

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zu Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und der
genetischen Variante Lys198Asn im Endothelin-1-Gen bei
Schlafapnoe-Patienten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Kathrin Kretschmer
aus Berlin

1. Prof. Dr. med. I. Roots
2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. I. Cascorbi
3. Prof. Dr. T. Penzel

Datum der Promotion: 27. März 2009

Gewidmet:

- *meinen geliebten Töchtern Antonia Klara & Violetta Sofia,*
- *meinem Ehemann Stefan und*
- *meiner Schwester Susi („der Küken-Montagsmama“).*

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A	
EINLEITUNG	
1. <u>Das Schlafapnoe-Syndrom</u>	1
2. <u>Das Endothelinsystem</u>	4
B	
AUFGABENSTELLUNG	11
C	
MATERIAL UND METHODEN	
1. <u>Rekrutierung der Studienteilnehmer</u>	
1.1. Patientenkollektiv (SA)	12
1.2. Kontrollgruppe (SG)	14
1.3. Ein- und Ausschlusskriterien	15
1.4. Kardiorespiratorische Polysomnographie	15
2. <u>Material</u>	
2.1. Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Endothelin-1	17
2.2. Geräte	18
3. <u>Methoden</u>	
3.1. Aufbereitung und Lagerung der gewonnenen Blutproben	19
3.2. Bestimmung der Endothelin-1-Plasmakonzentrationen mit Hilfe eines spezifischen ELISA-Kits	19
3.3. DNA-Extraktion	22
3.4. Amplifikation und Genotypisierung mittels Real-Time-PCR	23
3.5. DNA-Sequenzierung	28
4. <u>Statistik</u>	28
5. <u>Ethische Grundlagen und Datenschutz</u>	28

D	ERGEBNISSE	29
1.	<u>Charakterisierung der Kontroll- und Patientengruppe</u>	30
2.	<u>Endothelin-1</u>	
2.1.	Endothelin-1-Plasmakonzentrationen Kontrollgruppe versus Patientengruppe	31
2.2.	Endothelin-1-Plasmaspiegel und Apnoe-Hypopnoe-Index	
2.2.1.	Endothelin-1-Werte und AHI-Kategorien	32
2.2.2.	Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und AHI-Werte	33
2.3.	Endothelin-1-Plasmaspiegel und Lys198Asn-Genotypen	34
2.4.	Endothelin-1-Werte bei familiär vorbelasteten versus unbelasteten Patienten	36
2.5.	Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und mögliche Einflussfaktoren	37
2.5.1.	Endothelin-1-Plasmaspiegel und Atemwegserkrankungen	39
2.5.2.	Endothelin-1-Werte und HNO-Erkrankungen	40
2.5.3.	Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und arterielle Hypertonie	41
3.	<u>Lys198Asn-Polymorphismus im Endothelin-1-Gen</u>	
3.1.	Häufigkeitsverteilung des Lys198Asn-Polymorphismus	43
3.2.	Assoziation zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und dem Apnoe-Hypopnoe-Index	45
3.3.	Zusammenhang zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und bestimmten klinischen Faktoren	47
3.3.1.	Assoziation zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und Diabetes mellitus	48
3.3.2.	Zusammenhang zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und Allergien	49
4.	<u>Apnoe-Hypopnoe-Index</u>	
4.1.	Assoziation zwischen dem AHI und dem Lys198Asn-Genotyp, dem BMI und dem Geschlecht	50

E	DISKUSSION	
1.	<u>Endothelin-1</u>	53
2.	<u>Lys198Asn-Polymorphismus im Endothelin-1-Gen</u>	64
3.	<u>Apnoe-Hypopnoe-Index</u>	68
4.	<u>Schlussfolgerung</u>	70
F	ZUSAMMENFASSUNG	72
G	LITERATURVERZEICHNIS	74
	ANHANG	90
	DANKSAGUNG	92
	LEBENS LAUF	93
	ERKLÄRUNG	94

Abkürzungsverzeichnis

AHI	→	Apnoe-Hypopnoe-Index
AS	→	Aminosäuren
Asn	→	Asparagin
AWE	→	Atemwegserkrankungen
BMI	→	„body mass index“
bp	→	Basenpaare
COPD	→	„chronic obstructive pulmonary disease“
DNA	→	„deoxyribonucleic acid“
ECE	→	„endothelin converting enzyme“
EDN1	→	Endothelin-1
EDTA	→	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	→	„enzyme-linked immuno sorbent assay“
ET	→	Endothelin
FRET	→	„fluorescence resonance energy transfer“
GCP	→	„good clinical practice“
GG	→	Wildtyp
GT	→	heterozygot-mutierter Genotyp
HNO	→	Hals-Nasen-Ohren
ICH	→	„International Conference on Harmonization“
IQR	→	Interquartilsabstand („inter-quartile range“)
kb	→	Kilobasen
KHK	→	koronare Herzkrankheit
Lys	→	Lysin
nCPAP	→	„nasal Continuous Positive Airway Pressure“
OSA/OSAS	→	obstruktive Schlafapnoe/obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
PCR	→	Polymerase-Ketten-Reaktion
RIA	→	Radio-Immunassay
SA/SAS	→	Schlafapnoe/Schlafapnoe-Syndrom
SG	→	Schlafgesunde
TT	→	homozygot-mutierter Genotyp

A EINLEITUNG

1. Das Schlafapnoe-Syndrom

Das Schlafapnoe-Syndrom (SAS) beschreibt eine Form der Schlafstörung, die durch nächtliche Atemregulationsstörungen mit Schnarchen und Atemstillständen gekennzeichnet ist. Diese Apnoen können eine Dauer von zehn Sekunden bis zwei Minuten annehmen und führen somit zu einer Abnahme der Blutsauerstoffsättigung von durchschnittlich vier bis fünf Prozent. Sistiert die Atmung hingegen nicht, nimmt aber der Atemgasstrom um mehr als 50 Prozent ab, resultiert eine Hypopnoe. Die sich so unbewusst entwickelnde und zunehmende Atemnot verursacht Weckreaktionen, sogenannte Arousals. Eine Störung der Schlafarchitektur im Sinne einer Schlaffragmentierung ist die Folge. Die Patienten klagen über eine ausgeprägte Tagesmüdigkeit mit starker Einschlafneigung [Lavie et al. 1983], was wiederum zu einer erhöhten Unfallgefährdung (durch Einschlafen am Steuer) [Findley et al. 1988] und z.B. zu Schwierigkeiten am Arbeitsplatz führt.

Neben den bisher genannten Kardinalsymptomen (unregelmäßiges lautes Schnarchen mit längeren Atempausen, pathologische Einschlafneigung am Tage) sind folgende „assoziierte Symptome“ zu benennen: morgendliche Mundtrockenheit, morgendliche Kopfschmerzen, morgendliche Abgeschlagenheit, Konzentrations- und Gedächtnisstörungen, Leistungsabfall, Persönlichkeitsveränderungen, Veränderungen im Affekt, verlegte Nasenatmung, sexuelle Dysfunktion, Nykturie, Albträume und Schlaflosigkeit.

Drei Formen der Schlafapnoe werden unterschieden:

- *Zentrale Schlafapnoe*: Verlust von zentralnervösem Atemantrieb und Atemkontrolle,
- *Obstruktive Schlafapnoe*: frustrane Atemanstrengungen bei erhaltenem zentralnervösen Atemantrieb,
- *Gemischte (zentrale und obstruktive) Schlafapnoe*: initial zentrale Schlafapnoe gefolgt von einer obstruktiven Schlafapnoe [Walther & Bardenheuer 2001].

Bei mehr als 90 % der Schlafapnoe-Patienten ist die Störung jedoch auf eine obstruktive Ursache zurückzuführen [Roehrs et al. 1985], es wird von einem „obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom – OSAS“ [International classification] gesprochen. Im Folgenden soll daher nur diese Form berücksichtigt werden.

Die Prävalenz der Schlafapnoe für Männer und Frauen im mittleren Alter zwischen 30 und 60 Jahren liegt bei etwa 1 – 4 %, wobei Männer (4 %) etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen (2 %) [Young et al. 1993]. Obwohl die Häufigkeit dieser Erkrankung mit steigendem Alter der Patienten zunimmt [Ancoli-Israel et al. 1993, Janssens et al. 2000], zählen auch bereits 1,3 – 3,4 % der Kinder (Altersgipfel: 3. – 7. Lebensjahr) zu den Schlafapnoeikern [Carroll & Loughlin 1992, Warwick et al. 1998].

Trotzdem die Ätiologie der Schlafapnoe nach wie vor ungeklärt ist, verdichten sich die Hinweise dahingehend, dass das Schlafapnoe-Syndrom eine familiäre Häufung aufweist [Mathur & Douglas 1995]. Es ist daher anzunehmen, dass die erbliche Komponente eine Rolle in der Pathogenese spielt [Guilleminault et al. 1995, Redline et al. 1995]. Hierauf deuten auch populationsspezifische Unterschiede hin, die beispielsweise zwischen Afroamerikanern und Kaukasiern in den USA [Redline et al. 1997] ebenso wie zwischen Chinesen und Malaysiern bzw. Indern in Singapur [Ng et al. 1998] beschrieben wurden. Insbesondere scheinen genetische Faktoren, die u.a. mit Änderungen der kraniofazialen Struktur und der Gewebebeschaffenheit der oberen Atemwege [Mathur & Douglas 1995, Guilleminault et al. 1995, Cakirer et al. 2001], der Verteilung des Körperfetts [Mortimore et al. 1998], der neuronalen Kontrolle der oberen Atemwege oder der zentralen Atemregulation [Redline et al. 1997a] assoziiert sind, das Auftreten bzw. die Ausprägung der obstruktiven Schlafapnoe zu beeinflussen.

Neuere Publikationen lassen einen Zusammenhang zwischen erblichen Varianten verschiedener Gene und dem Auftreten eines Schlafapnoe-Syndroms vermuten. Dabei wurden z.B. innerhalb einer Familie Assoziationen zwischen der häufigsten erblichen Form der Polyneuropathie (Charcot-Marie-Tooth-Syndrom) und der Schlafapnoe gefunden [Dematteis et al. 2001]. Einer chinesischen Studie zufolge besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus des Angiotensin-I-Converting-Enzym-Gens und dem Schweregrad des OSAS (Beeinflussung der Erkrankungsausprägung durch das Gen vermutlich via Effekte auf hypoxische Arousals) [Xiao et al. 1999]. Eine dritte Arbeit hingegen fand Zusammenhänge zwischen Trägern des Apolipoprotein E ϵ 4 – das u.a. als Risikofaktor für die Alzheimer-Erkrankung und koronare Herzkrankheit gilt – und der Häufigkeit des Auftretens eines Schlafapnoe-Syndroms [Kadotani et al. 2001]. Diese Ergebnisse konnten in zwei anderen Studien [Saarelainen et al. 1998, Foley et al. 2001] jedoch nicht bestätigt werden.

Besonders interessant erscheinen weiterhin genetische Varianten, die in den Endothelin-Signalweg involviert sind, da Endothelin sowohl an der neuronalen Kontrolle der oberen Atemwege als auch an der zentralen Atmungsregulation und der Ausbildung der kraniofazialen Struktur beteiligt sein könnte [Redline & Tishler 2000]. OSAS ist jedoch eine komplexe Erkrankung, die neben erblichen Komponenten auch vom Habitus [Bonora 1984, Leiter 1985], Umwelt- und Entwicklungsfaktoren beeinflusst wird [Redline & Tishler 2000, Tishler et al. 2003, Palmer & Redline 2003]. Bei vielen Schlafapnoe-Patienten existieren Begleitumstände bzw. Begleiterkrankungen, die teilweise zu der Erkrankung beitragen oder für diese ursächlich sind (siehe Tabelle 1). Das Schlafapnoe-Syndrom findet sich z.B. mit einer höheren Prävalenz bei Adipositas (männlich: ca. 80 %, weiblich: ca. 50 %) [Salvador et al. 2004], kann jedoch auch bei normalgewichtigen Patienten bestehen. Neben der Hypertonie [Lavie 2000, Young et al. 1997, Grote et al. 1999] treten auch kardiovaskuläre Erkrankungen [Peker et al. 1999, Young & Peppard 2000] gehäuft bei Schlafapnoe-Patienten auf. Die kardiovaskulären Veränderungen sind der Hauptgrund der erhöhten Letalität des OSAS [Walther & Bardenheuer 2001]. Laut He et al. (1988) beträgt die 8-Jahres-Letalität bei einem schweren OSAS 37 %.

<u>Wichtige Begleiterkrankungen und Begleitumstände mit erhöhter Inzidenz des OSAS</u>	
Pathoanatomisch: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Adipositas (per magna), ▪ Akromegalie (Makroglossie), ▪ Nasenseptumdeviation, ▪ Tonsillenhypertrophie, ▪ Nasopharyngeale Tumore, ▪ Mandibularhypoplasie, Mikrognathie, ▪ Larynxdeformitäten. 	Funktionell: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hypertonie, ▪ KHK, ▪ Zerebrale Insulte, ▪ Diabetes mellitus, ▪ Chronisches Nierenversagen, ▪ Hypothyreose, ▪ Achondroplasie, ▪ Alkohol, ▪ Medikamente (z.B. Benzodiazepine).

Tabelle 1 (modifiziert nach Walther & Bardenheuer 2001)

Die Diagnose eines Schlafapnoe-Syndroms ergibt sich aus der Patientenanamnese und der klinischen Untersuchung und wird endgültig mittels kardiorespiratorischer Polysomnographie (siehe unten) bestätigt. Neben verschiedenen physikalischen, medikamentösen und chirurgischen Therapieoptionen gilt die kontinuierliche nasale Überdruckbehandlung (nCPAP) als das Mittel der Wahl [Ballester et al. 1999].

2. Das Endothelinsystem

Die Entdeckung des Endothelins in den 80er Jahren setzte einen neuen Meilenstein und verursachte eine enorme Forschungsaktivität auf diesem Gebiet. Nach zahlreichen Bemühungen gelang es 1988 Yanagisawa et al., ein vasokonstriktorisch wirksames Peptid - mit der bis zum damaligen Zeitpunkt höchsten Wirkstärke - aus dem Überstand kultivierter Endothelzellen zu isolieren. Entsprechend seinem Ursprungsort erhielt es den Namen Endothelin (ET).

Ein Jahr später wurde die Entdeckung von zwei weiteren Isoformen publiziert [Inoue et al. 1989a]. Alle drei Substanzen sind strukturell verschieden. Sie besitzen unterschiedliche pharmakologische Aktivität [Inoue et al. 1989a] und physiologische Funktionen [Gianessi et al. 2001]. Die zuerst entdeckte Form wird als Endothelin-1 (ET-1), die weiteren als Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) bezeichnet.

Im menschlichen Genom werden alle drei Vorläufer der ET-Isoformen durch ein eigenes Gen kodiert [Inoue et al. 1989a]. Die genetischen Informationen befinden sich in drei verschiedenen chromosomalen Regionen. So liegt das Gen für das humane Prohormon des Endothelin-1 – das sogenannte Präproendothelin-1 – auf Chromosom 6, das Gen für das Präproendothelin-2 auf Chromosom 1 und das Gen für das Präproendothelin-3 auf Chromosom 20 [Arinami et al. 1991]. Das humane Präpro-ET-1-Gen beinhaltet fünf Exons und vier Introns und erstreckt sich über ca. 6,8 kb DNA [Inoue et al. 1989a, Bloch et al. 1989b].

Die Synthese des Endothelin-1 (siehe Abbildung 1) beginnt mit dem Präpro-ET-1, welches beim Menschen aus 212 Aminosäuren (AS) besteht [Itoh et al. 1988]. Nach der Spaltung an zwei Positionen durch Basen-spezifische Endopeptidasen entsteht das aus 38 AS bestehende sogenannte Big-Endothelin-1 (big-ET-1) bzw. Proendothelin-1 (pro-ET-1) [Yanagisawa et al. 1988]. Zur biologischen Aktivierung ist anschließend die Spaltung durch ein „endothelin converting enzyme“ (ECE) zu dem reifen ET-1 (21 AS) notwendig, da ET-1 etwa 140-fach stärker vasokonstriktorisch wirkt als big-ET-1 [Kimura et al. 1989].

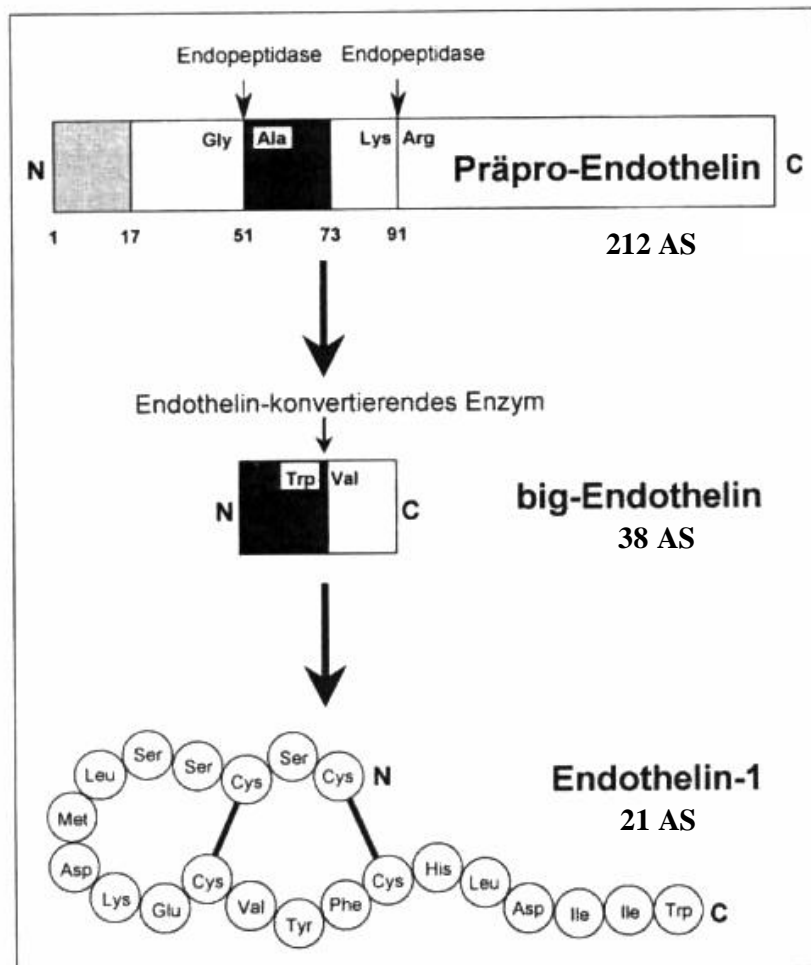


Abbildung 1: Synthese des Endothelin-1 (modifiziert nach Wagner et al. 2002)

Die Endothelin-1-Synthese kann durch zahlreiche Substanzen und andere Einflussgrößen angeregt bzw. gehemmt werden (siehe Anhang Tabelle A). Als wichtigster Inhibitor sei z.B. der physiologische ET-1-Gegenspieler Stickstoffmonoxid (NO) genannt.

Die biologischen Funktionen der Endotheline werden über zwei Rezeptoren, Endothelinrezeptor-A (ET-A) und Endothelinrezeptor-B (ET-B) [Arai et al. 1990, Sakurai et al. 1990], vermittelt. Der Endothelinrezeptor-C konnte bisher nur bei Fröschen, nicht jedoch in humanen Geweben nachgewiesen werden [Karne et al. 1993]. Der ET-A-Rezeptor vermittelt hauptsächlich die vasokonstriktorische Wirkung des ET-1, wird in geringerem Maße vom ET-2 und nur minimal vom ET-3 aktiviert. Der ET-B-Rezeptor hingegen besitzt gleiche Affinitäten für alle drei Isoformen [Giannessi et al. 2001]. Nicht nur die ET-Rezeptoren werden an verschiedenen Stellen unterschiedlich stark exprimiert (ET-A vor allem in glatten Muskelzellen, ET-B besonders in Endothelzellen) [Giannessi et al. 2001], auch die einzelnen Endotheline sind nur in bestimmten Geweben vertreten. So kann ET-1 in sämtlichen Organsystemen nachgewiesen werden und wird dabei als einziger Subtyp im Endothel gebildet [Lüscher 1991]. ET-2 hingegen kommt hauptsächlich in der Niere und im Darm vor, während für ET-3 eine starke Assoziation zum ZNS besteht [Lüscher 1991].

Die Plasmakonzentrationen von ir-ET - welches big-ET-1, ET-1, ET-2 und ET-3 beinhaltet - werden im picomolaren Bereich mit durchschnittlich 3 pg/ml (1,5 pmol/l) angegeben [Battistini et al. 1993]. Rossi et al. (2000) berichten hingegen von Endothelin-1-Plasmakonzentrationen im femtomolaren Bereich, die abhängig vom jeweiligen Untersucher von 0,1 bis 48 fmol/ml variieren können. Diese großen Abweichungen in den Konzentrationsangaben kommen unter anderem dadurch zustande, dass sich viele Publikationen zwar auf ET-1 beziehen, eigentlich jedoch das gesamte ir-ET bestimmt haben. Weiterhin liegen unterschiedlichste Endothelin-1-Meßmethoden, Probandenkollektive, Blutentnahme-Varianten und -Zeitpunkte (zirkadiane Schwankungen) vor. Die bisher veröffentlichten Endothelin-Werte sind demzufolge nicht leicht miteinander zu vergleichen. Es gibt keine allgemein gültigen Referenzwerte, was letztlich auch auf die zahlreichen Bestimmungsmethoden mit ihren jeweils eigenen angegebenen Normwertbereichen zurückzuführen ist [Rossi et al. 2000]. Der in dieser Arbeit verwendete ELISA-Kit arbeitet mit einem Plasma-ET-1-Normbereich von 0,2 – 0,7 fmol/ml.

Der geringe Größenordnungsbereich der Plasmakonzentrationen lässt darauf schließen, dass ET-1 eher als para- und autokriner Mediator denn als endokrines Hormon agiert [Galie et al. 2004]. Tatsächlich wird ET-1 von Endothelzellen stärker abluminal an die umliegenden glatten Muskelzellen als in das Gefäßlumen abgegeben [Yoshimoto et al. 1991, Wagner et al. 1992].

Endothelin besitzt eine große Vielfalt an Funktionen, die lange noch nicht alle erfasst sind. Als wichtigste Wirkung ist die ausgeprägte Vasokonstriktion hervorzuheben. ET-1 ist (nach dem zwischenzeitlich entdeckten Urotensin-II) - mit einer dem Noradrenalin gegenüber etwa 100-fachen Potenz - einer der stärksten natürlichen Vasokonstriktoren [Douglas & Ohlstein 2000, Levin 1995]. Diese Vasokonstriktion setzt nach einer vorübergehenden Vasodilatation [Inoue et al. 1989a, Cocks et al. 1989] ein und führt nach einer Bolusgabe von ET-1 in unphysiologisch hohen Dosen zu einer mehr als 60 Minuten anhaltenden Blutdruckerhöhung [Inoue et al. 1989a]. Niedrige Dosen von ET-1 wirken am Herzen positiv ino- [Ishikawa et al. 1988b, MacCarthy et al. 2000] und chronotrop [Ishikawa et al. 1988a]. Steigende Dosen führen durch eine Koronarkonstriktion und daraus folgenden Ischämien [Kurihara et al. 1989b] und Arrhythmien [Ezra et al. 1989] zu einem Absinken der Herzleistung. Auch beim kardialen Remodeling übernimmt Endothelin verschiedene Funktionen. Einerseits fördert lokal produziertes ET-1 die Proliferation kardialer Myofibroblasten [Ito et al. 1996], andererseits führt die durch ET-1 induzierte Aktivierung kardialer Fibroblasten zu vermehrter interstitieller Kollagenakkumulation [Colucci 1997].

Nierengefäße reagieren etwa zehnmal sensibler auf Endothelin-1 als Gefäße anderer Regionen [Marsen et al. 1994]. Durch die Konstriktion der efferenten und der afferenten Arteriolen [Edwards et al. 1990] kommt es hier zu einem Abfall des renalen Plasmaflusses und der glomerulären Filtrationsrate [Firth et al. 1988]. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass ET-1 neben direkten Rezeptor-vermittelten Effekten indirekt auch die Angiotensin-II-induzierte renale Vasokonstriktion potenziert [Riggleman et al. 2001]. Der Einfluss von Endothelin-1 auf die Wasser- und Elektrolytausscheidung ist konzentrationsabhängig. Bei niedrigen ET-1-Konzentrationen dominiert die Natriurese, bei hohen Konzentrationen die Antinatriurese [Kohan et al. 1992].

In der Lunge induziert ET-1 unter anderem die Bronchokonstriktion [Macquin-Mavier et al. 1989, Rubanyi & Polokoff 1994] - eine Wirkung, die vielleicht zur Entwicklung des pulmonalen Hochdrucks beiträgt. Außerdem stimuliert es die pulmonalen Fibroblasten zur Kollagenproduktion und erhöht die muköse Sekretion [Goraca 2002].

Auch die Effekte auf das endokrine System sind vielfältig. Unter anderem werden komplexe Wirkungen auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beobachtet. Bei Tieren erhöht ET-1 die Serumsekretion von ADH, ACTH, Aldosteron, Kortisol, Renin und Katecholaminen [Nakamoto et al. 1989]. Von einigen Zytokinen und Wachstumsfaktoren induziert es zum einen die Produktion und zum anderen verstärkt es deren Wirkungen [Luscher & Barton 2000]. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Endothelin-1 weiterhin direkte mitogene Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen [Luscher & Barton 2000], potente proinflammatorische Wirkungen [Joszef et al. 2002] und gerinnungsinduzierende Effekte über eine erhöhte Thrombozytenaggregation [Galie et al. 2004] aufzuweisen hat.

