- Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA (2005): "A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress." *Nature*. Sep 15;437(7057):426-31.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007): "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
- van 't Hooft FM, von Bahr SJ, Silveira A, Iliadou A, Eriksson P, Hamsten A (1999): "Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(12): 3063-3070.
- Vickroy TW, Malphurs WL (1995): "Inhibition of nitric oxide synthase activity in cerebral cortical synaptosomes by nitric oxide donors: evidence for feedback autoregulation." *Neurochem Res* 20(3): 299-304.
- Wang XL, Wang J (2000): "Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease." *Mol Genet Metab* 70(4): 241-251.
- Wernovsky G, Wypij D, Jonas RA, Mayer JE, Jr., Hanley FL, Hickey PR, Walsh AZ, Chang AC, Castaneda AR, Newburger JW, et al. (1995): "Postoperative course and hemodynamic profile after the arterial switch operation in neonates and infants. A comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulatory arrest." *Circulation* 92(8): 2226-2235.
- Wink DA, Mitchell JB (1998): "Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide." *Free Radic Biol Med* 25(4-5): 434-456.

- Wink DA, Miranda KM, Espey MG (2001): "Cytotoxicity related to oxidative and nitrosative stress by nitric oxide." *Exp Biol Med* (Maywood) 226(7): 621-623.
- Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Kaneshige T, et al. (2000): "Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-->C and missense Glu298Asp variants." *J Investig Med* 48(5): 367-374.
- Yuan Y, Granger HJ, Zawieja DC, DeFily DV, Chilian WM (1993): "Histamine increases venular permeability via a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade." *Am J Physiol* 264(5 Pt 2): H1734-1739.
- Zatz R, de Nucci G (1991): "Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation." *Am J Physiol* 261(2 Pt 2): F360-363.
- Zou AP, Cowley AW, Jr. (1997): "Nitric oxide in renal cortex and medulla. An in vivo microdialysis study." *Hypertension* 29(1 Pt 2): 194-198.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der NO-Synthese und Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur. Modifiziert nach Félétou 2011, S. 45.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der direkten und indirekten NO-Effekte. Modifiziert nach Evgenov et al. 2006 – Seite 23	7
Abbildung 3: Molekulare Mechanismen der Atherosklerose-protektiven Effekte des laminaren „shear stress“. TGF- β = Transforming growth factor β . Modifiziert nach Pan 2009, S. 1671.	8
Abbildung 4: Vergleich der <i>in vitro</i> durch verschiedene biomechanische Stimulie (laminare vs. statische, turbulente vs. statische und turbulente vs. laminare Strömung) veränderte Genexpression. Modifiziert nach García-Cardena et al. 2001, S. 4479.	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung des eNOS-Gens. Modifiziert nach Hingorani 2001 – Seite 524.	18
Abbildung 6: Eingabemaske „Allgemeine Patientendaten“.	23
Abbildung 7: Eingabemaske „Kardiale Anamnese“.	26

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CPB-assoziierte Veränderungen an Zielorganen.	15
Tabelle 2: Genotypen- und Allelverteilung.	37
Tabelle 3: Präoperative Daten.	38
Tabelle 4: Intraoperative Daten.	39
Tabelle 5: Postoperative Daten.	40
Tabelle 6: Mortalitätsraten.	41

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. José-Maria Hinz (Zentrum Anaesthesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin, Georg-August-Universität Göttingen) für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für die Beratung und großzügige Bereitstellung von Laborräumen und Geräten bedanken.

Meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Dr. med. A.-F. Popov (Abteilung Thorax-Herz- und Gefäßchirurgie des Zentrums Chirurgie, Universitätsklinikum Georg-August-Universität Göttingen), für sein großes Interesse und die vielen praktischen Hinweise im Rahmen der Experimente und des Schreibens der Arbeit, sowie für die intensive Betreuung in jeder Phase des Entstehens dieser Arbeit sei an dieser Stelle ganz besonderer Dank gesagt.

Bei Frau Kernchen (Zentrum Anaesthesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin, Georg-August-Universität Göttingen) möchte ich mich ebenfalls sehr herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit und die vielen Hilfestellungen bedanken.

Frau Waldmann-Beushausen (Abteilung Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Zentrums Chirurgie, Universitätsklinikum Georg-August-Universität Göttingen) möchte ich für die praktische Einführung in Labormethoden sowie die entgegenkommende Kooperation danken.

Lebenslauf

Am 05.10.1980 wurde ich als Kind des Zahnarztes Dr. med. dent. Hans-Joachim Henker und der Ökonomin Evelyn Henker, geb. Stühmke, in Dresden geboren. 1984 siedelten wir in die Bundesrepublik Deutschland über.

Dort verbrachte ich in Heusenstamm innerhalb des Landkreises Offenbach/Hessen meine Kindheit und besuchte von 1987 bis 1991 die dortige Adalbert-Stifter-Grundschule. Nachfolgend besuchte ich das Adolf-Reichwein-Gymnasium und beendete dort meine schulische Laufbahn mit dem Abitur im Jahr 2000. Anschließend folgte mein Zivildienst innerhalb der Johanniter-Unfallhilfe in Nieder-Roden/Rodgau.

Im Sommersemester 2002 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Während meines Studiums famulierte ich innerhalb verschiedenster Bereiche der Medizin in Göttingen, München und Neu-Delhi/Indien.

Studienbegleitend arbeitete ich als Tutor des makroskopischen Kursus der Anatomie innerhalb des Zentrums Anatomie der Georg-August-Universität. Später folgte eine Anstellung als studentische Hilfskraft innerhalb des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin in Göttingen (Abteilung Neurogenetik).

Im Sommer 2006 begann ich meine Dissertationsarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. F.A. Schöndube, Direktor der Abteilung Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Zentrums Chirurgie der Universitätsmedizin Göttingen.

Im August 2007 folgte das Praktische Jahr mit Tertialen in Oldenburg (Innere Medizin), East London/Südafrika (Allgemeinchirurgie) und Göttingen (Wahlfach Neurochirurgie). Im Frühjahr 2009 schloß ich mein Humanmedizinstudium mit der Zweiten Ärztlichen Prüfung ab.

Seit Oktober 2009 arbeite ich als Assistenzarzt innerhalb der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel.