

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
(Prof. Dr. med. M. Quintel)  
im Zentrum Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die  
5-Jahres-Mortalität und -Morbidity  
kardiochirurgischer Patienten

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

vorgelegt von  
Christina Lipke  
aus Brandenburg an der Havel

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. José. Hinz
2. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. Heike Bickeböller
3. Berichterstatter/-in Prof. Dr. Jürgen Brockmöller

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2015



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1	Funktion des Endothels	1
1.2	Stickstoffmonoxid (NO)	2
1.2.1	Molekularbiologische Eigenschaften von NO	3
1.2.2	Wirkung von NO auf das Herz-Kreislauf-System	3
1.2.3	Entstehung von NO	6
1.3	Enzymfamilie der NO-Synthasen	6
1.3.1	Endotheliale NO-Synthase	7
1.4	Genetische Variabilität- Polymorphismus	10
1.4.1	eNOS-Gen	11
1.4.2	Polymorphismen des eNOS-Gens	12
1.4.3	eNOS-G-894-T-Polymorphismus	13
1.4.4	eNOS-G-894-T-Polymorphismus in der Herzchirurgie	15
1.5	Zielsetzung	17
<b>2</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>18</b>
2.1	Studiendesign und Patientenkollektiv	18
2.2	Datensammlung	19
2.3	Aktuelle Daten	21
2.3.1	Anschreiben an die Hausärzte	21
2.3.2	Konzeption und Aufbau des Fragebogens	23
2.3.3	Kontaktaufnahme und Datenerhebung	27
2.4	Vorangegangene Daten	28
2.4.1	Präoperative Daten	29
2.4.2	Perioperative Daten	29
2.5	Analyse des eNOS-G-894-T-Polymorphismus	30
2.6	Statistische Auswertung	31
<b>3</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>32</b>
3.1	Rücklauf der aktuellen Daten	32
3.2	Analyse des Nachbeobachtungszeitraumes	33
3.3	Genotypen- und Allelfrequenzverteilung	37
3.4	Analyse der prä- und perioperativen Daten	37
3.5	Morbidität im Langzeitverlauf	40
3.6	Mortalität im Langzeitverlauf	41

---

3.6	Analyse der Überlebenszeiten	43
<b>4</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>45</b>
4.1	5-Jahres-Mortalität	52
4.2	5-Jahres-Morbidität	53
4.3	Genotypen- und Allelfrequenzverteilung	55
4.4	Einschränkungen der Studie	57
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b><u>Abbildungsverzeichnis</u></b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b><u>Tabellenverzeichnis</u></b>	<b>71</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACh	Acetylcholin
ACVB	Aorto- Koronarer-Venenbypass
AP-1	Aktivator Protein 1
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
BH 4 <sup>+</sup>	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body-Mass-Index
C	Cytosin
CABG	operative Myokardrevaskularisation
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cNOS	konstitutive NO-Synthase
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPB	Kardiopulmonaler Bypass
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin 1
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavimononukleotid
G	Guanin
Glu	Glutamat
HLM	Herz-Lungen-Maschine
hn-RNA	heterogene RNA
IL-6	Interleukin 6

---

iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositol 1, 4, 5-Triphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
L-NAME	NG-Nitro L-Arginin Methyl-Ester
L-NMMA	NG-Monomethyl-L-Arginin
mRNA	messenger- Ribonukleinsäure
MRRG	Melderechtsrahmengesetz
NADP <sup>+</sup>	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PAPmean	pulmonalarterieller Mitteldruck
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PiCCO	Pulskontur-Herzzeitvolumen
PLC	Phospholipase C
PVRI	Pulmonalvaskulärer Widerstandsindex
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
Sp-1	Specifity Protein 1
SVRI	Systemvaskulärer Widerstandsindex
T	Thymin
TA	Technische Assistentin
THG	Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VNTR	variable Nummer von Tandem-Repeats
ZARI	Zentrum Anaesthesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktion des Endothels

Alle Gefäße des menschlichen Körpers sind von einer einschichtigen Zellschicht, dem Endothel, ausgekleidet, welches das strömende Blut von der Gefäßmuskulatur trennt. Das Endothel hat nicht nur die Funktion einer physiologischen Barriere, sondern ist auch an der Regulierung des Blutflusses und des Gefäßtonus beteiligt (Lüscher und Tanner 1993). Ebenso wird dem Endothel eine wichtige Funktion bei der Entstehung von Entzündungsgeschehen und der Immunantwort zugeschrieben, da inflammatorische Prozesse die transendotheliale Zellmigration erleichtern. Auch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren sowie die antibakterielle Eigenschaft des Endothels rücken immer mehr in den Vordergrund (Bauer und Sotníková 2010). Endothelzellen können durch die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen den Tonus der glatten Gefäßmuskelzellen regulieren. Unter physiologischen Umständen scheint die Freisetzung relaxierender Faktoren, die eine Aggregation und Adhäsion von Blutzellen an der Gefäßwand verhindern, zu überwiegen (Vanhoutte et al. 1991). Durch Hypoxie oder Schädigung des Endothels werden jedoch prokoagulatorische Substanzen freigesetzt, die eine Vasokonstriktion zur Folge haben. So kann die antithrombogene Wirkung des Endothels in einen thrombogenen Wirkmechanismus übergehen. Als Grundlage für eine adäquate Durchblutung und eine ausreichende Organperfusion ist die Intaktheit des Endothels daher von enormer Wichtigkeit (Furchgott und Zawadzki 1980).

Zusätzlich sollte ein Gleichgewicht zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen endothelialen Substanzen gewährleistet werden. Zu den wichtigsten Vasodilatoren zählen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>), welches über die Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) eine Gefäßdilatation bewirkt und dabei gleichzeitig das proaggregatorische Thromboxan A<sub>2</sub> inhibiert. PGI<sub>2</sub> hemmt die Plättchenaggregation und kann somit der intraarteriellen Thrombenbildung entgegenwirken (Moncada et al. 1976). Endotheliale Vasokonstriktion wird vor allem durch Angiotensin II (Dzau 1986) und Endothelin-1 vermittelt. Die gefäßverengende Wirkung des

Endothelins ist langlebig und leistungsfähig, sodass es als ein entscheidender Faktor bei der Regulierung des Gefäßtonus angesehen werden kann (Lüscher und Tanner 1993).

Das Endothel hat nicht nur fibrinolytische, sondern auch prothrombotische Eigenschaften. Die Neigung zur Thrombinbildung kann sowohl durch biologisch aktive Substanzen wie Homocystein, Interleukin I und Endotoxin als auch durch andere Faktoren, beispielsweise eine mechanische Verletzung des Endothels oder durch Hypoxie hervorgerufen werden. Diese prokoagulatorische Reaktion des Endothels verläuft in mehreren Phasen und ist multifaktoriell bedingt (Gertler et al. 1992). Durch das Verlorengelassen der Gefäßintegrität bildet sich eine reaktive Oberfläche aus, welche Thrombozytenaggregation ermöglicht und folglich auch das Entstehen von Thrombosen begünstigt.

Somit wird deutlich, dass das vaskuläre Endothel eine wichtige Rolle in der basalen und dynamischen Regulation des Kreislaufes einnimmt (Spieker und Lüscher 2005). Vor allem bei der Pathogenese von arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen, Myokardhypertrophie, aber auch bei der Genese von arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus spielt die endotheliale Dysfunktion eine ausschlaggebende Rolle (Channon und Guzik 2002).

## **1.2 Stickstoffmonoxid (NO)**

Furchgott und Zawadzki entdeckten im Jahre 1980 erstmals, dass das intakte Endothel durch Acetylcholin (Ach) angeregt wird, einen Botenstoff zu produzieren, welcher zur Dilatation glatter Gefäßmuskelzellen führt. Basierend auf Ursprung und Wirkung der Substanz bezeichneten sie diese als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) (Furchgott und Zawadzki 1980). Mitte der Achtziger Jahre gelang es Louis Ignarro und Robert Furchgott unabhängig voneinander, die Substanz EDRF als NO zu identifizieren (Marsh und Marsh 2000). In Hinblick auf Aktivität, Stabilität und Anfälligkeit für Inhibitoren waren beide Substanzen identisch (Palmer et al. 1987). NO gilt heute als eines der relevantesten Moleküle im menschlichen Organismus, da es in vielen biologischen Vorgängen involviert ist und auch als Signalmolekül im kardiovaskulären System eine bedeutende Rolle spielt (Bian und Murad 2003).

### **1.2.1 Molekularbiologische Eigenschaften von NO**

Das gasförmige und farblose Molekül NO besitzt eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden. Aufgrund der geringen Größe, der Ladungsneutralität und der Lipophilie (Kelm 1999) ist es möglich, dass NO über die Zellmembran diffundiert und somit auch an weiter entfernten Zellen wirken kann. Die Diffusionskapazität ist dabei enorm groß, sodass teilweise Diffusionsstrecken von bis zu 600 Mikrometer zurückgelegt werden können (Stamler et al. 1992). NO reguliert wichtige physiologische und biochemische Prozesse in der Zellregulation und Zellfunktion. Durch den Charakter als freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron lässt sich die hohe Reaktionsfreudigkeit dieses Moleküls erklären (Murad 2004).

Die Scherkräfte, die das Blut auf das Endothel ausübt, werden als ein starker Stimulus der NO-Freisetzung gesehen. Je höher die Scherkräfte, desto mehr NO wird freigesetzt. Diese „Flow-abhängige Vasodilatation“ wird als Reaktion auf einen stark erhöhten Blutfluss angesehen. Auch einige Hormone und Transmitter wie Bradykinin, Histamin, Serotonin oder Acetylcholin (ACh) üben ihre gefäßerweiternde Wirkung über die Stimulation der endothelialen NO-Produktion aus (Arnal 1997).

NO wird schnell durch Bindung an Hämoglobin oder durch Oxidation zu Nitrit metabolisiert und ist folglich nicht im Blut nachweisbar. Als stabiles Abbauprodukt von NO wird Nitrat letztlich über die Nieren ausgeschieden (Kelm 1999).

### **1.2.2 Wirkung von NO auf das Herz-Kreislauf-System**

Das endogen produzierte Signalmolekül NO besitzt ein vielfältiges Wirkspektrum. Gebildet aus L-Arginin, wirkt NO als Vermittler der endothel-abhängigen Vasodilatation. Durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase in den glatten Gefäßmuskelzellen kommt es zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieses führt wiederum zur Aktivierung einer Proteinkinase G, die über eine Abnahme der Calciumkonzentration eine Gefäßrelaxation bewirkt. In Thrombozyten bewirkt NO über Erhöhung der

löslichen Guanylatzyklase eine verminderte Adhäsion und Aggregation dieser Zellen. Die genannten gefäßerweiternden und antiaggregatorischen Eigenschaften wirken nicht nur der Entstehung von Vasospasmen und Thromben entgegen, sondern ermöglichen auch eine Verbesserung der Perfusion. Folglich nimmt NO eine wichtige Schutzfunktion in der lokalen Regulation des Blutflusses wahr (Lüscher 1991).

Neben der Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen inhibiert NO die Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion (Kubes et al. 1991), dämpft die vaskuläre Proliferation von glatten Muskelzellen und ist an der Immunabwehr beteiligt (Bian et al. 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NO ebenfalls eine Rolle im Fettstoffwechselkreislauf spielt, indem es die Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL) abbremsen kann (Hogg et al. 1993). Auch im zentralen Nervensystem (ZNS) werden NO vielfältige Funktionen zugeschrieben, beispielsweise ist es an der Regulation des cerebralen Blutflusses sowie an der Modulation der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt (Chiueh 1999). Durch seine vielfältigen Wirkungen als intrazellulärer Botenstoff, als parakrine Substanz, als Neurotransmitter oder als Hormon, welches auch an weit entfernten Zielgeweben für Effekte sorgen kann (Murad 2004), wird ersichtlich, dass NO von enormer Bedeutung im menschlichen Organismus in Bezug auf das Herz-Kreislauf-System ist.

NO ist ein sehr komplexes und facettenreiches Molekül, dessen Wirkungen dosisabhängig und zelltypspezifisch variieren. So kann es in einigen Zellen die Apoptose fördern und in anderen Zellen wiederum eine antiapoptotische Funktion wahrnehmen. In Hepatozyten wirkt NO zytoprotektiv, weil es einen hemmenden Einfluss auf Apoptose vermittelnden Caspasen-Proteasen besitzt. Als endogene Inhibitoren der NO-Produktion werden NG-Monomethyl- L-Arginin (L-NMMA) oder auch NG-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) beschrieben (Kubes et al. 1991).

Wie wahrscheinlich bei jedem Botenstoff zu beobachten, kann es aufgrund von hoher oder zu niedriger Konzentration der Substanz auch zum Auftreten pathologischer Effekte kommen. Ob und in welchem Maße NO zytotoxisch wirkt, ist abhängig vom Redoxzustand der Zelle. Durch oxidativen Stress kommt es zum vermehrten Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies, die die Reaktion von NO mit Superoxidanionen zu Peroxynitrit fördern. Peroxynitrit selbst kann

als starkes selektives Oxidationsmittel wirken und einen zytotoxischen Effekt über die Modifizierung von Proteinen vermitteln. Der Abbau durch freie Sauerstoffradikale ist ein entscheidender Faktor, der die Bioverfügbarkeit von NO begrenzt (Beckman und Koppenol 1996). Eine dauerhaft erhöhte Konzentration von Peroxynitrit kann mit rheumatoider Arthritis, amyotropher Lateralsklerose, Alzheimer und anderen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Squadrito und Pryor 1998). Eine chronisch längerfristige Exposition gegenüber permanent hohen NO-Konzentrationen kann sogar zu Zellveränderungen, Desoxyribonukleinsäure- (DNA) Schäden und zur Tumorentstehung beitragen (Kim et al. 2001).

Bei normal-niedrigen Konzentrationen von NO überwiegen hingegen die zytoprotektiven, antioxidativen, antiapoptotischen und vasoprotektiven Eigenschaften des Moleküls. Dieses Freisetzungsmuster wird als „low-output-Kinetik“ beschrieben.

Aus diesem Grund ist nachweislich eine relative Verminderung der normal-niedrigen NO-Spiegel als wichtiger Faktor bei der Entstehung der Arteriosklerose anzusehen, wohingegen eine übermäßige NO-Bildung an der Genese der Hypotonie und des Septischen Schocks beteiligt zu sein scheint (Arnal 1997). Aktuelle und zukünftige Untersuchungen werden zweifellos das klinische und therapeutische Spektrum von NO in Bezug auf eine Reihe wichtiger Erkrankungen erweitern.

### 1.2.3 Entstehung von NO

Die Entstehung von NO beruht auf einem sehr komplexen Mechanismus, der durch die NO-Synthase (NOS), eine Oxidoreduktase, katalysiert wird und die Anwesenheit verschiedenster Co-Moleküle voraussetzt (Tejero und Stuehr 2013). Die NOS setzt die Oxidation der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin zu Citrullin und NO um. In den letzten Jahren wurden immer mehr Mechanismen entdeckt, die die Aktivität der NOS kontrollieren und daher einen Einfluss auf den Umfang der NO-Produktion haben. So können sowohl Schwankungen des intrazellulären pH-Wertes und/ oder der Calciumkonzentration, als auch eine Änderung der Schubspannung maßgeblich die Aktivität der NOS in den Endothelzellen beeinflussen (Fleming und Busse 1995).

### 1.3 Enzymfamilie der NO-Synthasen

Derzeit sind drei NOS-Isoformen bekannt, die durch verschiedene Gene kodiert werden. Diese drei Isoenzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aktivierung, Wirkung, Expression (Takeishi 2010) und ihren Genloci (Griffith und Stuehr 1995):

- die neuronale NOS (nNOS oder NOS 1), lokalisiert auf Chromosom 12
- die induzierbare NOS (iNOS oder NOS 2), lokalisiert auf Chromosom 17
- die endotheliale NOS (eNOS oder NOS 3), lokalisiert auf Chromosom 7.

Sowohl die eNOS als auch die nNOS werden kontinuierlich exprimiert und daher auch als konstitutive NOS (cNOS) zusammengefasst. Beide sind Calcium- und Calmodulin-abhängig, da bei erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration das Protein Calmodulin an die cNOS bindet und diese aktiviert (Hattori et al.1994).

Im Unterschied dazu wird die iNOS nicht permanent exprimiert, sondern ist durch inflammatorische Reize induzierbar und befindet sich auch bei normalen Calciumkonzentrationen an Calmodulin gebunden (Balligand und Cannon 1997,

Hattori et al. 1994). Die iNOS wird vor allem in Effektorzellen des Immunsystems, wie Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten, teilweise aber auch in Muskel- und Endothelzellen Calcium-unabhängig exprimiert. Durch Entzündungsprozesse, die unter dem Einfluss von Zytokinen wie beispielsweise Tumornekrosefaktor- Alpha (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin- 6 (IL- 6) entstehen, können dabei 100-1000 fache Mengen der normalen NO-Konzentration erreicht werden („high-output-Kinetik“). Eine vermehrte Aktivität der iNOS wird auch in Zusammenhang mit myokardialer Dysfunktion, Myokarditis und der Entstehung von systemischen Entzündungsreaktionen gebracht (Hoit 2001).

Dem gegenüber synthetisiert die cNOS (bestehend aus nNOS und eNOS) Calcium-abhängig kontinuierlich eine geringe Mengen an NO, sodass die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Zytokin-/ Chemokinsynthese und die Leukozytenadhäsion gehemmt werden. Sie unterliegt einer „low-output-Kinetik“ und wirkt somit eher zytoprotektiv (Guizk et al. 2003). Kardiale Effekte der cNOS sind vielfältig, hierzu zählen beispielsweise die Regulation der Koronardurchblutung, der Herzfrequenz und der Myokardkontraktibilität (Hoit 2001).

Die neuronale NO-Synthase ist an vielen Prozessen der Informationsübertragung im ZNS und peripheren Nervensystem beteiligt. Sie wird überwiegend im neuronalen Gewebe Calcium-abhängig exprimiert und ist dort in höherer Konzentration als im Blutkreislauf nachweisbar (Steinert et al. 2010).

### **1.3.1 Endotheliale NO-Synthase**

Die endotheliale NO-Synthase ist ein Enzym, das konstitutiv vor allem in den Endothelzellen, Hepatozyten, Kardiomyozyten, aber auch von vielen weiteren Zellen unseres Körpers gebildet wird und entscheidend an der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase beteiligt ist. Am Herzmuskel hemmt die eNOS die Thrombozyten-, Monozyten- und Leukozytenadhäsion, ist zugleich aber auch in der Lage, den Sauerstoffverbrauch durch parakrin gebildetes NO zu senken (Balligand und Cannon 1997). Eine strenge Regulation der eNOS-Aktivität auf trans- und posttranslationaler Ebene muss somit stets gewährleistet sein. Es existieren verschiedene Faktoren, die die

Genexpression der eNOS induzieren oder auch reduzieren können und folglich NO-Synthese verändern.

Durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bildet sich ein Calcium-Calmodulin-Komplex aus, der an die Reduktasedomäne der eNOS bindet und so einen Elektronentransfer ermöglicht, durch den das Enzym in den Zustand seiner maximalen Aktivität überführt wird (Presta et al. 1997). Es existieren mehrere verschiedene Mechanismen, die die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflussen können. Agonisten, wie ACh oder auch Bradykinin (Lowry et al. 2013) induzieren über die Bildung von Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) eine Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und steigern damit die eNOS-Aktivität. Folglich wird mehr NO gebildet (Dinerman et al. 1993).

Die Bildung von NO durch die eNOS der Endothelzellen kann aber auch Calcium-unabhängig durch Erhöhung der Scherkräfte gesteigert werden. In der Promotorregion der eNOS ist ein Element enthalten, welches an der Erkennung von Scherkräften beteiligt ist. Bei vermehrter hämodynamischer Belastung in einem Gefäß kommt es zur Registrierung dieser erhöhten Scherkräfte, was eine gesteigerte eNOS-Expression nach sich zieht (Uematsu et al. 1995).

Daneben existieren noch weitere Stimuli, die eine NO-Freisetzung durch die eNOS induzieren. Östrogene können die Genexpression der NOS 3 steigern, indem sie die Bindung des Transkriptionsfaktors Specificity Protein 1 (Sp-1), der essentiell für die Aktivität des NOS 3 Promotors ist, fördern. Aufgrund der erhöhten Aktivität der vasoprotektiven eNOS können Östrogene möglicherweise dazu beitragen, die Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen zu senken (Kleinert et al. 1998).

Caveolin, ein integrales Membranprotein, wirkt wiederum hemmend auf die Aktivität des eNOS und bindet dabei ebenfalls an der Reduktasedomäne. Als Antagonist zum Calcium/ Calmodulinkomplex bewirkt Caveolin eine kompetitive Hemmung der eNOS. Demnach führt eine Überexpression von Caveolin zu einer gedämpften eNOS-Enzymaktivität, hat jedoch keinen Einfluss auf die anderen NOS-Formen, was auf eine eNOS spezifische Hemmung durch Caveolin hindeutet (Michel et al. 1997, Chen et al. 2012). Auch durch Phosphorylierung bestimmter Serin- und Threoninkinasen kann die eNOS-Aktivität reguliert werden (Dimmeler et al. 1999).

Hohe NO-Konzentrationen können ihrerseits ebenfalls über einen negativen Feedbackmechanismus die Aktivität der NOS verringern. Mittels Bindung von NO an die Häm-prothetische Gruppe der NOS wird die NO-Synthese reduziert. Interessant ist hierbei, dass die eNOS und die nNOS sensitiver als die iNOS auf Inhibition durch hohe NO-Spiegel reagieren (Griscavage et al. 1995). Dennoch konnte in einer kürzlich publizierten Studie nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit essentieller Hypertonie die iNOS-Expression erhöht und dadurch die NO-abhängige Vasodilation reduziert ist (Smith et al. 2011). Somit wird die NO-Synthese auch entscheidend von der lokalen NO-Konzentration beeinflusst. Da eNOS über die Freisetzung von NO an der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase beteiligt ist, sind diese Regulationsmechanismen der eNOS von enormer Wichtigkeit, um ein Gleichgewicht zwischen Aktivität und Hemmung zu gewährleisten.

Der Mechanismus der permanenten NO-Freisetzung durch die eNOS wirkt protektiv auf das menschliche Herz-Kreislauf-System. Ein relativer Mangel der vaskulären NO-Konzentration kann Folge einer endothelialen Dysfunktion sein. Aufgrund erniedrigter eNOS-Konzentrationen kann es zur Vasokonstriktion, neointimaler Proliferation und zu Entzündungsreaktionen kommen, wodurch die Entstehung von Arteriosklerose oder auch von pulmonaler Hypertension begünstigt wird (Atochin und Huang 2010).

Ferner konnte gezeigt werden, dass es während und auch nach herzchirurgischen Eingriffen mit Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) zu einer signifikanten Erhöhung der NO-Produktion kommt (Ruvolo et al. 1994). Als Grund dafür können die entstehenden Endotoxine angesehen werden, die bei der Durchführung einer kardiopulmonaler Bypassoperation als potenter Stimulus für die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine verantwortlich sind. Diese bedingen eine gesteigerte iNOS Expression, die mit nachfolgender massiver NO-Freisetzung einhergeht (Hogg et al. 1993). Die Erhöhung der lokalen NO-Konzentration mindert, wie bereits erwähnt, die eNOS-Aktivität, erhöht gleichzeitig aber auch die vaskuläre Permeabilität und fördert die Entstehung systemischer Entzündungsprozesse nach kardiochirurgischen Operationen (Fischer et al. 2007).

## 1.4 Genetische Variabilität- Polymorphismus

Die DNA beinhaltet die genetischen Erbinformationen des Organismus. Durch die Bindung einer Base, eines Phosphatrestes und eines 5er-Zuckers (Desoxyribose) entsteht der Grundbaustein der DNA: das Nukleotid. Dabei stehen unserem Körper vier Basen zur Verfügung, je zwei Purinbasen (Adenin und Guanin) und zwei Pyrimidinbasen (Thymin und Cytosin). Je drei Nukleotide codieren für eine Aminosäure (AS). Durch die Abfolge mehrerer ASn hintereinander, einer AS-Sequenz, wird ein Protein gebildet.

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms gelang erstmals im Jahre 2000. Kurze Zeit später wurde die zu 99,9% entschlüsselte Genkarte des Menschen veröffentlicht. Durch den revolutionären Erkenntniszuwachs auf Ebene der Molekularbiologie kann heute gesagt werden, dass das menschliche Genom 3,08 Milliarden Basen enthält und aus circa 20-25.000 proteinkodierenden Genen besteht. Vom gesamten Genom codieren jedoch nur 2-3% der Gene für ein Genprodukt.

Aufgrund von Unterschieden in der Abfolge der Nukleotidsequenz sind von einigen Genen verschiedene Genvarianten vorhanden. Treten diese Sequenzänderungen in homologen DNA-Bereichen mit einer Allelfrequenz von >1% auf, dann wird im molekularbiologischen Terminus von einem genetischen Polymorphismus gesprochen. Bei der Mutation hingegen liegt die Auftretswahrscheinlichkeit von Nukleotidsequenzänderungen bei <1% (Buselmaier und Tariverdian 2006). Polymorphismen sind beispielhaft für die Variabilität des Genoms, teilweise sind sogar 50- 80 Polymorphismen pro Gen bekannt.

Von der Vielzahl der genetischen Polymorphismen stellt der Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism=SNP) mit circa 90% eine der häufigsten genomischen Variabilitäten dar. Der SNP entsteht durch den Austausch eines einzelnen Nukleotids gegen ein anderes. Wird hierbei eine Purinbase gegen eine andere Purinbase ausgetauscht oder eine Pyrimidinbase ihrerseits durch eine andere Pyrimidinbase ersetzt, wird von einer Transition gesprochen. Abzugrenzen davon ist die Transversion, bei der eine Pyrimidinbase gegen eine Purinbase (oder umgekehrt) ausgetauscht wird. Daneben gibt es andere, weitaus seltener vorkommende Sequenzvarianten, wie Insertions- und Deletionspolymorphismen, die durch das Einfügen oder

Entfernen einer oder mehrerer Basen oftmals schwerwiegende Folgen nach sich ziehen. Hierbei kann das Genprodukt enorm verändert werden (Alharbi et al. 2013).

Zudem gibt es Repeat-Polymorphismen, die eine vielfältige Wiederholung von Basentriplets aufweisen, wobei die Pathogenität mit steigender Anzahl der Repeats zunimmt (Tsai et al. 2012).

Polymorphismen, die in der Promotorregion eines Genes lokalisiert sind, können die Transkriptions- oder auch die Expressionsrate eines Genes verändern. Da hierdurch oftmals die Bindungsstelle von Transkriptionsfaktoren verändert wird, kann das Genprodukt in Qualität und Quantität beeinflusst werden (van't Hooft et al. 1999). Nukleotidsequenzänderungen, die in funktionell nicht relevanten DNA-Abschnitten liegen, werden als stille Polymorphismen bezeichnet, weil sie zu keiner Veränderung der Genexpression und des Genproduktes führen (Buselmaier und Tariverdian 2006). Insgesamt existieren über eine Million Polymorphismen im menschlichen Genom und circa 85% der DNA-Unterschiede zwischen zwei Individuen sind auf sie zurückzuführen.

#### **1.4.1 eNOS-Gen**

Das auf dem Chromosom 7q35-36 liegende eNOS-Gen beinhaltet 26 Exons und 25 Introns. Gensequenzen, die in der messenger-Ribonukleinsäure (m-RNA) vorhanden sind und auch nach dem Spleißen erhalten bleiben, werden als Exons bezeichnet. Introns hingegen befinden sich in der heterogenen-RNA (hn-RNA), werden aber durch den Spleißvorgang exzidiert, sodass sie in der m-RNA nicht mehr vorhanden sind und folglich auch nicht für ein Genprodukt kodieren.

Insgesamt überspannt das eNOS-Gen circa 21 Kilobasen (kb) genomischer DNA und kodiert für ein Protein mit dem Molekulargewicht von 135 Kilodalton (kDa) (Marsden et al. 1993). Die gespleißte und translationsbereite m-RNA des eNOS-Gens besteht aus 4052 Nukleotiden, ist endothelzellspezifisch und umfasst 4 kb. Normalerweise besitzt die m-RNA eine relativ lange Halbwertszeit von circa 24 bis 48 Stunden, die jedoch in Anwesenheit von TNF  $\alpha$  oder durch

Hypoxie auf wenige Stunden gesenkt werden kann (Karantzoulis-Fegaras et al. 1999). In der Promotorregion befinden sich mehrere cis-regulatorische Sequenzen, darunter zum Beispiel Aktivator Protein 1 (AP-1), AP-2, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder auch Sp-1. Wie bereits in Kapitel 1.3.1 erwähnt, können Östrogene die NOS 3-Expression hochregulieren, da sie die Bindeaktivität des Transkriptionsfaktors Sp-1 an den Promotor des eNOS-Gens erhöhen (Kleinert et al. 1998). Auch vermehrte hämodynamische Belastung führt zu einer verstärkten eNOS-Bildung, da die Promotoregion regulatorische Elemente enthält, welche erhöhten Scherstress wahrnehmen und dementsprechend die Expression ankurbeln (Uematsu et al. 1995).

#### **1.4.2 Polymorphismen des eNOS-Gens**

Es existieren mehrere Polymorphismen des eNOS-Gens, die die Produktion und die funktionelle Aktivität des Enzymes beeinflussen. Dadurch können die Expression, die Translation und die katalytische Aktivität der eNOS verändert werden (Dosenko et al. 2006).

Als erstes sei der in dieser Arbeit relevante eNOS-G-894-T-Polymorphismus genannt. Aufgrund einer Basensubstitution von Guanin (G) zu Thymin (T) an Position 894 im Exon 7 des eNOS-Gens kommt es zum Austausch der AS Glutamat (Glu) gegen Aspartat (Asp). Dies bedingt eine Änderung der AS-Sequenz des Codons 298. Diese Genvariante wird daher auch als Glu-298-Asp-Polymorphismus betitelt und führt zu einer molekularen Variante des eNOS-Gens, die anfälliger für proteolytische Spaltung ist, möglicherweise auch einen Einfluss auf die Enzymstabilität hat und die Interaktion von Proteinen untereinander verändert (Teasuro et al. 2000). Es existieren drei Genotypen des eNOS-G-894-T-Polymorphismus: GG, GT und TT.

Als weitere genetische Variabilität wird der eNOS-T-786-C-Polymorphismus beschrieben. Dieser ist in der 5' flankierenden Promotorregion des eNOS-Gens lokalisiert und führt zu einer Transition an Position 786, bei der die Pyrimidinbase Thymin (T) durch Cytosin (C) ersetzt wird. Dieser Polymorphismus ist entscheidend an der Regulation der eNOS-Genexpression beteiligt, da er

teilweise die Transkriptionsrate um bis zu 50% reduzieren kann. Auch hier werden drei Genotypen beschrieben: TT, TC und CC (Rossi et al. 2003).

Eine weitere Variante ist der eNOS-27-bp-Polymorphismus im Intron 4 des eNOS-Gens, dem eine variable Nummer von Tandem-Repeats (VNTR) zugrunde liegt. Es sind zwei Allele bekannt: das 4a-Allel, bestehend aus vier 27-bp-Repeats und das 4b-Allel, bestehend aus fünf 27-bp-Repeats (Dosenko et al. 2006).

Daneben existiert der eNOS-G-10-T-Polymorphismus, welcher im Intron 23 lokalisiert ist. Es wird spekuliert, dass diese Transversion den Spleißvorgang des eNOS-Genes verändern könnte (Gluba et al. 2009).

### **1.4.3 eNOS-G-894-T-Polymorphismus**

Bereits in einigen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der eNOS-G-894-T-Polymorphismus mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist (Angeline et al. 2011, Hingorani et al. 1999). Es existieren drei Genotypen, wobei ein Individuum entweder jeweils Träger des homozygoten GG- oder TT-Allel ist oder das heterozygote GT-Allel besitzt.

Die funktionelle Bedeutung dieses Polymorphismus zeigt sich vor allem bei homozygoten TT-Allelträgern, da die hiermit einhergehende verminderte Enzymaktivität der eNOS zu einer geringeren basalen NO-Produktion führt. Die veränderte Syntheserate von NO beschleunigt das Auftreten von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen und koronaren Spasmen. Aufgrund dieser Tatsache ist gut nachvollziehbar, dass der homozygote TT-Genotyp des eNOS-G-894-T-Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit (KHK) oder eines akuten Myokardinfarktes assoziiert ist (Hingorani et al. 1999).

Des Weiteren kann die TT-Genvariante mit einer erhöhten Prävalenz bestimmter Risikofaktoren der KHK wie Hypercholesterinämie, Arteriosklerose (Jeerooburkhan et al. 2001) und Diabetes mellitus (Angeline et al. 2011) in Zusammenhang gebracht werden. Daher könnte der eNOS-G-894-T-Polymorphismus möglicherweise als genetischer Einflusswert der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität betrachtet werden und auch als

genetischer Marker für die Entwicklung von arteriosklerotischen Erkrankungen von Bedeutung sein.

Im Gegensatz dazu scheint die Rolle dieses Polymorphismus in Bezug auf essentielle arterielle Hypertonie noch nicht endgültig geklärt zu sein. Miyamoto et al. zeigten, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem Auftreten von essentieller Hypertonie besteht. Demnach zogen sie es in Erwägung, ihn als eigenständigen Faktor für die Entwicklung der essentiellen Hypertonie anzusehen (Miyamoto et al. 1998). Dahingegen konnte im Rahmen einer retrospektiven Kohortenstudie im Jahre 2004 keine Assoziation zwischen dem eNOS-G-894-T-Polymorphismus und einer erhöhten Inzidenz für Hypertonie festgestellt werden (Kishimoto et al. 2004). Noiri und seine Mitarbeiter publizierten im Jahre 2002, dass das T-Allel auch einen Risikofaktor für das Auftreten von kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, auf Grundlage von Diabetes mellitus, darstellt. Die mit dieser Genvariante einhergehende verminderte NO-Produktion kann abfallende vasodilatatorische Eigenschaften bedingen und die proinflammatorische Leukozytenadhäsion am Endothel steigern. Dadurch könnte das Auftreten von arteriosklerotischen Läsionen beschleunigt werden. In dieser Studie zeigte sich, dass Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, die homozygote TT-Träger des eNOS-G-894-T-Polymorphismus waren, eine deutlich erhöhte Prävalenz für das Auftreten von arteriosklerotischen Folgeerkrankungen wie KHK oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) hatten (Noiri et al. 2002).

Eine weitere Studie mit 291 Patienten untersuchte, ob der eNOS-G-894-T-Polymorphismus auch als limitierender Faktor für die Ausbildung von Kollateralen bei Patienten mit chronischen Koronarverschlüssen angesehen werden kann. Dies erscheint enorm wichtig, da es aufgrund von Okklusion zu Symptomen wie Angina pectoris oder auch linksventrikulärer Dysfunktion kommen kann. Beim Vorliegen des TT-Genotypes zeigte sich, dass die Angiogenese als Reaktion auf Gewebeischämie stark vermindert war, was sich durch eine geringere Aktivität der eNOS erklären lässt. Dementsprechend wird deutlich, dass die eNOS nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation des vaskulären Tonus wahrnimmt, sondern auch als ein entscheidender Faktor bei der Modulation der Angiogenese angesehen werden kann (Lamblin et al. 2005).

#### 1.4.4 eNOS-G-894-T-Polymorphismus in der Herzchirurgie

Welchen Einfluss Genpolymorphismen auf Patienten während und nach kardiochirurgischen Operationen haben, scheint bis heute noch nicht hinreichend untersucht worden zu sein. Die Detektion verschiedener Genotypen wäre zur Abklärung der interindividuellen Variabilität allerdings sinnvoll, um so möglicherweise individualisierte Therapien erstellen zu können.

Herzchirurgische Operationen werden heutzutage schon routinemäßig mit immer geringeren Mortalitätsraten durchgeführt. Um das Herz dabei stillzulegen, wird eine kardioplegische Lösung in die Koronarien injiziert und so ein künstlicher Herzstillstand herbeigeführt. Nun kann mit Hilfe einer HLM die Funktion des Kreislaufes aufrechterhalten werden.

Während herzchirurgischer Eingriffe mit HLM können Veränderungen der vaskulären Permeabilität, des regionalen Blutflusses sowie der Myokardperfusion auftreten. Dies zieht mitunter eine massive Freisetzung von vasoaktiven Substanzen wie Bradykinin oder NO nach sich. Die bereits durch den kardiopulmonalen Bypass bedingte Hypotension wird hierdurch noch weiter verstärkt (Ruvolo et al. 1999). Um den Patienten während des Eingriffes zu stabilisieren und der auftretenden Hypotension entgegenzuwirken, werden vasokonstriktive Substanzen benötigt. Häufig verwendet wird dabei beispielsweise Phenylephrin, ein  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Agonist.

Philip et al. versuchten 1999 erstmals eine mögliche Assoziation zwischen dem eNOS-G-894-T-Polymorphismus und dem vaskulären Antwortverhalten nach alpha-adrenerger Stimulation während kardiochirurgischer Operationen zu ermitteln. Hierbei zeigte sich ein deutlich erhöhtes Ansprechen auf die Phenylephrin-Injektionen bei Patienten, die TT- oder GT-Allelträger des eNOS-G-894-T-Polymorphismus waren. Das vaskuläre Antwortverhalten gegenüber vasoaktiven Substanzen scheint durch eNOS-894T-Genvariante verändert zu sein. Dies könnte sich auf die verminderte NO-Synthese zurückführen lassen, da dem Molekül NO starke Effekte in der Modulation des vaskulären Tonus zugeschrieben werden (Philip et al. 1999).