Aufgrund seiner zentralen physiologischen Bedeutung wird das Endothelin-1 zunehmend für die pathophysiologische Mitwirkung an der Entstehung diverser Erkrankungen verantwortlich gemacht. Neben erhöhten ET-1-Konzentrationen konnten bei einigen Krankheiten z.B. ein Zusammenhang zu bestimmten genetischen Polymorphismen im ET-1-Gen festgestellt werden (siehe Anhang Tabelle B). Endothelin-1 ist besonders stark mit vaskulären Erkrankungen, wie z.B. der koronaren Herzkrankheit, der chronischen Herzinsuffizienz, dem Myokardinfarkt und dem Apoplex bzw. deren Risikofaktoren (Hypertonus, Adipositas, Diabetes mellitus) assoziiert. All dies tritt gehäuft bei dem obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom auf (Tabelle 1), was wiederum eine eventuelle ätiopathologische Rolle des Endothelin-1 nahe legt. Die bisher vorliegenden Untersuchungen kommen diesbezüglich zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einige Studien zeigten, dass die Endothelin-1-Konzentrationen bei Schlafapnoeikern signifikant erhöht sind und dass eine effektive nCPAP-Therapie teilweise eine Senkung der ET-1-Werte bewirkt [Saarelainen et al. 1997, Phillips et al. 1999, Hu et al. 2002, Li et al. 2004]. Grimpen et al. (2000), Moller et al. (2003) und Jordan et al. (2005) konnten hingegen weder eine Endothelin-1-Steigerung bei OSA-Patienten gegenüber Schlafgesunden noch eine Konzentrationsänderung dieser Substanz unter einer nCPAP-Therapie nachweisen.

Kurihara et al. stellten 1994 mit Hilfe von Knockout-Mäusen fest, dass die Abwesenheit von ET-1 zu respiratorischen Störungen und zu Abnormitäten der Atemregulation führt. Zudem waren diese Tiere durch Veränderungen der kraniofaszialen Struktur sowie durch einen Hypertonus gekennzeichnet – Charakteristiken, die häufig auch bei OSA-Patienten auftreten [Taheri & Mignot 2002, Palmer & Redline 2003]. Dass ET-1 offensichtlich eine wichtige Rolle für die physiologische Atemregulation spielt, konnten ebenfalls durch Kuwaki et al. (1996) bestätigt werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zum einen ein Schlafentzug bei Ratten zu einer Erhöhung der ET-1-Plasmawerte führt [Palma et al. 2002] und zum anderen Patienten mit einer Cheyne-Stoke-Atmung und zentralen Schlafapnoe ebenfalls erhöhte ET-1-Konzentrationen aufweisen [El-Solh et al. 2002]. Auch diese Untersuchungen bieten einen weiteren Anhaltspunkt für eine möglicherweise vorhandene Assoziation zwischen dem Endothelin-1 und dem Schlafapnoe-Syndrom.

Es wird zunehmend versucht, durch entsprechende Untersuchungen einen möglichen Zusammenhang zwischen bestimmten genetischen Varianten im Endothelin-1-Gen und dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen herzustellen [Brown et al. 2000, Vasu et al. 2002, Kozak et al. 2002]. Als besonders interessant erscheint der Lys198Asn-Polymorphismus im Präproendothelin-1-Gen. Dabei kommt es zu einer G-zu-T-Transversion in Position +5665. Dies betrifft das 61ste Nukleotid im Exon 5 und führt zu dem Lysin-Asparagin-Tausch im Kodon 198 [Iglarz et al. 2002].

Verschiedene unabhängige epidemiologische Studien in europäischen und japanischen Populationen konnten einen Zusammenhang zwischen dem Lys198Asn-Polymorphismus und einem erhöhten Blutdruck bei übergewichtigen Personen aufzeigen [Tiret et al. 1999, Asai et al. 2001, Jin et al. 2003]. Treiber et al. (2003) konnten hingegen eine solche Assoziation zwischen der Mutation und dem Blutdruck bzw. totalen peripheren Widerstand nicht bestätigen. Allerdings wurde hier bei übergewichtigen T-Allelträgern in bestimmten Stresssituationen („behavioral stress“) ein stärkerer Anstieg des diastolischen Blutdrucks gegenüber den Normalgewichtigen nachgewiesen. Der Arbeitsgruppe Iglarz et al. (2002) gelang es schließlich, einen direkten Einfluss des Lys198Asn-Polymorphismus auf die Gefäßreagibilität aufzudecken. Sie untersuchten den in vitro Phenylephrin-induzierten Gefäßtonus und dessen Verstärkung unter Endothelin-1 und Angiotensin-II in humanen Mamma-Arterien. Dabei potenzierte die unterhalb der Schwellenkonzentration liegende ET-1-Konzentration von 10 pmol die Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion, welche bei den T-Allelträgern signifikant stärker ausgeprägt war.

Nur zwei Studien beschäftigten sich bisher mit der funktionellen Beziehung zwischen dem Lys198Asn-Polymorphismus und den Endothelin-1-Plasmaspiegeln. Barden et al. (2001) untersuchten Schwangere mit und ohne Präeklampsie und stellten fest, dass der T-Allelstatus zum einen mit höheren systolischen Blutdruckwerten und zum anderen mit höheren ET-1-Konzentrationen assoziiert ist. Tanaka et al. (2004) verglichen die ET-1-Plasmawerte von Hypertonie-Patienten mit und ohne Aminosäure-Substitution in Position 198, konnten dabei jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellen.

B AUFGABENSTELLUNG

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom ist eine ernstzunehmende Erkrankung mit bisher ungeklärter Pathogenese. In Tierversuchen konnte festgestellt werden, dass einige OSA-Phänotypen (z.B. kraniofasziale Struktur, zentrale Atemregulation, neuronale Kontrolle) durch Endothelin-1 beeinflusst werden.

Ob die Endothelin-1-Werte bei Schlafapnoe-Patienten jedoch tatsächlich erhöht sind und ob eine effiziente nCPAP-Therapie eben diese Werte normalisiert, ist aufgrund der kontroversen Datenlage bisher unklar. Nachgewiesenermaßen besitzen OSA-Patienten eine erhöhte Morbidität und Mortalität in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen, was für die Mitwirkung des Vasokonstriktors Endothelin-1 spricht .

Epidemiologische Studien haben weiterhin gezeigt, dass die Endothelin-1-Variante Lys198Asn (G/T) mit einem erhöhten Blutdruck bei Übergewichtigen assoziiert ist. In der vorliegenden Querschnittstudie wurde dieser Polymorphismus hinsichtlich seiner Bedeutung für die Manifestation und den Ausprägungsgrad der Schlafapnoe untersucht und gleichzeitig eine funktionelle Beziehung zu den Endothelin-1-Plasmakonzentrationen hergestellt.

Dabei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Sind die ET-1-Plasmawerte der OSA-Patienten gegenüber denen von Schlafgesunden erhöht? Agiert Endothelin-1 vielleicht sogar als Marker?
- Liegt eine funktionelle Beziehung zwischen den ET-1-Plasmakonzentrationen und einem bestimmten Genotypus bezüglich der Lys198Asn-Variante vor?
- Tritt die Lys198Asn-Mutation bei Schlafapnoe-Patienten häufiger auf und gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem Schweregrad des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms?

C MATERIAL UND METHODEN

1. Rekrutierung der Studienteilnehmer

1.1. Patientenkollektiv (SA)

Insgesamt sollte ein Kollektiv von ca. 300 Patienten mit einem manifesten obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) gewonnen werden. Dazu wurde allen Patienten mit der Diagnose oder dem Verdacht einer obstruktiven schlafbezogenen Atmungsstörung, die sich in der Schlafambulanz der Poliklinik der Charité vorstellten, die Teilnahme an der Studie angeboten. Eingeschlossen wurden daher zum einen Patienten, die sich bereits in der Schlafambulanz in Behandlung befanden und zur Therapiekontrolle vorstellig wurden, und zum anderen Patienten, die zur Erstdiagnostik in die Poliklinik kamen und bei denen sich der Verdacht auf eine schlafbezogene Atmungsstörung im ambulanten Schlafapnoe-Screening und der kardiorespiratorischen Polysomnographie bestätigte.

Alle OSA-Patienten durchliefen das folgende standardisierte, diagnostische, ambulante Stufenprogramm 1:

- Erhebung einer allgemeinen medizinischen Anamnese,
- Erhebung einer spezifischen Schlaf-Anamnese,
- Körperliche Untersuchung,
- Beantwortung folgender Fragebögen:
 - Allgemeiner Fragebogen zum Schlaf,
 - Fragebogen zum Schnarchen,
 - Fragebogen zur Müdigkeit am Tage (Epworth Sleepiness Scale = ESS),
- Ambulantes Schlafapnoe-Monitoring (MESAM 4/Merlin[®]/Embletta[®]).

Bei dem ambulanten Schlafapnoe-Screening wurde ein Gerät (MESAM 4) verwendet, welches von eingewiesenem Fachpersonal angelegt und vom Patienten über Nacht getragen wurde.

Hiermit wurden vier Parameter erfasst:

- Atemgeräusche (Schnarchen),
- Herzfrequenz (direkte Bestimmung aus der R-R-Zacken-Erkennung des EKGs),
- Sauerstoffsättigung und
- Schlafposition.

Zusätzlich bestand für den Patienten die Möglichkeit, nächtliche Ereignisse während der Registrierung zu markieren, welche im passenden Protokoll näher beschrieben und später bei der Auswertung berücksichtigt wurden. Anschließend wurden die Daten des ambulanten Schlafapnoe-Monitoring computergestützt visuell ausgewertet und der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI = Apnoen + Hypopnoen pro Stunde Schlaf) bestimmt.

In das Patientenkollektiv wurden nur Personen mit einem AHI > 5/h aufgenommen.

Drei verschieden starke Ausprägungsgrade des SAS (Schlafapnoe-Syndroms) werden unterschieden:

5/h < AHI < 15/h	mit klinischer Symptomatik	mildes SAS
15/h < AHI < 30/h	ohne/mit klinischer Symptomatik	moderates SAS
AHI > 30/h	ohne/mit klinischer Symptomatik	ausgeprägtes SAS

Tabelle 2: Schweregrade des Schlafapnoe-Syndroms

Zur Diagnoseobjektivierung unterzogen sich die Patienten mit einem positiven Schlafapnoe-Monitoring (mindestens mildes SAS) nach der Erstdiagnostik innerhalb von sechs Monaten einer weiterführenden stationären Differentialdiagnostik mittels kardiorespiratorischer Polysomnographie (siehe 1.4.). Patienten, bei denen die Polysomnographie zusätzlich zum OSAS eine andere Schlafstörung identifizierte, wurden von der Studie ausgeschlossen. Zur Beurteilung des Ausprägungsgrades der Schlafapnoe wurde jeweils der AHI der polysomnographischen Ableitung vor Therapiebeginn verwendet.

Um bestimmte Einflussfaktoren auf das Endothelinsystem in der Auswertung berücksichtigen zu können, wurde von allen Studienteilnehmern (Patienten- und Kontrollkollektiv) zusätzlich ein Fragebogen ausgefüllt, der Informationen zu folgenden Themen enthielt:

- Allgemeine Angaben (z.B. Geschlecht, Alter, BMI, ethnische Zugehörigkeit, Familienanamnese),
- Angaben zur Krankheitsanamnese (z.B. internistische – insbesondere Herz-Kreislauf- und Stoffwechselerkrankungen – sowie neurologische/psychiatrische Erkrankungen),
- Angaben zur Medikamentenanamnese,
- Angaben zum Genussmittelkonsum (z.B. Nikotin, Alkohol, Koffein).

Schließlich wurde der Blutdruck nach der Methode von Riva-Rocchi – standardisiert (im Sitzen, nach mindestens fünf Minuten Ruhe, am rechten Oberarm) – gemessen.

Die Blutentnahme (zwei 9 ml-EDTA-Küvetten) für die Analyse der Endothelin-1-Plasmaspiegel und der Genotypisierung erfolgte mittels peripher-venöser Punktion (z.B. Vena mediana cubiti) in einem definierten Zeitfenster (9.00 – 11.00 Uhr) am Vormittag.

Alle Daten sowie Blut- und Plasmaproben wurden anonymisiert und anschließend mit der entsprechenden Studienteilnehmer-Identifikation gekennzeichnet.

1.2. Kontrollgruppe (SG)

Diese Gruppe umfasste schlafgesunde Probanden, die sich innerhalb der Hauptaltersgruppe der OSA-Patienten befanden. Sie diente der Referenzwertfindung bezüglich des Endothelin-1-Plasmaspiegels und der Häufigkeitsverteilung des Lys198Asn-Polymorphismus. In das Kollektiv der Schlafgesunden (SG) wurden nur Probanden aufgenommen, bei denen eine schlafbezogene Atmungsstörung sowohl anamnestisch als auch diagnostisch ($AHI \leq 5/h$) ausgeschlossen werden konnte. Weiterhin wurde die Einnahme von Medikamenten, die eine zentrale Wirksamkeit, einen Einfluss auf den Schlaf, auf den Erregungsablauf des Herzens oder auf das Endothelinsystem haben, anamnestisch ausgeschlossen. Die Kontrollgruppe durchlief das gleiche diagnostische Programm wie die Gruppe der Schlafapnoeiker.

1.3. Ein- und Ausschlusskriterien

Für das Patienten- und das Kontrollkollektiv galten folgende Kriterien:

- Studienteilnehmer beiderlei Geschlechts,
- Nordeuropäische Abstammung (aufgrund interethnischer Unterschiede ist eine einheitliche Population notwendig, um das Risiko systemischer Fehler zu verringern),
- Alter: > 18 Jahre (SA);
Alter: > 30 Jahre (SG),
- $AHI \leq 5/h$: Kollektiv der Schlafgesunden (SG);
 $AHI > 5/h$: Kollektiv der Schlafapnoeiker (SA),
- Unterzeichnung einer schriftlichen Einwilligungserklärung (nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung).

1.4. Kardiorespiratorische Polysomnographie

Diese Untersuchung fand im Rahmen der weiterführenden stationären Schlafapnoe-Stufendiagnostik 2 im Forschungslabor des Schlafmedizinischen Zentrums in speziell zur Schlafableitung eingerichteten Räumlichkeiten statt. Dafür standen zwei getrennte Schlafaufzeichnungs- und Analysesysteme (ALICE 3TM, Healthdyne International S.A., Antony, Frankreich) in Einzelräumen zur Verfügung, so dass bei zwei Studienteilnehmern gleichzeitig die Ableitung durchgeführt werden konnte. Nach Anlegen der Ableitelektroden/Sensoren und dem Beginn der Messungen hielt sich der Nachtdienst in einem gesonderten Raum auf, von dem aus die Patientenüberwachung mittels einer Infrarotkamera und Wechselsprechanlage erfolgte. Die Probandenräume wurden während der Aufzeichnung nur in absoluten Ausnahmefällen betreten: z.B. bei Verlangen des Patienten, Auftreten erheblicher korrekturbedürftiger Mängel in der Schlafableitung oder in medizinischen Notfällen. Störungen im Schlafverlauf wurden stets dokumentiert. Die Schlafableitung wurde zu der individuell üblichen Zubettgehzeit gestartet und nach mindestens sechs Aufzeichnungsstunden durch Erwachen des Patienten (Schlaf ad libitum) oder zu vorher festgelegten Weckzeiten – spätestens jedoch um 8:00 Uhr – beendet.

Insgesamt beinhaltete die Schlafableitung folgende Parameter:

- Elektroencephalogramm (C3-A2, C4-A1, O1-A2, O2-A1),
- Elektroofokulogramm (EOG-re + EOG-li),
- Elektromyogramm (EMG-Kinn + EMG-Bein),
- Elektrokardiogramm (Ableitung nach Frank),
- Schnarchgeräusche (Erfassung mit Hilfe eines Kehlkopfmikrofons),
- Mund-/Nasenfluss (Erfassung mit Hilfe eines Thermistor und Flow/Druck-Wandler),
- Atemexkursion (Thorax + Abdomen (Induktionsplethysmographie)),
- Sauerstoffsättigung (mittels Pulsoximetrie),
- Lageposition (mittels elektromechanischem Lagesensor).

Auswertung:

Neben der ausführlichen Analyse der Schlafstruktur entsprechend den Kriterien von Rechtschaffen und Kales (Berechnung der Länge und prozentualen Anteile der einzelnen Schlafstadien, Schlafstadienwechsel, Schlaflatenzen und Schlafeffektivität) wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Analyse der Atmung gelegt. Für die Beurteilung einer Schlafapnoe und die Berechnung des AHI wurden Nasenfluss, Thorax- und Abdomenexkursion, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung herangezogen.

Eine Apnoe wurde als Sistieren des Luftflusses an Nase und Mund für eine Dauer von mindestens zehn Sekunden definiert.

Als Hypopnoe wurde die Reduzierung der Einzelsignale von Nase und/oder Mund um mindestens 50 % für eine Dauer von mindestens zehn Sekunden mit einem 3%igem O₂-Abfall und/oder einem assoziiertem Arousal bezeichnet.

Die Reduktion der Flow-Amplitude um 20 – 50 % mit bzw. ohne O₂-Änderungen und mit oder ohne Arousal beschrieb die sogenannte periodische Atmung bzw. Hypoventilation.

Apnoen und Hypopnoen wurden gezählt und auf die Stunde Schlaf umgerechnet. Daraus ergab sich der Apnoe (AI)- und der Hypopnoe (HI)-Index bzw. der Gesamtindex (AHI).

2. Material

2.1. Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Endothelin-1

Kit-Inhalt:

- 12 x 8-Well-Mikrotiterstreifen (beschichtet mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Endothelin-Antikörpern),
- 10 x Waschpufferkonzentrat (50 ml),
- Assaypuffer (100 ml),
- Detektionsantikörper (lyophilisierte, monoklonale Anti-Endothelin-Antikörper),
- sechs Standards von 0 bis 10 fmol/ml (synthetisches humanes Endothelin-1, lyophilisiert in Humanplasma),
- zwei Kontrollen (synthetisches humanes Endothelin-1, lyophilisiert in Humanplasma),
- Konjugat (22 ml Anti-Maus-IgG-Antikörper, gekoppelt an Peroxidase (HRPO)),
- Substrat (22 ml TMB-Lösung),
- Stopplösung (7 ml),
- PAA (Precipitating Agent Additive; 12 ml),
- Endothelin (synthetisches humanes Endothelin-1, lyophilisiert in Puffer),
- PB-Puffer,
- extra hoher Endothelin-Standard in Plasma (synthetisches humanes Endothelin-1, lyophilisiert in Humanplasma),
- zwei Stück selbstklebende Abdeckfolien.

Zusätzlich waren erforderlich:

- destilliertes Wasser,
- Polypropylenröhrchen (ca. 2 ml Kapazität),
- Spritzdosierflasche für Waschpuffer,
- Zellstoff.

Die notwendigen Reagenzien für die genetischen Untersuchungen werden unter 3.3. und 3.4. aufgeführt.

2.2. Geräte

- Pipetten (eppendorf),
- Zentrifuge: Centrifuge 5416 (eppendorf),
- Probenroller: RM 5 – Assistent 348 (Karl Hecht KG),
- Thermomixer comfort (eppendorf),
- Temperierter Schüttelinkubator: Typ 1092 (GFL),
- Gefrierschrank: Liebherr Premium (-20°C),
- Kühlschrank: Liebherr (-4°C),
- Mikrotiterplatten-Photometer: Spectra II (SLT Labinstruments Deutschland GmbH),
- Software für Extinktion-Auswertung: Magellan (TECAN, Dokumentenversion 1.1, Software-Version 2.5x, August 2000),
- DNA-Extraktionsgerät: Magna Pure LC (Roche Molecular Diagnostics GmbH),
- Echtzeitfluoreszenzzykler: Typ Light Cycler (Roche Molecular Diagnostics GmbH),
- Kapillaren (Light Cycler Capillaries, Roche Molecular Diagnostics GmbH),
- Light Cycler Probe Design Software[®],
- DNA-Sequenziergerät: ABI Prism 310 Genetic Analyzer,
- ABI Prism 310 diagnostic software[®]: ABI Prism Sequencing Analysis Version 3.3.

3. Methoden

3.1. **Aufbereitung und Lagerung der gewonnenen Blutproben**

Um zirkadiane Konzentrationsschwankungen des Endothelins auszuschließen, wurden alle Blutproben am Vormittag zwischen 9 – 11 Uhr durch peripher-venöse Punktion gewonnen. Aufgenommen in EDTA, wurden die jeweils 18 ml Blut (2 x 9 ml) eines jeden Studienteilnehmers sofort nach der Abnahme für maximal 50 Minuten auf Eis zwischengelagert. Davon wurden anschließend insgesamt 6 ml EDTA-Blut für fünf Minuten bei 5000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma, welches für die Analyse der ET-1-Plasmaspiegel nötig ist, wurde abpipettiert und in Polypropylenröhrchen à maximal 2 ml proportioniert. Bis zur analytischen Aufarbeitung (innerhalb von sechs Monaten) wurden die Röhrchen bei –20°C eingefroren. Die restlichen 12 ml EDTA-Blut eines jeden Studienteilnehmers wurden bis zum Beginn der pharmakogenetischen Untersuchungen ebenfalls tiefgefroren (bei –20°C) aufbewahrt.

3.2. **Bestimmung der Endothelin-1-Plasmakonzentrationen mit Hilfe eines spezifischen ELISA-Kits**

Durchführung:

Ansatz A: Direkte Bestimmung von Endothelin in humanem EDTA-Plasma

Reagenzienvorbereitung:

- Standards 0 bis 5 wurden in 1,5 ml Assaypuffer gelöst.
- Kontrollen („high“ & „low“) wurden in 1,5 ml Assaypuffer gelöst.
- Detektionsantikörper wurde in 5,5 ml Assaypuffer gelöst.
- Waschpufferkonzentrat wurde auf 500 ml mit destilliertem Wasser verdünnt.
- ▶ Alle Reagenzien mussten Raumtemperatur (18 – 26°C) haben, bevor sie im Test eingesetzt werden konnten.
- ▶ Dies galt auch für die tiefgefrorenen Plasmaproben. Sie wurden kurz vor ihrem Gebrauch mit Hilfe des Thermomixers auf entsprechende Temperatur gebracht.

Weitere Arbeitsschritte:

- Es wurden je 200 µl Standard (0 - 5), Kontrolle („high“ & „low“) bzw. Probe – immer als Doppelbestimmungen – in die entsprechenden Wells pipettiert.
- Dazu wurde weiterhin je 50 µl Detektionsantikörper in alle Wells – außer dem Leerwert – gegeben.
- Nach vorsichtigem Schütteln der Mikrotiterplatte (Mischvorgang) wurde diese sorgfältig mit Klebefolie abgedeckt (Vermeidung von Verdunstung) und über Nacht (16 – 24 h) bei Raumtemperatur (18 – 26°C) inkubiert.
- Am nächsten Tag wurde der Well-Inhalt verworfen und mindestens fünf Mal mit je 300 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden eventuelle Waschpufferreste durch Ausklopfen auf geeignetem Zellstoff entfernt.
- Nun wurden je 200 µl Konjugat in alle Wells pipettiert.
- Die Mikrotiterplatte wurde wiederum sorgfältig mit Klebefolie abgedeckt und 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert.
- Danach wurde der Inhalt der Wells verworfen und es folgten, wie zuvor beschrieben, weitere Waschschritte und „Ausklopfen“.
- Als nächstes wurde in alle Wells je 200 µl Substrat pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
- Anschließend wurde die Farbreaktion mit je 50 µl Stoplösung unterbrochen.
- Die Extinktion wurde danach sofort bei 450 nm bzw. 405 nm gegen einen Referenzfilter von 620 nm mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Photometers (SLT.Spectra) gemessen.
- Mittels der Software Magellan (TECAN) wurde nun der Absorptionswert des Leerwerts von allen anderen Messwerten abgezogen. Weiterhin wurde aus der Standardkurve eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe dann die Messwerte der anderen Proben berechnet werden konnten.

Da alle Leerwerte, Standards, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmungen ausgeführt wurden, konnten pro Mikrotiterplatte 39 Plasmaproben analysiert werden.

Testmerkmale:

Normalwerte: 0,2 bis 0,7 fmol/ml (in humanem EDTA-Plasma)

Standardbereich: 0 bis 10 fmol/ml

Spezifität/Kreuzreaktionen:

- Endothelin-1 (1-21): 100 %,
- Endothelin-2 (1-21): 100 %,
- Endothelin-3 (1-21): < 5 %,
- big-Endothelin (1-38): < 1 %,
- big-Endothelin (22-38): < 1 %.

In normalen humanen EDTA-Plasmen sollte die Konzentration von ET-2 weniger als 20 % und von ET-3 ca. 50 % der jeweiligen ET-1-Konzentrationen ausmachen.

Reproduzierbarkeit:*Intraassay:*

Mittelwert	Variationskoeffizient	Anzahl
2,77 ± 0,13	4,5 %	n = 18
5,42 ± 0,24	4,4 %	n = 18

Interassay:

Mittelwert	Variationskoeffizient	Anzahl
2,85 ± 0,20	6,9 %	n = 13
5,82 ± 0,45	7,6 %	n = 13

Wiederfindung:

Fünf verschiedene Plasmen wurden mit zwei unterschiedlichen Mengen synthetischem Endothelin-1 versetzt und im direkten Assay gemessen (Ansatz A):

- 0,5 fmol/ml Messwert: 0,48 fmol/ml 95 %,
- 2 fmol/ml Messwert: 2,08 fmol/ml 104 %.

