

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg

**Proatherogene Genexpression in peripheren
mononukleären Zellen bei obstruktiver Schlafapnoe:
Effekt von Adipositas und Continuous Positive Airway
Pressure - Therapie**

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

vorgelegt von
Raphael Rupert Josef Boneberg
aus München
Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 19.11.2020

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Dekan i.V. der Prodekan: Prof. Dr. R. Müller

Referent: Prof. Dr. W. Hildebrandt

1. Korreferent: Prof. Dr. U. Koehler

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
1 Einleitung	8
1.1 Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom	8
1.1.1 Definiton, Pathophysiologie und Klinik	8
1.1.2 OSAS und das metabolische Syndrom	9
1.1.3 OSAS und oxidativer Stress	10
1.2 OSAS- assoziiertes kardiovaskuläres Risiko	13
1.2.1 OSAS als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor	13
1.2.2 Rolle der PBMC bei der Atherosklerose	14
1.2.3 Inflammatorische Gefäßrisiken bei OSAS	16
1.2.4 Eigenschaften relevanter proatherogener Zytokine bei OSAS	18
1.2.5 PBMC und Zytokinproduktion bei OSAS	21
1.2.6 OSAS und Insulinresistenz	22
1.3 Therapie von OSAS	23
1.4 Fragestellung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Studiendesign und Studienpopulation	28
2.1.1 Ethik und Rekrutierung	28
2.1.2 Patienten und Probanden	28
2.1.3 Venöse Blutwertanalyse	29
2.1.4 Polysomnographie	29
2.1.5 Ein- und Ausschlusskriterien	31
2.1.6 Ablauf der Untersuchung	32
2.2 Untersuchung proatherogener Genexpression in mononukleären Zellen mittels qRT-PCR	34
2.2.1 Gewinnung der PBMC aus EDTA-Blut	34
2.2.2 RNA-Isolation aus mononukleären Zellen	35
2.2.3 Nachweis der RNA mittels Gelelektrophorese	36
2.2.4 Umschreiben der RNA in cDNA durch Reverse Transkriptase Reaktion	37
2.2.5 Prinzip der quantitativen Real Time-PCR	38

2.2.6	Referenzgen	40
2.2.7	Auswertung	41
2.2.8	Untersuchte Primer	42
2.3	Bestimmung von GSSG und GSH in PBMC mittels Enzymtest	45
2.3.1	Funktionsprinzip	45
2.3.2	Vorbereitung der Proben und Durchführung	46
2.4	Aminosäurenuntersuchung in mononukleären Zellen mittels ASA	47
2.4.1	Funktionsprinzip der Aminosäurenanalyse	47
2.4.2	Vorbereitung des Probenmaterials	48
2.5	Statistik	49
2.6	Materialien und Geräte	50
3	Ergebnisse	54
3.1	Anthropometrische Daten	54
3.2	Polysomnographische Untersuchungen	56
3.3	Venöse Blutparameter	59
3.4	Korrelationen von vaskulären Risikofaktoren mit schlafdiagnostischen Ergebnissen und BMI	63
3.5	Quantitative Real Time-PCR	65
3.5.1	Referenzgen	65
3.5.2	Ergebnisse Teil 1: Querschnittuntersuchung	68
3.5.3	Ergebnisse Teil 2: Längsschnittuntersuchung	79
3.6	Ergebnisse der GSH- und GSSG-Untersuchung	82
3.7	Vorläuferaminosäuren von Glutathion	85
4	Diskussion	91
4.1	Diskussion des Studiendesigns	91
4.1.1	Stärken des Studiendesigns	91
4.1.2	Schwächen des Studiendesigns	92
4.2	Diskussion der Methodik	93
4.2.1	Anthropometrische Daten, Blutanalyse und Diagnostik	93
4.2.2	Polysomnographie und Cut-off des AHI	93
4.2.3	RNA-Qualität und Real time RT- PCR	94
4.3	Diskussion der Ergebnisse	95
4.3.1	Anthropometrie	95
4.3.2	Venöse Blutwertanalyse	96
4.3.3	Referenzgen	97
4.3.4	Diskussion der PCR-Ergebnisse der Querschnittsuntersuchung	98

4.3.5	Diskussion der PCR- Ergebnisse der Längsschnittsuntersuchung	108
4.3.6	Diskussion der Ergebnisse der Glutathionanalyse	111
4.3.7	Diskussion der Vorläuferamino-säuren von Glutathion	113
5	Zusammenfassung	115
6	Summary	117
	Literaturverzeichnis	119
	Eigene Publikationen	135
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	136
	Danksagung	137

Abkürzungsverzeichnis

ABCG-1	ATP-binding-casette-transporter G1	IMT	Intima-Media Thickness
AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index	LDL	Low-Density Lipoprotein
bFGF	Basics fibroblast growth factor	LSM	Lymphocyte Separation Medium
B₂M	beta-2-Mikroglobulin	Lox-1	lectin-like oxLDL Rezeptor
BMI	Body-Mass-Index	M	Mittelwert
CD-36	Cluster of differentiation 36	MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
cDNA	Complementary deoxy- ribonucleic acid	MMP	Metalloproteinase
CEUS	Contrast-enhanced ultrasound	MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
CIH	Chronisch intermittierende Hypoxie	mRNA	Messenger Ribonucleic acid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease	MRT	Magnetresonanztomographie
COX	Cyclooxygenase	NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
cPAP	Continuous positive airway pressure	NRF2	factors nuclear factor erythroid 2-related factor 2
DNase	Desoxyribonuklease	OSAS	Obstructive Sleep Apnea Syndrome
dsDNA	Doppelstrang-DNA	PATS	plasma total antioxidant status
DUSP-1	dual specificity phosphatase 1	PBMC	Peripher blood mononuclear cells
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PBS	Phosphate-buffered saline
EKG	Elektrokardiogramm	PCR	Polymerase chain reaction
FAT	Fatty acid translocase	PDGF	Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor
GAPDH	Glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase	PTGS-2	Prostaglandin-Endoperoxidsynthase 2
GCL	Glutamatcysteinligase	qRT-PCR	Quantitative real time PCR
GDF-15	Growth differentiation factor 15	RIN	RNA Integrity Number
GSH	Glutathion	RNase	RNA-spaltendes Enzym
GSS	Glutathionsynthase	ROS	Reactive oxygen species
GSSG	Glutathiondisulfid	RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0
GSR	Glutathionreduktase	RR	Blutdruckmessung nach Riva Rocci
GUSB	β-Glucuronidase	rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
HbA1c	Glykohämoglobin	SEM	Standard error of the mean
HDL	High-Density Lipoprotein	SSA	5- sulfosalicylicaciddihydrate
HF	Herzfrequenz	SOCS-3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
HIF-1	Hypoxie-induzierten Faktor 1	TBP	TATAA box binding protein
HOMA	Homeostasis Model Assessment	TE	Tris-EDTA
HPLC	High performance liquid chromatography	TGF-beta	Transforming growth factor beta
HuPO	human acidic ribosomal protein	TNF-α	Tumor-Nekrosefaktor-alpha
Hyp-Reox	Hypoxie-Reoxygenierung	TST	Total sleep time
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1	UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
IFN-γ	Interferon- gamma	US	Ultraschall
IL	Interleukin	VEGF	Vascular endothelial growth factor
		XDH	Xanthindehydrogenase
		XOD	Xanthinoxidase

Abbildungsverzeichnis

1	Überlappende Auswirkungen von OSAS und metabolischem Syndrom	10
2	Schematische Darstellung der EDTA- Blut Auftrennung mittels Ficoll- Gradient	34
3	Chip für RNA- Nachweis mittels Gelelektrophorese	36
4	Beispiel für Amplifikationskurven	39
5	Temperatur- und Zyklusprofil	40
6	Prinzip des Enzymtests: Reduktion des DTNB zu TNP in Anwesenheit von GSH/GSSG unter NADPH- Abhängigkeit (Tietze, 1969)	45
7	AHI (N/h) der adipösen und nicht-adipösen Kontrollprobanden und OSAS-Patienten	58
8	Zeit (min/TST) während der die Sauerstoffsättigung unter 90% bei adipösen und nicht-adipösen Kontrollprobanden und OSAS-Patienten liegt	58
9	HOMAR-IR	60
10	HbA1c- Werte [%] der adipösen und nicht-adipösen Strata	62
11	Gesamt- Cholesterin [mg/dl] der adipösen und nicht-adipösen Strata	62
12	Korrelation zwischen IMT und AHI	64
13	Relative Expression des TBP in den Strata ($M \pm SEM$)	65
14	Relative Expression des RPLP0 in den Strata ($M \pm SEM$)	66
15	Relative Expression von GUSB in den Strata ($M \pm SEM$)	66
16	Relative Expression von GUSB bei Patienten ohne und mit Therapie ($M \pm SEM$)	67
17	Relative Genexpression von $IL-1\beta$ im Gesamtkollektiv ($M \pm SEM$)	70
18	Relative Genexpression von $IL-1\beta$ in den Strata ($M \pm SEM$)	70
19	Korrelation der relativen Genexpression von $IL-1\beta$ und AHI aller untersuchten Probanden und Patienten	71
20	Korrelation der relativen Genexpression von $IL-1\beta$ und HbA1c aller untersuchten Probanden und Patienten	72
21	Relative Genexpression von COX-2 im Gesamtkollektiv ($M \pm SEM$)	73
22	Relative Genexpression von COX-2 in den Strata ($M \pm SEM$)	73
23	Korrelation der relativen Genexpression von COX-2 und AHI von Probanden und Patienten	74
24	Korrelation der relativen Genexpression von COX-2 und $IL-1\beta$ von Probanden und Patienten (mit Therapie)	74
25	Relative Genexpression von IL-6 im Gesamtkollektiv ($M \pm SEM$)	75
26	Relative Genexpression von IL-6 in den Strata ($M \pm SEM$)	75
27	Relative Genexpression von $TNF-\alpha$ im Gesamtkollektiv ($M \pm SEM$)	76
28	Relative Genexpression von $TNF-\alpha$ in den Strata ($M \pm SEM$)	76
29	Korrelation der relativen Genexpression von $TNF-\alpha$ und der nächtlichen Zeit mit einer Sauerstoffsättigung unter 90% (min/TST) von Probanden und Patienten	77
30	Relative Genexpression von VEGF-A im Gesamtkollektiv ($M \pm SEM$)	78
31	Relative Genexpression von VEGF-A in den Strata ($M \pm SEM$)	78
32	Red. GSH in nmol/mg aller Gruppen (Mittelwert)	84
33	Verhältnis red. GSH [nmol/mg]/GSSG[nmol/mg] aller Gruppen (Mittelwert)	84
34	Extrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen von Glutamat, Glycin und Cystin ($M \pm SEM$)	87
35	Intrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen von Glutamat und Glycin ($M \pm SEM$); Cystin ist intrazellulär nicht nachweisbar	87

36	Extrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen von Glutamat, Glycin und Cystin ($M \pm$ SEM)	89
37	Intrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen von Glutamat und Glycin ($M \pm$ SEM) . .	90

Tabellenverzeichnis

1	Reagenzien zur cDNA- Synthese	37
2	Temperatur- und Zyklusprotokoll der qRT-PCR	38
3	Bezeichnung der verwendeten Primer	42
4	Chemische Reagenzien für Aminosäurenanalyse	47
5	Anthropometrische Daten der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten	54
6	Anthropometrische Daten der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe	55
7	Polysomnographische Untersuchungsergebnisse der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten	56
8	Polysomnographische Untersuchungsergebnisse der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe	57
9	Nüchtern- Blutparameter der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten	59
10	Nüchtern- Blutparameter der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe	61
11	Korrelationen vaskulärer Risikofaktoren mit polysomnographischen Ergebnissen und BMI	63
12	Relative Genexpression der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten	68
13	Relative Genexpression der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe	69
14	Anthropometrische Daten und venöse Blutparameter der OSAS-Patienten vor und nach Therapie	79
15	Relative Genexpression der in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten vor und nach Therapie	80
16	Anthropometrische Daten, schlafdiagnostische Ergebnisse und blutvenöse Parameter aller Kontrollen und Patienten	82
17	Anthropometrische Daten, schlafdiagnostische Ergebnisse und blutvenöse Parameter der nicht-adipösen und adipösen Strata aller Kontrollen und Patienten	83
18	Ergebnisse der GSH und GSSG Bestimmung in gepoolten Gruppen	83
19	Extra- und intrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten	85
20	Extra- und intrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe	86
21	Aminosäuren aller in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten vor und nach Therapie .	88
22	Aminosäuren der nicht-adipösen und adipösen Strata vor und nach Therapie (M ± SEM)	89