Eine im Jahre 2006 publizierte Studie untersuchte den Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die perioperative Hämodynamik und auf den Katecholaminverbrauch bei Patienten während herzchirurgischer Operationen.

In Hinblick auf die hämodynamischen Parameter sowie die benötigte pharmakologisch inotrope Unterstützung ließen sich jedoch keine Unterschiede zwischen dem GG-, GT- und TT-Genotyp feststellen. Auch postoperativ konnte keine Korrelation zwischen auftretenden hämodynamischen Schwankungen und dem eNOS-G-894-T-Polymorphismus festgestellt werden. Das klinische *early-Outcome* schien nicht verändert zu sein. Dies sollte allerdings kritisch hinterfragt werden, da hier nur elektive Patienten ausgewählt wurden, die sich Aorto-Koronaren-Venenbypass (ACVB) Operationen unterzogen und Studienkollektiv mit 105 Patienten allerdings relativ gering war (Liakopoulos et al. 2006).

## 1.5 Zielsetzung

Der eNOS-G-894-T-Polymorphismus ist mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, KHK, Hypertension sowie Hyperlipidämie vergesellschaftet. Aufgrund der verringerten eNOS-Enzymaktivität, die eine verminderte NO-Synthese bedingt, scheint dieser Polymorphismus von enormer Bedeutung für das Herz-Kreislauf-System zu sein. Auch während kardiochirurgischer Interventionen spiegelt sich die klinische Relevanz dieser Genvariante wider, da die veränderte eNOS-Enzymaktivität das Auftreten von vasomotorischen Abnormalitäten begünstigen kann.

In einigen Studien wurden bereits Zusammenhänge zwischen genetischen Polymorphismen und deren Einfluss auf die Entstehung von Endorganschäden nach kardiochirurgischen Operationen untersucht (Popov et al. 2010 b, Wang JF et al. 2010). In Hinblick auf peri- und postoperative auftretende hämodynamische Veränderungen bei kardiochirurgischen Eingriffen konnte der eNOS-G-894-T-Polymorphismus bereits als Kandidatengen identifiziert werden. Insbesondere nach elektiven Eingriffen zeigte sich eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate innerhalb der Gruppe der homozygoten TT-Allelträger des eNOS-G-894-T-Polymorphismus (Janssen 2009).

Ob und vor allem welchen Effekt Genpolymorphismen auf die Langzeitmortalität nach kardiochirurgischen Eingriffen haben, scheint bisweilen noch unklar und wurde zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend untersucht.

Daher soll es Zielsetzung dieser Studie sein, den klinischen Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die 5-Jahres-Mortalität und -Morbidität kardiochirurgischer Patienten nach Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass zu untersuchen.

Anhand dieser Ergebnisse könnte sich ableiten lassen, ob dieser Polymorphismus hinreichend Pathogenität besitzt, um als eventueller prädispositionierender Risikofaktor der kardiovaskulären Langzeitmortalität angesehen zu werden. Als genetischer Marker würde er der Risikoevaluierung dienen und könnte folglich als Screeningparameter etabliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

Ziel dieser Studie war es, den klinischen Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die 5-Jahres-Mortalität und -Morbidität kardiochirurgischer Patienten zu untersuchen. Das Kollektiv dieser prospektiven Langzeitstudie umfasste 500 männliche und weibliche kardiochirurgische Patienten, die im Zeitraum von November 2005 bis Dezember 2006 in der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (THG) (Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. F.A. Schöndube) der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) operiert wurden. Es wurden nur Probanden ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Operation zwischen 18-80 Jahren alt waren. Patienten mit vorbekannten Neoplasien wurden aus der Studie ausgeschlossen. Zu den durchgeführten kardiochirurgischen Interventionen gehörten sowohl Bypass-, Herzklappen- und Aorteneingriffe sowie kombinierte Prozeduren, die unter Anschluss an HLM durchgeführt wurden. Dabei wurden elektive, dringliche und auch Notfalloperationen mit in die Studie eingeschlossen.

Die direkte postoperative Überwachung erfolgte auf der Intensivstation 0118 des Zentrums für Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin (ZARI) (Direktor: Prof. Dr. med. M. Quintel) der UMG. Die anschließende Versorgung und ärztliche Betreuung der Patienten bis zum definitiven Entlassungsdatum wurde von den Mitarbeitern der THG sichergestellt. Zur Bestimmung der Genpolymorphismen wurde den Patienten im Rahmen der Überwachung einmalig 5ml Blut anlässlich einer routinemäßigen Blutentnahme entnommen.

Neben dem direkten postoperativen Outcome (Janssen 2009) war von vornerein eine anschließende Langzeitstudie geplant. Um Aussagen bezüglich des Einflusses des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf 5-Jahres-Mortalität und -Morbidität kardiochirurgischer Patienten treffen zu können, war es im Rahmen dieser Studie erforderlich, nach Ablauf von fünf Jahren, Informationen zum aktuellen Gesundheitszustand der Patienten zu gewinnen. Zur Datenerhebung wurde ein speziell auf diese Studie zugeschnittener Fragebogen ausgearbeitet, der an die jeweiligen Hausärzte der Patienten gesendet wurde. Die Daten der

zurückgesendeten Fragebögen wurden anschließend in das eigens entwickelte Datenbanksystem (von Herrn Prof. Dr. med. J. Hinz und Herrn PD. Dr. med. A.-F. Popov) übernommen und ausgewertet.

Die Patientenaufklärung erfolgte im Zuge der initialen Studie (Janssen 2009). Alle Patienten wurden darüber informiert, welche Ziele diese Studie verfolgt, dass eine studienspezifische Blutentnahme durchgeführt wird und dass ihre Daten unter Anwendung des Datenschutzgesetzes ausgewertet und gespeichert werden. Zusätzlich wurde darüber aufgeklärt, dass es möglich sei, auch mehrere Jahre nach der Hospitalisierung aktuelle Informationen zum gegenwärtigen Gesundheitszustand einzuholen. Nach ausführlicher Aufklärung erfolgte die freiwillige, schriftliche Einwilligung der Patienten. Bei nicht-einwilligungsfähigen Patienten wurde der „mutmaßliche Wille“ durch Angehörige erfragt oder die Einwilligung erfolgte durch einen gesetzlich ernannten Betreuer. Die Patienten konnten jederzeit auf eigenen Wunsch ohne Angabe von Gründen aus der Studie austreten. Diese Studie wurde von der hiesigen Ethikkommission mit der Antragsnummer 30/7/05 genehmigt.

## **2.2 Datensammlung**

Diese hier vorgelegte Arbeit stellt eine Folgestudie dar und schließt teilweise an eine bereits stattgehabte Dissertation (Janssen 2009) an. Dazu muss berücksichtigt werden, dass initial von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Hinz/ PD Dr. med. Popov 525 Patienten zur Untersuchung der Bedeutung verschiedener Genpolymorphismen für das Auftreten und den Schweregrad des Lungenversagens in die Studie eingeschlossen und deren Daten im Datenbanksystem gespeichert wurden. Als Risikopatienten für die Entwicklung eines Lungenversagens galten dabei Patienten mit Langzeitbeatmung (n=25) und kardiochirurgische Patienten mit Operationen unter Hilfe einer HLM (n=500). Um Aussagen zum Einfluss der Polymorphismen auf die Morbidität und die Mortalität treffen zu können, wurde gemäß einer durchgeführten Poweranalyse eine Fallzahl von 500 Patienten empfohlen.

Zum postoperativen Outcome der Patienten verfasste Frau Gesine Janssen Ihre Dissertation mit dem Titel *„Der Einfluss des eNOS- Polymorphismus 894*

*G/T auf das Auftreten und den Schweregrad eines Lungenversagens“* (Janssen 2009). Das Patientenkollektiv von Frau Janssen wurde aus der genannten Datenbank entnommen und umfasste 25 Patienten mit Langzeitbeatmung sowie 475 kardiochirurgische Patienten. Dahingegen bestand das Patientenkollektiv der hier vorgelegten prospektiven Studie aus 500 kardiochirurgischen Patienten (davon 475 Patienten identisch Janssen). Ziel war es, mittels Fragebogen einen *Follow-up-Status* der Patienten zu erheben, um Aussagen zum Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf 5-Jahres-Mortalität und -Morbidity kardiochirurgischer Patienten zu ermitteln.

Somit kann die Datenerhebung in zwei Kategorien unterteilt werden. Es wurden zum einen aktuelle Daten aus dem Fragebogen ausgewertet und zur bestehenden Datenbank hinzugefügt oder ergänzt. Zum anderen wurde wiederum auch auf Daten der vorangegangenen Studie zurückgegriffen, die sich bereits in der Datenbank befanden. Dazu zählten beispielsweise allgemeine Patienteninformationen, prä- und perioperative Daten oder Kontaktdaten des Hausarztes (Janssen 2009).

Die Datenbank wurde eigens für diese aneinander anschließenden Studien auf der Basis eines Softwarepaketes von Microsoft® Access mit integrierter Programmiersprache Microsoft® Visual-Basic entwickelt.

Die gesammelten Daten der Probanden lassen sich folglich in zwei Abschnitte gliedern:

- aktuelle Daten (*Follow-up-Daten*), erhoben anhand der Auswertung des Fragebogens
- vorangegangene Daten, die sich bereits in der Datenbank befanden.

## **2.3 Aktuelle Daten**

Zu den aktuellen Daten zählten alle Informationen, die mittels der Fragebögen, des telefonischen Kontaktes und der Auskünfte der zuständigen Einwohnermeldeämter erhoben wurden. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

### **2.3.1 Anschreiben an die Hausärzte**

Um eine adäquate Kontaktaufnahme mit den Hausärzten herzustellen, wurde ein passendes Anschreiben entworfen, das Informationen bezüglich der Studie und zu dem beiliegenden Fragebogen enthielt. Darüber hinaus wurden die Ziele der Studie erläutert und mitgeteilt, dass der genannte Patient in die Studie eingewilligt hat und es somit möglich sei, Informationen bezüglich seines Gesundheitsstandes zu erfragen. Ebenso wurde mit Hilfe des Anschreibens deutlich gemacht, wie wichtig die Mithilfe der niedergelassenen Kollegen und Kolleginnen sei, denn nur durch einen möglichst vollständig beantworteten Fragebogen könnten wissenschaftlich verwertbare Angaben gemacht werden. Weiterhin wurde in dem Anschreiben vermerkt, dass diese Studie durch die zuständige Ethikkommission genehmigt wurde und es enthielt die entsprechende Antragsnummer, sodass Transparenz ermöglicht wurde. Ferner wurde in dem Anschreiben darauf aufmerksam gemacht, dass bei Unklarheiten oder Fragen jederzeit die Möglichkeit zu einem telefonischen Gespräch bestehe. Falls dennoch Zweifel bezüglich der Informationsfreigabe der Patientendaten bestanden, konnten die Hausärzte Einsicht in die Einwilligungserklärung des Patienten und in die Genehmigung der Ethikkommission nehmen. Somit sollte eine Nichtbeantwortung des Fragebogens aufgrund von Bedenken und Unsicherheit verhindert werden. Um die Motivation der Kollegen und Kolleginnen zu wecken, um sie dazu zu bewegen, den Fragebogen zu beantworten, unterschrieben Herr Prof. Dr. med. J. Hinz und Herr PD. Dr. med. A. F. Popov alle Anschreiben persönlich.

UNIVERSITÄTSMEDIZIN : **UMG**  
GÖTTINGEN

**Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz**  
Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. F.A. Schöndube  
Studienleiter: Dr. med. A.-F. Popov

**Zentrum Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin**

Prof. Dr. med. M. Quintel  
Studienleiter: PD Dr. med. J. Hinz

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

im Rahmen der Studie *„Die Bedeutung der Gen- Polymorphismen Endothelin-1 198T, Endothelin-T1370G (ET-1), e Nitric Oxide Synthase G894T und e Nitric Oxide Synthase T786C (eNOS) für das Auftreten und den Schweregrad des Lungenversagens.“* benötigen wir Information zu Ihrem Patient/Patienten

Ihr Patient/Patientin hat im Jahr 2006 an der obigen Studie teilgenommen und sich bereit erklärt, dass wir uns im Verlauf mit seinem Hausarzt in Kontakt setzen, um die neusten Daten zu seinen/ihren Befinden und die neusten für die Studie wichtigen Befunde erhalten.

Daher sind wir auf Ihre Mithilfe angewiesen und hoffen, dass Sie es uns mit den entsprechenden Daten ein „**Follow up**“ der Studie ermöglichen. Sie geben uns damit die Möglichkeit Kenntnisse auf dem Gebiet des Lungen- und des Organversagens nach herzchirurgischen Operationen mit Herz-Lungenmaschine zu erweitern.

Wir möchten Sie bitten, den beigefügten Fragebogen soweit wie möglich zu beantworten, da nur durch vollständig beantwortete Fragen wissenschaftlich verwertbare Aussagen gemacht werden können.

Bitte senden Sie, den ausgefüllten Fragebogen unter der Faxnummer: **0551/398375** mit dem Betreff: **„Polymorphismus-Studie“** schnellstmöglich an uns zurück.

Bei Fragen stehen wir natürlich jederzeit telefonisch zur Verfügung.

Diese Studie wurde von der hiesigen Ethik- Kommission mit der Antragsnummer 30/7/05 genehmigt. Vielen Danke für Ihre Mithilfe.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

PD. Dr. med. J. Hinz

Dr. med. A.-F. Popov

Priv.- Doz. Dr. med. J. Hinz    Tel: 0551/3922995  
Dr. med. A.- F. Popov        Tel: 0551/3914691  
**Doktoranden**  
Hr. Christian Bireta         Tel: 0176/24196483  
Fr. Christina Lipke         Tel: 0176/24869426

**Abbildung 1: Das Anschreiben**

### 2.3.2 Konzeption und Aufbau des Fragebogens

Mithilfe des Fragebogens gelang es, auch ohne direkten Patientenkontakt, Informationen zum derzeitigen Gesundheitszustand des einzelnen Studienteilnehmers zu gewinnen. Der Fragebogen, welcher sowohl offene als auch geschlossene Fragen enthielt und sich in zwei Abschnitte untergliederte, entstand durch Zusammenarbeit der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Kooperation mit dem Zentrum für Anaesthesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin der Universitätsmedizin Göttingen. Ziel dieses Fragebogens war es, zu eruieren, welchen Einfluss der eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die 5-Jahres-Mortalität und -Morbidity des einzelnen Studienteilnehmers besitzt. Dazu wurde der Fragebogen so konzipiert, dass im ersten Abschnitt Fragen hinsichtlich der Mortalität gestellt wurden und im zweiten Abschnitt die Morbidity, bezogen auf die einzelnen Organsysteme, untersucht wurde.

Der erste Themenkomplex beinhaltete zwei offene Fragen, durch die Informationen zur Mortalität und zur erneuten Hospitalisierung gewonnen werden konnten. Diese Fragen wurden bewusst als offene Fragen konzipiert, da sich so ein breites Spektrum an Antwortmöglichkeiten für den Hausarzt ergab. Beispielsweise konnte damit näheres über die Todesursache und das Todesdatum eruiert werden. So konnte das Langzeitüberleben, bezogen auf den jeweiligen Genotyp, untersucht werden und mögliche Unterschiede hinsichtlich der Überlebensrate aufgedeckt werden. Dabei war es auch wichtig ein mögliches gehäuftes Auftreten von Todesursachen in Abhängigkeit eines Genotyps zu detektieren und somit einen Bezug zu dem von uns untersuchten Polymorphismus herzustellen.

Der zweite Themenkomplex beschäftigte sich mit der Morbidity und setzte sich aus Fragen zu Erkrankungen der einzelnen Organsysteme zusammen. Es wurden nur solche Organsysteme ausgewählt, bei denen die verringerte NO-Konzentration aufgrund des eNOS-G-894-T-Polymorphismus direkte Auswirkungen zeigt. Hierzu zählen beispielsweise ZNS, Lunge, Niere und Herz.

Der erste Abschnitt hinsichtlich der einzelnen Organsysteme bezog sich auf Fragen zum Zentralen Nervensystem. Diese wurden als geschlossene Fragen angelegt, bei denen nur die Antwort „ja“ oder „nein“ möglich war. Falls der Hausarzt eine der Fragen, betreffend Apoplex oder Blutung im ZNS des Patienten mit „ja“ beantwortete, wurde er gleichzeitig aufgefordert, das Datum dieses Ereignisses zu benennen, falls es ihm bekannt war.

Im nachfolgenden Gebiet „Lunge“ gab es sowohl offene als auch geschlossene Fragen. Hier sollten Informationen bezüglich Erkrankungen pulmonaler Genese der Patienten, wie chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und Asthma erfasst werden. Des Weiteren wurde erfragt, ob der Patient nach der stationären Entlassung aus der UMG künstlich beatmet wurde und falls ja, wie lange die Beatmungsdauer betrug.

Im darauffolgenden Abschnitt „Niere“ wurden die Hausärzte gebeten, den aktuellsten und den maximalsten Kreatinin- und Harnstoffwert des Patienten, jeweils mit Datum und Einheit, zu nennen. Zudem wurde ermittelt, ob der Patient ein Nierenersatzverfahren benötigte.

Der letzte Abschnitt „Herz“ stellte den umfassendsten Bereich des Fragebogens dar und beinhaltete Fragen zu kardialen Erkrankungen. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob der Studienteilnehmer nach der Hospitalisierung einen Myokardinfarkt erlitt und ob Erkrankungen wie Angina pectoris, Rhythmusstörungen oder Vorhofflimmern bestanden. Additiv dazu wurde versucht herauszufinden, ob bei dem Patient eine Re-Intervention am Herzen stattfand. Falls dies zutraf, baten wir den Hausarzt die Art der Re-Intervention näher zu beschreiben. Des Weiteren fragten wir nach Echokardiographiebefunden, dabei genügten Angaben zur Ejektionsfraktion (EF) und zum pulmonal-arteriellen Mitteldruck (PAPmean), da diese Parameter die Herzfunktion des Patienten reflektieren. Abschließend wurde nach einer Kopie des Herzkatheterbefundes gefragt, falls dieser postoperativ durchgeführt worden war. Da eine verringerte NO-Menge an der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt zu sein scheint, wurde dieser Themenkomplex sehr ausführlich dargestellt.