Nachweisgrenze:

Die Nachweisgrenze ist jene Konzentration an Endothelin, die sich drei Standardabweichungen vom Nullwert unterscheidet. Sie liegt hier bei 0,05 fmol/ml.

3.3. DNA-Extraktion

Die Isolierung der DNA aus dem Blut (welches bis zu diesem Zeitpunkt tiefgefroren gelagert wurde) erfolgte mit dem vollautomatischen Extraktionsgerät Magna Pure LC (Roche). Für die Durchführung wurden zum einen der Magna Pure-DNA-Isolation-Kit (siehe unten) und zum anderen 200 µl Blut eines jeden Studienteilnehmers benötigt. Die entsprechenden Reaktionsgefäße und Pipetten wurden an den festgelegten Stellen positioniert. Pro Durchgang konnten 32 Proben verarbeitet werden.

Der Magna Pure LC arbeitet nach dem Festphasenextraktionsprinzip, welches sich folgendermaßen zusammensetzt:

Das Blut wird zunächst in eine Hochsalzpufferlösung überführt, welche die im Blut befindlichen Zellen lysiert und die DNA somit frei vorliegen lässt. Hinzu kommen magnetische Glaspartikel und Natrium. Diese als Festphase bezeichneten Partikel mit magnetischem Kern und Siliziumbeschichtung binden bei den herrschenden hohen Salzkonzentrationen (chaotrop) mit ihren Sianolgruppen über Natrium an die Phosphatgruppe der Nukleinsäure. Auf diese Weise kann die DNA von den anderen Blutbestandteilen getrennt werden. Durch darauffolgende Waschvorgänge wird die DNA von den Partikeln gereinigt und kann nun gebrauchsfertig in entsprechend beschriftete Eppendorfgefäße pipettiert und in einem Kühlschrank bei +4°C gelagert werden.

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume (Roche Diagnostics GmbH):

- | | |
|--------------------------------------|-------------------|
| ▪ Wash Buffer I | 3 x 100 ml, |
| ▪ Wash Buffer II | 3 x 60 ml, |
| ▪ Wash Buffer III | 2 x 100 ml, |
| ▪ Lysis Binding Buffer | 70 ml, |
| ▪ Magnetic Glass Particle Suspension | sechs Fläschchen, |
| ▪ Elution Buffer | 100 ml, |
| ▪ Proteinase K Buffer II | 100 ml, |
| ▪ Proteinase K | drei Fläschchen. |

(Dieses Volumen ist ausreichend für die DNA-Extraktion von 288 Proben aus 20-200 µl Blut.)

3.4. Amplifikation und Genotypisierung mittels Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Weiterentwicklung der Polymerase-Ketten-Reaktion. Sie erlaubt die Amplifikation des zu untersuchenden Genabschnittes und die Identifikation von Mutationen in nur einem Arbeitsdurchgang. Die synthetisierten Nukleinsäuren können „online“ in Echtzeit („real time“) reproduzierbar quantifiziert und typisiert werden. Auf der Basis von „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt, welches proportional der angereicherten DNA ist. Die Fluoreszenzsignale entstehen entweder sequenzunspezifisch durch Interkalierung in doppelsträngige DNA oder sie entstehen, wie im vorliegenden Fall, sequenzspezifisch durch Hybridisierung mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sonden (siehe Messprinzip).

Durchführung:

Es wurde ein vollautomatischer Echtzeitfluoreszenzyzykler (Typ: Light Cycler) der Firma Roche verwendet, dem 32 Kapillaren (Light Cycler Capillaries, Roche Molecular Diagnostics GmbH) und die unten aufgeführten Reagenzien (siehe Tabelle 3) zugefügt wurden. Pro Arbeitslauf diente eine Kapillare als Negativkontrolle, um eventuelle Kontaminationen erkennen und ausschließen zu können. In jede der restlichen 31 Kapillaren wurden 20 µl des PCR-Ansatzes und 1 µl DNA pipettiert.

Reagenzien	Menge	Funktion
10xTaq-Puffer	2 µl	- sorgt für optimales pH-Milieu (pH-Optimum der Taq-Polymerase: 8,8)
MgCl ₂	3,0 mM	- ist ein Kofaktor der Polymerase und somit wichtig für dessen Enzymaktivität
Nukleotidtriphosphate dNTP's	0,1 mM	- sind die Bausteine zur Synthese des Nukleinsäurestrangs
BSA (Bovine Serum Albumin), konzentriert	30 mg/L	- BSA dient als Enzymstabilisator: bindet freie Fettsäuren und Lipide, welche die Proteine während der Hitzedenaturierung verändern würden
DMSO (Dimethylsulfoxid)	50 mg/L	- DMSO ist ein Lösungsmittel; neutralisiert Hydroxylradikale und verhindert, dass Reagenzien an den Kapillarwänden haften bleiben
Primer: EDN1x5 U EDN1x5 B	0,2 µM 0,2 µM	- sind Oligonukleotide und stellen die spezifischen Startermoleküle für die Synthese des gewünschten Genabschnittes dar
Sonden: Sensor [G] Anchor Ex5 (705)	0,075 µM 0,075 µM	- sind sequenzspezifische und fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (auch Fluorophore genannt), welche für die Typisierung der DNA von Bedeutung sind
Taq-Polymerase	1 U	- das hitzestabile Enzym (aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>) synthetisiert den komplementären DNA-Strang
Aqua bidest.	11,7 µl	- schafft das nötige wässrige Milieu
Ansatzvolumen	20 µl	

Tabelle 3: Reagenzien für Real-Time-PCR

Primer, DNA und Wasser lagerten bis zur Verwendung im Kühlschrank bei +4°C. Puffer, Nukleotide, Magnesiumchlorid und Taq-Polymerase wurden bei -20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Unmittelbar vor ihrem Gebrauch wurden die tiefgefrorenen Reagenzien aufgetaut, geschüttelt und zentrifugiert. Die in Tabelle 3 genannten Reagenzien wurden in ein Eppendorfgefäß (Polypropylenröhrchen) pipettiert, gemischt und zentrifugiert, wobei die Polymerase immer als letztes hinzukam. All dies wurde stets auf einer Eisplatte durchgeführt, um frühzeitige Hybridisierungen unter den Reagenzien zu verhindern.

Die Amplifikation des Endothelin-1-Gen-Fragmentes (Exon 5) erfolgte mit den Endothelin-1-spezifischen Oligonukleotidprimern EDN1x5 U und EDN1x5 B (Tabelle 4). Sie dienen der Taq-Polymerase als Startpunkte. Beide spezifischen Primer wurden mit Hilfe der Light Cycler Probe Design Software[®] entwickelt.

Name	Ausrichtung	Sequenz	Länge [bp]
EDN1x5 U	vorwärts	5'-ggttttgtttgtgccagattc	21
EDN1x5 B	rückwärts	5'-cttcagacaggccccgaa	18

Tabelle 4: Charakterisierung der Primer

Die Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Abschnittes mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion baute sich folgendermaßen auf:

- Initialdenaturierung (DNA-Aufspaltung zu Einzelsträngen; einmalig) bei 95 °C (120 s),
- Annealing (Primer-Anlagerung) bei 60 °C (20 s),
- Elongation (Polymerisierung zur Doppelstrang-DNA durch Anlagerung der dNTPs mit Hilfe der Taq-Polymerase) bei 72 °C (30 s) und
- Denaturierung bei 95 °C (0 s).

Die drei Schritte – Denaturierung, Annealing, Elongation – durchliefen 43 Zyklen, in denen es zur exponentiellen Vermehrung des gesuchten Genfragmentes kam.

Im Anschluss daran wurde die Genotypisierung mit Hilfe der Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. An dieser Stelle kamen die spezifischen Hybridisierungssonden zum Einsatz . Das Amplifikat wurde wiederum auf 95°C erhitzt, um die DNA in ihre einzelsträngige Form zu bringen. Dies war die Voraussetzung für die darauffolgende Bindung der Sonden bei 49 °C (20s). Es erfolgte das stetige Erwärmen der Proben von 0,1 °C je Sekunde auf 75 °C mit paralleler Messung der Fluoreszenzen.

Messprinzip:

Wie bereits erwähnt, wurden zu dem PCR-Ansatz zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Hybridisierungssonden) hinzugefügt (Tabelle 5).

	Name	Ausrichtung	Sequenz
Sensor	Sensor [G]	vorwärts	5'-ctgaaaggcaagccctcca-F
Anchor	Anchor Ex5 (705)	vorwärts	5'-LC Red 705-gagcgttatgtgaccacaaccgag-p

Tabelle 5: Charakterisierung der Hybridisierungssonden

g = Wildtyp-spezifische Base; F = Fluorescein; p = Phosphat; LC = Light Cycler

Diese Sonden binden in räumlicher Nähe zueinander (ca. 5-10 Basenpaare) zwischen den beiden Primern an die Ziel-DNA (Sensor bindet mittig über zu untersuchenden Gensequenz). Sie sind mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der Sensor trägt an seinem 3'Ende Fluorescein, während der Anchor an seinem 5'Ende mit LC Red 705 markiert ist. Der Light Cycler besitzt drei Detektionskanäle, mit denen er die Emissionsfluoreszenzen misst. Die Fluorophoren werden mit einer Blau-Licht emittierenden Diode (= LED/Light Emitting Diode) bei einer Wellenlänge von 470 nm beleuchtet. Dadurch wird das gelb-grüne Fluorophor Fluorescein (260 nm) spezifisch angeregt und die resultierende Emissionsfluoreszenz im Kanal 1 gemessen. Weiterhin kann das Fluorescein seine Energie auf den benachbarten Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall LC Red 705 (705nm), übertragen. Dieser emittiert nun rote Fluoreszenz, welche im Kanal 3 gemessen wird (LC Red 640 → Kanal 2).

Dieses Prinzip der sichtbarmachenden Energieübertragung wird als „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) bezeichnet. Es funktioniert jedoch nur, wenn beide Sonden an ihre komplementäre Sequenz gebunden sind und dicht beieinander liegen.

Um entsprechende Mutationen detektieren zu können, wurde nun eine Schmelzkurve aufgenommen.

Das Hybridisierungsprodukt – bestehend aus Sonden und komplementärer DNA – wurde unter stetiger Messung ihrer Fluoreszenz erhitzt.

Der hier benutzte Sensor besaß seine spezifische Schmelztemperatur (Temperatur, bei der die Anzahl der gebundenen und freien Sonden im Gleichgewicht stehen) bei 62 °C. Das bedeutet, dass sich bei dieser Temperatur die Fluoreszenz (durch die Abspaltung des Sensors von der DNA verursacht) verringerte, was in Form eines „Peaks“ dargestellt wurde. Da die Sondenprobe genau im Bereich der möglichen Punktmutation an die Ziel-DNA bindet, erniedrigt jede Änderung der komplementären Sequenz ihren Schmelzpunkt.

Die DNA-Sequenz des Wildtypen war der Sensor-Sequenz exakt komplementär und erhielt ihren Fluoreszenz-Peak somit bei 62 °C. Eine homozygot-mutierte Probe hatte ihren Peak hingegen bei 57 °C. Handelte es sich jedoch um einen Heterozygoten, zeigten sich demnach zwei Peaks - einen bei der höheren Temperatur (Schmelzpunkt des Wildtyps) und einen bei der niedrigeren Temperatur (Schmelzpunkt des Mutanten) – (siehe Abbildung 2).

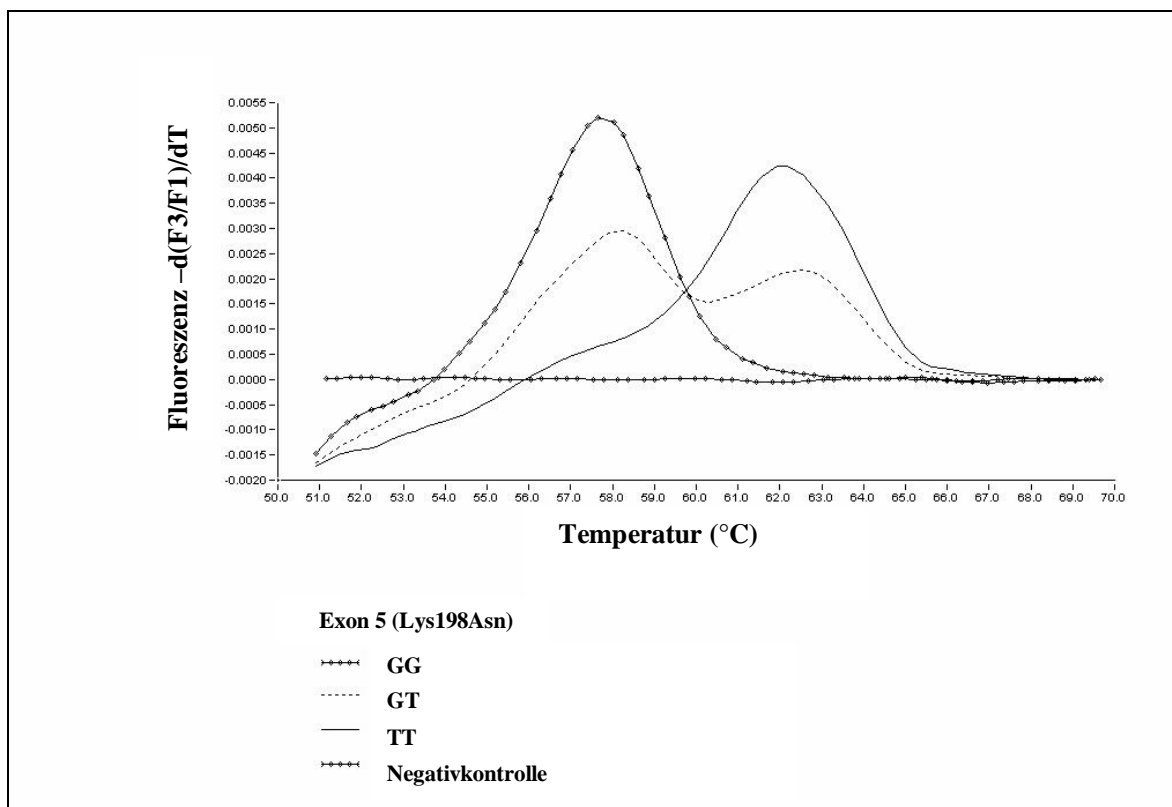


Abbildung 2: Darstellung von Schmelzkurven zur Identifizierung der einzelnen Mutationen im Exon 5 (Lys198Asn) des Endothelin-1-Gens

3.5. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung (Kettenterminationsmethode nach Sanger) wurde zum Nachweis der Richtigkeit der Mutationsanalyse verwendet.

4. Statistik

Um die erarbeiteten Daten entsprechend auswerten zu können, wurden verschiedene statistische Verfahren eingesetzt. Zur Prüfung des Zusammenhangs zwischen kategorialen Merkmalen diente der χ^2 -Test. Um den Unterschied von metrisch nicht normalverteilten Merkmalen zwischen zwei bzw. mehr als zwei Stichproben aufzudecken, wurden der Mann-Whitney-U- bzw. Kruskal-Wallis-Test verwendet. Mit Hilfe der Korrelations- bzw. Regressionsanalyse wurde schließlich der Zusammenhang zwischen metrischen (intervallskalierten) Merkmalen untersucht.

Aus Übersichtsgründen wurde bei sämtlichen Abbildungen (insbesondere Boxplots) auf die Darstellung von sogenannten Ausreißern verzichtet. Dabei handelte es sich um Datenwerte, die zwischen innerer (1,5 x IQR) und äußerer (3 x IQR) Eingrenzung (= „milde Ausreißer“) bzw. außerhalb der äußeren Eingrenzung (= „extreme Ausreißer“) lagen.

5. Ethische Grundlagen und Datenschutz

Die Durchführung dieser Querschnittstudie erfolgte stets unter der Berücksichtigung internationaler ethischer Leitlinien (z.B. Deklaration von Helsinki, ICH und GCP). Neben einer biochemischen Auswertung beinhalteten die Blutuntersuchungen auch eine genotypische Analyse. Die Patienten wurden ausführlich darüber informiert und mussten dies auch schriftlich bestätigen. Es stand ihnen selbstverständlich frei, die Studie zu jedem beliebigen Zeitpunkt abzubrechen. Die Patientendaten wurden in anonymisierter Form (fortlaufende Nummer und Initialen) erhoben und gespeichert.

D ERGEBNISSE

Der Probandenpool der Kontrollgruppe umfasst insgesamt 57 und der der Patientengruppe insgesamt 365 Individuen. Von den insgesamt 57 Schlafgesunden, bei welchen die genotypische Untersuchung bezüglich der Lys198Asn-Mutation durchgeführt worden ist, konnte bei 48 zusätzlich der ET-1-Plasmaspiegel bestimmt werden. Von den insgesamt 365 Schlafapnoeikern, bei welchen die genotypische Untersuchung bezüglich der Lys198Asn-Mutation durchgeführt worden ist, konnte bei 347 zusätzlich der ET-1-Plasmaspiegel bestimmt werden. Aufgrund fehlender Angaben oder einer schlecht eingestellten nCPAP-Therapie mussten für die Endothelin-Plasmaspiegel-Auswertungen 40 Patienten ausgeschlossen werden.

1. Charakterisierung der Kontroll- und Patientengruppe

	Kontrollgruppe (SG)	Patientengruppe (SA)
Studienteilnehmeranzahl (n)	57	365
Alter (Jahre)*	49 [40 – 59]	61 [53 – 67]
Geschlecht: weiblich (n)	16 (28,1 %)	79 (21,6 %)
AHI/h*	2,0 [0,9 – 3,8]	30,2 [15,0 – 53,9]
BMI (kg/m²)*	26,0 [23,9 – 29,1]	30,2 [27,4 – 33,5]
Raucher (n)	12 (21,1 %)	60 (16,4 %)
Medikamenteneinnahme (n)	27 (47,4 %)	304 (83,3 %)
Hypertonie (n)	20 (35,1 %)	240 (65,8 %)
KHK (n)	6 (10,5 %)	122 (33,4 %)
Diabetes mellitus (n)	1 (1,8 %)	74 (20,3 %)
Hyperlipidämie (n)	10 (17,5 %)	137 (37,5 %)
Atemwegserkrankungen (n)	7 (12,2 %)	51 (14,0 %)
HNO-Erkrankungen (n)	15 (26,3 %)	137 (37,5 %)
Allergie (n)	19 (33,3 %)	103 (28,2 %)
Schilddrüsenerkrankungen (n)	2 (3,5 %)	60 (16,4 %)
Nierenerkrankungen (n)	4 (7,0 %)	34 (9,3 %)
Lebererkrankungen (n)	5 (8,8 %)	38 (10,4 %)
Neurologische Erkrankungen (n)	1 (1,8 %)	34 (9,3 %)
Psychologische Erkrankungen (n)	8 (14,0 %)	36 (9,9 %)
Familiäre OSAS-Belastung (n)	9 (15,8 %)	46 (12,6 %)

* Median [Quartile 1 – 3]

Tabelle 6: Kontroll- und Patientengruppe

Die Gruppe der Schlafgesunden soll dazu dienen, einen entsprechenden Vergleichswert für den Endothelin-1-Plasmaspiegel zu entwickeln und die Allelhäufigkeiten für den Lys198Asn-Polymorphismus überprüfen zu können. Diese Gruppe eignet sich nicht generell als Kontrollgruppe, da sie zum einen verhältnismäßig klein (n = 57) ist und sich zum anderen in vielen wichtigen Aspekten (wie z.B. Alter (49 versus 61 Jahre) und BMI (26,0 versus 30,2 kg/m²)) von den Schlafapnoeikern unterscheidet (siehe Tabelle 6).

2. Endothelin-1

2.1. Endothelin-1-Plasmakonzentrationen Kontrollgruppe versus Patientengruppe

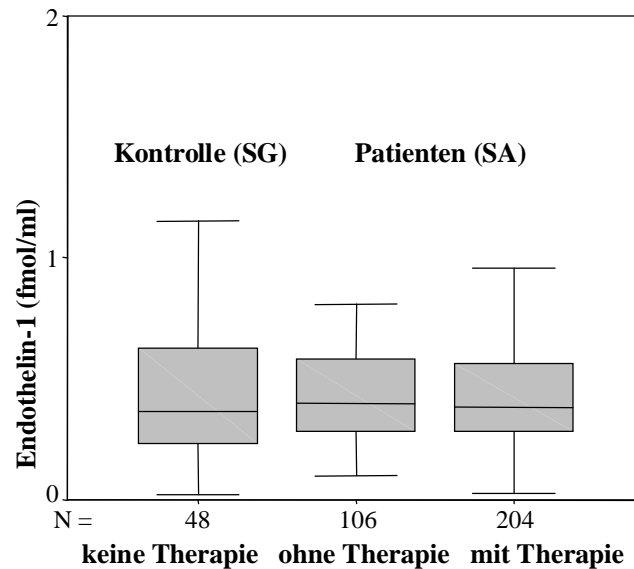


Abbildung 3: Boxplots für Endothelin-1-Plasmakonzentrationen

(aus Übersichtsgründen wird auf die Darstellung von Ausreißern (Werte zwischen innerer und äußerer Eingrenzung bzw. außerhalb äußerer Eingrenzung; siehe C 4.) verzichtet)

Die Endothelin-1-Plasmaspiegel (Median [Quartile 1 – 3]) liegen für die Kontrollgruppe bei 0,37 fmol/ml [0,23 – 0,62 fmol/ml]. Schlafapnoe-Patienten ohne nCPAP-Therapie haben eine Konzentration von 0,40 fmol/ml [0,28 – 0,59 fmol/ml] und solche mit nCPAP-Therapie eine Konzentration von 0,38 fmol/ml [0,28 – 0,57 fmol/ml] (siehe Abbildung 3). Demzufolge besteht offensichtlich kein signifikanter Unterschied in den Endothelin-1-Plasmaspiegeln zum einen zwischen der Kontroll- und Patientengruppe und zum anderen zwischen Schlafapnoe-Patienten vor und unter Therapie. Diese Annahme konnte durch den Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,817$) bestätigt werden.

Des Weiteren ist anzumerken, dass die medianen Endothelin-1-Werte für beide Gruppen in dem vom Kit-Hersteller angegebenen Normbereich 0,2 bis 0,7 fmol/ml liegen.

2.2. Endothelin-1-Plasmaspiegel und Apnoe-Hypopnoe-Index

2.2.1. Endothelin-1-Werte und AHI-Kategorien

Mit Hilfe des Apnoe-Hypopnoe-Index wird der Schweregrad des Schlafapnoe-Syndroms beurteilt:

- Kategorie 1 (mild) → $5/h < AHI < 15/h$,
- Kategorie 2 (moderat) → $15/h < AHI < 30/h$,
- Kategorie 3 (ausgeprägt) → $AHI > 30/h$.

Im Folgenden wird untersucht, ob sich der Endothelin-1-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad der Erkrankung verändert. Hierfür werden nur die bisher unbehandelten Schlafapnoe-Patienten eingeschlossen.

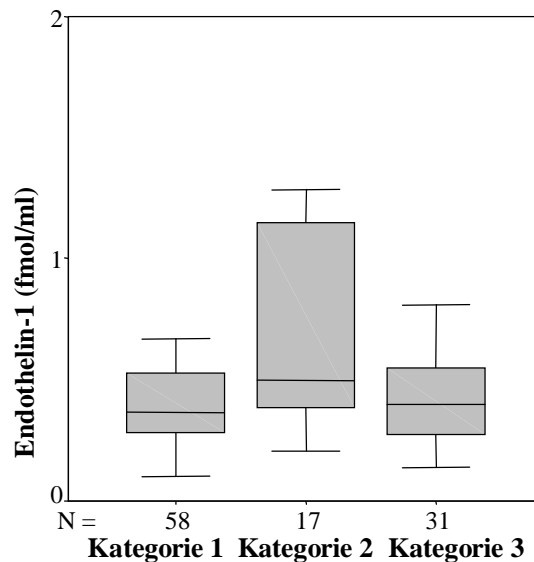


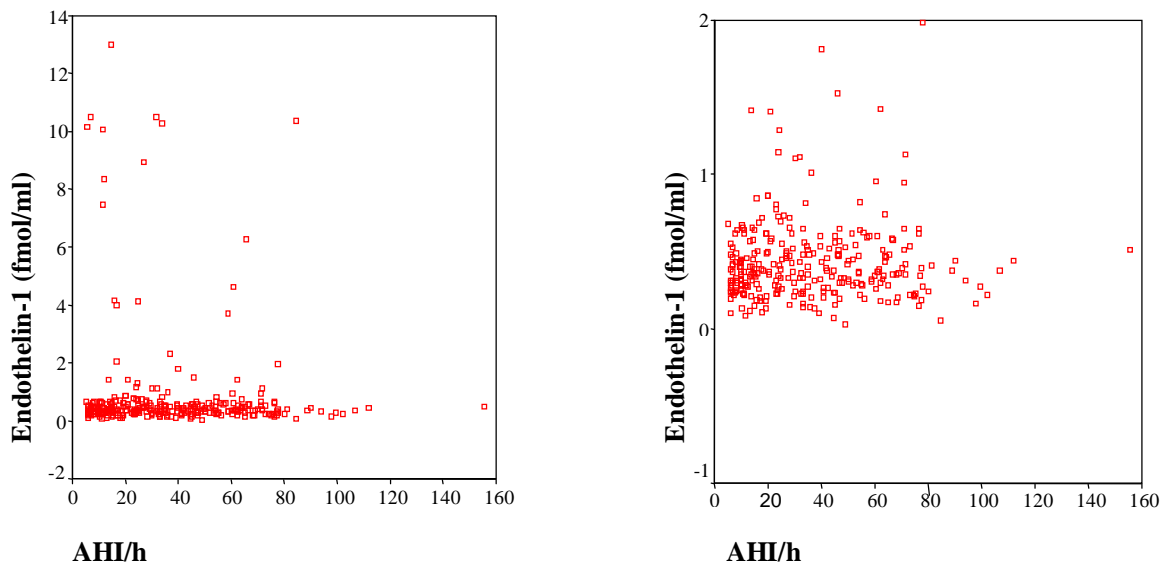
Abbildung 4: Boxplots für Endothelin-1-Plasmaspiegel bei Schlafapnoe-Patienten verschiedener AHI-Kategorien
(aus Übersichtsgründen wird auf die Darstellung von Ausreißern verzichtet)

Die Endothelin-1-Plasmaspiegel (Median [Quartile 1 – 3]) liegen für die Schlafapnoe-Patienten mit der AHI-Kategorie 1 bei 0,37 fmol/ml [0,28 – 0,49 fmol/ml], mit der AHI-Kategorie 2 bei 0,45 fmol/ml [0,31 – 0,69 fmol/ml] und mit der AHI-Kategorie 3 bei 0,38 fmol/ml [0,28 – 0,54 fmol/ml].