1 Einleitung

1.1 Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom

1.1.1 Definiton, Pathophysiologie und Klinik

Das *obstruktive Schlafapnoe-Syndrom* (OSAS) stellt eine der häufigsten schlafbezogenen Atmungsstörung dar. Definiert wird OSAS durch repetitive, obstruktiv-bedingte Atemaussetzer (Apnoe) oder Phasen mit verminderter Atmung (Hypopnoe), wofür ein Kollaps der oberen Luftwege aufgrund vermindertem Tonus der Pharynxmuskulatur (v.a. im REM-Schlaf) verantwortlich ist (Harrison et al. (2012), S.2362). Hierdurch kommt es bei Inspiration durch einen hohen Unterdruck speziell im unteren Atemtrakt zum teilweisen (Hypopnoe) oder vollständigen Kollabieren (Apnoe) der oberen Atemwege (Harrison et al. (2012), S.2362, Dempsey et al. (2010)). Dies führt je nach Körperlage oft zu einem massiven Abfall der Sauerstoffsättigung des Blutes um >15-20% (Strollo and Rogers, 1996; Caples et al., 2005). Dabei kommt es zu einer Hyperkapnie, die zusammen mit der Hypoxie (gemessen u.a. an Chemorezeptoren des Glomus caroticum) nachts zu starkem Atemantrieb und Aufweckreaktionen, sog. *micro-arousals* führt. Die resultierende Schlaffragmentierung reduziert die Qualität des Schlafes bzw. die damit verbundene Erholung deutlich. Die Tagesschläfrigkeit bis hin zum unfreiwilligen Einschlafen stellt das Hauptsymptom der Erkrankung dar (Mayer et al. (2017), S. 101). Begünstigt wird OSAS u.a. durch Adipositas, vergrößerte Tonsillen, Alkohol- und Tabakkonsum ((Mayer et al., 2017), S. 107).

Die Schwere des OSAS wird anhand des sog. „*apnea-hypopnea index*“ (AHI) eingeteilt. OSAS mit einem AHI (N/h) zwischen 5 und 10 wird als „*mild*“, zwischen 10 und 30 als „*moderat*“ und >30 als „*schwer*“ bezeichnet. Die Prävalenz von moderatem bis schwerem OSAS mit einem $AHI \geq 15$ N/h beträgt 23,4% bei Frauen und 49,7% bei Männer (Heinzer et al., 2015). Bei Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung und eines Schlaganfalls steigt seine Inzidenz sprunghaft auf 48- 70% an (Dempsey et al., 2010; Xie et al., 2014; Loo et al., 2014; Mooe et al., 1996).

Bei OSAS kommt es zu einer „*chronisch intermittierenden Hypoxie*“ (CIH) und somit zum dauerhaften „*Hypoxie-Reoxygenierungs-Stress*“ (Hyp-Reox), der unter anderem durch Sauerstoffradikale (Superoxidionen) zu einem proinflammatorischen Milieu führt (Yamauchi et al., 2005; Passali et al., 2015). Dies gilt als Hauptfaktor für eine „*dosisabhängige*“, endotheliale Dysfunktion, Hypertonie, Insulinresistenz und assoziiertes kardiovaskuläres Risiko (Tietjens et al., 2019; Chirinos et al., 2014; Jelic et al., 2010; Levy et al., 2015; Wahlin Larsson et al., 2008; Dempsey et al., 2010; Kraiczi et al., 2001).

1.1.2 OSAS und das metabolische Syndrom

Patienten, die an OSAS leiden, zeigen meist auffällig viele klinische Merkmale, die sich per definitionem mit dem metabolischen Syndrom decken (Kumor et al., 2013). Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO müssen für die Diagnose metabolisches Syndrom entweder eine gestörte Glukosetoleranz bzw. eine Insulinresistenz oder ein Diabetes mellitus in Kombination mit zwei weiteren Parametern vorliegen. Hierzu gehören arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselstörung, stammbetonte Fettleibigkeit und Mikroalbuminurie (Alberti and Zimmet, 1998). Eine Studie zur Prävalenz des metabolischen Syndroms zeigt, dass dieses bei OSAS-Patienten ca. 9-fach häufiger auftritt (Coughlin et al., 2004). Einerseits wurde gezeigt, dass OSAS selbst zum metabolischen Syndrom beiträgt (Chopra et al., 2017). Andererseits leiden viele adipöse Patienten an Schlafapnoe (bis zu 70%, Young et al. 2002b). Als Adipositas-assoziiierter fördernder Faktor für OSAS wird z.B. der Nackenumfang diskutiert, da ein erhöhter Umfang mit OSAS und dem metabolischen Syndrom einhergeht (Cizza et al., 2014). Es besteht also offenbar eine bidirektionale Interaktion von OSAS und dem Gewicht der Patienten (Bozkurt et al., 2016).

Das metabolische Syndrom und OSAS gehen gleichermaßen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einher (Lakka et al., 2002; Wu et al., 2010) (s. Kapitel 1.2), wobei diese beiden Krankheitsbilder jeweils zu ähnlichen Risiken für das kardiovaskuläre System führen. Das Detektieren von OSAS-spezifischen molekularen Veränderungen stellt eine Herausforderung dar, da die beschriebene breite Überlappung von OSAS mit allen Parametern des metabolischen Syndroms besteht (Arnardottir et al., 2009). Die Schwierigkeit, die zwei Syndrome als Risikofaktoren getrennt auf Ihren Beitrag zu Studien-bedingten Endpunkten zu untersuchen, ist Abbildung 4 zu entnehmen.

In vielen bisher durchgeführten Studien zu OSAS wird jedoch nicht ausreichend nach Adipositas stratifiziert (Parlapiano et al., 2005; Dempsey et al., 2010; Gilat et al., 2014). In einigen Studien wird allerdings darauf geachtet, ähnliche „*Body-Mass-Index-Werte*“ (BMI- Werte) in Kontroll- und Patientengruppen zu verwenden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten (Yokoe et al., 2003; Yaranov et al., 2015). Allerdings fehlt eine detaillierte Untersuchung von nicht-adipösen OSAS Patienten, was für die vorliegende Arbeit einen Ausgangspunkt darstellt.