Betreff: **Polymorphismus- Studie (0551/398375)**

Studien- Nr.:

Name des Patienten:

Geburtsdatum des Patienten:

**Ist der Patient/ die Patienten innerhalb der letzten 5 Jahre verstorben? Falls ja, nennen Sie uns bitte die Todesursache und das Todesdatum.**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Erfolgte eine erneute Hospitalisierung (postoperativ) aufgrund pulmonaler oder kardialer Genese (wenn ja, bitte mit Datum)?**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### ZNS

Hatte der Patient in den letzten 5 Jahren einen:

- **Apoplex:** Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_
- **eine Blutung im ZNS:** Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_

### Lunge:

Leidet der Patient unter (postoperativ):

- **COPD:** Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_
- **Asthma:** Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_

Wurde der Patient in den letzten 5 Jahren beatmet?

Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_

Falls ja, wie lange und warum hat die Beatmung stattgefunden?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Abbildung 2:** Der Fragebogen Seite 1

Betreff: **Polymorphismus- Studie (Fax: 0551/398375)**

Studien- Nr.:

Name des Patienten:

Geburtsdatum des Patienten:

**Niere:**

Bitte nennen Sie uns die Harnstoff und Kreatininwerte des Patienten mit Einheit.  
(Wir benötigen den Maximalwert der letzten 5 Jahre als auch den aktuellsten Wert)

Kreatinin: max.: \_\_\_\_\_, (Datum): \_\_\_\_\_, aktuell: \_\_\_\_\_ (Datum): \_\_\_\_\_

Harnstoff: max.: \_\_\_\_\_, (Datum): \_\_\_\_\_, aktuell: \_\_\_\_\_ (Datum): \_\_\_\_\_

Benötigte der Patient in den letzten 5 Jahren und/ oder aktuell ein Nierenersatzverfahren?

Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_

**Herz:**

Hatte der Patient in den letzten 5 Jahren:

• einen **Myokardinfarkt:** Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_

• eine **Angina pectoris:** Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_

• **Vorhofflimmern:** Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_

• **Rhythmusstörungen :** Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_

• **Re-Operation am Herzen:** Ja: \_\_\_\_\_, (Datum) \_\_\_\_\_ Nein: \_\_\_\_\_

• **Art der Re- Operation:** \_\_\_\_\_

Als letztes möchten wir Sie noch bitten, uns Befunde zu den folgenden Untersuchungen mitzuteilen, falls diese innerhalb der letzten 5 Jahre durchgeführt worden sind.

**Echokardiografie:** EF (%): \_\_\_\_\_, Datum: \_\_\_\_\_

PAPmean (mmHg): \_\_\_\_\_, Datum: \_\_\_\_\_

Herzkatheterbefund, wenn vorhanden mit Datum (in Kopie):

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Abbildung 3:** Der Fragebogen Seite 2

### 2.3.3 Kontaktaufnahme und Datenerhebung

Nach der Ausarbeitung des Anschreibens und des Fragebogens wurden diese per Postweg an die Hausärzte der Studienteilnehmer gesendet. Das Patientenkollektiv umfasste ursprünglich 500 Patienten. Aufgrund einer peri/postoperativen Mortalitätsrate von 8,2% (n=41) in der initialen Studie (Janssen 2009) konnten allerdings nur 459 Fragebögen versendet werden.

Zum Großteil waren die Adressen der niedergelassenen Kollegen und Kolleginnen in der bereits erwähnten Datenbank zu finden. Die Hausärzte wurden gebeten, den mit gesendeten Fragebogen so vollständig wie möglich auszufüllen. Die Rücksendung des Fragebogens mit den dazugehörigen Patienteninformationen durch den Hausarzt erfolgte per Fax an das Ebenenbüro der THG der Universitätsmedizin Göttingen. Nach Erhalt des Fragebogens wurde dieser von uns ausgewertet und die daraus gewonnenen Informationen in das Datenbanksystem eingegeben und gespeichert. Danach sendeten wir ein Dankeschreiben an die jeweiligen Hausärzte zurück, in dem wir uns für Ihre wissenschaftliche Mithilfe und die gute Zusammenarbeit bedankten.

Falls wir nach dem ersten Anschreiben keine Antwort erhielten, sendeten wir nach telefonischer Kontaktaufnahme mit den Hausärzten nochmals einen Fragebogen an die Kollegen, um so einen möglichst hohen Rücklauf an Daten zu gewährleisten. Allerdings musste festgestellt werden, dass nicht alle niedergelassenen Hausärzte, den Fragebogen zurücksendeten oder aber, dass der Patient den Hausarzt wechselte und dieser daher keine Informationen zurücksenden konnte. Oftmals fehlten wohl aber auch die ausreichende Zeit oder der finanzielle Anreiz, sodass die Teilnahme an der Studie verweigert wurde. In diesen Fällen wurde versucht telefonisch Kontakt mit den Patienten aufzunehmen. In der Datenbank befanden sich die persönlichen Daten sowie die Telefonnummern der Studienteilnehmer, sodass teilweise durch direkten telefonischen Kontakt mit den Patienten der aktuelle Hausarzt ausfindig gemacht werden konnte oder der Fragebogen direkt mit den Patienten telefonisch bearbeitet wurde.

Jedoch gelang es nicht bei allen Patienten eine telefonische Datenerhebung sicherzustellen. Um auch diese Patienten erfassen zu können, wurde das

zuständige Einwohnermeldeamt kontaktiert, um so letztendlich Informationen bezüglich der Mortalität der übriggebliebenen Studienteilnehmer zu erhalten. Unter Berufung auf §21 Absatz 2 des Melderechtsrahmengesetzes (MRRG) konnte durch die erweiterte Melderegistrier Auskunft nach Glaubhaftmachung von berechtigtem Interesse eine Datenweitergabe ermöglicht werden. Zu den Daten der erweiterten Melderegistrier Auskunft zählen beispielsweise: frühere Vor- und Familienamen, Tag und Ort der Geburt, Staatsangehörigkeit, aber auch Sterbetag und -Ort.

Die *Follow-up-Datenerhebung* der Patienten erfolgte in enger, kollegialer Zusammenarbeit mit Herrn Bireta über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren (Juni 2010- Januar 2012) mit einem durchschnittlichen Zeitaufwand von circa 30 Wochenstunden für beide Doktoranden. Alle für die Studien notwendigen Arbeitsschritte (Studienplanung, Konzeption und Erstellung des Fragebogens, Datenerhebung sowie Datenauswertung) wurden zu gleichen Anteilen von Herrn Bireta und mir durchgeführt. Herr Bireta war ebenfalls in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Hinz/ PD Dr. med. Popov tätig und verfasste parallel zu der hier vorgelegten Arbeit eine Dissertation mit dem Titel „*Einfluss des eNOS T-786C-Polymorphismus auf die 5-Jahres-Mortalität und -Morbidität von Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen.*“

## **2.4 Vorangegangene Daten**

Wie bereits erwähnt schließt diese Arbeit zum Teil an eine Studie an, in welcher der postoperative Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf das Auftreten und den Schweregrad eines Lungenversagens untersucht wurde (Janssen 2009). Schon damals war es vorgesehen, die Patienten nach Ablauf eines bestimmten Zeitraumes wieder zu kontaktieren, um so einen *Follow-up-Status* zu erheben. Diese nun vorliegende Langzeitstudie baut teilweise auf Patientendaten der vorangegangenen Studie auf, sodass diese hier kurz genannt seien.

### **2.4.1 Präoperative Daten**

Zu den allgemeinen Patientendaten zählten Informationen wie Name, Geschlecht, Geburtsdatum, Adresse, Telefonnummer und behandelnder Hausarzt. Vor der Auswertung erfolgte eine Pseudonymisierung mit Hilfe von Zahlen. Weiterhin wurden das stationäre Aufnahmedatum in die UMG, das Operationsdatum, der offizielle Entlassungszeitpunkt und das eventuelle Todesdatum mit in die Datenbank aufgenommen, um eine zeitgenaue Nachverfolgung zu gewährleisten.

Die Risikofaktoren der Patienten wurden ebenfalls präoperativ ermittelt und in die Datenbank eingegeben. Zu den Risikofaktoren zählten folgende definierte Werte: Nikotinabusus, arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese bezüglich kardialer Ereignisse, pAVK, zerebrale Ereignisse, pulmonale Hypertonie, COPD, Herzinsuffizienz, KHK, Angina pectoris und aktive oder anamnestische Krebsleiden.

Durch den ausgefüllten und zurückgesendeten Fragebogen stellte sich nun jedoch heraus, dass bei einigen Patienten neue Risikofaktoren hinzugekommen waren, sodass die Datenbank auch diesbezüglich teilweise komplettiert wurde.

### **2.4.2 Perioperative Daten**

In der Datenbank waren Informationen bezüglich des perioperativen Verlaufs der Patienten gespeichert. Zu den intraoperativ erhobenen Daten zählten beispielsweise die Aortenabklemmzeit, die Anschlussdauer an die HLM, die verabreichten Medikamente, sowie die auftretenden perioperativen Komplikationen. Des Weiteren wurde die Notwendigkeit des Eingriffes in verschiedene Stufen unterteilt, dabei wurden elektive, -dringliche und -Notfalloperationen voneinander unterschieden. Postoperativ wurden während der intensivmedizinischen Überwachung die relevanten Kreislaufparameter via Elektrokardiogramm (EKG), arterieller Blutdruckmessung, zentralem Venenkatheter, Pulmonalkatheter und Pulskontur-Herzeitvolumen (PiCCO) überwacht.

## 2.5 Analyse des eNOS-G-894-T-Polymorphismus

Um den Genpolymorphismus bestimmen zu können, wurde bei allen Patienten eine studienspezifische Blutentnahme durchgeführt. Dazu wurden 5ml Blut aus einem zentralen Venenzugang oder aus einem arteriellen Katheter der A. radialis abgenommen. Das Ethylendiamintetraacetat (EDTA)- gepufferte Vollblut wurde anschließend eingefroren und somit für die weiterführende Diagnostik konserviert.

Die initiale Probenauswertung erfolgte im Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie. Die Methodik der Genotypisierung mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese erfordert mehrere Einzelschritte, die im Rahmen der vorangegangenen Studie durchgeführt wurden (Janssen 2009). Dabei wurde die DNA zunächst aus dem EDTA-gepufferten Blut des Patienten isoliert und mittels PCR amplifiziert. Danach wurde das PCR-Produkt sequenziert, um somit den entsprechenden Genotypen des eNOS-G-894-T-Polymorphismus festzulegen.

Da diese Genotypisierungsmethode 2009 allerdings nicht mehr als „State of the Art“ angesehen wurde, erfolgte am 10.11.2009 eine Neotypisierung der Patienten mittels TaqMan-SNP-Genotypisierung, einer PCR-basierten Methode zur Alleldiskriminierung von Single Nukleotid Polymorphismen, durch das Institut für klinische Pharmakologie der UMG (PD Dr. med. Tzvetkov). Hierbei wurden Oligonukleotid-Sonden eingesetzt, die am 5'-Ende mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Reporterfarbstoffen und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert waren. Eine vollständige Hybridisierung der Sonden erfolgte nur spezifisch in Abhängigkeit der gewählten Punktmutation und erzeugte ein Fluoreszenzsignal, welches nach Beendigung der PCR-Reaktion mittels Detektorgerät gemessen und ausgewertet werden konnte.

Folglich konnten die Patienten entsprechend ihres Genotyps in drei Gruppen aufgeteilt werden:

- homozygote GG-Allelträger (n=251)
- heterozygote GT-Allelträger (n=210)
- homozygote TT-Allelträger (n=39).

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Software STATISTIKA<sup>R</sup> (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Bei allen statistischen Sets wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  für den alpha-Fehler als signifikant angenommen. Die Genotypverteilung wurde mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz im Vergleich zur Normalbevölkerung überprüft. Die Überprüfung der Ergebnisse auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Bei Annahme der Normalverteilung wurde die deskriptive Statistik als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ermittelt. Bei Ablehnung der Normalverteilung durch den Kolmogorov-Smirnov-Test wurde die deskriptive Statistik als Median oder als Bereich angegeben. Bei ordinalskalierten Daten erfolgte die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test. Bei kategorialen Variablen wurden die Werte als prozentualer Anteil angegeben. Die weitere Testung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte in einer Feldertafel mit dem Pearson-Chi-Quadrat-Test. Die Testung auf Unterschiede in den Gruppen in der 5-Jahres-Mortalität erfolgte mit der Kaplan-Meier-Analyse und einem Log-Rank-Test.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Rücklauf der aktuellen Daten

Da diese Arbeit wie bereits erwähnt, zum Teil an eine vorangegangene Studie anschließt, wurde stellenweise auf entsprechenden Daten der Vorgängerstudie, die sich im Datenbanksystem befanden, zurückgegriffen. Diese Daten sind ebenfalls essentiell für die hier vorgelegte Arbeit, weil die anschließenden Ergebnisse teilweise darauf aufbauen oder in Bezug zu ihnen gesetzt werden (Janssen 2009).

Die Studienpopulation umfasste insgesamt 500 kardiochirurgische Patienten, wobei die postoperativen Mortalität 8,2% (n=41) betrug (Janssen 2009). Somit wurden nach Ablauf von fünf Jahren 459 speziell ausgearbeitete Fragebögen an die Hausärzte der verbliebenen Studienteilnehmer versendet. Von diesen versendeten Fragebögen wurden 329 ausgefüllt und zurückgesendet. Hierdurch gelang es, im ersten Schritt der Datensammlung einen Rücklauf von 71,7% zu erzielen. Anschließend erfolgte im zweiten Schritt die persönliche telefonische Kontaktaufnahme mit den Studienteilnehmern. Dabei konnten wiederum 29 Fragebögen beantwortet werden, sodass hierdurch weitere 6,3% *Follow-up-Daten* gewonnen werden konnten. Im letzten Schritt wurden die zuständigen Einwohnermeldeämter der restlichen 101 Patienten kontaktiert. Dadurch konnten weitere 22% an Daten zum *Follow-up-Status* hinzugefügt werden. Letztendlich gelang es mittels der genannten Maßnahmen bezüglich der Mortalität ein *Gesamtfollow-up* von 100% zu erzielen.

Dahingegen war der Rücklauf an verwertbaren Daten in Hinblick auf die Langzeitmorbidity unzureichend, so dass es diesbezüglich nicht gelang klinisch relevante Aussagen zu treffen.

### 3.2 Analyse des Nachbeobachtungszeitraumes

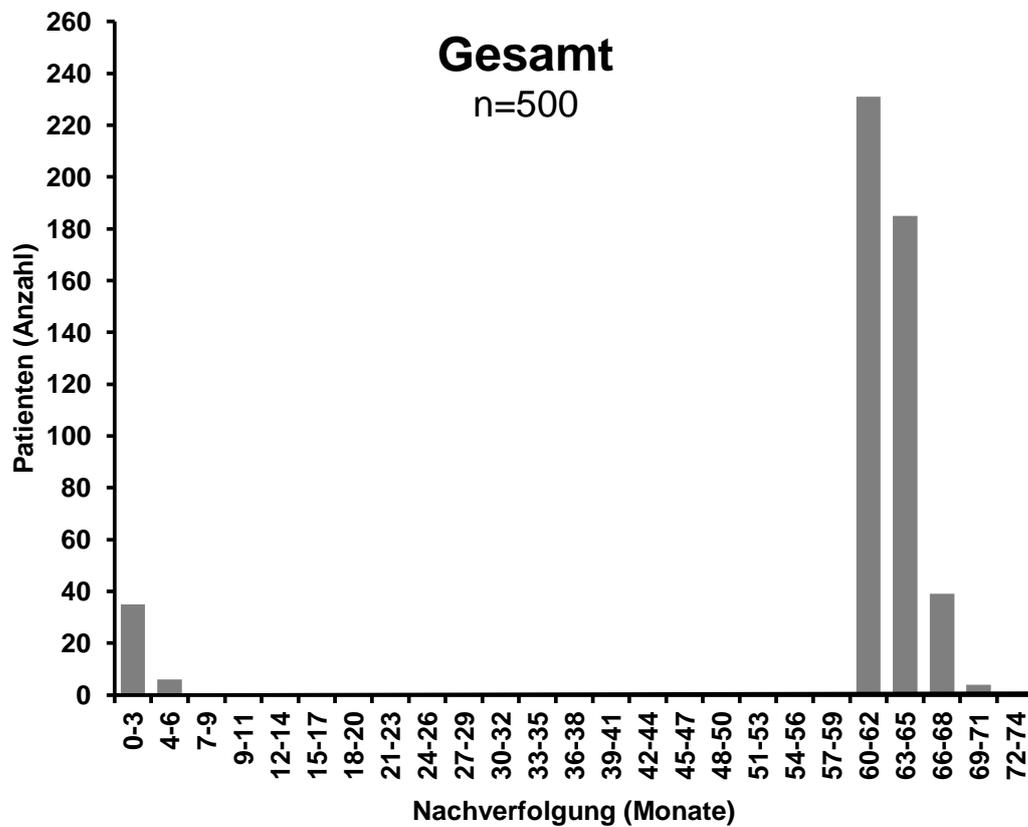
Zur differenzierten Darstellung der Nachverfolgung erfolgte eine Auswertung der Daten, die innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes von fünf Jahren erhoben wurden.

Zunächst wurde aus der initialen Studie der Operationszeitpunkt des jeweiligen Studienteilnehmers als Startpunkt übernommen, um einen klaren und einheitlichen ersten Messpunkt zu definieren. Der ermittelte messbare Endpunkt wurde, angesichts des unterschiedlichen Verlaufs der Patienten, der unterschiedlich angewandten Methodik zur Datenerhebung und der daraus resultierenden nicht einheitlichen Messpunkte, ebenfalls standardisiert. Als Endpunkt wurde das Datum des letzten Eintrags in die Datenbank definiert. So gelang es einen einheitlichen Nachbeobachtungszeitraum zu ermitteln. Bei Patienten, die im Verlauf des Nachbeobachtungszeitraumes verstorben waren, wurde das Todesdatum als weiterer Messpunkt hinzugefügt. Dahingegen wurde bei Probanden, die innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes am Leben geblieben sind, der letzte von uns durchgeführte Eintrag in die Datenbank als Endpunkt übernommen. Demnach konnten in Bezug auf die Überlebenszeit (gelebte Tage nach der Operation) und hinsichtlich der Überlebensraten (Auswertung mittels Kaplan-Meier-Kurve) statistische Aussagen getroffen werden.

In den folgenden Graphiken wurde das Datum der *Follow-up-Datenerhebung* (standardisierter Endpunkt), jeweils in drei Monatsschritten gegenüber der Anzahl der Patienten aufgetragen. Es zeigten sich sowohl beim Gesamtkollektiv, als auch bei den einzelnen Genotypen (GG-, GT- und TT) erwartungsgemäß zwei Peaks in der *Follow-up-Datenerhebung*.

Zum einem wurde ein geringer Teil der *Follow-up-Daten* peri/postoperativ nach durchgeführter Operation im Rahmen der initialen Studie erhoben (Janssen 2009). Dazu zählten beispielsweise Patienten, die peri/postoperativ verstorben waren oder Patienten, die aufgrund von aufgetretenen Komplikationen länger postoperativ überwacht werden mussten.