Die Endothelin-1-Werte der Patienten mit der AHI-Kategorie 2 sind zwar denen der Patienten mit der AHI-Kategorie 1 und 3 gegenüber erhöht, gleichzeitig sind jedoch die ET-1-Konzentrationen der Schlafapnoe-Patienten mit einem milden und einem ausgeprägten Krankheitsbild nahezu identisch (siehe Abbildung 4). Diese Ergebnisse lassen demnach keine signifikanten Unterschiede in den Endothelin-1-Plasmaspiegel der einzelnen AHI-Kategorien vermuten, was durch den p-Wert von 0,089 (Kruskal-Wallis-Test) gefestigt wird.

2.2.2. Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und AHI-Werte

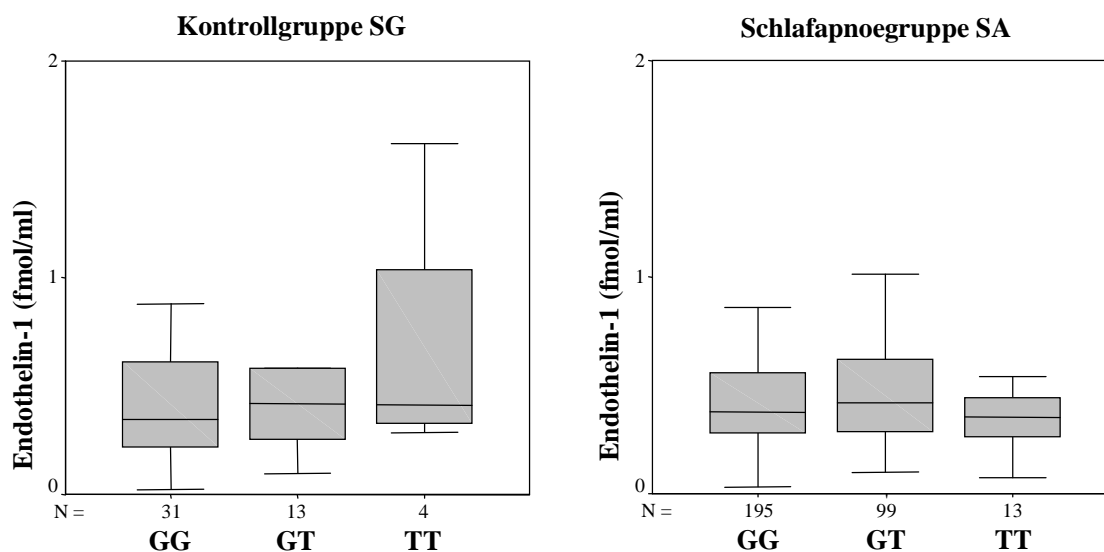
Um festzustellen, ob eventuell eine Korrelation zwischen den Endothelin-1-Plasmaspiegeln und den AHI-Werten vorliegt, werden diese beiden Merkmale gegeneinander aufgetragen (Abbildungen 5 und 6).



Abbildungen 5 und 6: Endothelin-1-Plasmaspiegel und AHI-Werte innerhalb der Patientengruppe
(links: Übersicht; rechts: vergrößerter Ausschnitt, ohne Ausreißer)

Sowohl in der Übersicht als auch in der Vergrößerung ist zu erkennen, dass die ET-1- und die AHI-Werte nicht miteinander korrelieren. Bei z.B. steigenden AHI-Werten zeigt sich keine tendenzielle Veränderung der Endothelin-1-Werte, die Punktwolke verläuft parallel zur Ordinate. Das Vorliegen von zwei linear unkorrelierten Merkmalen wird hier durch den Spearman'schen Korrelationskoeffizienten von 0,004 ($p = 0,94$) bestätigt.

2.3. Endothelin-1-Plasmaspiegel und Lys198Asn-Genotypen



Abbildungen 7 und 8: Boxplots für Endothelin-1-Plasmaspiegel der drei verschiedenen Lys198Asn-Genotypen
(aus Übersichtsgründen wird auf die Darstellung von Ausreißern verzichtet)

Die Abbildungen 7 und 8 sowie die Tabelle 7 verdeutlichen, dass eine unterschiedliche Verteilung der Endothelin-1-Werte in der Kontroll- im Vergleich zur Patientengruppe vorliegt. Bei den Kontrollen sind die ET-1-Konzentrationen der GT- und TT-Allelträger denen der GG-Träger gegenüber etwas erhöht. Dieser Sachverhalt wird in der Patientengruppe hingegen nicht (bzw. nur teilweise) bestätigt. Hier sind zwar die ET-1-Werte der GT-Träger gegenüber denen der Wildtypen (GG) auch erhöht, die ET-1-Konzentrationen der Homozygot-Mutierten (TT) gegenüber denen der GG-Träger jedoch erniedrigt.

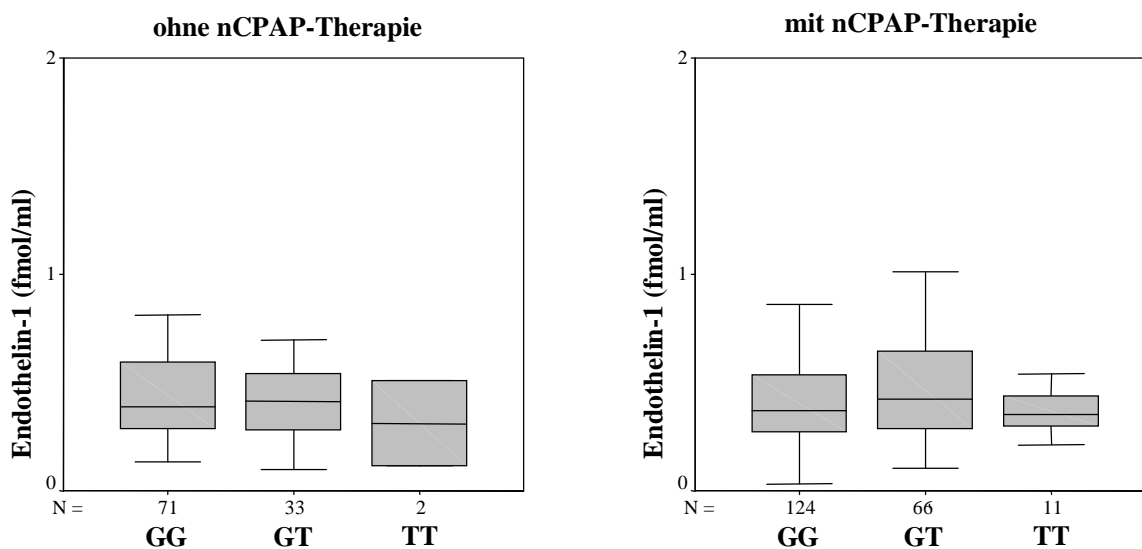
	Kontrollgruppe			Patientengruppe		
	GG	GT	TT	GG	GT	TT
Endothelin-1 (fmol/ml)*	0,35 [0,22 – 0,58]	0,42 [0,25 – 0,58]	0,41 [0,35 – 0,75]	0,38 [0,28 – 0,56]	0,42 [0,28 – 0,62]	0,35 [0,26 – 0,44]

* Median [Quartile 1 – 3]

Tabelle 7: Endothelin-1-Plasmakonzentrationen der drei verschiedenen Lys198Asn-Genotypen innerhalb der Kontroll- und Patientengruppe

Sowohl der p-Wert (Kruskal-Wallis-Test) für die Kontrollgruppe mit 0,718 als auch der p-Wert für die Patientengruppe mit 0,278 liegen deutlich über dem angestrebten Signifikanzniveau von 0,05. Demzufolge ergibt diese Studie keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen dem Endothelin-1-Plasmaspiegel und einem bestimmten Lys198Asn-Genotypus.

Die Endothelin-1-Werte der Allelträger (GT & TT) für den Lys198Asn-Polymorphismus sind im Vergleich zu denen der Wildtypen (GG) nicht signifikant verschieden.



Abbildungen 9 und 10: Boxplots für Endothelin-1-Plasmawerte der drei verschiedenen Lys198Asn-Genotypen bei SA-Patienten ohne bzw. mit nCPAP-Therapie (aus Übersichtsgründen wird auf die Darstellung von Ausreißern verzichtet)

	SA-Patienten ohne nCPAP			SA-Patienten mit nCPAP		
	GG	GT	TT	GG	GT	TT
Endothelin-1 (fmol/ml)*	0,39 [0,22 – 0,61]	0,41 [0,28 – 0,58]	0,31 [0,11 – 0,51]	0,37 [0,27 – 0,54]	0,42 [0,29 – 0,64]	0,35 [0,26 – 0,44]

* Median [Quartile 1 – 3]

Tabelle 8: Endothelin-1-Plasmakonzentrationen der drei verschiedenen Lys198Asn-Genotypen bei SA-Patienten ohne bzw. mit nCPAP-Therapie

In den vorliegenden Darstellungen wird die Gruppe der Schlafapnoe-Patienten weiterhin nach ihrem nCPAP-Langzeit-Therapiestatus (ohne/mit) aufgeteilt. Auch hier werden die Endothelin-1-Konzentrationen innerhalb der drei verschiedenen Genotypen einander gegenübergestellt.

Anhand der Abbildungen 9 und 10 sowie der Tabelle 8 ist zu erkennen, dass die ET-1-Werte der Schlafapnoe-Patienten ohne und mit nCPAP-Therapie innerhalb der Genotypen ähnlich verteilt sind. Der jeweils durchgeführte Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass sowohl bei den OSA-Patienten ohne nCPAP-Therapie ($p = 0,729$) als auch mit nCPAP-Therapie ($p = 0,3$) keine signifikanten Unterschiede in den ET-1-Spiegeln zwischen den drei Genotypen bestehen.

2.4. Endothelin-1-Werte bei familiär vorbelasteten versus unbelasteten Patienten

In einem anamnestischen Fragebogen (der von den Patienten selbst ausgefüllt wurde) ist unter anderem erfragt worden, ob Fälle der Schlafapnoe innerhalb der Familie bekannt seien. Dabei sind diese Familienmitglieder benannt worden: Vater, Mutter, Bruder, Schwester, Sohn, Großvater, Großmutter, Onkel und Neffe. Im Folgenden werden familiär unbelastete und vorbelastete OSA-Patienten gegenübergestellt und deren Endothelin-1-Konzentrationen miteinander verglichen.

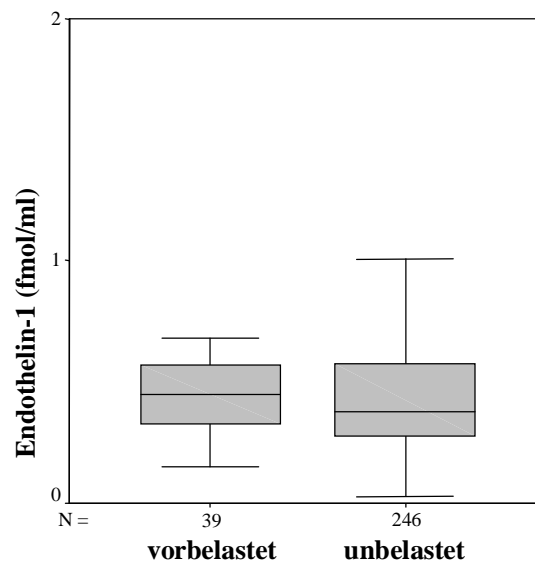


Abbildung 11: Boxplots für Endothelin-1-Plasmaspiegel von familiär vorbelasteten und unbelasteten Schlafapnoe-Patienten
(aus Übersichtsgründen wird auf die Darstellung von Ausreißern verzichtet)

Wie der Abbildung 11 zu entnehmen ist, sind die ET-1-Werte (Median [Quartile 1 – 3]) der familiär vorbelasteten (0,45 [0,32 – 0,58]) denen der familiär unbelasteten (0,38 [0,27 – 0,58]) Schlafapnoe-Patienten gegenüber erhöht. Aufgrund der unterschiedlich großen Stichproben ($n = 39$ versus $n = 246$) ergibt der Mann-Whitney-U-Test einen p-Wert von 0,154. Demzufolge herrscht kein signifikanter Unterschied in den Endothelin-1-Plasmaspiegeln zwischen familiär vorbelasteten und familiär unbelasteten OSA-Patienten.

Mit Hilfe der Fragebögen konnte weiterhin eine familiäre Häufung des Schlafapnoe-Syndroms nachgewiesen werden. 39 OSA-Patienten geben diesbezüglich eine positive Familienanamnese an. Demnach ist aus eigenanamnestischen Gesichtspunkten bei etwa jedem siebten Schlafapnoe-Patienten (13,7 %) mindestens ein Erkrankungsfall innerhalb der jeweiligen Familie bekannt.

2.5. Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und mögliche Einflussfaktoren

Um feststellen zu können, ob der Endothelin-1-Plasmaspiegel der Schlafapnoe-Patienten von bestimmten Lebensumständen oder Erkrankungen beeinflusst wird, sind sämtliche Angaben aus den Fragebögen ausgewertet und die entsprechenden ET-1-Werte gegenübergestellt worden.

Dabei handelt es sich um folgende Merkmale:

- Alter (25 – 45 J., 46 – 65 J., 66 – 85 J.),
- Geschlecht (weiblich, männlich),
- BMI ($< 30 \text{ kg/m}^2$ und $\geq 30 \text{ kg/m}^2$),
- Nikotinabusus (nie, früher, jetzt),
- Medikamenteneinnahme (ja, nein),
- Arterielle Hypertonie (ja, nein),
- KHK (ja, nein),
- Diabetes mellitus (ja, nein),
- Hyperlipidämie (ja, nein),
- Atemwegserkrankungen (ja, nein),
- HNO-Erkrankungen (ja, nein),
- Allergien (ja, nein),
- Schilddrüsenerkrankungen (ja, nein),
- Nierenerkrankungen (ja, nein),
- Lebererkrankungen (ja, nein),
- Neurologische Erkrankungen (ja, nein),
- Psychische Erkrankungen (ja, nein).

In dem überwiegenden Anteil der Fälle zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Endothelin-1-Konzentrationen. Stellvertretend werden drei Merkmale näher beschrieben (siehe Tabelle 9).

Einflussfaktor	ja		nein	
	Anzahl (n)	ET-1-Werte (fmol/ml)*	Anzahl (n)	ET-1-Werte (fmol/ml)*
Geschlecht: weiblich			71 (23,1 %)	0,39 [0,28 – 0,55]
männlich	236 (76,9 %)	0,39 [0,28 – 0,57]		
KHK:	92 (30,0 %)	0,39 [0,30 – 0,54]	215 (70,0 %)	0,38 [0,27 – 0,58]
Neurologische Erkrankungen:	28 (9,1 %)	0,42 [0,24 – 0,55]	279 (90,9 %)	0,39 [0,28 – 0,58]

* Median [Quartile 1 – 3]

Tabelle 9: Endothelin-1-Plasmakonzentrationen betrachtet nach verschiedenen Einflussfaktoren

Männliche und weibliche Schlafapnoe-Patienten weisen nahezu identische Endothelin-1-Plasmaspiegel auf und auch OSA-Patienten mit und ohne KHK unterscheiden sich in ihren ET-1-Werten nicht wesentlich voneinander (0,39 fmol/ml versus 0,38 fmol/ml; siehe Tabelle 9). Schlafapnoe-Patienten, die unter neurologischen Erkrankungen (Tumore, Epilepsie, Migräne, zerebrale Durchblutungsstörungen, Apoplex) leiden, zeigen nur eine tendenzielle Erhöhung ihrer Endothelin-1-Konzentrationen gegenüber denen, die frei von neurologischen Beschwerden sind (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,100$).

Insgesamt drei der untersuchten Merkmale rufen signifikante Unterschiede in den Endothelin-1-Plasmaspiegeln hervor. Das Vorhandensein von Atemwegserkrankungen, HNO-Erkrankungen oder arterieller Hypertonie scheint einen Einfluss auf die Endothelin-1-Werte bei Schlafapnoe-Patienten zu haben. Diese Befunde sollen im Folgenden näher erläutert werden.

2.5.1. Endothelin-1-Plasmaspiegel und Atemwegserkrankungen

Die Endothelin-1-Plasmaswerte von OSA-Patienten mit und ohne Atemwegserkrankungen sind in Abbildung 12 gegenübergestellt. „Atemwegserkrankungen“ ist ein weit gefasster Begriff und beinhaltet in diesem Fall: Asthma bronchiale, chronische Bronchitits, COPD, Sarkoidose, chronischen Husten, Lungenembolie und -emphysem.

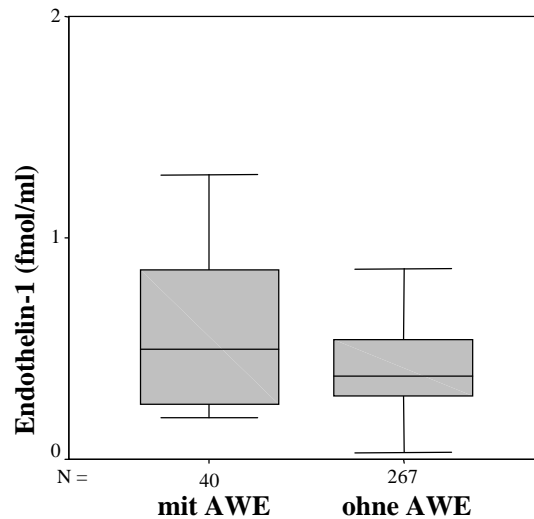


Abbildung 12: Boxplots für Endothelin-1-Plasmaspiegel von Schlafapnoe-Patienten mit und ohne Atemwegserkrankungen (AWE)
(aus Übersichtsgründen wird auf die Darstellung von Ausreißern verzichtet)

Die ET-1-Konzentrationen (Median [Quartile 1 – 3]) für Schlafapnoe-Patienten mit AWE liegen bei 0,50 fmol/ml [0,24 – 0,86 fmol/ml] und für Patienten ohne AWE bei 0,38 fmol/ml [0,28 – 0,54 fmol/ml]. Der Mann-Whitney-U-Test mit einem p-Wert von 0,039 bestätigt, dass der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant ist.

2.5.2. Endothelin-1-Werte und HNO-Erkrankungen

Beim Gegenüberstellen von OSA-Patienten mit und ohne HNO-Erkrankungen konnten ebenfalls signifikante Unterschiede in den Endothelin-1-Plasmakonzentrationen festgestellt werden. Das Merkmal „HNO-Erkrankungen“ umfasst bei unseren Patienten folgende Krankheiten: Nasenseptumanomalien mit Verengung der Atemwege, Nasenschleimhauthypertrophie bzw. trockene Nasenschleimhaut, Polypen, Tonsillenhypertrophie, Rhinitis, Sinusitis, Laryngitis, Schwerhörigkeit, Tinnitus aurium und rezidivierende Otitis media.

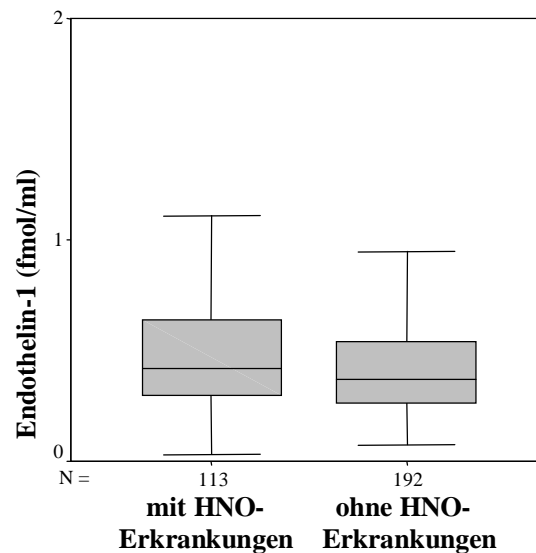


Abbildung 13: Boxplots für Endothelin-1-Plasmaspiegel von Schlafapnoe-Patienten mit und ohne HNO-Erkrankungen
(aus Übersichtsgründen wird auf die Darstellung von Ausreißern verzichtet)

Mit 0,42 fmol/ml [0,30 – 0,64 fmol/ml] sind die ET-1-Werte (Median [Quartile 1 – 3]) von Schlafapnoe-Patienten mit HNO-Erkrankungen höher als die von Patienten ohne HNO-Erkrankungen (0,37 fmol/ml [0,28 – 0,54 fmol/ml]) (siehe Abbildung 13). Der Unterschied ist statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,036$).

2.5.3. Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und arterielle Hypertonie

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, inwiefern hypertone Blutdruckwerte (Definition: systolisch > 140 mmHg; diastolisch > 90 mmHg) bei Schlafapnoe-Patienten mit einer Veränderung der Endothelin-1-Plasmaspiegel assoziiert sind. Dazu werden zunächst OSA-Patienten mit und ohne Bluthochdruck gegenübergestellt und deren Endothelin-1-Konzentrationen miteinander verglichen (siehe Abbildung 14).

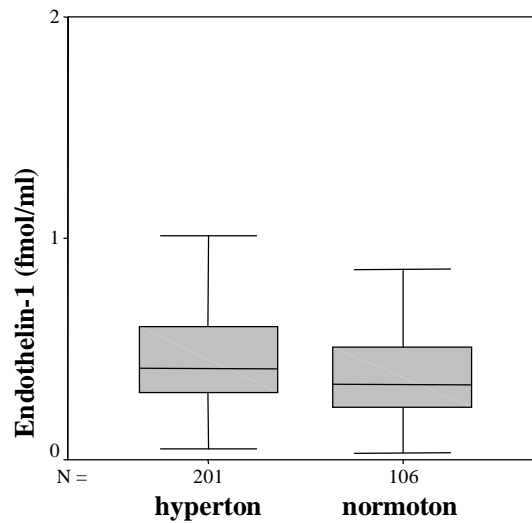


Abbildung 14: Boxplots für Endothelin-1-Plasmaspiegel von normo- und hypertonen Schlafapnoe-Patienten
(aus Übersichtsgründen wird auf die Darstellung von Ausreißern verzichtet)

Anhand dieser Analyse ist zu erkennen, dass die ET-1-Werte (Median [Quartile 1 – 3]) für Schlafapnoeiker mit arterieller Hypertonie bei 0,41 fmol/ml [0,30 – 0,60 fmol/ml] liegen während Patienten ohne Hypertonie einen Wert von 0,34 fmol/ml [0,24 – 0,50 fmol/ml] aufweisen. Der Mann-Whitney-U-Test ergibt einen p-Wert von 0,01 und bestätigt somit, dass die Endothelin-1-Konzentrationen der hyper- und normotonen OSA-Patienten signifikante Unterschiede aufweisen.

Da es neben dem Bluthochdruck einige andere chronische Erkrankungen (z.B. KHK, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie) und Medikamente (z.B. Diuretika, β -Blocker, ACE-Hemmer, Nitrate, Katecholamine) gibt, die einen Einfluss auf den Endothelin-1-Plasmaspiegel haben, wird im Folgenden eine Subgruppe von 30 (der insgesamt 57) Schlafgesunden und 91 (der insgesamt 307) Schlafapnoe-Patienten gebildet, die völlig frei von eben diesen Einflussfaktoren sind.

Dementsprechend konnten 30 normotone Schlafgesunde, 66 normotone und 25 hypertone OSA-Patienten analysiert werden.

Unter den 66 normotonen Schlafapnoeikern müssen 26 erst noch mit einer nCPAP-Therapie beginnen, wohingegen die restlichen 40 bereits eine effektive nCPAP-Therapie (im ambulanten Monitoring: $AHI \leq 5/h$) erhalten. Bei den 25 hypertonen OSA-Patienten stehen sich 13 noch untherapierte und 12 therapierte gegenüber.