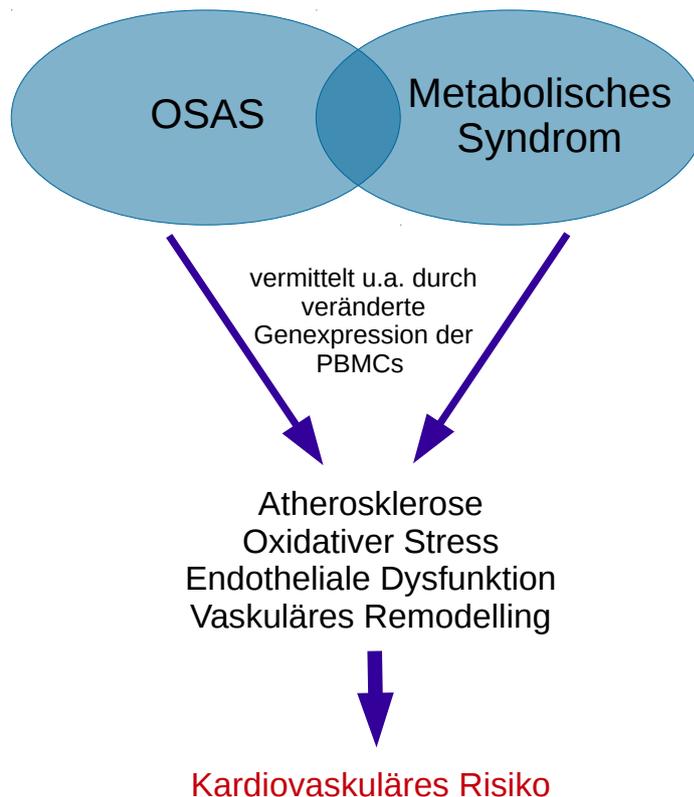


Abbildung 1: Überlappende Auswirkungen von OSAS und metabolischem Syndrom

1.1.3 OSAS und oxidativer Stress

Physiologischerweise werden im Körper z.B. durch die mitochondrialen Elektronentransportkette und Cytochrom-P450-Oxidasen reaktive Sauerstoffverbindungen („*reactive oxygen species*“, ROS) gebildet, die durch Radikalfänger und Antioxidantien z.T. enzymatisch umgewandelt werden können (Klinke et al. (2010), S. 881).

Dieses Schutzsystem des Körpers wird gebildet durch Enzyme, die folgende Reaktionen beschleunigen:



Als Radikalfänger fungieren zudem Vitamin C, Vitamin E, β -Carotin oder Harnsäure. Der „*Xanthinoxidase*“ (XOD) und der „*Xanthindehydrogenase*“ (XDH) werden wichtige Rollen bei oxidativem Stress zugesprochen. Das Enzym XOD kann durch Oxidation aus dem Enzym XDH hervorgehen und ist maßgeblich an der intrazellulären

ren Produktion von O_2^- (Superoxid-Anionenradikal) beteiligt (Chung et al., 1997):

Xanthinoxidase: $Xanthin + O_2 \rightarrow O_2^- + \text{Harnsäure}$

Xanthindehydrogenase: $Xanthin + NAD \rightarrow NADH + \text{Harnsäure}$.

Wenn allerdings ein Ungleichgewicht zwischen diesen Systemen besteht spricht man von „*oxidativem Stress*“ durch vermehrte Bildung der Verbindungen Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Superoxid- Anionenradikal (O_2^-) und das Hydroxylradikal (OH^-) (Mesarwi et al., 2015). Diese können ebenfalls durch Zigarettenrauch und Luftverschmutzungen aufgenommen oder im Rahmen von Infektionen bzw. von CIH im Rahmen von OSAS gebildet werden. Sie besitzen die Eigenschaft, Zellstrukturen wie z.B. Nukleinsäuren (Yamauchi et al., 2005) und Proteine (Yang et al., 2013) oxidativ zu verändern, wodurch ihnen auch eine wichtige Rolle in der unkontrollierten Zellproliferation und somit Karzinomentstehung zugesprochen wird. Deutlich häufiger allerdings gehen die betroffenen Zellen, wie z.B. Endothelzellen, in die Apoptose, wodurch wiederum Zytokine freigesetzt werden, die aktivierend auf Zellen des mononukleären-phagozytären Systems wirken. Somit stellt eine erhöhte Belastung durch ROS ein kardiovaskuläres Risiko hinsichtlich Arteriosklerose dar. Da Patienten, die an OSAS erkrankt sind, einer massiv erhöhten Zahl an Hypoxie-Reoxygenierungs-Zyklen durch CIH ausgesetzt sind und somit unter Hyp-Reox-Stress leiden, wird angenommen, dass hierdurch auch die Belastung durch ROS gesteigert ist (Yamauchi et al., 2005; Passali et al., 2015). Durch diese pro-oxidative Aktivierung der mononukleären Zellen ändert sich vor allem auch deren proinflammatorische Genexpression. Die vermehrte Expression von Zytokinen und Enzymen führt unter anderem im Blut zu erhöhten Entzündungswerten (z.B. CRP- Werten) (Punjabi and Beamer, 2007). Bei dieser Veränderung der Expression durch Entzündungsreaktionen spielt der Transkriptionsfaktor „*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*“ (NF- κ B) eine zentrale Rolle. Dieser meist im Zytoplasma vorkommende Faktor wird u.a. via Toll-Like-Rezeptoren durch Lipopolysachharide aktiviert, in den Zellkern transloziert und führt dort zur Induktion verschiedener Gene (z.B. „*Cyclooxygenase-2*“ - COX-2), die für die Immunantwort essentiell sind (Rassow et al. (2012), S.660). NF- κ B ist zudem ein redox- und sauerstoffsensitiver Faktor und steht unter dem Einfluss des proatherogenen Zytokins „*tumor necrosis factor- α* “ (TNF- α) (Wong et al., 1997; Haddad, 2002). Studien zeigen darüber hinaus, dass antioxidative Enzyme (z.B. Katalase und Glutathionperoxidase) im venösen Blut bei Patienten, die an OSAS erkrankt sind, in geringerem Maße auftreten (Asker et al., 2015).

Wenig untersucht ist dagegen die Rolle des intrazellulären „*Glutathion*“ (GSH)- Antioxidanz bei OSAS: Bei Glutathion handelt es sich um ein überwiegend intrazelluläres Tripeptid (v.a. Muskel und Gehirn) aus Glutamat, Cystein und Glycin, das neben der Funktion als Antioxidanz auch in der Biotransformation (Phase II) eine wichtige Rolle einnimmt (Rassow et al. (2012), S. 737). Bei der Reduktion von ROS wird es von der monomeren Form GSH aufgrund einer freien Thiolgruppe vom Cystein zum „*Glutathiondisulfid*“ (GSSG) mittels der oben genannten Glutathionperoxidase oxidiert. Hierdurch werden Elektronen auf ROS übertragen und diese damit unschädlich gemacht (Klinke et al. (2010), S. 472). GSSG kann durch die „*Glutathionreduktase*“ (GSR) wieder reduziert werden und somit erneut antioxidativ wirksam werden:



Da Glutathion nicht mit der Nahrung aufgenommen wird, muss es vom Körper aus den drei Aminosäuren mittels des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms „*Glutamatcysteinligase*“ (GCL) und „*Glutathionsynthase*“ (GSS) durch Kondensation von Glutamylcystein und Glycin synthetisiert werden, wobei Cystein der limitierende Faktor ist. Cystein wiederum kann durch verschiedene Lebensmittel (z.B. Schweinefleisch, Lachs) aufgenommen werden oder, da es eine nicht-essenzielle Aminosäure ist, aus Methionin intermediär entstehen (Lu, 2009). Das Verhältnis von GSH zu dessen Disulfid GSSG bestimmt hauptsächlich den intrazellulären Redoxstatus bzw. das Redoxpotential. Je größer dieses Ratio ist, desto besser können Sauerstoffradikale abgepuffert und die Zelle geschützt werden. Somit kann das oben beschriebene, durch ROS ausgelöste kardiovaskuläre Risiko durch physiologische Verhältnisse von GSH:GSSG reduziert werden. Thiolantioxidantien sind an einer Vielzahl von Vorgängen im Körper beteiligt. Hierzu gehören die bereits erwähnte GSH-Bildung als Thiol/Disulfid Puffersystem, eine chelatbildende Verbindung sowie Radikalfänger (Deneke, 2000). Hinzu kommt die Cystinbildung aus zwei Cystein-Aminosäuren. Eine Untersuchung des Redoxstatus im Plasma von älteren Probanden stellt fest, dass sich im Vergleich zu jungen Kontrollen erhöhte Cystinwerte, aber kaum Veränderung in der Thiolkonzentration finden, wobei dies an einer erhöhten Anzahl freier und löslicher Aminosäuren liegen könnte (Hildebrandt et al., 2002). Kinscherf et al. (2003) zeigen eine positive Korrelation zwischen der Thiol- und der „*High density lipoprotein*“ (HDL)- Konzentration im Plasma. Aufgrund dessen wird vermutet, dass ein exzessiver Metabolismus von Cystein und damit einhergehender Rückgang der Thiol- Konzentration für niedrige HDL-, sowie auch erhöhte „*Low density lipoprotein- Spiegel*“ (LDL- Spiegel) verantwortlich ist. Dies ist ein Beispiel dafür, inwiefern sich kardiovaskuläre Risikofaktoren (z.B. erhöhtes LDL) und antioxidative Systeme beeinflussen.

1.2 OSAS- assoziiertes kardiovaskuläres Risiko

1.2.1 OSAS als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor

OSAS gilt als ein unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor (Moore et al., 1996; Lavie et al., 2005; Hung et al., 1990; Dempsey et al., 2010; Yaggi et al., 2005; Punjabi et al., 2002).

So ist arterielle Hypertonie mit OSAS assoziiert bzw. wird durch Schlafapnoe verursacht (Gottlieb et al., 2014; Tamisier et al., 2011). Dies wird u.a. in der „*Sleep Heart Health Study*“ von Baltimore untersucht, die diesen Effekt unabhängig von Geschlecht, Gewicht und ethnischem Hintergrund zeigt (Nieto et al., 2000). Die Erhöhung des systemischen Blutdrucks durch OSAS wird als eine Folge der Hypersensibilität von Chemorezeptoren durch eine dauerhafte vasokonstriktorisch wirkende Aktivierung des Sympathikus gesehen (Somers et al., 1995). Unterstützt wird dieser Vorgang durch eine Überproduktion von Superoxidionen und somit durch ein proinflammatorisches Milieu der Widerstandsgefäße (Dempsey et al., 2010). Dies führt zu einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasodilatation der Widerstandsgefäße als Faktor der arteriellen Hypertonie, die bei OSAS-Patienten gehäuft besteht (Kato et al., 2000). Dies wird gestützt durch eine prospektive Studie, die eine von weiteren Confoundern unabhängige Erhöhung des Blutdrucks durch OSAS beschreibt (Peppard et al., 2000). Im Widerspruch hierzu steht allerdings die Aussage einer prospektiven Studie, die nach der Blutdruckbestimmung von 2470 Patienten und Berücksichtigung des Confounders „Adipositas“ keine Erhöhung des systemischen Blutdrucks durch moderates OSAS ($AHI < 30$ N/h) nachweist (O'Connor et al., 2009). Zu beachten ist hierbei, dass OSAS zum metabolischen Syndrom beiträgt (Bozkurt et al., 2016).

Neben Hypertonus werden auch weitere vaskuläre zu OSAS- assoziierte Endpunkte wie koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und Schlaganfall beschrieben. Bereits 1990 wird festgestellt, dass OSAS ein unabhängiger Risikofaktor für Herzinfarkte ist (Hung et al., 1990). Darüber hinaus wird ein Zusammenhang zwischen OSAS-Patienten mit nächtlicher Hypoxämie und koronarer Herzkrankheit aufgezeigt (Moore et al., 1996; Ghazal et al., 2015; Moore et al., 2001). Zudem erkrankten Patienten mit schwerer OSAS ($AHI > 30$ N/h) ohne Behandlung 2,6-fach häufiger an Herzinsuffizienz oder Koronarsyndrom als Behandelte (Hla et al., 2015).

Bei der Betrachtung der Inzidenz von OSAS- assoziierten Folgeerkrankungen beschreibt die „*Sleep Heart Health Study*“, dass schlafbezogene Atmungsstörungen häufig mit Herzversagen, Schlaganfall und Koronarsyndrom einhergehen (Shahar et al., 2001).

Weiterhin zeigen prospektive Studien eine von Hypertension unabhängige Korrelation zwischen dem obstruktiven Schlafapnoe- Syndrom und Schlaganfallrisiko (Yaggi et al., 2005; Young et al., 2002a). OSAS wird des Weiteren als von Vorhofflimmern unabhängiger Risikofaktor für Schlaganfall bestätigt (Yaranov et al., 2015). Eine große epidemiologische Studie zeigt nach der Auswahl von über 2500 Patienten ein deutliches OSAS-assoziiertes Risiko für arterielle und pulmonale Hypertonie, Kardiomyopathie sowie Herzrhythmusstörungen (Gilat et al., 2014).

1.2.2 Rolle der PBMC bei der Atherosklerose

Die „*peripheral blood mononuclear cells*“ (PBMCs) stellen eine Gruppe von Leukozyten dar, die hauptsächlich aus Lympho- und Monozyten bestehen. Diese sind an zahlreichen inflammatorischen, proatherogenen und vaskulären Vorgängen beteiligt und nehmen durch ihre phagozytische und zytokinbildende Funktion eine Schlüsselrolle bei zahlreichen Erkrankungen ein. Hierzu zählen vor allem Atherosklerose und assoziierte Komorbiditäten (Harrison et al. (2012), S. 2125f.).