Der Großteil der *Follow-up-Daten* wurde jedoch innerhalb des von uns untersuchten Nachbeobachtungszeitraumes erhoben. Neben dem initialen zeigte sich ein weiterer Peak zwischen 60-72 Monaten nach durchgeführter Operation.



**Abbildung 4:** Nachbeobachtungszeitraum des Gesamtkollektivs

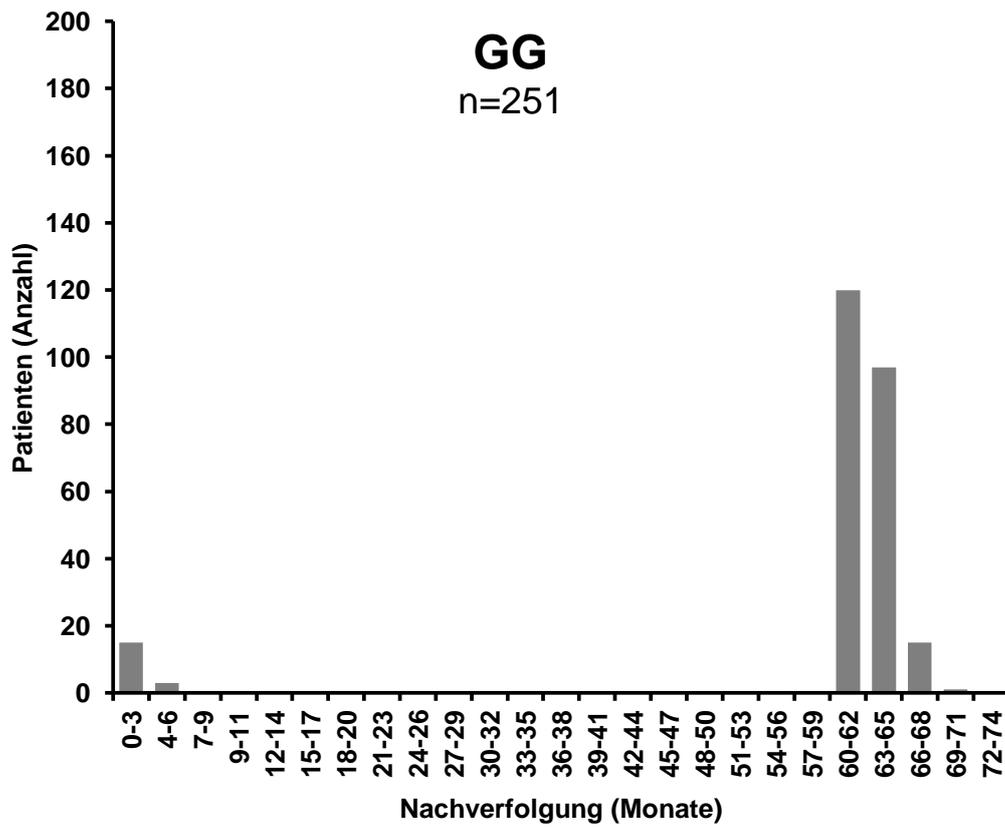


Abbildung 5: Nachbeobachtungszeitraum des GG- Genotyp

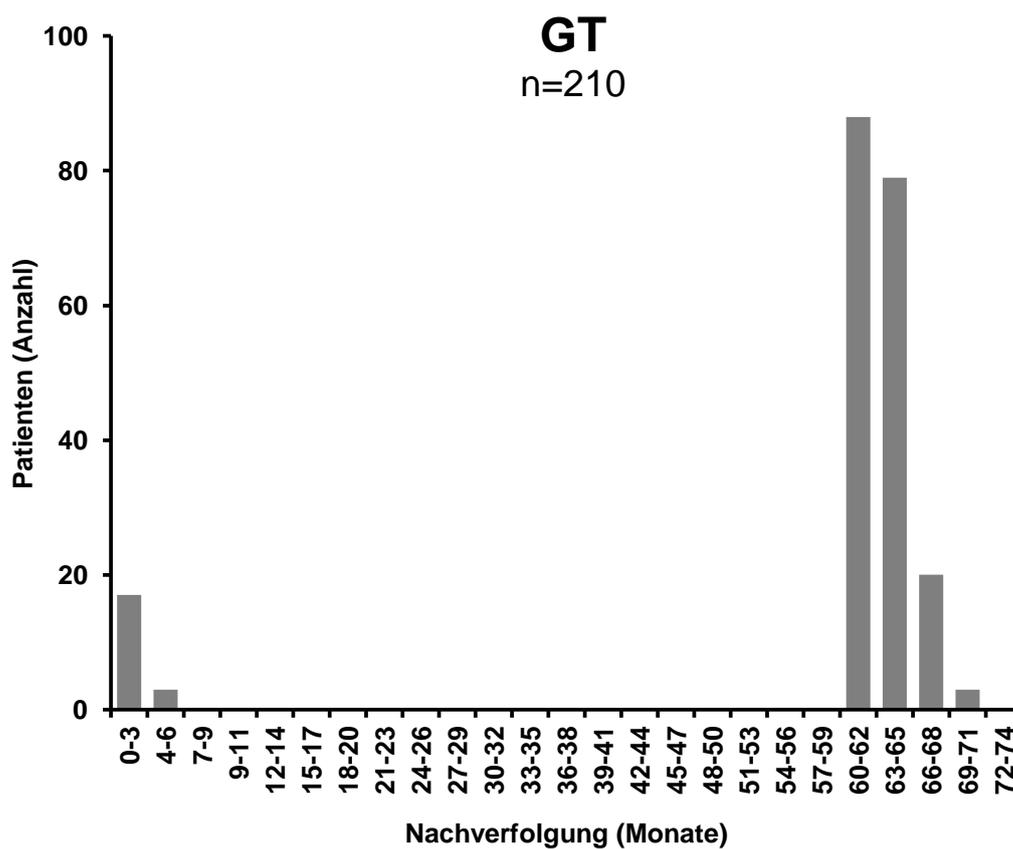


Abbildung 6: Nachbeobachtungszeitraum des GT-Genotyp

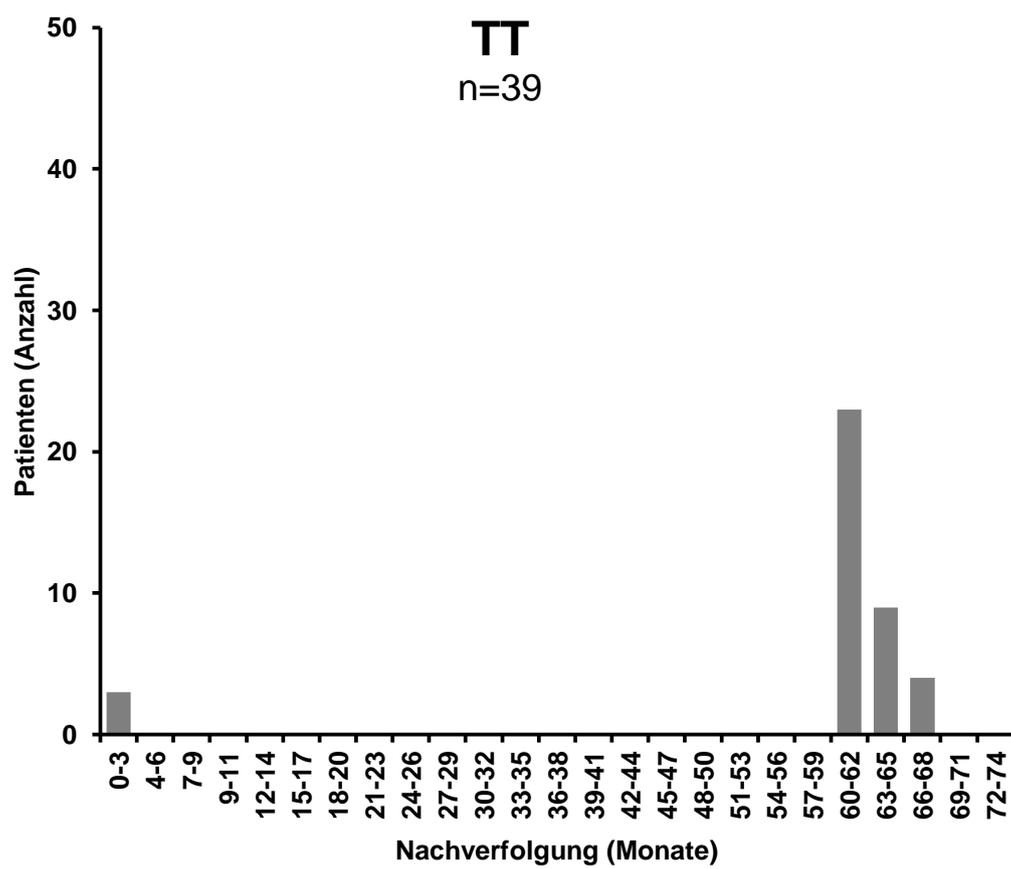


Abbildung 7: Nachbeobachtungszeitraum des TT-Genotyp

### 3.3 Genotypen- und Allelfrequenzverteilung

Bei allen Studienteilnehmern wurde mittels Taqman-SNP-Genotypisierung der eNOS-G-894-T-Polymorphismus detektiert und bestimmt. Demnach konnten drei Gruppen entsprechend ihres Genotypes definiert werden: homozygote Träger des G-Allels (GG), heterozygote Träger des G- sowie des T-Allels (GT) und homozygote T-Allelträger (TT). In unserer Studienpopulation zeigte sich hierbei eine Genotypenverteilung, die dem Hardy-Weinberg-Equilibrium entsprach. Von den 500 in die Studie eingeschlossenen Patienten konnten 251 Studienteilnehmer als homozygote G-Allelträger (GG) identifiziert werden, 210 Studienteilnehmer waren heterozygot (GT) für den Polymorphismus und weitere 39 Studienteilnehmer waren homozygot (TT) für die Transversion in diesem Gen.

Folglich konnte eine Allelfrequenz von 0.71 für das G-Allel und 0.29 für das T-Allel beobachtet werden. Die Gen- und Allelfrequenzverteilung des eNOS-G-894-T-Polymorphismus in dieser Studienpopulation korrelierte mit anderen bereits publizierten Studien (Liakopoulos et al. 2006, Philip et al. 1999) und zeigte eine Übereinstimmung mit der Minor-Allel-Frequenz der db-SAP-Datenbank.

**Tabelle 1:** Genotypen- und Allelfrequenzverteilung

894 G/T	GG	GT	TT	G-Allel	T-Allel	p-Wert
n=500	251	210	39	712	288	0,86
(%)	50	42	8	71	29	

### 3.4 Analyse der prä- und perioperativen Daten

Diese Daten wurden prä- und perioperativ erhoben und bereits ausführlich in der vorangegangenen Studie (Janssen 2009) diskutiert. Jedoch sind sie ebenfalls in dieser Arbeit aufgeführt, weil die anschließenden Ergebnisse und teilweise darauf aufbauen.

In der folgenden Tabelle wurden allgemeine und klinische Daten der Patienten, bezogen auf die verschiedenen Genotypen zusammengestellt. Hierbei ließen sich bezüglich Alter und Geschlecht keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen feststellen. Auch in Hinblick auf die Risikofaktoren wie Body-Mass-Index, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese, Ejektionsfraktion, Niereninsuffizienz, pAVK, zerebrale Ereignisse, pulmonale Hypertonie und COPD waren keine Auffälligkeiten zwischen den einzelnen Genotypen zu beobachten. Eine erhöhte Signifikanz konnte in der Gruppe der homozygoten TT-Allelträger bezüglich des arteriellen Hypertonus (87%) festgestellt werden. Daraus ergab sich ein p-Wert von 0.05, welcher das Signifikanzniveau erreichte.

**Tabelle 2:** Präoperative Patientendaten

	<b>GG</b> n=251	<b>GT</b> n=210	<b>TT</b> n=39	<b>p- Wert</b>
Alter (Jahre)	68±10	67±11	68±9	0.97
Geschlecht männlich (%)	65	64	67	0.93
<b>Risikofaktoren</b>				
BMI (kg/m <sup>2</sup> );	28±4.6	27±4.8	27±4.5	0.18
Nikotinabusus (%)	34	31	41	0.49
Hypertonus (%)	73	69	87	0.05
Hypercholesterinämie (%)	50	45	54	0.48
Diabetes mellitus (%)	31	30	33	0.91
Positive Familienanamnese (%)	16	15	21	0.66
Ejektionsfraktion (%)	53±14	52±15	62±10	0.07
Niereninsuffizienz (%)	12	16	15	0.41
pAVK (%)	7	6	15	0.09
Zerebrale Ereignisse (%)	14	12	10	0.70
Pulmonale Ereignisse (%)	10	5	8	0.13
COPD (%)	7	9	10	0.74

BMI: Body-Mass-Index (kg/m<sup>2</sup>); pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit; COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung

Betrachtet man die Dringlichkeiten der operativen Eingriffe, so ließen sich zwischen elektiven und dringlichen Operationen keine Unterschiede hinsichtlich der einzelnen Genotypen beobachten. Signifikante Unterschiede zeigten sich hingegen im Bereich der notfallmäßig durchgeführten operativen Interventionen in der Gruppe der heterozygoten GT-Allelträger ( $p=0.03$ ). Bezogen auf die Art des operativen Eingriffes zeigten sich bei der operativen Myokardrevaskularisation (CABG), bei Herzklappenoperationen, bei kombinierten Eingriffen oder bei anderen Verfahren keine Unterschiede innerhalb der Gruppen.

**Tabelle 3:** Perioperative Daten

	<b>GG</b> n=251	<b>GT</b> n=210	<b>TT</b> n=39	<b>p- Wert</b>
<b><i>Dringlichkeit des Eingriffes</i></b>				
Elektive Operationen n=396 (%)	81	77	85	0.41
Dringliche Operationen n=41 (%)	10	6	5	0.21
Notfalloperationen n=63 (%)	9	17	10	0.03
<b><i>Art des Eingriffes</i></b>				
CABG n=251 (%)	47	53	56	0.26
Herzklappenoperationen n=107 (%)	23	21	13	0.32
Kombinierte Eingriffe n=101 (%)	22	17	26	0.36
Andere Verfahrensweisen n=41 (%)	8	9	5	0.78

CABG: operative Myokardrevaskularisation; elektive Eingriffe: zum Zeitpunkt der Wahl, nicht zwingend notwendig; dringliche Operation: sobald ein Operationsaal verfügbar ist, spätestens innerhalb einer Woche nach Überweisung; Notfalloperationen: unverzügliche Operationsindikation, da vitale Bedrohung des Patienten.

### 3.5 Morbidität im Langzeitverlauf

Um aussagekräftige Ergebnisse bezüglich der Langzeitmorbidität treffen zu können, sollte ein möglichst hoher Satz an auswertbaren Daten vorhanden sein.

Dazu wurden die Fragebögen und die Informationen der Melderegisterauskünfte ausgewertet. Da jedoch nur 329 der 459 versendeten Fragebögen von den Hausärzten zurückgesendet wurden, gelang es nicht, alle benötigten Informationen zu eruieren, die notwendig gewesen wären, um statistisch signifikante Aussagen hinsichtlich der Langzeitmorbidität treffen zu können. Dies mag teils daran gelegen haben, dass nicht alle von uns erfragten Werte von klinischer Relevanz für den Patienten waren, sodass der Hausarzt diese nicht bestimmt hatte. Weiterhin wurden einige, der von uns erfragten Untersuchungen nicht oder in nur unregelmäßigen Abständen von den Hausärzten durchgeführt, sodass auch hier keine aussagekräftigen Daten erhoben werden konnten. Da 29 Fragebögen telefonisch durch direkten Patientenkontakt beantwortet wurden, war es hierbei nicht möglich, Informationen zu aktuellen Blutwerten oder speziellen Werten der Echokardiographie zu erhalten. Des Weiteren mag die unzureichende Datengewinnung bezüglich der Langzeitmorbidität auch daran gelegen haben, dass 101 Patienten über die zuständigen Einwohnermeldeämter erfasst wurden. Diese erweiterte Melderegisterauskunft konnte allerdings nur Auskunft über den Sterbetag und -ort des Studienteilnehmers geben, wohingegen keine Aussagen bezüglich der Morbidität getroffen werden konnten.

### 3.6 Mortalität im Langzeitverlauf

Bei einem *Follow-up-Datensatz* von 100% in Hinblick auf die Langzeitmortalität gelang es, die Sterblichkeit bezogen auf die einzelnen Genotypen des eNOS-G-894-T-Polymorphismus zu analysieren.

Bei einem ursprünglich gesamten Patientenkollektiv von n=500 wurde in der vorangegangenen Studie (Janssen 2009) eine peri/postoperative Mortalität von 8,2% (n=41) beobachtet. Dazu kamen innerhalb des von uns betrachteten Nachbeobachtungszeitraumes weitere 16,8% (n=84), sogenannte Out-of-Hospital-Mortalität. Folglich ergab sich eine Gesamtmortalität/ 5-Jahres-Mortalität von 25% (n=125).

Sowohl peri/ postoperativ, als auch hinsichtlich der Out-of-Hospital-Mortalität sowie in Bezug auf die Gesamtmortalität ließen sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Mortalitätsraten zwischen einzelnen Genotypen (GG, GT und GT) des eNOS-G-894-T-Polymorphismus aufdecken. Folglich zeigte kein Genotyp dieser Genvariante eine signifikant erhöhte Sterblichkeit.

**Tabelle 4:** Mortalitätsraten im Vergleich

	<b>GG</b> n=251	<b>GT</b> n=210	<b>TT</b> n=39	<b>p- Wert</b>
Peri/postoperative Mortalität n=41 (%)	7	10	8	n.s.
Out-of-Hospital-Mortalität n=84 (%)	18	14	21	n.s.
5-Jahres-Mortalität n=125 (%)	26	24	28	n.s.

n.s. = nicht signifikant

In Hinblick auf die Todesursachen konnten keine klinisch relevanten Aussagen getroffen werden.

Dies mag unter anderem daran liegen, dass von den Kollegen der initialen Studie, trotz einer peri/postoperativen Mortalitätsrate von 8,2% keine genauere Differenzierung der Todesursache vorgenommen wurde (Janssen 2009). Eine nachträglich von uns durchgeführte Analyse scheiterte allerdings, da oftmals keine genaue Abgrenzbarkeit der Todesursache zwischen peri/postoperativem Herz-Kreislaufversagen, postoperativ entwickelter Sepsis oder einem Multiorganversagen bei den initial verstorbenen Patienten möglich war. Um einer Verfälschung der Daten entgegenzuwirken, wurde die Todesursache dieser Patienten folglich als unbekannt eingestuft.