	Normotone OSA-Patienten		Hypertone OSA-Patienten		Kontrollgruppe
	\emptyset nCPAP	nCPAP	\emptyset nCPAP	nCPAP	
Anzahl (n)	26	40	13	12	30
Endothelin-1 (fmol/ml)*	0,38 [0,27 – 0,63]	0,35 [0,23 – 0,48]	0,37 [0,28 – 0,51]	0,36 [0,22 – 0,47]	0,37 [0,26 – 0,56]
p-Wert	0,429		0,926		

* Median [Quartile 1 – 3]

Tabelle 10: Endothelin-1-Plasmaspiegel in einer Subgruppen-Analyse

Wie die Tabelle 10 zeigt, unterscheiden sich die ET-1-Werte der drei Subgruppen (Kontrollgruppe, normo- und hypertone Schlafapnoe-Patienten) nicht grundlegend voneinander, sondern bewegen sich alle in einem Intervall von 0,35 – 0,38 fmol/ml. Eine signifikante Erhöhung der Endothelin-1-Konzentrationen der OSA-Patienten mit arterieller Hypertonie gegenüber OSA-Patienten ohne arterielle Hypertonie bzw. normotonen Schlafgesunden kann hier nicht bestätigt werden. Des weiteren wird unter einer effektiven nCPAP-Therapie (bei normo- und hypertonen Schlafapnoe-Patienten) keine relevante Senkung der Endothelin-1-Plasmaspiegel beobachtet (0,38 vs. 0,35 fmol/ml $\rightarrow p = 0,429$; 0,37 vs. 0,36 fmol/ml $\rightarrow p = 0,926$), was im Einklang zu den Ergebnissen unter 2.1. steht.

3. Lys198Asn-Polymorphismus im Endothelin-1-Gen

3.1. Häufigkeitsverteilung des Lys198Asn-Polymorphismus

In einem Genpool (Population) sind Gene (bzw. Allele) mit gewissen Häufigkeiten vertreten, welche dem sogenannten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entsprechen. Mit Hilfe dieses Gleichgewichtes können die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen folgendermaßen berechnet werden: $(p + q)^2 = p^2 + 2 pq + q^2 = 1$. Dabei entspricht p^2 dem Genotypus GG, $2 pq$ dem Genotypus GT und q^2 dem Genotypus TT.

	Kontrollgruppe	Patientengruppe
Anzahl (n): GG	36	232
GT	16	117
TT	5	16
	} 57	} 365
relative Häufigkeit: G-Allel	0,772	0,796
T-Allel	0,228	0,204
χ^2-Test	2,344	0,065
p-Wert	0,126	0,798

Tabelle 11: Lys198Asn-Häufigkeitsverteilung innerhalb der Kontroll- und Patientengruppe

Die errechneten p-Werte von 0,126 und 0,798 (siehe Tabelle 11) liegen weit über dem angestrebten Signifikanzniveau von 0,05. Somit weicht die Genotyphäufigkeitsverteilung innerhalb der Kontroll- und der Patientengruppe nicht signifikant von den Hardy-Weinberg-Erwartungen ab. Die Häufigkeiten des G- und T-Allels befinden sich für beide Gruppen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Genotypverteilungen Kontroll- versus Patientengruppe

Um nun zu prüfen, ob sich die Genotyphäufigkeiten der Schlafapnoe-Patienten von denen der Schlafgesunden unterscheiden, werden diese für die jeweilige Gruppe dargestellt und anschließend miteinander verglichen.

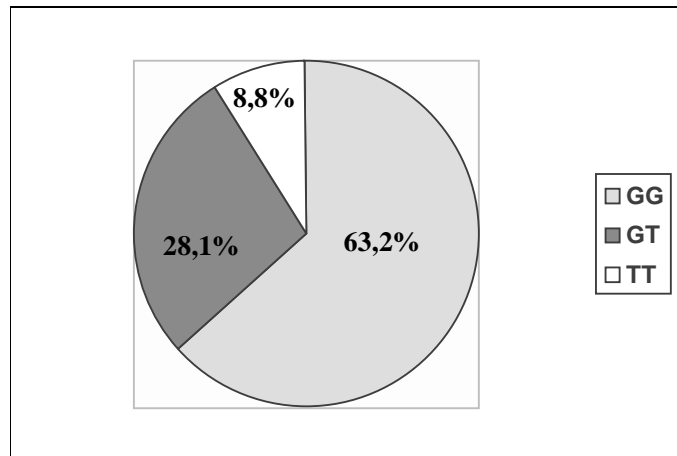


Abbildung 15: Genotypverteilung in der Kontrollgruppe

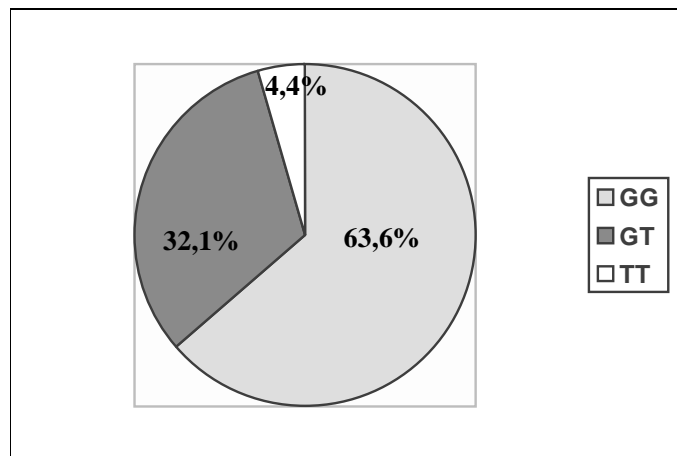


Abbildung 16: Genotypverteilung in der Patientengruppe

Anhand der Abbildungen 15 und 16 ist bereits gut zu erkennen, dass die einzelnen Genotyphäufigkeiten der Kontroll- und der Patientengruppe nicht bedeutend voneinander abweichen, sondern sehr ähnlich verteilt sind. Dies wird durch den p-Wert von 0,320 (χ^2 -Test) bestätigt.

3.2. Assoziation zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und dem Apnoe-Hypopnoe-Index

Im Folgenden wird untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und dem Schweregrad des OSAS besteht. Dazu werden die AHI-Werte für jeden der drei Genotypen bestimmt und einander gegenübergestellt (siehe Abbildung 17 und Tabelle 12).

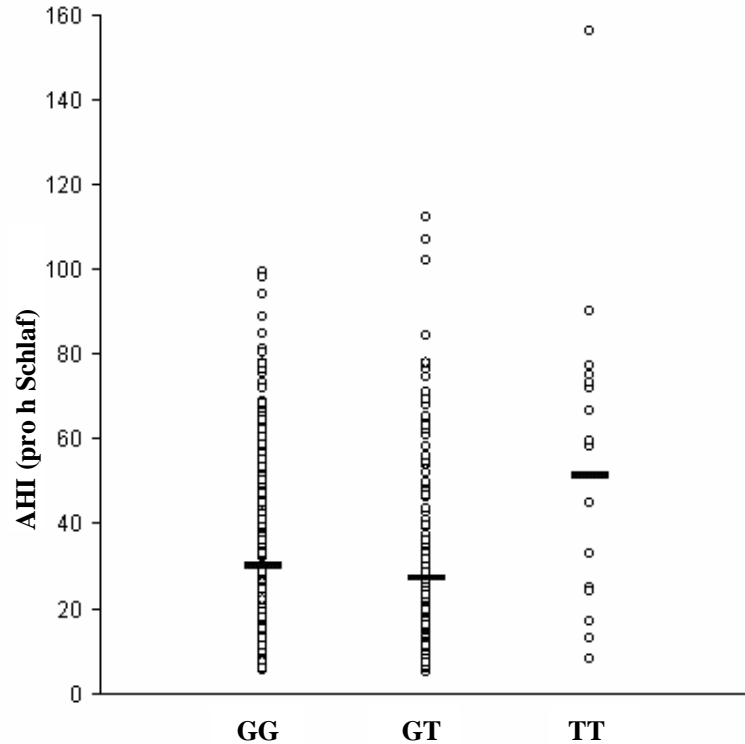


Abbildung 17: Effekt des Lys198Asn-Genotyps (GG → Wildtyp, GT → heterozygot-mutiert, TT → homozygot-mutiert) auf den Apnoe-Hypopnoe-Index innerhalb der Patientengruppe (— Median)

	Lys198Asn-Genotyp		
	GG	GT	TT
Anzahl (n)	232	117	16
AHI (pro h Schlaf)*	30,1 [14,1 – 51,7]	27,2 [16,1 – 52,0]	58,7 [24,3 – 74,5]

* Median [Quartile 1 – 3]

Tabelle 12: AHI-Werte in Abhängigkeit vom Lys198Asn-Genotyp innerhalb der SA-Gruppe

Mit einem Wert von 58,7/h Schlaf (Median) ist der AHI der TT-Genotypträger deutlich höher als der der GT- und GG-Genotypträger, wohingegen sich die AHI-Werte der Wildtypen und Heterozygot-Mutierten kaum unterscheiden (siehe Abbildung 17 und Tabelle 12). Bereits der Kruskal-Wallis-Test ergibt einen p-Wert von 0,049 und beschreibt signifikante Unterschiede in der AHI-Verteilung der drei Lys198Asn-Genotypgruppen. Mit Hilfe der p-Wert-Adjustierung nach Bonferroni-Holm bei den paarweisen Gruppenvergleichen zeigen sich signifikante Unterschiede in den AHI-Verteilungen für die TT-Träger versus GT-Träger ($p = 0,048$) und für die TT-Träger versus GG-Träger ($p = 0,028$). Der paarweise Gruppenvergleich der GG- und GT-Genotypträger dagegen ergibt mit einem p-Wert von 0,842 keinen signifikanten Unterschied in der AHI-Verteilung.

3.3. Zusammenhang zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und bestimmten klinischen Faktoren

Um herauszufinden, ob ein bestimmter Lys198Asn-Genotyp z.B. mit dem Auftreten einer bestimmten Erkrankung oder anderen klinischen Faktoren assoziiert ist, werden die OSA-Patienten nach ihrem Genotyp aufgeteilt und anschließend die jeweiligen Parameter miteinander verglichen. Dabei handelt es sich um folgende Merkmale:

- Alter,
- Geschlecht (weiblich),
- BMI,
- Arterielle Hypertonie,
- KHK,
- Diabetes mellitus,
- Hyperlipidämie,
- Atemwegserkrankungen,
- HNO-Erkrankungen,
- Allergien,
- Schilddrüsenerkrankungen,
- Nierenerkrankungen,
- Lebererkrankungen,
- Neurologische Erkrankungen,
- Psychische Erkrankungen.

Die einzelnen Lys198Asn-Genotypen unterscheiden sich bezüglich der drei Charakteristika Alter, Geschlecht und BMI nicht auffällig voneinander (siehe Tabelle 13), ein Zusammenhang zwischen einem spezifischen Genotypus und einem der Merkmale ist nicht erkennbar.

	Lys198Asn-Genotyp		
	GG	GT	TT
Alter (Jahre)*	59 [50 – 65]	58 [50 – 64]	55 [48 – 60]
Geschlecht: weiblich	22,8 %	18,8 %	25,0 %
BMI (kg/m²)*	30,3 [27,4 – 33,7]	29,7 [27,0 – 33,2]	31,1 [28,1 – 37,2]

* Median [Quartile 1 – 3]

Tabelle 13: Klinische Charakteristika der Schlafapnoe-Patienten in Abhängigkeit vom Lys198Asn-Genotyp

Die meisten der aufgezählten Erkrankungen treten nicht häufiger bei einem bestimmten Lys198Asn-Genotyp auf. Nur bei Diabetes mellitus und Allergien finden sich auffällige Unterschiede, auf welche anschließend näher eingegangen wird.

3.3.1. Assoziation zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und Diabetes mellitus

Werden die Schlafapnoeiker in Patienten mit und ohne Diabetes mellitus unterteilt und die dazugehörigen Lys198Asn-Genotypverteilungen miteinander verglichen (siehe Abbildung 18), so fällt auf, dass es in der Gruppe ohne Diabetes doppelt so viele GT-Genotypträger (36,0 %) wie in der Gruppe der Diabetes-Erkrankten (17,6 %) gibt. Der Anteil der TT-Träger steigt von 2,7 % auf 4,8 % und der Anteil der GG-Träger sinkt von 79,7 % auf 59,2 %.

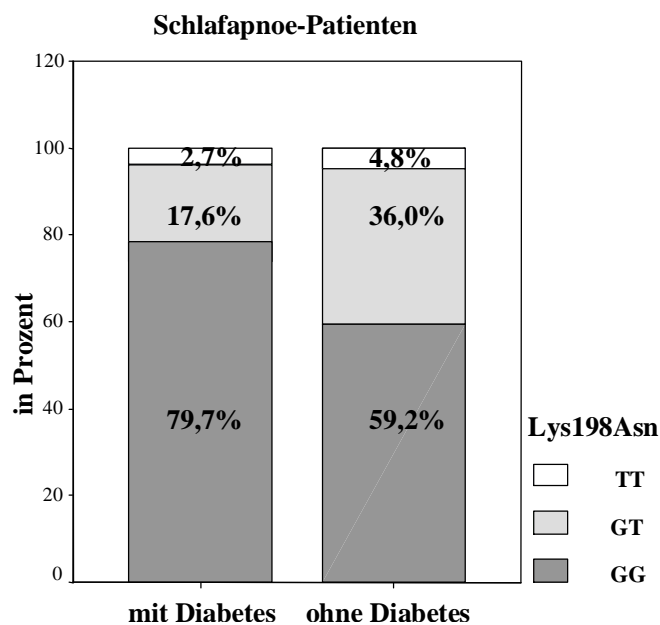


Abbildung 18: Lys198Asn-Genotypverteilung bei Schlafapnoe-Patienten mit und ohne Diabetes mellitus

Mit Hilfe des χ^2 -Tests ($p = 0,004$) können die gefundenen Unterschiede in der Lys198Asn-Genotypverteilung als statistisch signifikant verifiziert werden. Bei Schlafapnoe-Patienten mit einem Diabetes mellitus tritt häufiger der GG-Genotyp (korrigierte Residuen: $3,3 > 1,96$) und seltener der GT-Genotyp (korrigierte Residuen: $-3,0 < -1,96$) auf.

3.3.2. Zusammenhang zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und Allergien

Neben anderen anamnestischen Daten haben die Patienten auch Angaben zu ihrer Allergie-Anfälligkeit gemacht. Es wurden Unverträglichkeiten gegen Pollen (Heuschnupfen), diverse Lebensmittel, Hausstaubmilben, Wespen/Bienen, Tierhaare, verschiedene Medikamente, Nickel/Chrom, Gummi/Latex, Tenside und Kälte angegeben.

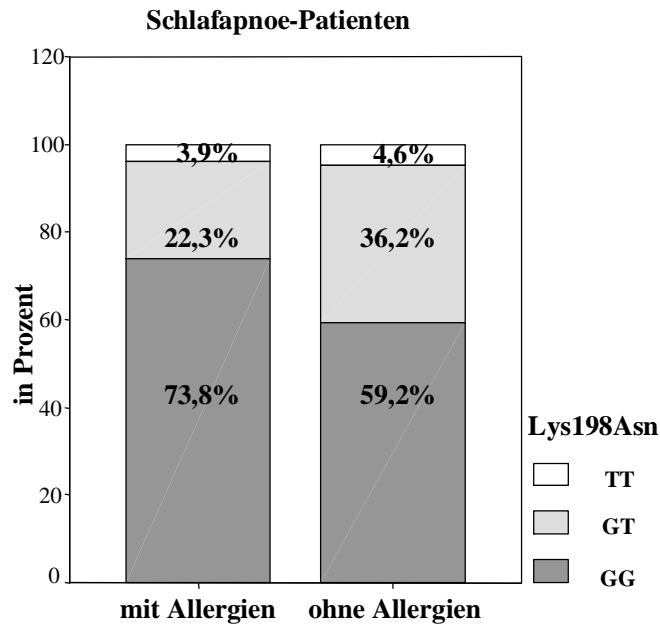


Abbildung 19: Lys198Asn-Genotypverteilung bei Schlafapnoe-Patienten mit und ohne Allergien

Abbildung 19 zeigt, dass sich eine ähnliche Verschiebung der Genotypverteilung wie beim Diabetes mellitus ergibt (siehe Abbildung 18). Bei den Schlafapnoe-Patienten ohne Allergien kommen ebenfalls mehr (ca. 1,6 mal mehr) Heterozygot-Mutierte vor, der Anteil der TT-Träger ist höher und der Anteil der GG-Träger ist niedriger. Der p-Wert von 0,028 (χ^2 -Test) beschreibt dies als einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Allergien und einem bestimmten Lys198Asn-Genotyp. Bei Schlafapnoe-Patienten mit Allergien ist dementsprechend der Wildtyp häufiger (korrigierte Residuen: 2,6 > 1,96) und der GT-Genotyp seltener (korrigierte Residuen: -2,5 < -1,96) vertreten.

4. Apnoe-Hypopnoe-Index

4.1. Assoziation zwischen dem AHI und dem Lys198Asn-Genotyp, dem BMI und dem Geschlecht

Werden die Schlafapnoe-Patienten nach ihrem jeweiligem Körpergewicht aufgeteilt, so wird deutlich, dass Adipositas den Effekt des homozygoten TT-Genotyps auf den AHI modifiziert. Bei den insgesamt 191 übergewichtigen Schlafapnoe-Patienten ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) besteht eine starke Assoziation zwischen dem Lys198Asn-Genotyp und dem AHI (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,005$). In der Gruppe der 173 Normalgewichtigen hingegen kann ein solcher Zusammenhang nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$) (siehe Abbildung 20).

In der Adipositas-Gruppe ergeben die paarweisen Gruppenvergleiche signifikante Unterschiede in den AHI-Verteilungen für die TT-Träger versus GT- und GG-Träger (nach Bonferroni-Holm adjustierte p-Werte: 0,018 bzw. 0,001). Die AHI-Werte (Median [Quartile 1 – 3]) der TT-Träger (71,7 [58,0 – 77,0]) sind höher als die der GT-Träger (41,0 [20,0– 63,8]) und die der GG-Träger (35,0 [18,4 – 58,6]) (siehe Abbildung 20).

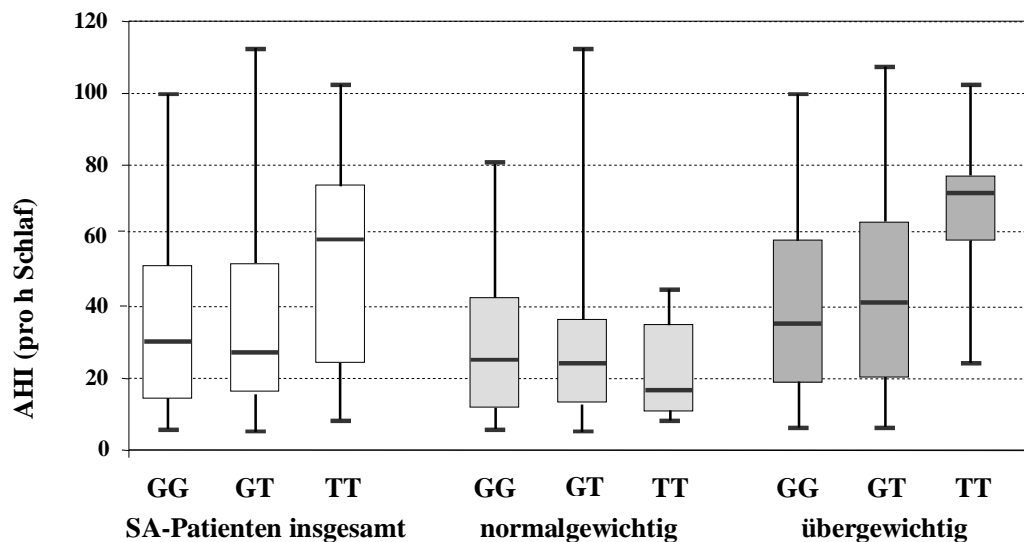


Abbildung 20: Zusammenhang zwischen dem AHI/h, dem Lys198Asn-Genotyp und dem Körpergewichtsstatus in der Gruppe der Schlafapnoe-Patienten

Die Vermutung, dass der TT-Träger-Status und der BMI miteinander interagieren und den AHI-Wert beeinflussen, wird mit Hilfe der multiplen linearen Regression bestätigt. Als erstes wird diese ohne die Berücksichtigung von Interaktionstermen ([BMI; genetischer Faktor], [BMI; Geschlecht], [genetischer Faktor; Geschlecht]) durchgeführt, wohingegen beim zweiten Ansatz eben diese Terme eingeschlossen werden. Das Modell ohne die Interaktionsterme zeigt signifikante Einflüsse des TT-Genotyps ($p = 0,007$), des BMI ($p < 0,001$) und des Geschlechts ($p = 0,018$) auf den AHI. Der BMI, der TT-Träger-Status bezüglich Lys198Asn und das männliche Geschlecht werden demnach als signifikante Risikofaktoren für einen hohen Apnoe-Hypopnoe-Index identifiziert.

Für die anschließende multiple lineare Regression mit dem Einschluss von Interaktionstermen werden nun die linearen Anteile der drei genannten Faktoren berücksichtigt, um zu untersuchen, ob zusätzliche Effekte bestehen, wenn bestimmte Kombinationen des TT-Genotyps und des Geschlechts vorliegen – oder ob sich der Einfluss des BMI in Abhängigkeit vom TT-Träger-Status und Geschlecht verändert. Als Resultat dieses Modells zeigt sich ein signifikanter Einfluss des BMI auf den AHI ($p < 0,001$) sowie signifikante Interaktionsterme für den TT-Genotyp mit dem BMI ($p = 0,002$) und für den BMI mit dem Geschlecht ($p = 0,010$).

Demzufolge besteht eine positive Assoziation zwischen dem BMI und dem AHI, wobei die beiden Faktoren Geschlecht und TT-Träger-Status bezüglich Lys198Asn die Abhängigkeit des AHI vom BMI modifizieren.

Wird der BMI um eine Einheit (1 kg/m^2) erhöht, so steigt der AHI im Mittel:

- für Männer mit dem Lys198Asn-Genotyp GG oder GT um 1,63 Einheiten (pro h Schlaf),
- für Frauen mit dem Lys198Asn-Genotyp GG oder GT um 1,39 Einheiten (pro h Schlaf),
- für Männer mit dem TT-Träger-Status um 2,18 Einheiten (pro h Schlaf) und
- für Frauen mit dem TT-Träger-Status um 1,94 Einheiten (pro h Schlaf).

Die AHI-Erhöhung ist also bei den TT-Trägern im Vergleich zu den GT- und GG-Trägern größer – für die Männer um einen Faktor von 1,33 und für die Frauen um einen Faktor von 1,39 (siehe Abbildung 21).

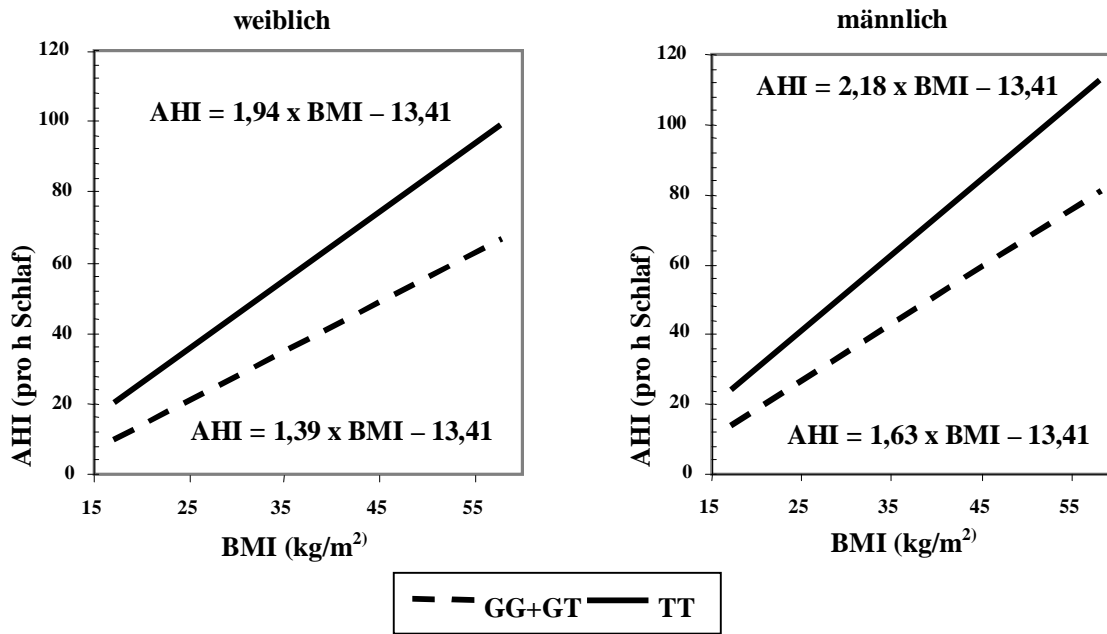


Abbildung 21: Prädiktive AHI-Werte der verschiedenen Lys198Asn-Genotypen, getrennt nach Geschlecht

E DISKUSSION

1. Endothelin-1

Die Analysen der Studienteilnehmer-Plasmen mit Hilfe eines ELISA ergaben folgende Endothelin-1-Konzentrationen:

- Kontrollgruppe SG (n = 48): 0,37 fmol/ml [0,23 – 0,62 fmol/ml],
- Patientengruppe SA mit n-CPAP (n = 204): 0,38 fmol/ml [0,28 – 0,57 fmol/ml],
- Patientengruppe SA ohne n-CPAP (n = 106): 0,40 fmol/ml [0,28 – 0,59 fmol/ml].

Alle genannten Werte befanden sich zudem innerhalb des vom Hersteller angegebenen Normbereichs (0,2 – 0,7 fmol/ml).

Die ET-1-Konzentrationen der Schlafgesunden unterschieden sich nicht signifikant von denen der Schlafapnoe-Patienten. Folglich scheint das Vorhandensein eines OSAS keinen Einfluss auf den ET-1-Plasmaspiegel zu nehmen.

Des weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den ET-1-Werten der SA-Patienten mit und ohne n-CPAP-Langzeit-Therapie aufgezeigt werden. Der Einsatz einer effektiven n-CPAP-Therapie (im ambulanten Monitoring: $AHI \leq 5/h$) verursacht demzufolge keine Änderung der ET-1-Plasmakonzentrationen.