Zu den mononukleären Zellen des peripheren Blutes werden zusätzlich zahlreiche Progenitorzellen gezählt (Zhang and Huang, 2012). In Studien wird über hämatopoetische (Damon and Damon, 2009; Zhang et al., 2009) und mesenchymale Stammzellen (Zvaifler et al., 2000) sowie endotheliale Vorläuferzellen (Asahara et al., 1997) in diesem Kompartiment berichtet. PBMCs besitzen die Eigenschaft, sich zu verschiedenen Gewebezellen zu differenzieren. Ihnen wird bei immunologischen und inflammatorischen Reaktionen des Körpers eine Hauptrolle zugesprochen. Zum einen sind sie an der direkten Immunantwort beteiligt, und zum anderen werden Entzündungsreaktionen, ob durch Erreger oder oxidative Vorgänge, von ihnen getriggert und verstärkt. Somit haben sie bei der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung eine wichtige, teils prognostischen Rolle.

In den westlichen Industrieländern stellt Atherosklerose die führende Ursache für Tod und Behinderung dar (Harrison et al. (2012), S. 2125). Es handelt sich um eine chronische und progressive Erkrankung, die innerhalb von mehreren Jahren entsteht, dabei allerdings ein diskontinuierliches Fortschreiten aufweist und je nach betroffenem Gefäßabschnitt zu unterschiedlichen Symptomen und Krankheiten (z.B. Angina pectoris, periphere arterielle Verschlusskrankheit) führen kann. Über die Entstehung und Pathophysiologie von Artherosklerose gibt es zahlreiche Hypothesen. Eine führende Theorie von Russell Ross erklärt die Ätiopathogenese mit der „*Response to injury*“- Hypothese:

Durch inflammatorische Mediatoren, wie z.B. TNF- α kommt es nach dieser Hypothe-

se im Gefäßsystem zu einer Erhöhung der Permeabilität des Endothels, wodurch ein Einwandern von Monozyten in die Gefäßwand (sog. „*Diapedese*“) ermöglicht wird. Es folgt die Differenzierung zu Makrophagen. Rekrutieren und Diapedese unterliegen einem komplexen Mechanismus, an dem verschiedene Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren, chemotaktische Faktoren und Zytokine beteiligt sind (Fenyo and Gafencu, 2013). Verstärkt wird die Expression dieser Rezeptoren zum Beispiel durch das oxidativ modifizierte LDL. Die Migration wird unter anderem durch das sog. „*Monocyte chemoattractant protein 1*“ (MCP-1) gesteuert.

Zudem kommt es durch diese Permeabilitätssteigerung im Endothel letztlich zu erhöhten Akkumulation an Lipoproteinen im Subintimaraum, wodurch sie oxidativ modifiziert werden können und u.a. Aldehydabbauprodukte gebildet werden (Libby and Aikawa, 2002). Die lipoproteinassoziierte Phospholipase A2 kann aus oxidierten Phospholipiden in LDLs proinflammatorische Lipide herstellen. Lipoproteine können an Bestandteile der extrazellulären Matrix binden und sich mit Glykosaminoglykanen verknüpfen. Durch diese Prozesse werden die Fette in der Intima der Gefäße gehalten und Vorläufer der späteren Plaques, sog. „*Fatty Streaks*“ entstehen (Harrison et al. (2012), S. 2126). Zu den antiatherogenen Faktoren, die die Ablagerung von Lipiden reduzieren bzw. aufhalten, gehören zum Beispiel HDL, das mithilfe der ATP-Binding-Cassette(ABC)-Transporter Cholesterin aufnehmen und zur Leber transportieren. Erst wenn diese antiatherogenen Mechanismen erschöpft sind, kommt es zu einer Lipidablagerung (Harrison et al. (2012), S. 2126f.). Die eingewanderten Zellen binden unter anderem oxidativ modifiziertes LDL über Scavenger- Rezeptoren, wodurch intrazelluläre Signalwege aktiviert werden und es zu einer erhöhten Expression an Zytokinen kommt (Hajjar and Haberland, 1997; Bonaterra et al., 2007). Außerdem nehmen sie die mit Cholesterin beladenen LDL-Partikel durch Endozytose auf. Hierdurch differenzieren sich die Makrophagen zu sog. „*foam cells*“ (Schaumzellen) (Moore and Freeman, 2006), die sich in der Gefäßwand ablagern, Ischämie erzeugen und somit wiederum die Zytokinproduktion erhöhen. Zu den in Plaques freigesetzten Zytokinen gehören unter anderem „*Interleukin-1*“ (IL-1), TNF- α und zahlreiche Wachstumsfaktoren. Schaumzellen gehen anschließend in die Apoptose, was die Plaque-Entstehung, v.a. in Arterien, fördert. Hierdurch entsteht ein lipidreiches Zentrum bzw. ein nekrotischer Kern in adulten Plaques. Durch verschiedene Mediatoren kommt es zum Anlocken weiterer Monozyten und das Einwandern und die Proliferation von glatten Muskelzellen, die die Dicke der Plaques erhöhen (Gui et al., 2012). Hierfür wird von eingewanderten Monozyten und Endothelzellen der „*plättchenabhängige Wachstumsfaktor*“ (PDGF) gebildet, der die Migration der glatten Muskulatur aus der Tunica media in die Intima ermöglicht. Die Produktion von extrazellulärer Matrix wird unter anderem durch den sog. „*Transformierten Wachstumsfaktor β* “ (TGF- β) stimuliert, der maßgeblich

an einer Plaquentstehung und -entwicklung beteiligt ist. Antagonisiert wird dies durch „*Interferon- γ* “ (IFN- γ). Somit entwickeln sich aus den fettreichen Vorläuferläsionen fibröse Plaques mit zahlreicher extrazellulärer Matrix und glatten Muskelzellen (Harrison et al. (2012), S. 2127).

An den Prädilektionsstellen für die Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen findet sich meist ein gestörter laminärer Fluss (z.B. Gefäßbifurkationen). Durch normale laminäre Scherkräfte im arteriellen Gefäßsystem wird die Produktion des vasodilatatorischen Moleküls Stickstoffmonoxid erhöht. Dies weist gleichzeitig auch einen antiinflammatorischen Effekt durch Reduktion von Leukozytenadhäsionsmoleküle auf.

In wachsenden Plaques verringert sich die Sauerstoffkonzentration, sodass es, tumorähnlich, zur Ausbildung eigener Mikrogefäße kommt. Diese begünstigen wiederum die Plaquentstehung, da sie die Leukozyteninfiltration erleichtern. Im späteren Stadium lagern sich neben Kalziumionen auch kalziumbindende Proteine ab, die an die Knochenbildung erinnern (Harrison et al. (2012), S. 2127).