Bezüglich der Out-of-Hospital-Mortalität von 16,8% (n=84) konnte die Todesursache bei 39 der 84 verstorbenen Patienten eruiert werden. Davon verstarben 12 Patienten aufgrund von kardialen Ereignissen, 10 Patienten an Sepsis mit nachfolgendem Multiorganversagen, 8 Patienten an zerebralen Ereignissen wie Apoplex oder Blutung, weitere 4 Patienten an neu diagnostizierten Malignomerkrankungen und 5 Patienten aufgrund von sonstigen Todesursachen (beispielsweise Tod durch Wohnungsbrand). Den Großteil hingegen bildete die Gruppe der unbekannteren Todesursachen (n=45). Aufgrund der unzureichenden Datenlage war es folglich nicht möglich, die Todesursache in Zusammenhang mit der klinischen Bedeutsamkeit des eNOS-G-894-T-Polymorphismus zu bringen.

**Tabelle 5:** Todesursachen (5-Jahres-Mortalität /Gesamtmortalität)

Todesursachen	Gesamtmortalität, n=125	Anteil in %
Kardiale Ereignisse	12	10
Sepsis mit Multiorganversagen	10	8
Zerebrale Ereignisse	8	6
Malignome	4	3
Sonstige Todesursachen	5	4
Unbekannte Todesursachen	86	69

Zerebrale Ereignisse: Apoplex oder Blutung; Malignomerkrankungen: innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes neu diagnostiziert (waren bei Einschluss in die Studie nicht bekannt).

### 3.7 Analyse der Überlebenszeiten

Die Analyse der Überlebenszeiten beinhaltete die Langzeitmortalitätsrate, das Todesalter sowie das Alter bei Operation.

In Hinblick auf das Todesalter konnten zwischen den jeweiligen Genotypen des eNOS-G-894-T-Polymorphismus keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei GG-Allelträgern betrug das Alter bei Tod  $74\pm 8$  Jahre, bei GT-Allelträgern  $73\pm 7$  Jahre und beim TT-Genotyp  $75\pm 4$  Jahre. Auch hinsichtlich des Alters bei Operation ließen sich vergleichbare Werte zwischen den einzelnen Genotypen feststellen.

In Bezug auf die Langzeitmortalität wurden die gelebten Tage nach der Operation betrachtet. Dabei konnte jedoch kein Genotyp identifiziert werden, der eine signifikant bessere oder schlechtere Überlebenszeit aufwies. In der homozygoten GG-Gruppe wurden kumulativ  $500\pm 493$  gelebte Tage nach OP datiert, in der heterozygoten GT-Gruppe waren es  $497\pm 588$  Tage und in der homozygoten TT-Gruppe  $599\pm 578$  Tage. Der p-Wert war hinsichtlich der Langzeitmortalität, bezogen auf die einzelnen Genotypen, als nicht signifikant anzusehen.

**Tabelle 6:** Überlebensraten sowie Operations- und Todesalter, n=125

	<b>GG</b> n=64	<b>GT</b> n=50	<b>TT</b> n=11	<b>p- Wert</b>
Alter bei Operation (Jahre)	$72\pm 8$	$72\pm 7$	$73\pm 4$	0.67
Gelebte Tage nach OP (Tage)	$500\pm 493$	$497\pm 588$	$599\pm 578$	0.71
Alter bei Tod (Jahre)	$74\pm 8$	$73\pm 7$	$75\pm 4$	0.64

Mittels der Kaplan-Meier-Kurve wurden die Überlebensraten der drei Genotypen bestimmt. Hierzu wurden zu jedem Jahr direkt die kumulativen Prozentsätze der verstorbenen Patienten aufgetragen.

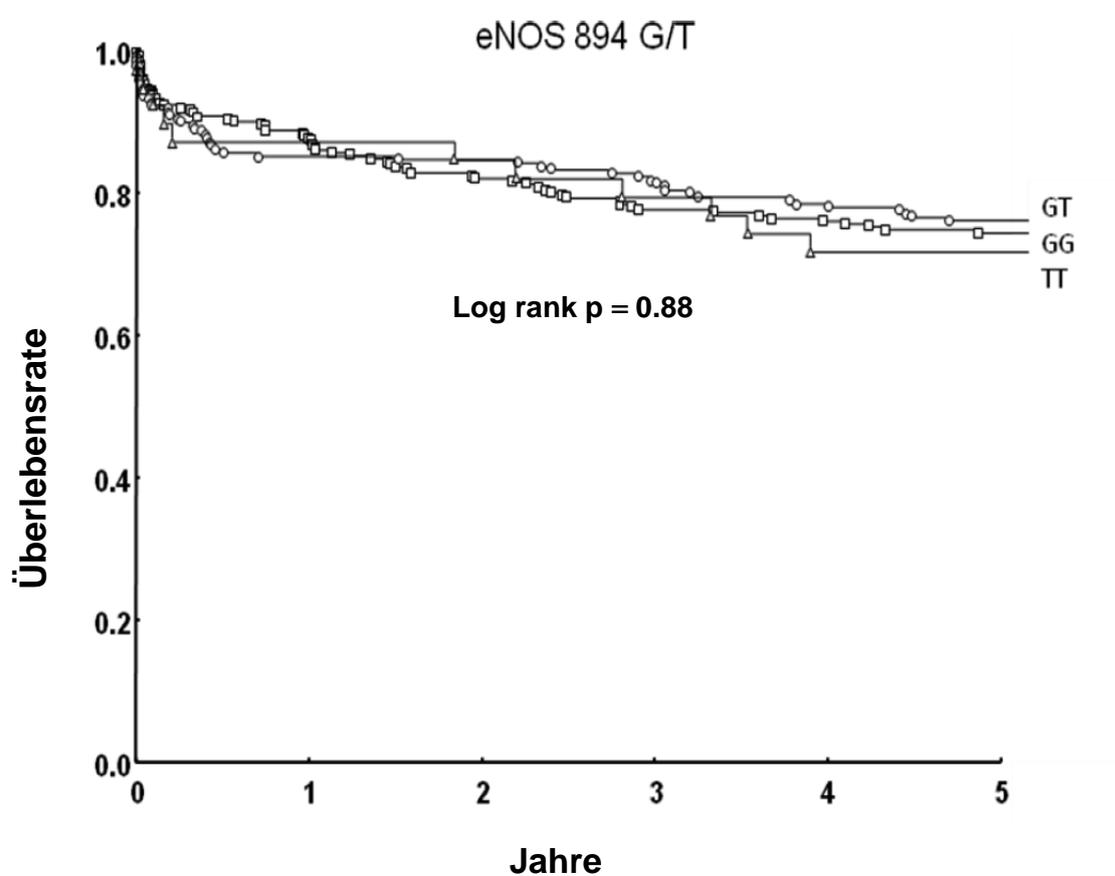


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve

## 4 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die klinische Relevanz des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die 5-Jahres-Mortalität und -Morbidity von kardiochirurgischen Patienten zu ermitteln. Dabei schließt diese Arbeit an eine vorangegangene Dissertation an, die den direkten postoperativen Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus bei Patienten nach Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass untersuchte (Janssen 2009). Initial wurden 500 Patienten in die Studie eingeschlossen. Unter Berücksichtigung der postoperativen Mortalitätsrate von 8,2% (n=41) in der initialen Studie, konnte von 459 Patienten ein *Follow-up-Status* bezüglich Morbidity und Mortalität erhoben werden. Dabei wurden die Probanden entsprechend ihres Genotyps in drei Gruppen aufgeteilt (GG, GT und TT). Das Hauptaugenmerk richtete sich in dieser Studie vor allem auf die Gruppe der homozygoten TT-Allelträger, da hauptsächlich das T-Allel als Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen wird (Hingorani et al. 1999) und somit eine höhere 5-Jahres-Mortalitätsrate innerhalb dieser Gruppe erwartet wurde.

Bei einem *Follow-up-Ergebnis* von 100%, bezogen auf die Langzeitmortalität, konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass sich keine Unterschiede hinsichtlich der Sterblichkeit, bezogen auf die einzelnen Genotypen, erkennen lassen. Bei homozygoten TT-Allelträgern wurde folglich keine erhöhte 5-Jahres-Mortalität nach herzchirurgischen Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass festgestellt. In Hinblick auf die Langzeitmorbidity konnten keine Aussagen getroffen werden, da der Datenrücklauf auf diesem Gebiet unzureichend war.

Da Herz-Kreislauf-Erkrankungen heutzutage zu den häufigsten Todesursachen zählen, scheint es von enormer Bedeutung zu sein, genetische Risikofaktoren zu detektieren, die an der Genese dieser Erkrankungen beteiligt sind. Laut Pressemitteilung des Statistischen Bundesamtes lag die Zahl der Todesfälle aufgrund von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, gemessen an der Gesamtmortalität der deutschen Bevölkerung im Jahre 2011 bei 40,2% (Statistisches Bundesamt 2011). Diese Zahl macht deutlich, wie notwendig eine intensive Forschung auf

diesem Gebiet ist, da kardiovaskuläre Erkrankungen nicht nur von exogenen Faktoren abhängig sind, sondern auch aus dem Zusammenwirken der einzelnen genetischen Prädispositionsfaktoren eines Individuums entstehen.

Durch Veränderungen der NO-Bioverfügbarkeit kann die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen gesteigert werden, da NO eine entscheidende Rolle in der Regulation des Herz-Kreislauf-Systems einnimmt. NO vermittelt nicht nur die endothelabhängige Vasodilatation, sondern dämpft auch die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen, hemmt die Plättchenaggregation und ist somit an der Regulation des vaskulären Tonus sowie des Blutdruckes beteiligt (Moncada und Higgs 2006).

Der von uns untersuchte eNOS-G-894-T-Polymorphismus ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und kann Veränderungen der NO-Biosynthese bedingen, weil eNOS die Oxidation von L-Arginin zu NO und Citrullin umsetzt. Bei diesem Polymorphismus kommt es aufgrund einer Basensubstitution von G zu T an Position 894 im Exon 7 zu einer Änderung der AS-Sequenz, was insbesondere bei homozygoten TT-Allelträgern eine verminderte NO-Produktion bedingt (Teasuro et al. 2000). Daneben konnten weitere Polymorphismen des eNOS-Gens identifiziert werden, die eine tragende Rolle in der Regulation des kardiovaskulären Systems spielen und folglich Morbidität als auch Mortalität beeinflussen können. Genannt seien beispielsweise der eNOS-T-786-C-Polymorphismus (Rossi et al. 2003), der eNOS-27-bp-Polymorphismus (Dosenko et al. 2006) und der eNOS-G-10-T-Polymorphismus (Gluba et al. 2009). Im Hinblick auf die pathophysiologische Bedeutung von NO ist die Rolle von eNOS in der Entwicklung verschiedener Erkrankungen als möglicher Risikofaktor schon mehrfach untersucht worden.

Angesichts der verringerten NO-Synthese, die bei homozygoten TT-Allelträgern des eNOS-G-894-T-Polymorphismus vorliegt, kann die Entwicklung von endothelialer Dysfunktion und das Auftreten von arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen begünstigt werden (Hingorani et al. 1999). Ein relativer Mangel an NO könnte folglich die Entstehung einer KHK begünstigen. Ob und inwieweit der eNOS-G-894-T-Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für die Prädisposition einer KHK einhergeht, wurde schon mehrfach, teilweise mit kontroversen Ergebnissen, untersucht.

Colombo et al. publizierten im Jahre 2003, dass genetische Polymorphismen des eNOS-Gens die individuelle Anfälligkeit für KHK beeinflussen können. In dieser Studie zeigten homozygote TT-Allelträger des Genpolymorphismus angiographisch vermehrt stenosierte Herzkranzgefäße, was folglich mit einem erhöhten Risiko für KHK assoziiert ist (Colombo et al. 2003). Diese Daten wurden jedoch von anderen Studien widerlegt, die keinen Zusammenhang zwischen der Polymorphismus-Genvariante und einer erhöhten Inzidenz für KHK feststellten (Wang CL et al. 2001, Mathew et al. 2008). Auch in einer Studie, die 184 Probanden einschloss, zeigten homozygote TT-Allelträger des eNOS-G-894-T-Polymorphismus keine erhöhte Assoziation für das Auftreten oder den Schweregrad einer KHK (Jaramillo et al. 2006). Um diese gegensätzlichen Aussagen zu objektivieren, wurde eine große Meta-Analyse, bestehend aus 56 Einzelstudien, durchgeführt. Hierdurch war es möglich, die verschiedenen Einzelergebnisse zusammenzufassen und somit die Effektgröße zu bestimmen. Im Rahmen dieser Meta-Analyse zeigte sich eine erhöhte Assoziation zwischen dem T-Allel und der KHK, was letztlich die Aussage unterstützt, dass homozygote TT-Allelträger des eNOS-G-894-T-Polymorphismus als eine Risikogruppe für das Auftreten einer KHK anzusehen sind (Li et al. 2010). Diese Ergebnisse wurden auch von weiteren neueren Studien untermauert (Tian et al. 2013, Zhang et al. 2012).

Die klinische Relevanz des eNOS-Polymorphismus spiegelt sich ebenfalls bei herzchirurgischen Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass wider. Hier können Veränderungen der eNOS-Enzymaktivität zu einem suboptimalen Outcome vieler Patienten führen (Cattaruzza et al. 2004). Eine verminderte eNOS-Aktivität kann hierbei, wie bereits in Kapitel 1.3.1 erwähnt, das Auftreten von systemischer Hypotension, Herzversagen und erhöhter vaskulärer Permeabilität begünstigen. Durch den Kontakt des Blutes mit der Fremdoberfläche der HLM werden proinflammatorische Substanzen freigesetzt, die ihrerseits die Endothelintegrität stören und damit zu Veränderungen der vasomotorischen Regulation führen können (Baehner et al. 2012). Als Antwort auf Verletzung verliert das Endothel seine antiaggregatorischen und vasodilatatorischen Eigenschaften, sodass die Durchgängigkeit der koronaren Bypassgefäße beeinträchtigt werden kann. Dies könnte die Genesung der Patienten negativ beeinflussen, das Arterioskleroserisiko erhöhen und den

Langzeiterfolg des koronararteriellen Bypass beeinträchtigen (Sellke et al. 1996).

Um das Komplikationsrisiko während kardiochirurgischer Eingriffe besser abschätzen zu können und auch den peri- sowie postoperativen Verlauf genauer zu kontrollieren, wurden die Forschungen auf dem Gebiet der Herzchirurgie in den letzten Jahren intensiviert. So gelang es bereits mehrere genetische Polymorphismen zu detektieren, die eine Auswirkung auf die Morbidität und Mortalität herzchirurgischer Patienten zeigen (Ozolina et al. 2012, Tatarūnas et al. 2012).

In Hinblick auf die Entwicklung von akutem Lungenversagen (Wang JF et al. 2010), akutem Nierenversagen (Isbir et al. 2007), postoperativen Infektionen (Nakazawa et al. 2012) sowie postoperativen Myokardinfarkten (Podgoreanu et al. 2006) und erhöhten postoperativen Mortalitätsraten (Nakada et al. 2011) konnten die klinischen Einflüsse von Genpolymorphismen schon untersucht und bestätigt werden. Somit können einige Genpolymorphismen als potentielle prädiktive Faktoren für das Auftreten von postoperativen Risiken nach chirurgischen Eingriffen angesehen werden.

Auch die Genvarianten der eNOS schienen für Genassoziationsstudien in der Herzchirurgie vielversprechend zu sein, da eNOS intensiv mit dem Endothel interagiert und das Herz-Kreislauf-System reguliert. In einer Studie von Popov et al. wurde erstmals die klinische Relevanz des eNOS-Polymorphismus in Bezug auf die postoperative Mortalität kardiochirurgischer Patienten untersucht. Es wurde angenommen, dass genetische Variationen der eNOS, aufgrund ihrer erhöhten Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen zu höheren Mortalitätsraten führen könnten. Allerdings wurde in dieser Studie speziell der eNOS-T-786-C-Polymorphismus und nicht der eNOS-G-894-T-Polymorphismus betrachtet. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant erhöhte postoperative Mortalitätsrate innerhalb der Gruppe der homozygote CC-Allelträger des eNOS-T-786-C-Polymorphismus. Demnach könnten diese Allelträger als eine Hochrisikogruppe innerhalb einer heterogenen Population von Individuen angesehen werden. Dies würde nicht nur der genetischen Risikoabschätzung dienen, sondern auch die Prognosen und Komplikationen einzelner Patienten maßgeblich bestimmen (Popov et al. 2010 a).

Demnach schien es ebenfalls sinnvoll, den eNOS-G-894-T-Polymorphismus in Bezug auf kardiochirurgische Interventionen näher zu betrachten, da auch hier Veränderungen der Mortalitätsraten, insbesondere bei homozygoten T-Allelträgern, erwartet wurden. Es konnte bereits festgestellt werden, dass TT-Allelträger dieser Genvariante vermehrt auf vasokonstriktive Stimulation während herzchirurgischer Eingriffe ansprechen. Das veränderte vaskuläre Antwortverhalten basiert möglicherweise auf der verminderten NO-Synthese dieser Patienten (Philip et al. 1999).

Daher wurde erwartet, dass sich der eNOS-G-894-T-Polymorphismus ebenfalls auf die peri- und postoperative Hämodynamik herzchirurgischer Eingriffe mit kardiopulmonalem Bypass auswirkt. Dieser Fragestellung widmeten sich Liakopoulos et al. im Jahre 2006. Allerdings widerlegten die Ergebnisse dieser Studie die angenommene Hypothese. Konträr wurde kein Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die perioperative Hämodynamik kardiochirurgischer Patienten nachgewiesen. Auch in Hinblick auf die pharmakologisch inotrope und vasopressorische Unterstützung während der Eingriffe ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen (GG, GT, TT) detektieren (Liakopoulos et al. 2006). Da die Studienpopulation mit n=105 allerdings relativ gering war und nur elektive Patienten für ACVB-Operationen ausgewählt wurden, sollte man diese Ergebnisse kritisch hinterfragen.

In Folge untersuchte Gesine Janssen in ihrer Dissertationsarbeit den Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf das Auftreten und den Schweregrad eines Lungenversagens sowie auf die postoperative Mortalitätsrate kardiochirurgischer Patienten. Es wurden 500 Patienten in diese Studie eingeschlossen, wobei die kardiochirurgischen Interventionen sowohl elektive, dringliche als auch Notfalloperationen umfassten. Nach elektiven Eingriffen wurde eine signifikant erhöhte Mortalität (30%) innerhalb der Gruppe der homozygoten TT-Allelträger beobachtet. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte somit bestätigt werden, dass der eNOS-G-894-T-Polymorphismus die Mortalitätsrate nach kardiochirurgischen Interventionen zu beeinflussen vermag und das vor allem das T-Allel als Risikofaktor in Bezug auf eine erhöhte postoperative Mortalität anzusehen ist (Janssen 2009).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde im Rahmen der vorliegenden Studie der Einfluss der eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die 5-Jahres-Mortalität und -Morbidity kardiochirurgischer Patienten untersucht. Derzeit sind kaum Genassoziationsstudien im Bereich der koronaren Revaskularisationstherapie publiziert, die Langzeitüberlebensraten von kardiochirurgischen Patienten näher untersuchen. Dies mag einerseits daran liegen, dass die Patientenrekrutierung in kardiochirurgischen Fächern relativ gering ist, andererseits sind Langzeitüberlebensstudien von der Durchführung eher schwer zu organisieren und oftmals gelingt es nicht, die benötigte Fallzahl, die für ein aussagekräftiges *Follow-up-Ergebnis* nötig wäre, zu erreichen.