Die Datenlage bezüglich der Endothelin-1-Plasmaspiegel bei Schlafapnoe-Patienten und einer möglichen Wirkung der n-CPAP-Therapie auf die ET-1-Konzentrationen ist widersprüchlich. Bestätigt werden unsere Ergebnisse von folgenden drei Arbeiten: Grimpen et al. (2000), Moller et al. (2003) und Jordan et al. (2005). Diese Autoren konnten zum einen keine signifikante Erhöhung der ET-1-Plasmaspiegel bei OSA-Patienten gegenüber entsprechenden Kontrollen feststellen, und zum anderen konnte weder nach Kurzzeit- noch nach Langzeit-nCPAP-Therapie eine signifikante Änderung (im Sinne einer Senkung) der ET-1-Werte bei OSA-Patienten beobachtet werden.

Kontroverse Auffassungen vertreten dahingegen Saarelainen et al. (1997), Phillips et al. (1999), Hu et al. (2002), Li et al. (2004) und Zhang et al. (2004). Saarelainen et al. stellten z.B. signifikant erhöhte ET-1-Werte bei einer kleinen Gruppe (n = 17) normo- und hypertensiver Schlafapnoe-Patienten fest, konnten nach einer dreimonatigen nCPAP-Therapie jedoch keine bedeutende Senkung der ET-1-Konzentrationen nachweisen.

Phillips et al. zeigten bei insgesamt 22 Schlafapnoe-Patienten einen signifikanten Endothelin-1-Anstieg nach vier Stunden Schlaf ohne nCPAP-Therapie und einen signifikanten ET-1-Abfall nach weiteren fünf Stunden Schlaf mit nCPAP-Therapie. Wie die meisten anderen Publikationen auch, untersuchten die beschriebenen zwei Arbeiten nur eine geringe Anzahl von Patienten. Unsere Studie hingegen berücksichtigte eine mehr als 10fach höhere OSA-Patientenanzahl ($n = 365$ versus $\emptyset n = 25$). Fehlerhafte Resultate aufgrund einer zu klein gewählten Stichprobe können in diesem Fall daher nahezu ausgeschlossen werden.

Außerdem kam es bei einigen Veröffentlichungen trotz der bereits sehr klein gewählten Teilnehmerzahl zum Einschluß von Schlafapnoe-Patienten ungeachtet ihrer Krankengeschichte [Phillips et al.; Zhang et al. untersuchten Patienten mit OSAS und KHK.] und einer erheblichen Medikamentenanamnese [Phillips et al., Grimpen et al.]. Bei Moller et al., deren Ergebnisse sich mit den unseren decken, wurden nur SA-Patienten ohne sonstige Nebenerkrankungen und ohne jegliche Medikamenteneinnahme eingeschlossen, was einen deutlichen Vorteil gegenüber den aufgeführten Publikationen bezüglich der Reliabilität darstellt.

Da es zirkadiane Schwankungen in den ET-1-Werten gibt, ist es weiterhin entscheidend, zu welchem Zeitpunkt die Blutentnahme stattfindet. In den genannten Arbeiten wurden die Blutentnahmen beispielsweise abends direkt vor dem Schlafengehen [Phillips et al., Grimpen et al., Jordan et al.], morgens während oder kurz nach dem Aufwachen [Saarelainen et al., Phillips et al., Grimpen et al., Jordan et al.] und/oder während der Nacht [Phillips et al., Grimpen et al., Jordan et al.] durchgeführt. Im vorliegenden Fall fanden sämtliche Blutentnahmen in einem eng definierten Zeitfenster (9.00 - 11.00 Uhr) am Vormittag statt. Diese unterschiedlichen Vorgehensweisen könnten bereits die Diskrepanzen zwischen den Resultaten der einzelnen Veröffentlichungen erklären.

Besonders hervorzuheben ist die Studie von Jordan et al., da neben dem Endothelin-1 auch die Vorläufersubstanz big-Endothelin-1 bestimmt wurde. Hier kam die Arbeitsgruppe zu dem Ergebnis, dass nicht das ET-1, sondern das big-ET-1 bei OSA-Patienten erhöht ist. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass im Gegensatz zum ET-1 die Werte vom big-ET-1 unter einer nCPAP-Langzeit-Therapie signifikant sanken. Als mögliche Ursache dafür wurde die extrem kurze Halbwertszeit des ET-1 mit etwa 40 – 70 Sekunden gegenüber 23 Minuten beim big-ET-1 aufgeführt. Dadurch könnte ein möglicher Anstieg des ET-1 maskiert werden.

Ebenfalls interessant ist, dass bei Jordan et al. der gleiche ELISA-Kit von BIOMEDICA® zur Bestimmung des ET-1 eingesetzt wurde wie bei unserer Studie. Dies macht die Endothelin-1-Plasmakonzentrationen besonders gut vergleichbar, und tatsächlich unterscheiden sie sich in ihrer Größenordnung nicht voneinander.

Wie bereits erwähnt, gibt es eine sehr große Auswahl kommerziell erwerbbarer Antikörper-Kits, weshalb keine allgemein gültigen Referenzwerte für das ET-1 verfügbar sind. Im Allgemeinen besitzen die Sandwich-Enzym-Immunoassays (ELISA) gegenüber den Radio-Immunoassays (RIA) jedoch eine weitaus höhere Spezifität, was unter anderem auf die unterschiedlichsten Extraktionsmöglichkeiten vor den jeweiligen Radio-Immunoassays zurückzuführen ist [Shaw et al. 2000]. Diesbezüglich ist auffällig, dass sämtliche Autoren, die erhöhte ET-1-Plasmaspiegel bei Schlafapnoe-Patienten nachwiesen, mit RIAs gearbeitet haben [Saarelainen et al., Phillips et al., Hu et al.]. Jene Studien, die keine erhöhten Endothelin-1-Werte feststellen konnten [Moller et al., Jordan et al.], nutzten hingegen – bis auf eine Ausnahme [Grimpen et al.] – einen spezifischen ELISA.

Außerdem verwendeten Saarelainen et al. zur Bestimmung des Endothelin-1 einen RIA, der eine 100%ige Kreuzreaktion gegenüber dem ET-3 (versus < 5 % beim genutzten Kit) zeigte. Dies könnte zu einer Überbewertung der eigentlich vorhandenen ET-1-Konzentrationen geführt haben. Phillips et al. arbeiteten mit einem RIA, der eine Kreuzreaktivität von 70 % gegenüber big-ET-1 (versus < 1 % beim genutzten Kit) aufwies. Werden neuere Ergebnisse von Jordan et al. berücksichtigt, könnten in diesem Fall die erhöht nachgewiesenen Endothelin-1-Werte bei OSA-Patienten fälschlicherweise durch die eigentliche Erhöhung des big-ET-1 verursacht worden sein.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten des weiteren keinen Zusammenhang zwischen den ET-1-Werten und dem Schweregrad des Schlafapnoe-Syndroms aufzeigen. Zum einen konnten keine signifikanten Unterschiede in den ET-1-Plasmakonzentrationen innerhalb der drei verschiedenen AHI-Kategorien (mild, moderat, ausgeprägt) aufgedeckt werden, und zum anderen bestand keine Korrelation zwischen den einzelnen ET-1- und AHI-Werten.

Grimpen et al. und Jordan et al. – die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den ET-1-Konzentrationen zwischen Schlafgesunden und SA-Patienten erkennen konnten – bestätigen unsere Annahme, dass keine Wechselbeziehung zwischen den Endothelin-1- und AHI-Werten besteht (Grimpen et al.: $r = 0,022 \rightarrow p = 0,92$).

Phillips et al. und Li et al. hingegen haben erhöhte Endothelin-1-Spiegel bei OSA-Patienten festgestellt und wiesen daher auch eine positive Korrelation zwischen dem ET-1 und dem Schweregrad des Schlafapnoe-Syndroms nach ($r = 0,51$ und $r = 0,334$). Mögliche Probleme dieser Arbeiten wurden bereits in vorangehenden Abschnitten diskutiert.

Sowohl für die Patienten- ($p = 0,278$) als auch für die Kontrollgruppe ($p = 0,718$) ergaben die Analysen keinen relevanten Zusammenhang zwischen den ET-1-Plasmakonzentrationen und dem Lys198Asn-Polymorphismus. Die ET-Werte der Allelträger (GT & TT) bezüglich der genannten Punktmutation waren im Vergleich zu denen der Wildtypen (GG) nicht signifikant erhöht. Auch der nCPAP-Langzeit-Therapiestatus (mit/ohne) zeigte keinen erkennbaren Effekt auf die ET-1-Plasmaspiegel innerhalb der drei verschiedenen Genotypen.

Bisher beschäftigten sich nur zwei Publikationen mit der funktionellen Beziehung zwischen den Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und dem Lys198Asn-Polymorphismus – jedoch nicht auf dem Gebiet der Schlafapnoe. Tanaka et al. (2004) prüften die ET-1-Plasmawerte von Hypertonie-Patienten und konnten keine signifikanten Unterschiede der ET-1-Spiegel in Abhängigkeit vom Lys198Asn-Genotyp feststellen. Dieses Resultat steht mit dem unseren in Einklang, wenn bedenkt wird, dass Bluthochdruck mit dem Schlafapnoe-Syndrom assoziiert ist. Barden et al. (2001) untersuchten Schwangere mit und ohne Präeklampsie und wiesen nach, dass der TT-Genotyp bezüglich der Lys198Asn-Variante mit signifikant höheren ET-1-Spiegeln verbunden ist. Auf den ersten Blick steht dieses Ergebnis in relativem Gegensatz zu dem unseren. Wird die genannte Arbeit jedoch genauer betrachtet, so fallen mehrere Problematiken auf. Die beschriebene Assoziation zwischen dem T-Allel und höheren ET-1-Konzentrationen konnte zum einen nur in der kombinierten Probandengruppe (Schwangere mit und ohne Präeklampsie) festgestellt werden, zum anderen war die statistische Relevanz bei einem Signifikanzniveau von 0,05 und dem hier angegebenen p-Wert von 0,046 grenzwertig. Weiterhin fiel auf, dass dieser Effekt sechs Wochen post partum nicht mehr existent war. Demnach könnten die gemessenen Erhöhungen der ET-1-Werte in dieser Studie auch allein dem Umstand der Gravidität zuzuschreiben sein. Schließlich kommt es während der Schwangerschaft neben teilweise erheblichen Gewichtszunahmen zu einer enormen Umstellung des gesamten Metabolismus (wie z.B. einer gesteigerten Insulinresistenz), was folglich auch zu Veränderungen im Endothelinsystem führen kann. Die eigentliche Ursache (Gravidität/Lys198Asn-Mutation) der erhöhten ET-1-Plasmaspiegel bei Barden et al. ist daher nicht eindeutig verifizierbar.

Unsere Analysen konnten des Weiteren keinen relevanten Unterschied in den Endothelin-1-Werten der Schlafapnoe-Patienten mit positiver Familienanamnese gegenüber denen mit negativer Familienanamnese bezüglich dieser Erkrankung aufdecken. Zwar waren die ET-1-Spiegel der familiär vorbelasteten Patienten mit 0,45 fmol/ml [0,32 – 0,58 fmol/ml] im Vergleich zu den familiär unbelasteten mit 0,38 fmol/ml [0,27 – 0,58 fmol/ml] tendenziell etwas höher, wegen der unterschiedlich großen Stichproben ($n = 39$ versus $n = 246$) war diese Differenz statistisch gesehen jedoch nicht signifikant ($p = 0,154$).

Vergleichbare Publikationen gibt es bisher leider nicht. Eine Arbeit von Ergul et al. (1996) z.B. ermittelte signifikant höhere ET-1-Konzentrationen bei schwarzen Hypertonie-Patienten gegenüber weißen Bluthochdruck-Patienten. Dies beschreibt ethnische Unterschiede in den Endothelin-1-Werten, was auf eventuell bestehende Vererbungsmodi innerhalb einer ethnischen Gruppe hinweisen könnte.

Die familiäre Häufung der Schlafapnoe gilt bereits als gesichert [z.B. Mathur & Douglas 1995], was auch in unserer Studie bestätigt werden konnte. Laut eigenanamnestischen Angaben wies jeder siebte der OSA-Patienten eine positive Familienanamnese auf. Allerdings wurde diese Information meist aus den schriftlich beantworteten Fragebögen der Patienten entnommen. Es wurde nach bereits bekannten Fällen eines Schlafapnoe-Syndroms innerhalb der jeweiligen Familie gefragt, was für viele einen weit gefassten Begriff darstellt. Dadurch kam es bei der statistischen Auswertung ebenfalls zur Berücksichtigung von Erkrankungsfällen des zweiten oder gar dritten Familiengrades, was die wissenschaftliche Relevanz einzelner Angaben mitunter einschränkt. Außerdem stützen sich die erwähnten Daten zum größten Teil auf die individuellen Angaben der Studienteilnehmer und konnten aus Kapazitätsgründen nur selten in einem persönlichen Gespräch hinterfragt und dementsprechend dokumentiert werden. Dies muss bei einer kritischen Betrachtung der einzelnen Ergebnisse mit ins Kalkül gezogen werden.

In dieser Arbeit wurden weitere Einflussfaktoren in Bezug auf eine eventuell vorhandene Wirkung auf die Endothelin-1-Plasmawerte untersucht (siehe Ergebnisteil 2.5.). Bis auf drei Ausnahmen (welche anschließend diskutiert werden) konnte bei allen anderen Analysen kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem jeweils getesteten Merkmal und den ET-1-Spiegeln festgestellt werden, weshalb im Folgenden nur fünf interessante Punkte (Alter, Geschlecht, BMI, Nikotinabusus, KHK) berücksichtigt werden.

Um den Einfluss des Alters prüfen zu können, wurden die Schlafapnoe-Patienten in drei verschiedene Altersgruppen (25 – 45 J., 46 – 65 J., 66 – 85 J.) aufgeteilt. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in den ET-1-Konzentrationen identifiziert ($p = 0,066$). Dieses Ergebnis steht mit bisher publizierten im Einklang [Battistini et al. 1993, Phillips et al. 1999, Grimpen et al. 2000].

Des Weiteren konnte keine spezifische Wirkung des Geschlechts auf die ET-1-Plasmaspiegel verifiziert werden, weil Männer (0,39 fmol/ml [0,28 – 0,57 fmol/ml]) und Frauen (0,39 fmol/ml [0,28 – 0,55 fmol/ml]) diesbezüglich nahezu identische Werte boten. Phillips et al. (1999) kamen zu dem gleichen Resultat, zwei andere Arbeiten vertreten gegenteilige Meinungen. Polderman et al. (1993) beschrieben signifikant höhere ET-1-Plasmakonzentrationen bei Männern, wohingegen Evans et al. (1996) die höheren ET-1-Spiegel bei Frauen fanden. Da jedoch Testosteron als Induktor und Östrogen als Inhibitor der Endothelin-1-Synthese gelten (siehe Anhang Tabelle A), sollte demzufolge eigentlich das männliche Geschlecht höhere ET-1-Spiegel aufweisen. Aufgrund der umfangreichen Stichprobengröße der vorliegenden Studie (im Gegensatz zu den hier zitierten) sind unsere Ergebnisse in diesem Fall recht zuverlässig.

Um das Merkmal „body mass index“ untersuchen zu können, wurden die OSA-Patienten der normalgewichtigen ($BMI < 30 \text{ kg/m}^2$) bzw. der übergewichtigen ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) Gruppe zugeordnet. Anhand dieser Gegenüberstellung konnten keine statistisch relevanten Differenzen in den ET-1-Werten ermittelt werden ($p = 0,657$). Somit übt der BMI keinen bedeutenden Einfluss auf die ET-1-Spiegel aus. Bisherige Veröffentlichungen sind sich dahingehend nicht einig. Drei Arbeiten [Saarelainen et al. 1997, Grimpen et al. 2000, Jordan et al. 2005] wiesen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem BMI und den ET-1-Konzentrationen bei SA-Patienten nach und unterstützen die genannten Resultate. Eine ausgeprägte Abhängigkeit des ET-1-Plasmaspiegels vom BMI konnten hingegen Ferri et al. (1995) aufdecken: nach einer dreimonatigen Gewichtsreduzierung sanken die ET-1-Werte bei normo- und hypertonen Übergewichtigen bedeutend. Auch Haapaniemi et al. (2000) und Glowinska et al. (2004) zeigten eine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Merkmalen.

Allerdings beschäftigten sich diese Studien mit Schlaganfallpatienten bzw. mit Personen, die bestimmte Atherosklerose-Risikofaktoren (Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus) aufwiesen. Besser vergleichbar mit unseren Resultaten sind daher die drei zuvor genannten Publikationen, weil sie sich mit dem gleichen Krankheitsbild auseinandersetzen.

Die Studienteilnehmer wurden in dem Anamnesebogen weiterhin bezüglich ihres Nikotinabusus befragt und anhand dieser Angaben anschließend in drei verschiedene Raucher-Kategorien (nie, früher, jetzt) eingeteilt. Zwischen den entsprechenden Endothelin-1-Plasmakonzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p = 0,751$). Demzufolge vermag weder eine konsequente Nikotinabstinenz noch jahrzehntelanges Rauchen eine positive bzw. negative Wirkung auf die ET-1-Werte auszuüben. Dieses Resultat bekräftigt die Befunde von Goerre et al. (1995), wobei lediglich grenzwertig erhöhte ET-1-Plasmaspiegel zehn Minuten nach dem Zigarettenkonsum ermittelt werden konnten. Anschließende ET-1-Bestimmungen (jeweils vier und acht Stunden nach Nikotin-Exposition) waren völlig unauffällig. Die erhöhten ET-1-Konzentrationen nach dem Zigarettenkonsum scheinen demnach nur ein vorübergehendes, auf die ersten zehn Minuten nach entsprechender Exposition beschränktes Phänomen darzustellen.

Schließlich konnte ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen den Endothelin-1-Werten und dem Vorhandensein von anamnestisch erfragter koronarer Herzkrankheit (KHK) erfasst werden. Die OSA-Patienten mit KHK (0,39 fmol/ml [0,30 – 0,54 fmol/ml]) wiesen nahezu die gleichen Konzentrationen auf wie jene ohne KHK (0,38 fmol/ml [0,27 – 0,58 fmol/ml]). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu bisherigen Publikationen [z.B. Ferri et al. 1997, Borries et al. 1996]. Beide Arbeiten beschrieben signifikant erhöhte ET-1-Plasmaspiegel bei Patienten mit koronaren Herzproblemen (stabile/instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt) gegenüber gesunden Kontrollen. Interessanterweise benannten Borries et al. auch hier das big-ET-1 als den sensitiveren Bestimmungsparameter im Vergleich zum Endothelin-1 (siehe Jordan et al. 2005). Anzumerken ist, dass sich die Datenerhebung bezüglich einer eventuell vorhandenen KHK bei unseren Schlafapnoe-Patienten lediglich auf eigenanamnestische Angaben der Patienten stützte. Es wurden keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt, um die Richtigkeit der angegebenen Informationen überprüfen zu können. Daher sind Falsch-Zuordnungen zu einer der jeweiligen Gruppen (mit/ohne KHK) aufgrund irrtümlicher Patientenangaben durchaus denkbar. Dies könnte das beschriebene Resultat verzerrt haben.

Bei der Gegenüberstellung von OSA-Patienten mit und ohne Atemwegserkrankungen (AWE) konnten signifikant höhere Endothelin-1-Konzentrationen bei den Patienten mit AWE (0,50 fmol/ml [0,24 – 0,86 fmol/ml]) im Vergleich zu jenen ohne AWE (0,38 fmol/ml [0,28 – 0,54 fmol/ml]) festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen zahlreicher bisheriger Studien. Als Beispiel sei hier die Arbeit von Roland et al. (2001) genannt, die erhöhte ET-1-Plasmaspiegel bei COPD-Patienten während einer Exazerbation der Erkrankung zeigte. Des Weiteren wiesen El-Gamal et al. (2002) erhöhte ET-1-Werte bei asthmatischen Kindern während der Akut- und Remissionsphase nach. Obwohl auch leicht erhöhte ET-1-Konzentrationen in der Asthma-Remissionsphase festgestellt wurden, waren diese Steigerungen doch eher mit akuten Atemwegsproblemen assoziiert.

Das vorliegende Resultat passt zwar zu den genannten Aussagen, jedoch bezogen sich diese Analysen abermals auf Patientenangaben. Dabei konnte häufig weder die entsprechende Diagnose noch der jeweilige Schweregrad der Erkrankung (einmaliges oder häufiges/chronisches Auftreten) verifiziert werden. Außerdem wurden AWE verschiedenster Genese (Asthma bronchiale, chronische Bronchitis, COPD, Sarkoidose, Lungenembolie und -emphysem) eingeschlossen. All dies relativiert die Aussage unseres Ergebnisses, auch wenn Endothelin-1 als potenter Bronchokonstriktor bekannt ist [Rubanyi & Polokoff 1994].

Mit 0,42 fmol/ml [0,30 – 0,64 fmol/ml] waren die Endothelin-1-Werte bei Schlafapnoe-Patienten mit HNO-Erkrankungen signifikant höher als bei SA-Patienten ohne HNO-Erkrankungen (0,37 fmol/ml [0,28 – 0,54 fmol/ml]). Demnach scheint das Vorhandensein von HNO-Erkrankungen bei OSA-Patienten eine relevante Steigerung der ET-1-Plasmaspiegel hervorzurufen. Allerdings schloß die Krankheitsdefinition unterschiedliche pathophysiologischen Zustände ein (z.B. Nasenseptumabnormalitäten, Polypen, Rhinitis, Otitiden, Tinnitus) und die Analyse stützte sich wiederum auf Patientenangaben.

Leider gibt es bisher keine vergleichbare Literatur, die die funktionelle Beziehung zwischen den beiden genannten Merkmalen betrachtet. Kurihara et al. (1994) ermittelten zwar Veränderungen der kraniofaszialen Struktur bei Endothelin-1-defizienten Knockout-Mäusen, führten aber keine plasmaanalytischen Untersuchungen durch. Für eine vergleichende Diskussion unseres Resultats sollten daher weitere Arbeiten auf diesem spezifischen Gebiet abgewartet werden.

Die Untersuchungen der Endothelin-1-Plasmawerte bezüglich des Vorhandenseins eines arteriellen Hypertonus (>140/90 mmHg) erbrachten sehr interessante Ergebnisse. Bei Einschluss sämtlicher OSA-Patienten, ungeachtet der jeweiligen Kranken- und Medikamentenanamnese, zeigten hypertone Schlafapnoeiker signifikant höhere ET-1-Konzentrationen ($p = 0,01$). Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass das Vorhandensein der Bluthochdruck-Erkrankung bei SA-Patienten den Endothelin-1-Plasmaspiegel bedeutend anhebt. In einer Subgruppen-Analyse, in die lediglich normotone Schlafgesunde und normo- bzw. hypertone OSA-Patienten eingeschlossen wurden, die frei von chronischen Erkrankungen waren und keine Medikamente einnahmen, unterschieden sich die ET-1-Konzentrationen innerhalb der drei genannten Subgruppen jedoch nicht signifikant voneinander. Eine statistisch relevante Erhöhung der ET-1-Werte aufgrund eines vorliegenden Bluthochdrucks konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Zudem verursachte auch eine effektive nCPAP-Therapie (bei normo- und hypertonen SA-Patienten) keine bedeutende Senkung der ET-1-Plasmaspiegel, was bereits zuvor beschriebene Ergebnisse bestätigt.

Die Mehrzahl der Publikationen berichten, dass die Endothelin-1-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit einem essentiellen Hypertonus normal oder nur minimal erhöht sind [Levin 1995, Schiffrin et al. 1999]. Saarelainen et al. (1997) stellten nur eine leichte, nicht signifikante Steigerung der ET-1-Werte bei hypertonen gegenüber normotonen OSA-Patienten fest. Auch Grimpen et al. (2000) konnten keine Korrelation zwischen dem ET-1-Spiegel und dem arteriellen Blutdruck nachweisen. Die Resultate von Saarelainen erscheinen diesbezüglich besonders valide, da hier nur Schlafapnoeiker mit einem normalen BMI und ohne weitere Nebenerkrankungen (die mit veränderten ET-1-Konzentrationen assoziiert sein könnten) eingeschlossen wurden. Kontroverse Ansichten hingegen teilen Phillips et al. (1999) und Li et al. (2004), beide Arbeiten untersuchten ebenfalls SA-Patienten. Phillips et al. beschrieben, dass Änderungen in den ET-1-Werten signifikant mit Änderungen des durchschnittlichen arteriellen Blutdrucks korrelierten. Li et al. fanden bedeutend höhere Endothelin-1-Serumspiegel bei hypertonen als bei normotonen OSA-Patienten ($p < 0,05$). Die Problematik dieser beiden Studien lag jedoch darin, dass wiederum Schlafapnoeiker mit zusätzlichen Erkrankungen eingeschlossen wurden. Bekanntermaßen sind das bei SA-Patienten oft Adipositas, Diabetes mellitus und KHK. All diese pathologischen Zustände sind besonders häufig mit einer arteriellen Hypertonie assoziiert und können außerdem zu veränderten Endothelin-1-Konzentrationen führen (siehe Anhang Tabelle B). Daher ist es auch möglich, dass die beschriebenen Endothelin-1-Erhöhungen zumindest teilweise durch die genannten Nebenerkrankungen verursacht wurden.