OSAS gilt als Risikofaktor für eine atherosklerotischen Verdickung der Intima der Arteria carotis, die hierbei auch unabhängig von Hypertonie entstehen kann (Damiani et al., 2015).

1.2.3 Inflammatorische Gefäßrisiken bei OSAS

Getriggert wird die beschriebene Entstehung von Atherosklerose durch ein inflammatorisches Milieu im Gefäßsystem und die hierdurch bedingte endotheliale Dysfunktion. Dieses Milieu kann durch erhöhte Werte an oxidiertem LDL oder hohe Konzentrationen an freien Radikalen entstehen. Die Radikale entstehen wiederum direkt oder indirekt durch Rauchen, Hypertension, Infektionen und Hypoxie, die bei OSAS als intermittierender Faktor auftritt. Dass OSAS mit einer Inflammation im Gefäßsystem einhergeht, bzw. diese bedingt, wird unter anderem 2002 durch einen erhöhten CRP-Spiegel bei Patienten gezeigt (Shamsuzzaman et al., 2002). Zusätzlich kann endotheliale Dysfunktion durch OSAS nachgewiesen werden (Hopps and Caimi, 2015).

Erste PBMC-Genexpressions-Studien weisen bei OSAS-Patienten auf erhöhte proatherogene Marker wie MnSOD hin, die auch nach Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Kinscherf bei anderen kardiovaskulären Risikogruppen (Hyperlipidemikern) hochreguliert sind (Hoffmann et al., 2007; Bonaterra et al., 2005, 2007).

Im Mausmodell des OSAS wird eine endotheliale Aktivierung mit Expression von „*intercellular adhesion molecule 1*“ (ICAM-1), Leukozyten- Adhesion, -Rolling und -Intima-Invasion, sowie vaskuläres Remodelling gezeigt (Arnaud et al., 2011).

Der „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF) ist ein Zytokin, das bei der Angiogenese eine zentrale Rolle spielt und über drei verschiedene VEGF-Rezeptoren (Tyro-

sinkinase) stimulierend auf vaskuläres Endothel wirkt (Yla-Herttuala et al., 2007). Bei verringerter zellulärer Sauerstoffversorgung kommt es zur Ausschüttung von hypoxie-induzierten Faktoren (v.a. der Transkriptionsfaktor „*hypoxia inducible factor-1*“ HIF-1) und nachfolgend vermehrter Transkription von VEGF, was auf Proteinebene letztlich die Angiogenese stimuliert (Mohamed et al., 2004). Unterstützt wird diese Angiogenese durch einen „*basic fibroblast growth factor*“ (bFGF). Bei bFGF handelt es sich um ein Protein, das vor allem bei der Tumorentwicklung sowie Wundheilung beteiligt ist und entscheidenden Einfluss auf die Entstehung neuer Blutgefäße hat.

Es wird beschrieben, dass eine Produktion von VEGF durch Monozyten die Expression von MCP-1 in endothelialen Zellen erhöht, hierdurch weitere mononukleären Zellen angelockt werden und die Permeabilität des Endothels erhöht wird (Harrison et al. (2012), S. 1935, S. 2127). Somit ist VEGF an arteriosklerotischen Vorgängen beteiligt.

Bei OSAS-Patienten kommt es, wie bereits beschrieben, zu einer nächtlichen, chronisch intermittierenden Hypoxie. Dies führt zu einem verringerten Sauerstoffangebot und Hyp- Reox- Stress. Untersuchungen von VEGF-A- Konzentrationen im Serum von OSAS-Patienten liefern unterschiedliche Resultate: Einerseits wird eine Erhöhung der Konzentration beschrieben (Maeder et al., 2015; Schulz et al., 2000, 2002). Andererseits zeigen weitere Studien eine Erhöhung bedingt durch das Alter der Patienten und weniger durch die Schwere der OSAS-Erkrankung (Peled et al., 2007).

Die VEGF-Produktion findet, neben PBMCs, hauptsächlich in endothelialen Zellen statt. Es wird gezeigt, dass aktivierte T-Zellen nach Stimulation mit Interleukin-2 und Hypoxie ebenso an seiner Produktion beteiligt sind (Mor et al., 2004). Weiterhin ist in PBMCs von OSAS-Patienten eine vermehrte Expression von VEGF-A (Takahashi et al., 2005) und diversen „*Metalloproteinasen*“ (MMP) inkl. MMP-9 (als Faktor des vaskulären Remodellings) zu finden, wobei in dieser Studie nicht bezüglich BMI kontrolliert wird. Darüber hinaus wird festgestellt, dass eine erhöhte Produktion von Angiotensin II die VEGF- Expression in PBMC verstärkt und somit indirekt an vaskulärem Remodelling beteiligt ist (Takahashi et al., 2005). Zusätzlich können in der Population der PBMCs endotheliale Vorläuferzellen gefunden werden, die direkt an der Bildung von Kollateralen zur Blutversorgung von ischämischem Gewebe beteiligt sind (Asahara et al., 1997). Zudem werden Endothelzellen durch den oben beschriebenen plättchenabhängigen Wachstumsfaktor stimuliert, die hierdurch ihre mitotische Aktivität erhöhen und somit zur Neovaskularisierung beitragen (Jaipersad et al., 2014).

Während es, wie beschrieben, bereits mehrere Untersuchungen zu den Serumkonzentrationen von VEGF-A gibt, ist bisher unklar, inwiefern sich die VEGF-A- Expression auf RNA-Level in PBMCs unabhängig von Adipositas bei OSAS-Patienten verändert.

1.2.4 Eigenschaften relevanter proatherogener Zytokine bei OSAS

Die nachfolgend angegebenen Zytokine, die in dieser Studie in PBMCs untersucht werden, gelten als relevant für Atherosklerose. Es ist bisher jedoch nicht hinreichend untersucht worden, ob und in welchem Ausmaß sie von OSAS oder Adipositas beeinflusst werden.

Inflammatorische Zytokine:

TNF- α : TNF- α wirkt als Akut-Phase-Protein auf fast alle Körperzellen außer Erythrozyten (Harrison et al. (2012), S.2875) und senkt die periphere Insulinsensitivität. Es wird v.a. durch Makrophagen ausgeschüttet (Morishita et al., 2015). Weitere Produktionszellen sind neben Monozyten und Mastzellen auch basophile und neutrophile Granulozyten. Außerdem induziert es Adhäsionsmoleküle und die Expression chemotaktischer Faktoren (Sullivan et al., 2007). Neben der Induktion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine ist es an der Entstehung von Fieber und Schock maßgeblich beteiligt, erhöht die Leukozytenzytotoxizität und steigert die „*Natürliche Killerzellen-Funktion*“.