Da der eNOS-G-894-T-Polymorphismus, wie bereits erwähnt die postoperative Mortalitätsrate kardiochirurgischer Patienten signifikant beeinflusst (Janssen 2009), nahmen wir an, dass sich auch Unterschiede in der 5-Jahres-Mortalitätsrate zwischen den einzelnen Genotypen aufdecken lassen. Die intensive Nachverfolgung der 459 kardiochirurgischen Patienten erfolgte mittels Sendung eines speziell ausgearbeiteten Fragebogens an die Hausärzte, direkten telefonischen Kontakt zu den Patienten und Anschreiben der zuständigen Einwohnermeldeämter.

So gelang es bezüglich der Langzeitmortalität/ 5-Jahres-Mortalität ein *Follow-up-Ergebnis* von 100% zu erreichen. Allerdings zeigten sich, entgegen der zuvor angenommenen Hypothese, keine Unterschiede in der 5-Jahres-Mortalitätsrate der einzelnen Genotypen. Obwohl vor allem das T-Allel des eNOS-G-894-T-Polymorphismus, bedingt durch eine verminderte NO-Synthese, als Risikofaktor für verschiedene Erkrankungen wie Hypertonie (Miyamoto et al. 1998) und Diabetes mellitus (Angeline et al. 2011) angesehen wird, scheint es basierend auf den Ergebnissen dieser Studie, nicht als ein prädiktiver Faktor für eine erhöhte Langzeitmortalität nach kardiochirurgischen Interventionen zu gelten. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass die Anzahl der homozygoten TT-Allelträger in unserem Studienkollektiv sehr gering war (n=39). In Bezug auf die Langzeitmorbidity war der Datenrücklauf unzureichend, sodass es nicht gelang statistisch signifikante Aussagen zu treffen und einen Genotyp des Polymorphismus in Zusammenhang mit auftretenden Erkrankungen zu bringen.

Damit bestätigen unsere Ergebnisse die Aussagen von Liakopoulos et al., da auch in dieser Studie kein Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die perioperative Hämodynamik und das postoperative Outcome nach herzchirurgischen Eingriffen festgestellt wurde. Allerdings war die Studienpopulation in unserem Kollektiv größer als bei Liakopoulos et al. (n=105), sodass eine höhere statische Power erzielt werden konnte.

## 4.1 5-Jahres-Mortalität

Die Untersuchung der 5-Jahres-Mortalität war einer der Hauptschwerpunkte dieser Studie. Dabei ergaben die errechneten Werte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Trotz eines Datenrücklaufes von 100% ließ sich kein Genotyp des eNOS-Polymorphismus als möglicher Risikofaktor für eine erhöhte Langzeitmortalität identifizieren. Der eNOS-G-894-T-Polymorphismus hat somit keinen Einfluss auf die 5-Jahres-Mortalitätsrate kardiochirurgischer Patienten nach Eingriffen mit CPB.

Insgesamt verstarben innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes nicht mehr Patienten als erwartet. Die 5-Jahres-Mortalität/ Gesamt mortalität, bestehend aus der peri/postoperativen Mortalität von 8,2% (n=41) und aus der Out-of-Hospital-Mortalität von 16,8% (n=84), betrug in dieser Studie 25% (n=125).

Auch andere Langzeitstudien, die ebenfalls kardiochirurgische Patienten nach Eingriffen mit CPB nachverfolgten, zeigten ähnliche Ergebnisse. In einer kürzlich publizierten Studie, die 80 kardiochirurgische Patienten einschloss, betrug die 5-Jahres-Mortalitätsrate beispielsweise  $26\pm 5\%$  (Levy et al. 2012). Eine weitere Studie beobachtete 8597 Patienten nach Operationen mit ACVB hinsichtlich der 1-, 3-, 5- und 7-Jahres-Mortalität. Die 7-Jahresmortalitätsrate wurde mit hier mit 24,2% angegeben (Wu et al. 2012).

Dabei ist berücksichtigen, dass unsere Studie, im Gegensatz zu Levy et al. und Wu et al. nicht nur elektive Operationen, sondern verschiedenste kardiochirurgische Interventionen umfasste. Dazu zählten etwa Mitralklappenersatz/ rekonstruktion, Aorteneingriffe, komplexe kombinierte Verfahren und sowohl dringliche als auch Notfalloperationen. Darüber hinaus wurden Patienten, die bereits zum Zeitpunkt der Operation reanimationspflichtig waren nicht aus der Studie ausgeschlossen.

Die Ergebnisse unserer Studie sind demnach mit anderen internationalen Studien vergleichbar und decken sich mit den allgemeinen Sterblichkeitsraten von Patienten nach Eingriffen mit CPB.

## 4.2 5-Jahres-Morbidität

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die 5-Jahres-Morbidität von kardiochirurgischen Patienten zu ermitteln. Bereits vorangegangene Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem eNOS-G-894-T-Polymorphismus und auftretenden kardiovaskulären Erkrankungen. Die verminderte NO-Synthese, die mit dieser Genvariante vergesellschaftet ist, kann direkte Auswirkungen an verschiedenen Organsystemen bedingen. Mit Hilfe des von uns erstellten Fragebogens wurde versucht diese Morbiditäten aufzudecken und sie in einen Zusammenhang mit einem Genotyp des eNOS-G-894-T-Polymorphismus zu bringen. Dazu wurden folgende Organsysteme näher betrachtet: ZNS, Lunge, Niere und Herz.

Im ZNS vermittelt NO, als potentes Antioxidans, nicht nur neuroprotektive Effekte, sondern ist auch an der Regulierung des cerebralen Blutflusses und an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt (Chiueh 1999). Demnach wird verständlich, dass verminderte NO-Spiegel zu pathologischen Veränderungen im ZNS führen können. In einer kürzlich publizierten Studie konnte der TT-Genotyp des eNOS-G-894-T-Polymorphismus als Risikofaktor für einen ischämischen Schlaganfall identifiziert werden (Xiong et al. 2012).

Auch in Hinblick auf das Organsystem „Niere“ wurden auftretende Langzeitmorbiditäten in unserem Studienkollektiv erwartet. In einer vorangegangenen Publikation des „*Perioperative Genetics and Safety Outcomes Study (PEGASUS) Investigative Team*“ konnte gezeigt werden, dass genetische Polymorphismen das Risiko der Entwicklung einer Niereninsuffizienz nach kardiochirurgischen Eingriffen erhöhen können (Stafford-Smith et al. 2005). Anschließend identifizierten Popov et al. den eNOS-Polymorphismus als eventuellen Prädispositionsfaktor für das Entstehen eines postoperativen Nierenversagens nach kardiochirurgischen Eingriffen mit CPB (Popov et al. 2009).

Zudem zeigt der eNOS-G-894-T-Polymorphismus ebenfalls in Bezug auf das Herz-Kreislauf-System verschiedene Auswirkungen. Durch die verminderte NO-Synthese kann beispielsweise das Auftreten von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen beschleunigt werden. Dabei kann vor allem das T-Allel

mit einer erhöhten Prävalenz für Arteriosklerose, Hypercholesterinämie (Jeerooburkhan et al. 2001), Diabetes mellitus (Angeline et al. 2011) und essentieller Hypertonie (Srivastave et al. 2008) in Verbindung gebracht werden.

Nach Auswertung der zurückgesendeten Fragebögen konnte allerdings kein ausreichender Datensatz an Informationen gewonnen werden, da nur 329 der 459 versandten Fragebögen beantwortet wurden und diese oftmals nicht vollständig ausgefüllt waren. Der Rücklauf an verwertbaren Daten bezüglich der Langzeitmorbidity war somit unzureichend und folglich gelang es nicht aussagekräftige Ergebnisse bezüglich der 5-Jahres-Morbidity zu treffen. Es ließ sich demnach kein Genotyp identifizieren bei dem signifikant gehäufte Morbidity in den zuvor diskutierten Organsystemen ZNS, Lungen, Niere und Herz auftraten.

Um bestimmte Allelträger des eNOS-G-894-T-Polymorphismus möglicherweise als eine Risikogruppe für das Auftreten bestimmter Morbidity zu identifizieren, wäre eine Nachuntersuchung mit direktem Patientenkontakt an der UMG von Vorteil gewesen. Auch ein Hausbesuch bei den Patienten wäre ebenfalls denkbar gewesen, da diese Studie allerdings nicht industriell gefördert wurde, war dies nicht möglich.

### 4.3 Genotypen- und Allelfrequenzverteilung

Diese Studie schließt, wie bereits ausführlich in Kapitel 2.2. erläutert, zum Teil an eine vorangegangene Dissertation mit dem Titel „*Der Einfluss des eNOS-Polymorphismus 894G/T auf das Auftreten und den Schweregrad eines Lungenversagens*“ (Janssen 2009) an. Allerdings zeigte sich bei gleicher Anzahl der untersuchten Patienten (n=500) eine unterschiedliche Genotypen- und Allelfrequenzverteilung des eNOS-G-894-T-Polymorphismus zwischen dem Patientenkollektiv von Frau Janssen und dem der hier vorgelegten Arbeit. Dies kann durch zwei Punkte plausibel erklärt werden:

- Die Patientenkollektive wichen voneinander ab.

Initial wurden insgesamt 525 Patienten zur Untersuchung der Bedeutung verschiedener Polymorphismen für das Auftreten und den Schweregrad eines Lungenversagens von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hinz/ PD Dr. Popov in die Studie eingeschlossen und deren Daten im Datenbanksystem gespeichert, wie bereits in Kapitel 2.1 erwähnt. Als Risikopatienten für die Entwicklung eines Lungenversagens galten Patienten mit Herzoperationen unter Anschluss eine HLM (n=500) und Patienten mit Langzeitbeatmung (n=25). Um Aussagen zum Einfluss der Polymorphismen auf die Morbidität und die Mortalität treffen zu können, wurde gemäß einer durchgeführten Poweranalyse eine Fallzahl von 500 Patienten empfohlen. Frau Janssen untersuchte in Ihrer Dissertationsarbeit den Einfluss eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf das Auftreten und den Schweregrad eines Lungenversagens und schloss 25 Patienten mit Langzeitbeatmung sowie 475 Patienten mit Operationen unter Hilfe einer HLM in das Patientenkollektiv ein. Dahingegen befasste sich diese Studie mit dem Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die 5-Jahres-Mortalität und -Morbidität kardiochirurgischer Patienten. Das Patientenkollektiv dieser hier vorgelegten Studie umfasste 500 Patienten mit Operationen unter Hilfe einer HLM (davon 475 Patienten identisch zu Frau Janssen).

Demnach wurde jeweils auf unterschiedliche Patienten der obengenannten Datenbank zurückgegriffen. Das führte zu Unterschieden in der Genomverteilung.

- Die Diskrepanz der Genomverteilung erklärt sich zusätzlich durch unterschiedliche Genotypisierungsverfahren.

Die initiale Genotypisierung mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese erfolgte Rahmen der initialen Studie (Janssen 2009) durch die beteiligten Doktoranden, unter Hilfe und Anleitung einer technischen Assistentin (TA) aus der THG. Da dieses Genotypisierungsverfahren allerdings 2009 nicht mehr als „State of the Art“ angesehen wurde, erfolgte am 10.11.2009 eine Neotypisierung mittels TaqMan-SNP-Genotypisierung durch das Institut für klinische Pharmakologie (PD Dr.med. Tzvetkov), wie bereits in Kapitel 2.5 beschrieben. Daraus ergab sich insgesamt eine Änderung in der Genomverteilung des eNOS-G-894-T-Polymorphismus von 5% im Gegensatz zu den initialen Ergebnissen. Es erfolgten unsererseits diverse Plausibilitätskontrollen, die harte Hinweise für die Korrektheit der Ergebnisse lieferten. Zum einen zeigten die Ergebnisse der TaqMan-SNP-Genotypisierung eine Übereinstimmung mit der Minor-Allel-Frequenz der db-SAP-Datenbank und zum anderen eine Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium ( $p=0,86$ ). Zusätzlich erfolgte bei 9,4% der Proben eine doppelte Genotypisierung. Diese Gegenprobe zeigte eine komplette Übereinstimmung der Ergebnisse. Somit kann die Plausibilität und Korrektheit der ermittelten Genotypen- und Allelfrequenzverteilung durch das Taqman-SNP-Genotypisierungsverfahren bestätigt werden.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Unterschiede in der Genotypen- und Allelfrequenzverteilung zwischen dem Patientenkollektiv von Frau Janssen und dem der hier untersuchten Studie aufgezeigt. Aufgrund unterschiedlicher Patientenkollektive und unterschiedlicher Genotypisierungsverfahren ergab sich ein Änderung in der Anzahl der homozygoten TT-Allelträger, zusätzlich zeigten Änderungen in Hinblick auf den GG- und den GT-Genotyp des eNOS-G-894-T-Polymorphismus.

**Tabelle 7:** Patientenkollektiv und Genotypenverteilung Janssen/ Lipke

Frau Janssen	Frau Lipke
<p><u>Patientenkollektiv (n=500)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 Patienten mit Langzeitbeatmung</li> <li>• 475 Patienten mit HLM</li> </ul> <p><u>Genotypen- und Allelfrequenzverteilung</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-Genotypisierung</li> <li>• GG=260</li> <li>• GT=226</li> <li>• TT=14</li> <li>• G-Allel= 746</li> <li>• T-Allel= 254</li> </ul>	<p><u>Patientenkollektiv (n=500)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 Patienten mit HLM ( 475 identisch zu Fr. Janssen)</li> </ul> <p><u>Genotypen- und Allelfrequenzverteilung</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• TaqMan-SNP-Genotypisierung</li> <li>• GG=251</li> <li>• GT=210</li> <li>• TT=39</li> <li>• G-Allel= 712</li> <li>• T-Allel= 288</li> </ul>

HLM: Herz-Lungen-Maschine; PCR: Polymerasekettenreaktion.

#### 4.4 Einschränkungen der Studie

Die durchgeführte Studie unterlag insgesamt einigen Einschränkungen. Das Studienkollektiv war mit 500 Patienten relativ limitiert gewählt. Zwar ergab die zuvor durchgeführte Poweranalyse des Instituts für Medizinische Statistik der UMG, dass eine Anzahl von 500 Patienten genügen würde, um Unterschiede hinsichtlich 5-Jahres-Mortalität und -Morbidität zwischen den einzelnen Genotypen aufzudecken, dennoch zeigten unsere Daten diesbezüglich keine signifikanten Ergebnisse.

Die Genotypenverteilung des eNOS-G-894-T-Polymorphismus entsprach bei unserem Studienkollektiv dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Equilibrium werden relative Häufigkeiten dominanter oder rezessiver Gene in der Population berechnet. Diese bleiben unter der Voraussetzung der Panmixie und Abwesenheit von Mutationen oder Selektionen stets konstant. Da unser Patientenkollektiv allerdings vorwiegend aus älteren Menschen bestand, die kardiale Vorerkrankungen auswiesen und daher kardiochirurgische Interventionen benötigten, kann demzufolge von einer

gewissen Vorselektion gesprochen werden. Zudem setzte sich das Studienkollektiv zum Großteil aus Kaukasiern zusammen, die meist aus dem Raum Süd und -Mittelniedersachsen stammten. Dies spiegelt jedoch nur eine geringe Anzahl aller Patienten, die sich Herzoperationen mit CPB unterziehen, wider.

Ebenso war die Anzahl der homozygoten TT-Allelträger mit  $n=39$  verhältnismäßig gering. Da jedoch gerade das T-Allel mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist, wurde genau in der Gruppe der homozygoten TT-Allelträger eine erhöhte Langzeitmortalität erwartet. Daher wäre es empfehlenswert, die Studie noch einmal mit einer größeren Anzahl an homozygoten TT-Allelträgern durchzuführen, um somit repräsentativere Ergebnisse zu erhalten und diese dann gegebenenfalls mit unseren Daten zu vergleichen. Daraus könnten sich eventuelle Unterschiede oder Gemeinsamkeiten ableiten lassen.

Eine zusätzliche Einschränkung dieser Studie war die Datengewinnung mittels der speziell ausgearbeiteten Fragebögen. Durch diese Methode konnten nicht ausreichend Informationen bezüglich der Langzeitmorbidity und der Todesursache gewonnen werden. Da die Studie darüber hinaus nicht durch wirtschaftliche Mittel gefördert wurde, fehlte wohl oftmals auch der finanzielle Anreiz für die niedergelassenen Kollegen zur vollständigen Beantwortung der Fragebögen. Beispielsweise gab es kaum einen Rücklauf an Daten hinsichtlich der von uns erfragten Blutwerte oder von speziellen Werten der Echokardiographie. Insgesamt wurden die Fragebögen meist nicht vollständig genug beantwortet, sodass es nicht gelang, bestimmte Morbiditäten in Zusammenhang mit einem Genotyp des eNOS-G-894-T-Polymorphismus zu bringen.

## 5 Zusammenfassung

Im menschlichen Organismus ist das Stickstoffmonoxid-System entscheidend an der Regulation des kardiovaskulären Gleichgewichts beteiligt. Die endotheliale NO-Synthase katalysiert dabei als Schlüsselenzym die Umsetzung des vasoprotektiven Signalmoleküls NO aus L-Arginin. NO wirkt seinerseits als Vermittler der endothelabhängigen Vasorelaxation, reguliert die Mikrozirkulation verschiedener Organe und wirkt der Thrombenbildung entgegen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass Veränderungen der NO-Konzentration an der Pathogenese verschiedener Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Arteriosklerose, Hypertonie, KHK oder Diabetes mellitus beteiligt sind.