Die Diskrepanz in unseren Ergebnissen bezüglich eines möglichen Zusammenhangs zwischen den Endothelin-1-Werten und einem bestehenden Hypertonus bei Schlafapnoe-Patienten zeigt sehr deutlich, wie wichtig es ist, speziell bei der Analyse dieser Beziehung Nebenerkrankungen und zusätzliche Medikamenteneinnahmen auszuschließen. Dies ist aufgrund der Multimorbidität der OSA-Patienten häufig schwierig.

2. Lys198Asn-Polymorphismus im Endothelin-1-Gen

Die Genotypisierung der Studienteilnehmer ergab eine T-Allelfrequenz von 0,23 für die Schlafgesunden (n = 57) und 0,20 für die Schlafapnoeiker (n = 365). Damit liegen die einzelnen Allelhäufigkeiten sowohl für die Kontroll- (p = 0,126) als auch für die SA-Patienten-Gruppe (p = 0,798) innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts. Auch die Gegenüberstellung der verschiedenen Genotyphäufigkeiten (GG, GT, TT) ergab zwischen der Kontroll- und der OSA-Patienten-Gruppe keine signifikanten Unterschiede.

Bisher beschäftigten sich vier große Populationsstudien (siehe Tabelle 14) mit dem Lys198Asn-Polymorphismus des Endothelin-1-Gens. Alle Genotypanalysen zeigten Resultate, die ebenfalls nicht von den Hardy-Weinberg-Erwartungen abweichen. Außerdem deckten sich die berechneten T-Allelfrequenzen mit den unseren. Die Untersuchungen von Tired et al. (1999) (ECTIM-Studie) ergaben für eine große Kontrollgruppe von 760 europäischen Kaukasiern beispielsweise eine T-Allelfrequenz von 0,23. Dieser Wert ist mit dem unserer Kontrollgruppe identisch.

Publikation	Population	Fallzahl (n)	T-Allelfrequenz
Tired et al. (1999)			
ECTIM-Studie	Kaukasier (IRL, F)	760	0,23
Glasgow-Studie	Kaukasier (GB)	1282	0,24
Asai et al. (2001)	Japaner	2500	0,27
(Ohasama-Studie)	Kaukasier	2564	0,24
Jin et al. (2003)	Japaner	3272	0,28
Treiber et al. (2003)	Kaukasier (USA)	213	0,25
	Afroamerikaner	161	0,22

Tabelle 14: Darstellung von vier großen Populationsstudien bezüglich des Lys198Asn-Polymorphismus

Anhand unserer Untersuchungen konnte weiterhin eine deutliche Erhöhung des Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) bei TT-Genotypträgern (58,7/h) im Verhältnis zu GT- (27,2/h) und GG-Trägern (30,1/h) festgestellt werden. Im Kruskal-Wallis-Test waren diese Unterschiede der AHI-Verteilung innerhalb der einzelnen Genotypen signifikant ($p = 0,049$). Mit Hilfe der p-Wert-Adjustierung nach Bonferroni-Holm wurde dieser statistisch relevante Unterschied bei den paarweisen Gruppenvergleichen nur für TT- versus GT-Träger und für TT- versus GG-Träger bestätigt, nicht jedoch für GG- versus GT-Träger. Somit ist der homozygot-mutierte Genotyp mit einem sehr hohen AHI assoziiert, was einen wesentlichen Einfluss der Lys198Asn-Variante auf den Schweregrad des Schlafapnoe-Syndroms annehmen lässt. Diese Mutation im Endothelin-1-Gen könnte daher einen der multiplen genetischen Faktoren darstellen, welche in die Ätiologie und Pathophysiologie der OSA eingreifen. Vielleicht könnte die Genotypisierung von Gefährdeten und bereits diagnostizierten Schlafapnoeikern bezüglich des Lys198Asn zukünftig sogar zur Diagnose- bzw. Prognosefindung herangezogen werden. Allerdings bedarf es hierfür noch weiterer Arbeiten mit einer sehr viel größeren Anzahl von homozygot-mutierten T-alleltragenden SA-Patienten als bei unseren Untersuchungen. Aufgrund des kleinen Anteils von 4,4 % wiesen nämlich nur 16 der OSA-Patienten den TT-Genotypus auf.

Die vorliegende Studie ist bisher die einzige, die sich mit der funktionellen Beziehung zwischen dem Lys198Asn-Polymorphismus und einem entsprechenden Ausprägungsgrad der Schlafapnoe auseinandersetzt. Kurihara et al. (1994) konnten bei Endothelin-1-defizienten Knockout-Mäusen Veränderungen der kraniofaszialen Struktur und das Auftreten eines Hypertonus nachweisen. Beides sind Charakteristika, die häufig bei OSA-Patienten auftreten (siehe Tabelle 1). Außerdem wurde eine durchaus wichtige Rolle des ET-1 für die physiologisch normale Atemregulation bei Mäusen beschrieben [Kurihara et al. 1994, Kuwaki et al. 1996]. Auch Letzteres könnte für die Pathophysiologie der Schlafapnoe und somit für die beschriebene Assoziation zwischen der Lys198Asn-Mutation im ET-1-Gen und dem Schweregrad dieser Erkrankung entscheidend sein. Um unser Resultat und die damit verbundenen Schlussfolgerungen untermauern zu können, bedarf es jedoch zusätzlicher experimenteller Befunde bei OSA-Patienten.

Bisherige Publikationen beschrieben vielfältige Interaktionen zwischen dem Lys198Asn-Polymorphismus und verschiedenen Merkmalen. Deshalb wurden auch hier verschiedene Faktoren analysiert, um einen eventuell vorhandenen Zusammenhang mit einem spezifischen Genotypus bezüglich der genannten Mutation im Endothelin-1-Gen ermitteln zu können. Als besonders interessant erschien dabei die arterielle Hypertonie. Drei große voneinander unabhängige epidemiologische Studien (siehe Tabelle 14) zeigten eine signifikante Assoziation zwischen der Lys198Asn-Variante und einem erhöhten Blutdruck bei adipösen Personen in europäischen bzw. japanischen Populationen [Tiret et al. 1999, Asai et al. 2001, Jin et al. 2003]. Barden et al. (2001) konnten bei schwangeren Frauen einen erhöhenden Effekt des T-Allels auf die systolischen Blutdruck-Werte nachweisen. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben – wie auch die von Treiber et al. (2003) – ein gegenteiliges Resultat, da keine relevante Interaktion zwischen dem Merkmal Hypertonie und dem Lys198Asn-Polymorphismus aufgedeckt werden konnten. Zudem beschäftigte sich keine der genannten Arbeiten mit dem Schlafapnoe-Syndrom, was die Vergleichbarkeit jener und unserer Ergebnisse limitiert.

Die Problematik unserer Analyse bestand wiederum in der Datenerhebung hinsichtlich eines vorhandenen Hypertonus bei OSA-Patienten. Die Zuordnung zu einer der beiden Patientengruppen (mit/ohne Bluthochdruck) erfolgte zumeist aufgrund eines – nach der standardisierten Methode von Riva-Rocchi gemessenen – Wertes. Bei einigen Schlafapnoeikern lagen mehrere Blutdruckmessungen vor, anhand derer ein Durchschnittswert gebildet wurde. Als weiteres Zuordnungskriterium dienten anamnestische Angaben. In den Fällen, in denen nur ein Messwert zur Verfügung stand, kann es jedoch durchaus zu falschen Gruppenzuweisungen gekommen sein, da es sich hierbei lediglich um Momentaufnahmen handelte. Trotz der konsequenten Einhaltung der Ruhephase vor der jeweiligen Blutdruckbestimmung können zusätzliche Faktoren (z.B. Tagesform und Gemütszustand des Patienten, „Weißkittelphänomen“ etc.) die Höhe des Wertes beeinflussen. Mehrere Blutdruckmessungen an verschiedenen Tagen zu unterschiedlichen Uhrzeiten hätten daher sicherlich zu einem zuverlässigeren Ergebnis geführt. Allerdings war dies aus organisatorischen Gründen nicht realisierbar.

Die Gegenüberstellung der Schlafapnoe-Patienten mit und ohne Diabetes mellitus deckte eine signifikant unterschiedliche Lys198Asn-Genotypverteilung ($p = 0,04$) in diesen beiden Gruppen auf. Besonders auffällig war der mehr als doppelt so große Anteil von GT-Trägern in der OSA-Gruppe ohne Diabetes (36,0 %), verglichen zu der OSA-Gruppe mit Diabetes (17,6 %). Dies könnte auf eine protektive Wirkung der heterozygot-mutierten Variante des Endothelin-1-Gens gegenüber einer möglichen Diabetes-Erkrankung bei Schlafapnoeikern hinweisen.

Bisher existieren leider keine weiteren Publikationen, die den Zusammenhang zwischen der Lys198Asn-Mutation und dem Auftreten von Diabetes mellitus analysieren, was eine direkte Diskussion unserer Resultate erschwert. Allerdings mehren sich die Hinweise, dass eine steigende Prävalenz von Diabetes mellitus (Typ II) mit einem zunehmenden Ausprägungsgrad des OSAS assoziiert sein könnte. Meslier et al. (2003) konnten beispielsweise bei 494 männlichen Schlafapnoe-Patienten eine sinkende Insulinsensitivität bei steigender Schwere der Erkrankung feststellen. Auch Makino et al. (2006) zeigten eine höhere Insulinresistenz bei Schlafapnoeikern mit einer ausgeprägten Krankheitsform gegenüber solchen mit einem milden oder moderaten Schweregrad. Demnach könnte ein ausgeprägtes Schlafapnoe-Syndrom ein Risikofaktor für die Entwicklung der Zuckererkrankung sein. Diese Hypothese muss in künftigen Arbeiten jedoch erst geprüft werden.

Zwischen dem Merkmal Allergien und dem Lys198Asn-Polymorphismus konnte ebenfalls eine signifikante Assoziation ($p = 0,028$) festgestellt werden. Die unterschiedliche Genotypverteilung der Schlafapnoe-Patienten mit und ohne Allergien verhielt sich ähnlich wie beim Diabetes mellitus. OSA-Patienten ohne Allergien waren bedeutend häufiger heterozygote Allelträger (GT). Unter den Allergikern hingegen war der Wildtyp (GG) öfter vertreten. Daher könnte auch hier eine protektive Wirkung des T-Allels (speziell des GT-Genotyps) gegenüber dem Auftreten einer Allergie bei Schlafapnoe-Patienten diskutiert werden. Allerdings wurde nicht nach bestimmten Allergien differenziert, und unsere Analyse beruhte wiederum ausschließlich auf Patientenangaben. Aus diesen Gründen erscheint es problematisch, aus den gefundenen Ergebnissen weitreichende Schlüsse zu ziehen. Außerdem ist die vorliegende Arbeit bisher die einzige, die eine mögliche Interaktion zwischen dem Vorhandensein von Allergien und der Lys198Asn-Variante untersuchte. Die Resultate zukünftiger Studien müssen daher abgewartet werden.

3. Apnoe-Hypopnoe-Index

Unsere Untersuchungen konnten einen bedeutenden Effekt des BMI auf den Schweregrad der Schlafapnoe (AHI) ermitteln, welcher durch das Geschlecht und die Lys198Asn-Variante modifiziert wird. Es konnte bestätigt werden, dass eine Erhöhung des BMI in unmittelbarem Zusammenhang mit einer Erhöhung des AHI steht und somit beide Parameter miteinander korrelieren – ein bereits bekanntes Ergebnis [z.B. Ogretmenoglu et al. 2005]. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Anstieg des AHI stärker bei Männern als bei Frauen und bei TT-Genotypträgern ins Gewicht fällt. Weiterhin identifizierte die Aufteilung der OSA-Patienten in zwei BMI-Gruppen eine besonders starke Assoziation zwischen dem AHI und dem Lys198Asn-Polymorphismus für die 191 übergewichtigen Patienten ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$), nicht jedoch für die 173 Normalgewichtigen ($\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$). Adipöse Schlafapnoeiker, die außerdem noch homozygote Allelträger bezüglich der Mutation in dem Endothelin-1-Gen waren, demonstrierten signifikant höhere AHI-Werte als die beiden anderen Genotypen. Bei den heterozygoten Allelträgern konnte nur ein statistisch nicht relevanter Trend zu höheren AHI-Niveaus gegenüber den homozygoten Wildtypen gezeigt werden.

Bisher existieren leider keine weiteren Arbeiten, die sich mit der funktionellen Beziehung zwischen dem Lys198Asn-Polymorphismus und einem entsprechenden Ausprägungsgrad der Schlafapnoe (AHI) in Abhängigkeit vom BMI auseinandersetzen. Allerdings unterstützt die Tatsache, dass in unserer gesamten (nicht nach Übergewichtstatus differenzierten) Gruppe von 365 OSA-Patienten zwar ein statistisch signifikanter, mit $p = 0,049$ jedoch nur grenzwertiger, Einfluss der untersuchten Mutation auf den AHI festgestellt werden konnte, das genannte Resultat. Kritisch zu betrachten bleibt jedoch die verhältnismäßig kleine Anzahl der homozygot-mutierten adipösen Schlafapnoe-Patienten. Die Genotypisierung identifizierte in der gesamten SA-Gruppe nur 16 TT-Träger, wovon zwölf als übergewichtig und vier als normalgewichtig eingestuft wurden. Um das vorliegende Ergebnis zu untermauern, wären daher Studien mit einer wesentlich größeren Gruppe von Schlafapnoeikern mit dem homozygot-mutierten Genotyp bezüglich Lys198Asn notwendig.

Es bleibt zu erwähnen, dass unsere Untersuchungen keinen direkten Zusammenhang zwischen der Variante in dem Endothelin-1-Gen und dem BMI aufdecken konnten. Dies stimmt mit den Resultaten bisheriger Publikationen überein [Asai et al. 2001, Jin et al. 2003].

Die Analyse der Beziehung zwischen dem BMI und der Lys198Asn-Mutation war deshalb so interessant, weil mehrere voneinander unabhängige epidemiologische Studien [Tiret et al. 1999, Asai et al. 2001, Jin et al. 2003] über eine solche Assoziation in Abhängigkeit von Blutdruckwerten und dem Vorhandensein der hypertensiven Erkrankung berichteten. Allerdings berücksichtigten diese Arbeiten nicht das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom, obwohl diese Krankheit mittlerweile als eine anerkannte Ursache für die arterielle Hypertonie gilt [Chobanian et al. 2003]. Zukünftige Untersuchungen sollten daher die Frage aufgreifen, ob die Interaktionen zwischen dem Lys198Asn-Polymorphismus im Endothelin-1-Gen und dem Bluthochdruck bei übergewichtigen Patienten mit der Schlafapnoe-Erkrankung in Verbindung stehen.

4. Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass sich die Endothelin-1-Plasmaspiegel der Schlafapnoe-Patienten von denen der Schlafgesunden nicht signifikant unterscheiden. Dies könnte einerseits daran liegen, dass das ET-1 bei OSA-Patienten wirklich nicht erhöht ist und somit keine entscheidende Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung spielt. Andererseits ist bekannt, dass Endothelin-1 vorwiegend als parakriner Mediator wirkt und lediglich über eine sehr kurze Halbwertszeit verfügt. Die ET-1-Plasmakonzentration könnte daher einen eher unverlässlichen Parameter darstellen und Schlussfolgerungen über bestimmte Zusammenhänge nur bedingt zulassen. Diese Annahme wird durch die neuere Publikation von Jordan et al. (2005) unterstützt, die ebenfalls keine erhöhten Endothelin-1-Werte, dafür aber gesteigerte big-ET-1-Spiegel bei SA-Patienten nachweisen konnte. Zukünftige Arbeiten sollten dies nach Möglichkeit berücksichtigen und eine synchrone Konzentrationsbestimmung sowohl von Endothelin-1 als auch big-ET-1 vornehmen.

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse über eine eventuell bestehende ET-1-Erhöhung bei Schlafapnoeikern gestalten sich sehr widersprüchlich. Unsere Untersuchungen konnten eine solche Konzentrationssteigerung nicht bestätigen, weshalb Endothelin-1 im vorliegenden Fall keinen pathognomonischen Marker für das Schlafapnoe-Syndrom darstellt.

Des Weiteren konnten die Analysen keinen Zusammenhang zwischen den ET-1-Plasmaspiegeln und einem spezifischen Genotypus bezüglich der Lys198Asn-Variante aufdecken. Eine Ursache könnte sein, dass tatsächlich vorhandene Endothelin-1-Erhöhrungen mit den hier genutzten Bestimmungsmethoden nicht detektiert werden können. Zum anderen wäre es aber auch denkbar, dass der untersuchte Polymorphismus die eigentliche Synthese des Endothelin-1 nicht entscheidend zu beeinflussen vermag. Laut Bloch et al. (1989b) liegt die Lys198Asn-Mutation nicht auf der Promotorregion des ET-1-Gens und ist daher unter Umständen nur eingeschränkt in der Lage, in eine sich ändernde Genexpression (als Antwort auf entsprechende Stimulatoren) einzugreifen. Popowski et al. (2003) zeigten jedoch, dass eine Insertation-A in Position +138 – die sich ebenfalls nicht auf der Promotorregion, sondern im Exon 1 des ET-1-Gens befindet – durchaus mit erhöhten mRNA-Konzentrationen assoziiert und somit funktionell wichtig für die ET-1-Expression ist.

Schließlich konnte ermittelt werden, dass der Lys198Asn-Polymorphismus des Endothelin-1-Gens signifikant mit dem Schweregrad des OSAS bei übergewichtigen Patienten assoziiert ist. Deshalb könnte er einen der multiplen genetischen Faktoren darstellen, welche in die Ätiologie und Pathophysiologie der Schlafapnoe-Erkrankung involviert sind.

Die vorliegende Studie ist bisher die einzige, die sich mit den Interaktionen zwischen den Endothelin-1-Plasmakonzentrationen, der Lys198Asn-Mutation und dem Schlafapnoe-Syndrom auseinandersetzt. Weitere Arbeiten auf diesem spezifischen Gebiet sind daher unbedingt erforderlich. Außerdem sollten künftige Untersuchungen, die sich mit der Analyse des genetischen Hintergrundes von kardiovaskulären Erkrankungen (besonders von arterieller Hypertonie) beschäftigen, auch Polymorphismen berücksichtigen, die den OSA-Schweregrad modifizieren.

F ZUSAMMENFASSUNG

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom ist eine relativ häufige und schwerwiegende Krankheit, deren Ätiologie und Pathogenese bislang weitestgehend unbekannt sind. Die Betroffenen müssen vor allem mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen rechnen. Bisher nachgewiesene Assoziationen zwischen dem potenten Vasokonstriktor Endothelin-1, Veränderungen der kraniofaszialen Struktur und dem Auftreten eines arteriellen Hypertonus lassen eine ätiopathologische Rolle dieser Substanz bezüglich der Schlafapnoe vermuten. Des Weiteren konnte die Endothelin-1-Variante Lys198Asn mit einem Bluthochdruck bei Übergewichtigen in Verbindung gebracht werden.

Aus diesen Gründen wurde der Lys198Asn-Polymorphismus zum ersten Mal hinsichtlich seiner Bedeutung für die Manifestation und den Ausprägungsgrad des Schlafapnoe-Syndroms untersucht und zusätzlich eine möglicherweise vorhandene funktionelle Beziehung zu den Endothelin-1-Plasmakonzentrationen geprüft.

Dafür wurden, nach der Durchführung einer entsprechenden kardiorespiratorischen Polysomnographie, insgesamt 57 Schlafgesunde und 365 Schlafapnoeiker rekrutiert. Bei nahezu allen Studienteilnehmern konnten mit Hilfe eines spezifischen ELISA die ET-1-Plasmawerte analysiert und außerdem die Genotypisierung bezüglich der Lys198Asn-Mutation durchgeführt werden.

Unsere Untersuchungen zeigten keine signifikanten Unterschiede in den ET-1-Plasmaspiegeln zwischen den Schlafapnoe-Patienten und den Kontrollprobanden, die gemessenen Endothelin-1-Werte bewegten sich in dem vom Hersteller angegebenen Normbereich (0,2 – 0,7 fmol/ml). Eine effektive nCPAP-Langzeit-Therapie erreichte keine Konzentrationsveränderungen. Weiterhin wurde keine Korrelation zwischen den ET-1-Werten und dem Ausprägungsgrad der Erkrankung (Apnoe-Hypopnoe-Index) nachgewiesen.

Die Endothelin-1-Plasmaspiegel normo- und hypertoner Schlafapnoeiker unterschieden sich ebenfalls nicht bedeutend voneinander.

Außerdem wurde keine Assoziation zwischen den Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und der Lys198Asn-Mutation festgestellt.

Allerdings konnte ermittelt werden, dass in der gesamten Gruppe der Schlafapnoe-Patienten ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Lys198Asn-Polymorphismus und dem Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) besteht. Dieser Effekt wurde durch das Merkmal Übergewicht modifiziert: nur bei adipösen ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$), nicht jedoch bei normalgewichtigen ($\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$) Schlafapnoeikern konnte eine solche Assoziation gezeigt werden. Eine Steigerung des BMI war mit einer Steigerung des AHI verbunden, wobei dieser Effekt stärker bei Männern als bei Frauen ausgeprägt und bei homozygot-mutierten Allelträgern (TT) gegenüber den anderen beiden Genotypen (GT, GG) um den Faktor 1,33 höher war.

Die vorliegenden Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass die Lys198Asn-Variante des Endothelin-1-Gens bei übergewichtigen OSA-Patienten mit dem Schweregrad des Schlafapnoe-Syndroms assoziiert ist. Ein wesentlicher Zusammenhang zwischen den Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und dem Vorhandensein der Schlafapnoe bzw. dem Lys198Asn-Polymorphismus konnte hingegen nicht gefunden werden.

G LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Akazawa H, Ikeda U, Kuroda T, Shimada K:
Plasma endothelin levels in Takayasu's arteritis. *Cardiology* 1996, 87: 303-305.
- 2 Ancoli-Israel S, Kripke DF, Klauber MR, et al.: Natural history of sleep disordered breathing in community dwelling elderly. *Sleep* 1993, 16 (8 Suppl): 25-29.
- 3 Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkuba H, Nakanishi S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990, 348 (6303): 730-732.
- 4 Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, et al.: Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (ET-1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34 and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet* 1991, 48 (5): 990-996.
- 5 Asai T, Ohkubo T, Katsuya T, et al.: Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the Ohasama study. *Hypertension* 2001, 38: 1321-1324.
- 6 Bakris GL, Fairbanks R, Traish AM, Akerstorm V, Kern S:
Arginine vasopressin stimulates human mesangial cell production of endothelin. *J Clin Invest* 1991, 87: 1158-1164.
- 7 Ballester E, Badia JR, Hernandez L, et al.: Evidence of the effectiveness of continuous positive airway pressure in the treatment of sleep apnea/hypopnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159 (2): 495-501.
Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159 (5 Pt 1): 1688.
- 8 Barden AE, Herbison CE, Beilin LJ, Michael CA, Walters BN, Van Bockxmeer FM:
Association between endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism blood pressure and plasma endothelin-1 levels in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Hypertension* 2001, 19: 1775-1782.

- 9 Battistini B, D'Orléans-Juste P, Sirois P: Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 1993, 68: 600-628.
- 10 Bloch KD, Friedrich SP, Lee ME, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T: Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem* 1989b, 264: 10851-10857.
- 11 Bonora M, Shields GI, Knuth SL, Bartlett D Jr, St John WM: Selective depression by ethanol of upper airway respiratory motor activity in cats. *Am Rev Respir Dis* 1984, 130: 156-161.
- 12 Borries M, Heins M, Fischer Y, et al.: Endothelin and big endothelin in coronary heart disease and acute coronary syndromes. *Z Kardiol* 1996, 85 (10): 761-767.
- 13 Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AWA, Werner A, Luscher TF: Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992, 70: 1191-1197.
- 14 Brown MJ, Sharma P, Stevens PA: Association between diastolic blood pressure and variants of the endothelin-1 and endothelin-2-genes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000, 35: S41-S43.
- 15 Cakirer B, Hans MG, Graham G, Aylor J, Tishler PV, Redline S: The relationship between craniofacial morphology and obstructive sleep apnea in whites and in African-Americans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163 (4): 947-950.
- 16 Carroll JL, Loughlin GM: Diagnostic criteria for obstructive sleep apnea in children. *Pediatr Pulmonol* 1992, 14: 71-74.
- 17 Casey ML, Word RA, MacDonald PC: Endothelin-1 gene expression and regulation of endothelin mRNA and protein biosynthesis in a vascular human amnion. *J Biol Chem* 1991, 266: 5762-5768.

- 18 Cauduro RL, Costa C, Lhulier F, et al.: Cyclosporine increases endothelin-1 plasma levels in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2004, 36 (4): 880-881.
- 19 Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al.: Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003, 42: 1206-1252.
- 20 Cocks TM, Broughton A, Dib M, Sudhir K, Angus JA: Endothelin is blood vessel selective: studies on a variety of human and dog vessels in vitro and on regional blood flow in the conscious rabbit. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989, 16: 243-246.
- 21 Colucci WS: Molecular and cellular mechanism of myocardial failure. *Am J Cardiol* 1997, 80: 15L-25L.
- 22 Dematteis M, Pepin JL, Jeanmart M, Deschaux C, Labarre-Vila A, Levy P: Charot-Marie-Tooth disease and sleep apnoea syndrome: a family study. *Lancet* 2001, 357 (9252): 267-272.
- 23 Ding SS, Qiu C, Hess P, Xi JF, Clozel JP, Clozel M: Chronic endothelin receptor blockade prevents renal vasoconstriction and sodium retention in rats with chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 2002, 53: 963-970.
- 24 Douglas SA, Ohlstein EH : Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2000, 10: 229-237.
- 25 Edwards RM, Trizna W, Ohlstein EH: Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol* 1990, 258: F217-F221.