Auch genetische Variationen des eNOS-Gens, sogenannte Polymorphismen, können die NO-Biosynthese beeinflussen. Der in dieser Arbeit untersuchte eNOS-G-894-T-Polymorphismus ist mit einer geringeren eNOS-Enzymaktivität und folglich verminderten basalen NO-Konzentrationen vergesellschaftet. Bereits in vorangegangenen Studien konnten Polymorphismen des eNOS-Gens als Prädispositionsfaktoren in Hinblick auf auftretende perioperative Komplikationen bei kardiochirurgischen Eingriffen identifiziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des eNOS-G-894-T-Polymorphismus auf die 5-Jahres-Mortalität und -Morbidität kardiochirurgischer Patienten untersuchen. In das Studienkollektiv wurden 500 Patienten einbezogen, die unter Anschluss an eine HLM an der UMG operiert wurden. Der eNOS-G-894-T-Polymorphismus wurde laboranalytisch mittels TaqMan-SNP-Genotypisierung bestimmt und die Patienten folglich anhand ihres Genotyps in drei Gruppen aufgeteilt (GG-, GT- und TT-Allelträger). Um Daten bezüglich der 5-Jahres-Mortalität und -Morbidität zu erhalten, wurde ein Fragebogen an die Hausärzte der Patienten gesendet. Falls dadurch kein Informationsrücklauf gelang, nahmen wir telefonisch Kontakt zu den Patienten auf oder wendeten uns an die zuständigen Einwohnermeldeämter. Dadurch gelang es ein *Follow-up-Status* von den Studienteilnehmern zu erheben.

In Hinblick auf die 5-Jahres-Morbidität war es nicht möglich klinisch relevante Aussagen zu treffen, da der Informationsrücklauf auf diesem Gebiet unzureichend war.

Demgegenüber konnten klare Aussagen bezüglich des härtesten klinischen Parameters, der 5-Jahres-Mortalität getroffen werden. Das Follow-up-Ergebnis hinsichtlich der Mortalität betrug 100%. Bei einer Gesamtmortalitätsrate von 25% (n=125) ließen sich allerdings keine Unterschiede, bezogen auf die Sterblichkeit zwischen den drei Gruppen feststellen. Folglich konnte kein Genotyp des eNOS-G-894-T-Polymorphismus identifiziert werden, der die 5-Jahres-Mortalitätsrate kardiochirurgischer Patienten nach Eingriffen mit CPB signifikant beeinflusst.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der eNOS-G-894-T-Polymorphismus nicht zur Abschätzung individueller Überlebensraten nach kardiochirurgischen Eingriffen geeignet ist und letztlich keinen Screeningparameter hinsichtlich der Langzeitmortalität darstellt.

Da die Pathogenese und die Folgen von kardiovaskulären Erkrankungen allerdings ein bevölkerungspolitisches Problem darstellen, sollte dieses komplexe und wichtige Thema der Genassoziationsstudien im Bereich der Herzchirurgie weiter intensiviert werden, um mögliche Präventionsmaßnahmen sowie neue Therapieansätze für kardiochirurgische Patienten entwickeln zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

Alharbi KK, Khan IA, Abed AS, Syed R (2013): Insertion/ Deletion polymorphisms do play any role in G6PD deficiency individuals in the Kingdom of the Saudi Arabia. *Bioinformation* 9, 49-53

Angeline T, Krithiga HR, Isabel W, Asirvatham AJ, Poornima A (2012): Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and diabetes mellitus (type II) among South Indians. *Oxid Med Cell Longev* 2011, 462607

Arnal JF (1997): Nitric oxide and circulatory homeostasis. *Ann Cardiol Angeiol Paris*. 46, 420-5

Atochin DN, Huang PL (2010): Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. *Pflugers Arch* 460, 965-74

Baehner T, Boehm O, Probst C, Poetzsch B, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P. (2012): Cardiopulmonary bypass in cardiac surgery. *Anaesthesist* 61, 846-56

Balligand JP, Cannon PJ (1997): Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1846- 58

Bauer V, Sotníková R (2010): Nitric oxide--the endothelium- derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *Gen Physiol Biophys* 29, 269-81

Beckman JS, Koppenol WH (1996): Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, 1424-37

Bian K, Murad F (2003): Nitric oxide (NO)--biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. *Front Biosci* 8, 264- 78

Bian K, Doursout MF, Murad F (2008): Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens* 10, 304-10

Buselmaier W, Tariverdian G :Humangenetik, 4. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg 2006, 18-21

Cattaruzza M, Guzik TJ, Słodowski 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, 841-7

Channon KM, Guzik TJ (2002): Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol* 53, 515-24

Chen Z, Bakhshi FR, Shajahan AN, Sharma T, Mao M, Trane A, Bernatchez P, van Nieuw Amerongen GP, Bonini MG, Skidgel RA, Malik AB, Minshall RD (2012): Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. *Mol Biol Cell* 23, 1388-98

Chiueh CC (1999): Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* 890, 301-11

Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Biagini A, Clerico A (2003): Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 49, 389-95

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999): Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-5

Dinerman JL, Lowenstein CJ, Snyder SH (1993): Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res* 73, 217-22

Dosenko VE, Zagoriy VY, Haytovich NV, Gordok OA, Moibenko AA (2006): Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. *Acta Biochim Pol* 53, 299-302

Dzau VJ (1986): Significance of the vascular renin-angiotensin pathway. *Hypertension* 8, 553-9

Fischer UM, Schindler R, Brixius K, Mehlhorn U, Bloch W (2007): Extracorporeal circulation activates endothelial nitric oxide synthase in erythrocytes. *Ann Thorac Surg* 84, 2000-3

Fleming I, Busse R (1995): „Control and consequences of endothelial nitric oxide formation. *Adv Pharmacol* 34, 187-206

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-6

Gertler JP, Abbott WM, Gertler JP, Abbott WM (1992): Prothrombotic and fibrinolytic function of normal and perturbed endothelium. *J Surg Res* 52, 89-95

Gluba A, Banach M, Rysz J, Piotrowski G, Fendler W, Pietrucha T (2009): Is polymorphism within eNOS gene associated with the late onset of myocardial infarction? A pilot study. *Angiology* 60, 588-95

Griffith OW, Stuehr DJ (1995): Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57, 707-36

Griscavage JM, Hobbs AJ, Ignarro LJ. (1995): Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds. *Adv Pharmacol* 34, 215-34

Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T (2003): Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54, 469- 87

Hattori R, Sase K, Eizawa H, Kosuga K, Aoyama T, Inoue R, Sasayama S, Kawai C, Yui Y, Miyahara K, et.al (1994): Structure and function of nitric oxide synthases. *Int J Cardiol* 1, 71-5

Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ (1999): A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100, 1515- 20

Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. (1993): Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 334, 170-4

Hoit BD (2001): Two faces of nitric oxide: lessons learned from the NOS2 knockout. *Circ Res* 89, 289-91

Isbir SC, Tekeli A, Ergen A, Yilmaz H, Ak K, Civelek A, Zeybek U, Arsan S (2007): Genetic polymorphisms contribute to acute kidney injury after coronary artery bypass grafting. *Heart Surg Forum* 10, 439-44

Janssen G: Der Einfluss des eNOS- Polymorphismus 894 G/T auf das Auftreten und den Schweregrad eines Lungenversagens. Med. Diss. Göttingen 2009

Jaramillo PC, Muñoz M A, Lanas M C, Lanas Z F, Salazar LA (2006): Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism in Chilean subjects with coronary artery disease and controls. Clin Chim Acta 1-2, 102-6

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, 1054-61

Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SL, Kulkarni G, D'Abreo C, Wong GK, Miller TL, Chan Y, Atkins J, Wang Y, Marsden PA (1999): Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. J Biol Chem 274, 3076-93

Kelm M (1999): Nitric oxide metabolism and breakdown. Biochim Biophys Acta 1411, 273-89

Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR (2001): The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. Int Immunopharmacol 1, 1421-41

Kishimoto T, Misawa Y, Kaetu A, Nagai M, Osaki Y, Okamoto M, Yoshida S, Kurosawa Y, Fukumoto S. (2004): eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese. Prev Med 39, 927-31

Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H, Förstermann U (1998): Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. Hypertension 31, 582- 8

Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991): Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 4651-5

Lamblin N, Cuilleret FJ, Helbecque N, Dallongeville J, Lablanche JM, Amouyel P, Bauters C, Van Belle E (2005): A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is associated with collateral development in patients with chronic coronary occlusions. BMC Cardiovasc Disord 5, 27

Levy E, Yakubovitch D, Rudis E, Anner H, Landsberg G, Berlatzky Y, Elami A (2012): The role of combined carotid endarterectomy and coronary artery bypass grafting in the era of carotid stenting in view of long-term results. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 15, 984-8

Li J, Wu X, Li X, Feng G, He L, Shi Y (2010): The endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary artery disease: a meta-analysis. *Cardiology* 116, 271-8

Liakopoulos OJ, Dörge 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, 233-8

Lowry JL, Brovkovich V, Zhang Y, Skidgel RA (2013): Endothelial Nitric-oxide Synthase Activation Generates an Inducible Nitric-oxide Synthase-like Output of Nitric Oxide in Inflamed Endothelium. *J Biol Chem* 288, 4174-93

Lüscher TF (1991): Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J* 12, 2-11

Lüscher TF, Tanner FC (1993): Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertens* 6, 283-293

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, 17478-88

Marsh N, Marsh A (2000): A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 28, 313-9

Mathew J, Narayanan P, Sundaram R, Jayaraman B, Dutta TK, Raman SK, Chandrasekaran A (2008): Lack of association between Glu(298) asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene and coronary artery disease in Tamilian population. *Indian Heart J* 60, 223-7

Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997): Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272, 15583-6

Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K (1998): Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32, 3-8

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976): An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263, 663-5

Moncada S, Higgs EA. (2006): Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 176, 213-54

Murad F (2004): Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 24, 452-74

Nakada TA, Russell JA, Boyd JH, McLaughlin L, Nakada E, Thair SA, Hirasawa H, Oda S, Walley KR (2011): Association of angiotensin II type 1 receptor-associated protein gene polymorphism with increased mortality in septic shock. *Crit Care Med* 39, 1641-8

Nakazawa K, Kotani N, Goto K, Nomura M, Ozaki M (2012): Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme considerably changes postoperative outcome. *J Clin Anesth* 24, 631-8

Noiri E, Satoh H, Taguchi J, Brodsky SV, Nakao A, Ogawa Y, Nishijima S, Yokomizo T, Tokunaga K, Fujita T (2002): Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. *Hypertension* 40, 535-40

Ozolina A, Strike E, Jaunalksne I, Serova J, Romanova T, Zake LN, Sabelnikovs O, Vanags I (2012): Influence of PAI-1 gene promoter-675 (4G/5G) polymorphism on fibrinolytic activity after cardiac surgery employing cardiopulmonary bypass. *Medicina (Kaunas)* 48, 515-20

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 10, 304-10

Philip I, Plantefeve G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, Poirier O, Levy BI, Desmots JM, Durand G (1999): G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation* 99, 3096-8

Podgoreanu MV, White WD, Morris RW, Mathew JP, Stafford-Smith M, Welsby IJ, Grocott HP, Milano CA, Newman MF, Schwinn DA; Perioperative Genetics and Safety Outcomes Study (PEGASUS) Investigative Team (2006): Inflammatory gene polymorphisms and risk of postoperative myocardial infarction after cardiac surgery. *Circulation* 114, 275-81

Popov AF, Hinz J, Schulz EG, Schmitto JD, Wiese CH, Quintel M, Seipelt R, Schoendube FA (2009): The eNOS 786C/T polymorphism in cardiac surgical patients with cardiopulmonary bypass is associated with renal dysfunction. *Eur J Cardiothorac Surg* 36(4), 651-6

Popov AF, Henker C, Schmitto JD, Wiese CH, Coskun KO, Moerer O, Danner BC, Schoendube FA, Quintel M, Hinz J (2010 a): Clinical relevance of eNOS T-786C polymorphism for hospital mortality and morbidity in cardiac surgical patients. *J Cardiovasc Surg* 51, 265-72

Popov AF, Schulz EG, Schmitto JD, Coskun KO, Tzvetkov MV, Kazmaier S, Zimmermann J, Schöndube FA, Quintel M, Hinz J (2010 b): Relation between renal dysfunction requiring renal replacement therapy and promoter polymorphism of the erythropoietin gene in cardiac surgery. *Artif Organs* 34, 961-8

Presta A, Liu J, Sessa WC, Stuehr DJ. (1997) Substrate binding and calmodulin binding to endothelial nitric oxide synthase coregulate its enzymatic activity. *Nitric Oxide* 1, 74-87

Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L, Cavallin M, Maiolino P, Pessina AC (2003): The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol* 41, 930-7

Ruvolo G, Greco E, Speziale G, Tritapepe L, Marino B, Mollace V, Nisticò G (1994): Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 57, 10

Ruvolo G, Speziale G, Greco E, Tritapepe L, Mollace V, Nistico G, Marino B (1999): Nitric oxide release during hypothermic versus normothermic cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 9, 651-4

Sellke FW, Boyle EM Jr, Verrier ED (1996): Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the pathophysiology of vasomotor dysfunction. *Ann Thorac Surg* 62, 1222-8

Smith CJ, Santhanam L, Bruning RS, Stanhewicz A, Berkowitz DE, Holowatz LA (2011): Upregulation of inducible nitric oxide synthase contributes to attenuated cutaneous vasodilation in essential hypertensive humans. *Hypertension* 58, 935-42

Spieker LE, Lüscher TF (2005): Protection of endothelial function. *Handb Exp Pharmacol* (170), 619-44

Squadrito GL, Pryor WA (1998): Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 25, 392-403

Srivastava K, Narang R, Sreenivas V, Das S, Das N (2008): Association of eNOS Glu298Asp gene polymorphism with essential hypertension in Asian Indians. *Clin Chim Acta* 387(1-2), 80-3

Stafford-Smith M, Podgoreanu M, Swaminathan M, Phillips-Bute B, Mathew JP, Hauser EH, Winn MP, Milano C, Nielsen DM, Smith M, Morris R, Newman MF, Schwinn DA; Perioperative Genetics and Safety Outcomes Study (PEGASUS) Investigative Team (2005): Association of genetic polymorphisms with risk of renal injury after coronary bypass graft surgery. *Am J Kidney Dis* 45(3), 519-30

Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992): Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258, 1898-902

Statisches Bundesamt (2011): Sterbefälle insgesamt 2011 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10, <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>

Steinert JR, Tschernowa T, Forsythe ID (2010): Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 16, 435-52

Takeishi Y (2010): The nitric oxide synthase family and left ventricular diastolic function. *Circ J* 74, 2556-7

Tatarūnas V, Lesauskaite V, Veikutiene A, Grybauskas P, Jakuska P, Benetis R (2012): The combined effects of clinical factors and CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms on initiating warfarin treatment in patients after cardiac valve surgery. *J Heart Valve Dis* 21, 628-35

Tejero J, Stuehr D (2013): Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthase. *IUBMB Life* 65, 358-65

Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J (2000): Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2832-5

Tian GX, Zeng XT, Wang XB, Zhang L, Zhang W, Wei WL (2013): Association between the endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and coronary heart disease: A meta-analysis of 39 case-control studies. *Mol Med Rep* 7, 1310-8

Tsai YC, Metzger S, Riess O, Soehn AS, Nguyen HP (2012): Genetic analysis of polymorphisms in the kalirin gene for association with age-at-onset in European Huntington disease patients. *BMC Med Genet* 13, 48

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG (1995): Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 269, 1371-8

Vanhoutte PM, Lüscher TF, Gräser T (1991): Endothelium-dependent contractions. *Blood Vessels*. 28, 74-83

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, 3063-70

Wang CL, Hsu LA, Ko YS, Ko YL, Lee YH (2001): Lack of association between the Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease among Taiwanese. *J Formos Med Assoc* 100, 736-40

Wang JF, Bian JJ, Wan XJ, Zhu KM, Sun ZZ, Lu AD (2010): Association between inflammatory genetic polymorphism and acute lung injury after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Med Sci Monit* 16, 260-5

Wu C, Camacho FT, Wechsler AS, Lahey S, Culliford AT, Jordan D, Gold JP, Higgins RS, Smith CR, Hannan EL (2012): Risk score for predicting long-term mortality after coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 125, 2423-30

Xiong L, Hu M, Zhang X, Jing Z, Li T, Li G, Liu J, Yu Y, Meng F, Wang Z (2012): Association between Glu298Asp/677C-T single nucleotide polymorphism in the eNOS/MTHRF gene and blood stasis syndrome of ischemic stroke. *Gene* 511, 475-9

Zhang K, Bai P, Shi S, Zhou B, Wang Y, Song Y, Rao L, Zhang L (2012): The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased coronary heart disease among Asia population: evidence from a Meta analysis. *Thromb Res* 130(2), 192-7

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Anschreiben	S.22
Abbildung 2: Fragebogen Seite 1	S.25
Abbildung 3: Fragebogen Seite 2	S.26
Abbildung 4: Nachbeobachtungszeitraum des Gesamtkollektivs	S.34
Abbildung 5: Nachbeobachtungszeitraum des GG- Genotyp	S.35
Abbildung 6: Nachbeobachtungszeitraum des GT- Genotyp	S.35
Abbildung 7: Nachbeobachtungszeitraum des TT- Genotyp	S.36
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve	S.44

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genotypen- und Allelfrequenzverteilung	S.37
Tabelle 2: Präoperative Daten	S.38
Tabelle 3: Perioperative Daten	S.39
Tabelle 4: Mortalitätsraten im Vergleich	S.41
Tabelle 5: Todesursachen (5-Jahres-Mortalität / Gesamtmortalität)	S.42
Tabelle 6: Überlebensraten sowie Operations- und Todesalter	S.43
Tabelle 7: Patientenkollektiv und Genotypenverteilung Janssen/ Lipke	S.57

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ein besonderes Wort des Dankes an die Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Ermöglichung dieser Dissertation richten.

Ich danke ganz herzlich meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. José Hinz, DEAA, EDIC für die Bereitstellung des Promotionsthemas und der benötigten Räumlichkeiten. Während der gesamten Zeit der Datenerhebung, sowie beim Verfassen der Dissertationsschrift stand er mir tatkräftig zur Seite, war immer ansprechbar für meine Fragen und gab mir mit seinem fundierten Fachwissen und wertvollen Ratschlägen viele Anregungen, die wesentlich zur Vollendung meiner Arbeit beigetragen haben.

Meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn PD. Dr. med. Aron Popov möchte ich vor allem für seine intensive Unterstützung und fachliche Beratung danken. Mit vielen praktischen Hinweisen und anregenden Diskussionen stand er mir während der Entstehung meiner Arbeit stets mit viel Geduld und Verständnis zur Seite.

Bei Frau Doris Fritsch, meiner Oberstufenlehrerin, bedanke ich mich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Insbesondere möchte ich bei meinem Mitdoktoranden Christian Bireta für die produktive Zusammenarbeit und gegenseitige Motivation bedanken. Erst durch die Kooperation als Team war es möglich einen hohen Rücklauf an Daten zu gewinnen und letztlich die Arbeit fertig zu stellen.

Nicht unerwähnt möchte ich meine Eltern lassen, denen ich für ihre vielen hilfreichen Anregungen während des Verfassens dieser Arbeit sehr dankbar bin. Ihre fortwährende Unterstützung und ihr Glauben an mich haben stets zu meiner Motivation beigetragen.