- 26 El-Solh AA, Bozkanat E, Mador J, Grant BJB: Association between plasma endothelin-1 levels and cheyne-stokes respiration in patients with congestive heart failure. *Chest* 2002, 121: 1928-1934.
- 27 Emori T, Hirata Y, Ohta K, et al.: Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 1991, 18 (2): 165-170.
- 28 Ergul S, Parish DC, Puett D, Ergul A: Racial differences in plasma Endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension* 1996, 28: 652-655.
- 29 Evans RR, Phillips BG, Singh G, Bauman JL, Gulati A: Racial and gender differences in endothelin-1. *Am J Cardiol* 1996, 78 (4): 486-488.
- 30 Ezra D, Goldstein RE, Czaja JF, Feuerstein GZ.: Lethal ischemia due to intracoronary endothelin in pigs. *Am J Physiol* 1989, 257: H339-H343.
- 31 Ferri C, Bellini C, Desideri G, et al.: Plasma endothelin-1 levels in obese hypertensive and normotensive men. *Diabetes* 1995, 44 (4): 431-436.
- 32 Ferri C, De Marzio P, Desideri G, et al.: Plasma ET-1-levels during transient acute myocardial ischaemia in men: effects of coronary revascularization. *Eur J Clin Invest* 1997, 27 (6): 526-532.
- 33 Findley LJ, Unverzagt ME, Suratt PM: Automobile accidents involving patients with obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis* 1988, 138: 337-340.
- 34 Firth JD, Ratcliffe PJ, Raine AE, Ledigham JG: Endothelin: an important factor in acute renal failure? *Lancet* 1988, ii: 1179-1182.
- 35 Galie N, Manes A, Branzi A: The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 2004, 1; 61 (2): 227-237.

- 36 Giannessi D, Del Ry S, Vitale RL: The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res* 2001, 43 (2): 111-126.
- 37 Glowinska B, Urban M, Hryniewicz A, Peczynska J, Florys B, Al-Hwish M: Endothelin-1 plasma concentration in children and adolescents with atherogenic risk factors. *Kardiol Pol* 2004, 61 (10): 329-338.
- 38 Goerre S, Staehli C, Shaw S, Luscher TF: Effect of cigarette smoking and nicotine on plasma endothelin-1 levels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, 26 (Suppl 3): 236-238.
- 39 Goligorski MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF: Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J Cell Physiol* 1994, 158: 485-494.
- 40 Goraca A: New views on the role of endothelin. *Endocr Regul* 2002, 36 (4): 161-167.
- 41 Gray GA, Webb DJ: The therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 1996, 72: 109-148.
- 42 Grimpen F, Kanne P, Schulz E, Hagenah G, Hasenfuss G, Andreas S: Endothelin-1 plasma levels are not elevated in patients with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2000, 15 (2):320-325.
- 43 Grote L, Ploch T, Heitmann J, Knaack L, Penzel T, Peter JH: Sleep-related breathing disorder is an independent risk factor for systemic hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160: 1875-1882.
- 44 Guillemineault C, Partinen M, Hollman K, Powell N, Stoohs R: Familial aggregates in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 1995, 107: 1545-1451.
- 45 Haapaniemi E, Tatlisumak T, Hamel K, et al.: Plasma Endothelin-1-levels neither increase nor correlate with neurological scores, stroke risk factors or outcome in patients with ischemic stroke. *Stroke* 2000, 31: 720-725.

- 46 He J, Kryger MH, Zorick FJ, Conway W, Roth T: Mortality and apnea index in obstructive sleep apnea: experience in 385 male patients. *Chest* 1988, 94: 9-14.
- 47 Hu RM, Chuang MY, Prins B, et al.: High density lipoproteins stimulate the production and secretion of endothelin-1 from cultured bovine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1994, 93 (3): 1056-1062.
- 48 Hu RM, Levin ER, Pedram A, Frank HJL: Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells: mediation through the C receptor. *J Biol Chem* 1992, 267: 17384-17389.
- 49 Hu X, Kang J, Xiao D, Wang W, Hou X, Yu R: The influence of nasal continual positive airway pressure (nCPAP) on some vasoactive substances in patients with OSAS. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2002, 25 (1): 36-38.
- 50 Iglarz M, Benessiano J, Philip I, et al.: Preproendothelin-1 gene polymorphism is related to a change in vascular reactivity in the human mammary artery in vitro. *Hypertension* 2002, 39: 209-213.
- 51 Ihling C, Szombathy T, Bohrman B, Brockhaus M, Schaefer HE, Loeffler BM: Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 2001, 104: 864-869.
- 52 Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al.: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989a, 86: 2863-2867.
- 53 International classification of sleep disorders. In: T.M.J. (Ed.), *Diagnostic and coding manual*. Allen Press, Lawrence, Kansas, 1990.
- 54 Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T: Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflügers Arch* 1988a, 413: 108-110.

- 55 Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T: Positive inotropic action of novel vasokonstriktor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 1988b, 255: H970-H973.
- 56 Ito H, Adachi S, Tamamori M, et al.: Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1 mediated mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 1996, 787: 302-311.
- 57 Itoh Y, Yanagisawa M, Ohkubo S, et al.: Cloning sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett* 1988, 231: 440-444.
- 58 Janssens JP, Pautex S, Hillert H, Michel JP: Sleep disordered breathing in the elderly. *Aging* 2000, 12 (6): 417-429.
- 59 Jin JJ, Nakura J, Wu Z, et al.: Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension* 2003, 41: 163-167.
- 60 Jordan W, Reinbacher A, Cohrs S et al.: Obstructive sleep apnea: Plasma endothelin-1 precursor but not endothelin-1 levels are elevated and decline with nasal continuous positive airway pressure. *Peptides* 2005, 26: 1654-1660.
- 61 Jozsef L, Khreiss T, Fournier JS, Chan JS, Filep JG: Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br J Pharmacol* 2002, 135: 1167-1174.
- 62 Kadotani H, Kadotani T, Young T, et al.: Association between apolipoprotein E epsilon 4 and sleep-disordered breathing in adults. *JAMA* 2001; 285 (22): 2888-2090.
- 63 Kanse SM, Takahashi K, Warren JB, Ghatei M, Bloom SR: Glucocorticoids induce endothelin release from vascular smooth muscle cells but not from endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1991, 199: 99-101.

- 64 Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR: Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993, 268: 19126-19133.
- 65 Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, et al.: Conversion of big endothelin-1 to 21 residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989, 13 (Suppl. 5): S5-S7.
- 66 Kohan DE, Padilla E: Endothelin-1 is an autocrine factor in rat inner medullary collecting system. *Am J Physiol* 1992, 263: F607-F612.
- 67 Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV: Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991, 88: 1054-1057.
- 68 Kozak M, Holla LI, Krivan L, et al.: Endothelin-1 gene polymorphism in the identification of patients at risk for malignant ventricular arrhythmia. *Med Sci Monit* 2002, 8 (5): BR164-BR167.
- 69 Kuchan MJ, Frangos JA: Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1993, H150-H156.
- 70 Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, et al.: The possible role of endothelin-1 in the pathogenesis of coronary vasospasm. *Cardiovasc Pharmacol* 1989b, 13 Suppl 5: S132-137; discussion S142.
- 71 Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, et al.: Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989a, 159(3): 1435-1440.
- 72 Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, et al.: Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994, 368 (6473): 703-710.

- 73 Kuwaki T, Cao WH, Kurihara Y, et al.: Impaired ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in mutant mice deficient in ET-1. *Am J Physiol* 1996, 270: R1279-R1286.
- 74 Lavie P: Incidence of sleep apnea in a presumably healthy working population: a significant relationship with excessive daytime sleepiness. *Sleep* 1983, 6 (4): 312-318.
- 75 Lavie P, Herer P, Hoffstein V: Obstructive sleep apnea syndrome as a risk factor for hypertension: population study. *BMJ* 2000, 320 (7233): 479-482.
- 76 Leiter JC, Knuth SL, Krol RC, Bartlett D Jr: The effect of diazepam on genioglossal muscle activity in normal human subjects. *Am Rev Respir Dis* 1985, 132: 216-219.
- 77 Letizia C, De Biase L, Caliumi C, et al.: Endothelin-1 circulating levels increase in patients with orthotopic heart transplantation and in chronic therapy with cyclosporine. *Minerva Cardioangiol* 2001, 49: 15-22.
- 78 Levin ER: Endothelins. *N Engl J Med* 1995, 333 (6): 356-63.
- 79 Li YZ, Wang TC, Lu HX, Wang X, Wang Y, Zhang BF: Evaluation of the serum endothelin-1 level and sleep architecture change in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome accompanied hypertension. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2004, 39 (2): 116-119.
- 80 Lüscher TF, Barton M: Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000, 102 (19): 2434-2440.
- 81 Lüscher TF: Endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991, 18: 15-22.
- 82 MacCarthy PA, Grocott-Mason R, Prendergast BD, Shah AM: Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and failing human heart: studies with an intracoronary ET (A) receptor antagonist. *Circulation* 2000, 101: 142-147.

- 83 Macquin-Mavier I, Levame M, Istin N, Harf A: Mechanism of endothelin-mediated bronchoconstriction in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1989, 250: 740-745.
- 84 Makino S, Handa H, Suzukawa K, et al.: Obstructive sleep apnoea syndrome, plasma adiponectin levels and insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006, 64 (1): 12-19.
- 85 Marsen TA, Schramek H, Dunn MJ: Renal actions of endothelin: linking cell signaling pathways to kidney disease. *Kidney Int* 1994, 45: 336-344.
- 86 Masoaka H, Suzuki R, Hirata Y, Emori T, Marumo F, Hirakawa K: Raised plasma endothelin in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Lancet* 1989, 2: 1402.
- 87 Mathur R, Douglas NJ: Family studies in patients with the sleep apnea-hypopnea syndrome. *Ann Intern Med* 1995, 122 (3): 174-178.
- 88 Meslier N, Gagnadoux F, Giraud P, et al.: Impaired glucose-insulin metabolism in males with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 2003, 22 (1): 156-160.
- 89 Milner P, Bodin P, Loesch A, Burnstock G: Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 170: 649-656.
- 90 Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, et al.: Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993, 73 (5): 887-897.
- 91 Moller DS, Lind P, Strunge B, Pedersen EB: Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea. *AJH* 2003, 16: 274-280.
- 92 Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER: Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochem J* 1998, 330: 1097-1105.

- 93 Morise T, Takeuchi Y, Takeda R, Karayalcin U, Yachie A, Miyawaki T: Increased plasma endothelin levels in Kawasaki disease: a possible marker for Kawasaki disease. *Angiology* 1993, 44: 719-723.
- 94 Mortimore IL, Marshall I, Wraith PK, Sellar RJ, Douglas NJ: Neck and total body fat distribution in nonobese and obese patients with sleep apnea compared to that in control subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157: 280-284.
- 95 Mostafa MG, Mima T, Taniguchi T, Mori K: Doxorubicin, an RNA synthesis inhibitor, prevents vasoconstriction and inhibits aberrant expression of endothelin-1 in the cerebral vasospasm model of the rat. *Neurosci Lett* 2000, 283: 197-200.
- 96 Nakamoto H, Suzuki H, Murakami M, et al.: Effects of endothelin on systemic and renal haemodynamics and neuroendocrine hormones in conscious dogs. *Clin Sci (Lond)* 1989, 77 (5): 567-572.
- 97 Ng TP, Seow A, Tan WC: Prevalence of snoring and sleep breathing-related disorders in Chinese, Malay and Indian adults in Singapore. *Eur Respir J* 1998, 12: 98-203.
- 98 Ogretmenoglu O, Suslu AE, Yucel OT, Onerci TM, Sahin A: Body fat composition: a predictive factor for obstructive sleep apnea. *Laryngoscope* 2005, 115 (8): 1493-1498.
- 99 Oliver FJ, De La Ruba G, Feener EP, et al.: Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 1991, 266: 23251-23256.
- 100 Orisio S, Benigni A, Bruzzi I, et al.: Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *Kidney Int* 1993, 43 (2): 354-358.
- 101 Ortega-Mateo A, De Artinano AA: Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res* 1997, 36: 339-351.
- 102 Palma BD, Gabriel A, Bignotto M, Tufik S: Paradoxical sleep deprivation increases plasma-ET-levels. *Braz J Med Biol Res* 2002, 35 (1): 75-79.

- 103 Palmer LJ, Redline S: Genomic approaches to understanding obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 2003, 135: 187-205.
- 104 Peker Y, Kraiczi H, Hedner J, Löth S, Johansson A, Bende M: An independent association between obstructive sleep apnoea and coronary artery disease. *Eur Respir J* 1999, 14 (1): 179-184.
- 105 Phillips BG, Narkiewicz K, Pesek CA, Haynes WG, Dyken ME, Somers VK: Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *J Hypertens* 1999, 17: 61-66.
- 106 Polderman KH, Stehouwer CDA, van Kamp GJ, Dekker GA, Verheugt FWA, Gooren LJJ: Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. *Ann Intern Med* 1993, 118 (6): 429-432.
- 107 Popowski K, Sperker B, Kroemer HK et al.: Functional significance of a hereditary adenine insertion variant in the 5'-UTR of the endothelin-1 gene. *Pharmacogenetics* 2003, 13 (8): 445-451.
- 108 Redline S, Leitner J, Arnold J, Tishler PV, Altose MD: Ventilatory-control abnormalities in familial sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1997a, 156 (1): 155-160.
- 109 Redline S, Tishler PV: The genetics of sleep apnea. *Sleep Medicine Reviews* 2000, 4 (6): 583-602.
- 110 Redline S, Tishler PV, Hans MG, Tosteson TD, Strohl KP, Spry K: Racial differences in sleep-disordered breathing in African-Americans and Caucasians. *Am J Respir Care Med* 1997b, 155: 186-192.
- 111 Redline S, Tishler PV, Tosteson TD, et al.: The familial aggregation of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151: 682-687.

- 112 Riggelman A, Hervey J, Baylis C: Endothelin mediates some of the renal actions of acutely administered angiotensin-II. *Hypertension* 2001, 38: 105-109.
- 113 Roehrs T, Conway W, Wittig R, Zorick F, Sicklesteel J, Roth T: Sleep-wake complaints in patients with sleep-related respiratory disturbances. *Am Rev Respir Dis* 1985, 132: 520-523.
- 114 Rossi GP, Seccia TM, Albertin G, Pessina AC: Measurement of endothelin: clinical and research use. *Ann Clin Biochem* 2000, 37: 608-626.
- 115 Rubanyi GM, Polokoff MA: Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994, 46: 325-411.
- 116 Saarelainen S, Seppälä E, Laasonen K, Hasan J: Circulating endothelin-1 in obstructive sleep apnea. *Endothelium* 1997, 5: 115-118.
- 117 Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa H, et al.: Cloning of a cDNA encoding a non-iso peptide-selective subtype of endothelin receptor. *Nature* 1990, 348 (6303): 732-735.
- 118 Salvador J, Iriarte J, Silva C, Gomez Ambrosi J, Diez Caballero A, Fruhbeck G: The obstructive sleep apnoea syndrome in obesity: a conspirator in the shadow. *Rev Med Univ Navarra* 2004; 48 (2): 55-62.
- 119 Schiffrin EL: Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension* 1999, 34 (2): 867-881.
- 120 Shaw SG, Schmid M, Casty A: Critical factors in the radioimmunoassay of Endothelin-1, Endothelin-3 and big-Endothelin-1 in human plasma. *Anal Biochem* 2000, 278 (2): 143-149.
- 121 Sofia M, Mormile M, Faraone S, et al.: Increased endothelin-like immunoreactive material on bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma and patients with interstitial lung disease. *Respiration* 1993, 60 (2): 89-95.

- 122 Stewart DJ, Kubac G, Costello K, Cernacek P: Increased plasma endothelin-1 in early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1991b, 18 (1): 38-43.
- 123 Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D: Increased plasma endothelin-1 levels in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991a, 114 (6): 464-469.
- 124 Sugiura M, Inagami T, Kon V: Endotoxin stimulates endothelin-release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 161: 1220-1227.
- 125 Taheri S, Mignot E: The genetics of sleep apnea. *Lancet Neurology* 2002, 1: 242-250.
- 126 Tanaka C, Kamide K, Takiuchi S, Kawano Y, Miyata T: Evaluation of the Lys198Asn and -134delA genetic polymorphisms of the endothelin-1 gene. *Hypertens Res* 2004, 5: 367-371.
- 127 Tiret L, Poirier O, Hallet V, et al.: The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people. *Hypertension* 1999, 33: 1169-1174.
- 128 Tishler PV, Larkin EK, Schluchter MD, Redline S: Incidence of sleep-disordered breathing in an urban adult population: the relative importance of risk factors in the development of sleep-disordered breathing. *JAMA* 2003, 289: 2230-2237.
- 129 Treiber FA, Barbeau P, Harshfield G, et al.: Endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism and blood pressure reactivity. *Hypertension* 2003, 42: 494-499.
- 130 Uslo T, Erem C, Tosun M, Deger O: Plasma endothelin levels in Behçet's disease. *Clin Rheumatol* 1997, 16: 59-61.
- 131 Vasku A, Spinarova L, Goldbergova M, et al.: The double heterozygote of two endothelin-1 gene polymorphisms (G8002A und -3A/-4A) is related to big endothelin levels in chronic heart failure. *Exp Mol Pathol* 2002, 73: 230-233.

- 132 Wagner A, Wieczorek I, Plug M, Kruse HJ: Physiologie und Pathophysiologie des vaskulären Endothelinsystems: klinische Implikationen. *VASA* 2002, 31: 143-151.
- 133 Wagner OF, Christ G, Wojta J, et al.: Polar secretion of ET-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992, 267: 16066-16088.
- 134 Walther A, Bardenheuer HJ: Das Schlaf-Apnoe-Syndrom. *Anaesthesist* 2001, 50: 295-308.
- 135 Warwick JP, Mason DG: Obstructive sleep apnoea syndrome in children. *Anaesthesia* 1998, 53: 571-579.
- 136 Xiao Y, Huang X, Qui C, Qhu X, Liu Y: Angiotensin-I-converting enzyme gene polymorphism in Chinese patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chin Med J* 1999, 112 (8): 701-704.
- 137 Yamauchi T, Ohnaka R, Takaayanagai R, Umeda F, Nawata H: Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 1990, 267: 16-18.
- 138 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al.: A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988, 332 (6161): 411-415.
- 139 Yokokawa K, Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Takeda T: Endothelin-3 regulates endothelin-1 production in cultured human endothelial cells. *Hypertension* 1991b, 18: 304-315.
- 140 Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, et al.: Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Ann Intern Med* 1991a, 11: 213-215.
- 141 Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S: Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke* 1991, 22 (3): 378-383.

- 142 Yoshio T, Masuyama J, Mimori A, Takeda A, Minota S, Kano S: Endothelin-1 release from cultured endothelial cells induced by sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1995, 54: 361-365.
- 143 Yoshizumi M, Kurihara H, Morita T, et al.: Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 166 (1): 324-329.
- 144 Young T, Peppard P: Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: epidemiologic evidence for a relationship. *Sleep* 2000, 23: 122-126.
- 145 Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S: The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993, 328: 1230-1235.
- 146 Young T, Peppard P, Palta M, et al.: Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch Intern Med* 1997, 157 (15): 1746-1752.
- 147 Zhang XL, Yin KS, Mao H, Wang H, Yang Y: Effect of continuous positive airway pressure treatment on vascular endothelial function in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome and coronary artery disease. *Chin Med J (Engl)* 2004, 117 (6): 844-847.
- 148 Ziv I, Fleminger G, Djaldetti R, Achiron A, Melamed E, Sokolovsky M: Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke* 1992, 23: 1014-1016.
- 149 Zolk O, Quattek J, Sitzler G, et al.: Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation* 1999, 99: 2118-2123.

ANHANG

Induktoren	Inhibitoren
Katecholamine: Adrenalin [Yanagisawa et al. 1988, Levin 1995] Noradrenalin [Levin 1995] Dopamin [Goraca 2002]	NO [Boulanger et al. 1990, Goligorski et al. 1994] NO-Derivate [Gray & Webb 1996]
Angiotensin-II [Emori et al. 1991]	ANP [Gray & Webb 1996, Hu et al. 1992]
ADH (Vasopressin) [Bakris et al. 1991]	Prostazyklin [Gray & Webb 1996, Galie et al. 2004]
Arginin [Levin1995]	Progesteron [Morey et al. 1998]
Testosteron [Polderman et al. 1993]	Östrogen [Morey et al. 1998, Galie et al. 2004]
Cortisol [Kanse et al. 1991]	Bradykinin [Goraca 2002]
Erythropoetin [Goraca 2002]	cGMP [Goraca 2002]
Insulin [Oliver et al. 1991]	starke Scherkräfte [Kuchan et al. 1993]
Zytokine: IL-1 [Yoshizumi et al. 1991] IL-1 β , IL-6 [Goraca 2002]	
Wachstumsfaktoren: TGF- β [Kurihara et al. 1989a] EGF [Casey et al. 1991] IGF [Levin 1995, Goraca 2002] FGF [Levin 1995, Goraca 2002]	
Endotoxin [Sugiura et al. 1989]	
Endothelin-3 [Yokokawa et al. 1991b]	
Ciclosporin [Cauduro et al. 2004]	
Ca ²⁺ -Ionen [Goraca 2002]	
Thrombin [Yanagisawa et al. 1988]	
Oxidiertes LDL [Boulangere et al. 1992]	
HDL [Hu et al. 1994, Galie et al. 2004]	
Glukose [Yamauchi et al. 1990]	
Hypoxie [Kourembanas et al. 1991]	
Ischämie [Galie et al. 2004]	
schwache Scherkräfte [Milner et al. 1990]	

Tabelle A: Induktoren und Inhibitoren der ET-1-Synthese

Mit Endothelin-1-assoziierte Erkrankungen / pathophysiologische Zustände	
Endotheliale Dysfunktion	Wagner et al. (2002)
Atherosklerose	Ihling et al. (2001) Boulangier et al. (1992)
Arterielle Hypertonie	Glowinska et al. (2004) Schiffrin (1999) Yokokawa et al. (1991a)
Myokardinfarkt	Stewart et al. (1991) Ortega-Mateo et al. (1997)
KHK Angina pectoris	Ortega-Mateo et al. (1997) Ferri et al. (1997)
Chronische Herzinsuffizienz	Zolk et al. (1999) Giannessi et al. (2001)
Subarachnoidalblutung (mit zerebralem Vasospasmus)	Mostafa et al. (2000) Masoaka et al. (1989)
Apoplex	Ziv I et al. (1992)
Niereninsuffizienz (chronisch)	Ding et al. (2002) Orsio et al. (1993)
Ciclosporin-Nephrotoxizität	Ortega-Mateo et al. (1997) Letizia et al. (2001)
Schock (endotoxisch/septisch)	Goraca (2002)
Vaskulitiden: M. Behçet M. Kawasaki Takayasu Arteriitis Lupus erythematodes	Uslo et al. (1997) Morise et al. (1993) Akazawa et al. (1996) Yoshio et al. (1995)
Raynaud-Phänomen	Ortega-Mateo et al. (1997)
Diabetes mellitus	Glowinska et al. (2004) Rubanyi et al. (1994)
Adipositas	Glowinska et al. (2004) Ferri et al. (1995)
Pulmonale Hypertonie	Stewart et al. (1991) Miyauchi et al. (1993)
Asthma bronchiale	Sofia M et al. (1993) Ortega-Mateo et al. (1997) Goraca (2002)
OSAS	siehe oben

Tabelle B: Endothelin-1-assoziierte Erkrankungen bzw. pathophysiologische Zustände

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ivar Roots sehr für die Überlassung des Themas und die günstigen Arbeitsbedingungen an seinem Institut.

Herrn Dr. med. Ingo Fietze danke ich für die Möglichkeit der Patientenrekrutierung in der Ambulanz für Schlafmedizin der Charité.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. Konstanze Diefenbach, die stets Zeit für mich fand und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. Steffen Bauer, Frau Dr. med. Ingrid Mai, Herrn Mark Goldammer, Herrn Farhad Arjomand Nahad, Frau Heidemarie Maszynski, Frau Petra Pietsch, Frau Christel Buch, Frau Anja Alfandega und Frau Jasmin Jamal El-Din für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor.

Antworten auf statistische Fragen erhielt ich von Herrn Dr. Uwe Malzahn und Frau Dr. Brigitte Wegner, die mich sogar über Ihren wohlverdienten Rentnerstatus hinaus unterstützte.

Frau Dr. med. Gabriele Laschinski danke ich besonders für die Korrektur der Arbeit und die damit verbundenen ausführlichen Telefonate.

Vielen Dank möchte ich außerdem Frau Susanne Kottschlag aussprechen, die mir in organisatorischen Belangen stets Hilfe leistete.

Meiner Mitkommilitonin Dana Buck danke ich nicht nur für den moralischen Beistand.

Nicht zuletzt gilt mein herzlichster Dank meiner lieben Familie, insbesondere meinem Ehemann Stefan, meinen Eltern Evelin und Bernd, meiner Schwester Susanne, meinen Schwiegereltern Renate und Iwan und allen meinen Großeltern. Neben geduldiger Motivation und kritischer Korrekturlesung haben sie diese Arbeit zum Beispiel auch durch die liebevolle Betreuung meiner Töchter Antonia Klara und Violetta Sofia ermöglicht.

LEBENS LAUF

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

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich (Kathrin Kretschmer), dass die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema „Untersuchungen zu Endothelin-1-Plasmakonzentrationen und der genetischen Variante Lys198Asn im Endothelin-1-Gen bei Schlafapnoe-Patienten“ selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter von mir verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Datum, Unterschrift