Desweiteren ist es an Atherogenese beteiligt, da es unter anderem von apoptotischen mononukleären Zellen freigesetzt wird, die sich durch Phagozytose von oxidativ verändertem LDL zu Schaumzellen entwickelt haben (Yehuda et al., 2011). Hierdurch werden weitere inflammatorische Zellen aktiviert und ein verstärkter proatherogener Prozess wird in Gang gesetzt.

IL-1 β : Bei IL-1 β handelt es sich um ein Zytokin, das schon in sehr geringen Mengen einen Anstieg an Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten), Fieberentstehung und eine Hochregulation der COX-2 in Endothelzellen bewirkt. Es wird, wie auch TNF- α , von Monozyten bzw. Makrophagen, B-Zellen und Fibroblasten gebildet. Neben dem Auslösen von Fieber und Schock bewirkt es eine Einwanderung von Neutrophilen und Makrophagen ins Gewebe, wodurch es maßgeblich eine vaskuläre Plaquentstehung fördert (Harrison et al. (2012), S. 2874, S. 2127).

IL-6: IL-6 wirkt zum einen auf einen membrangebundenen Rezeptor, der u.a. auf Leukozyten vorkommt, und zum anderen auf einen löslichen Rezeptor, wodurch zahlreiche Körperzellen erreicht werden. Dieses Zytokin wird bei akuten Entzündungsreaktionen vermehrt ausgeschüttet wodurch T-Lymphozyten angelockt werden. Hierdurch stellt es einen wichtigen Mediator an der Schlüsselstelle beim Übergang von der angeborenen zur erworbenen Immunantwort dar. Des Weiteren wirkt IL-6 auf Leukozyten apoptotisch, wohingegen es T-Lymphozyten antiapoptotisch beeinflusst (Jones, 2005).

PTGS-2: Die „*Prostaglandin-Endoperoxidsynthase 2*“ (PTGS-2), auch COX-2 genannt, ist ein Enzym, das Arachidonsäure zu Prostaglandin H_2 oxidiert. Dieses stellt die Vorstufe für viele weitere Prostaglandine und Thromboxane dar. Sie haben vielfältige Aufgaben im Kontext der Fieberentstehung und Chemotaxis. COX-2 wird im Gegensatz zu COX-1 nicht konstitutiv, sondern hauptsächlich nach Stimulation exprimiert (Graefe et al. (2011), S.131). Stimuli zur Expression von COX-2 sind meist extrazellulärer, inflammatorischer Art. Isoformen dieses Enzyms können in Makrophagen, Leukozyten und Fibroblasten, sowie in Epithelien des gastrointestinalen Trakts nachgewiesen werden (Rassow et al. (2012), S. 628). Die Untersuchung von atherosklerotischen Plaques auf COX-2- Genexpression hat vor allem bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II eine Erhöhung gezeigt (Baldan et al., 2014). Inflammatorische Prozesse, die u. a. durch das Enzym COX-2 vermittelt werden, sind als eigenständiger Mechanismus zur Entstehung von Plaques akzeptiert (Harrison et al. (2012), S.2127).

SOCS-3: Der „*Suppressor of Cytokine Signaling 3*“ (SOCS-3) unterdrückt verschiedene Signalwege, die durch Zytokine aktiviert werden. Seine eigene Expression unterliegt der Stimulation von inflammatorische Zytokinen, sodass es Teil eines Feedbackmechanismus ist. Eine mRNA- Stabilisierung und damit verbundene erhöhte Expression von SOCS-3 wird durch TNF- α ausgelöst, wobei IL-6 als Antagonist tätig ist (Ehltling et al., 2007). Bei der Untersuchung von atherosklerotischen Vorgängen findet sich eine positive, signifikante Korrelation von SOCS-3- Genexpression in PBMCs und Serumcholesterinkonzentrationen. Deshalb wird vermutet, dass SOCS-3 die Entstehung und Entwicklung von Atherosklerose fördert (Liang et al., 2013).

Antioxidatives Enzym

SOD-2: Die „*Superoxiddismutase-2*“ (SOD-2) ist ein Genabschnitt, der das Enzym MnSOD codiert. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid. Die Funktion dieses Enzyms wird in Kapitel 1.1.3 beschrieben.

Angiogenetisch wirksame Zytokine

VEGF-A: Bei VEGF-A handelt es sich um ein Zytokin, das vor allem für angiogenetische bzw. vaskulogenetische Vorgänge von Bedeutung ist. Hier spielt es v.a. in der Wundheilung, beim Muskelwachstum und bei der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle. Wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben, ist VEGF an der Plaquentstehung beteiligt, indem durch apoptotische mononukleäre Zellen in der Gefäßwand ein hypoxischer Bereich entsteht, in dem die Ausschüttung von VEGF eine Neubildung von Mikrogefäßen mit inflammatorischer Infiltration fördern kann (Harrison et al. (2012), S. 2127; Rassow et al. (2012), S.645).

GDF-15: Der „*growth differentiation factor- 15*“ (GDF-15) besitzt die Fähigkeit TNF- α zu inhibieren. Wiederum ist es an der Makrophagenaktivierung beteiligt. Er gehört zu der TGF- β - Superfamilie (Zimmers et al., 2005). Eine antiinflammatorische und immunsuppressive Fähigkeit von GDF-15 wird diskutiert (Breit et al., 2011). Zudem zeigen Tierstudien, dass es sich bei GDF-15 um einen zentralen Regulator des Appetits und somit des Körpergewichts handelt (Tsai et al., 2013). Ebenso wird er als Biomarker für mitochondriale Funktionsstörung, Alterungsprozesse und Mortalitätsprädiktor verwendet (Yatsuga et al., 2015). Eine Untersuchung von GDF-15-Plasmakonzentrationen von über 3000 Probanden zeigt, dass GDF-15 mit subklinischer Atherosklerose und der Plaquepräsenz in der Arteria carotis assoziiert ist und es bereits ein früher Marker zum Screening des kardiovaskulären Risikos darstellen könnte (Gopal et al., 2014). GDF-15 wird eine protektive Rolle bei fortgeschrittener Atherosklerose und Makrophagenakkumulation zugesprochen, da es vermutlich die Expression von Adhäsionsmolekülen reduziert (Preusch et al., 2013).

Lipidmetabolismus

CD-36: Der „*Cluster of differentiation- 36*“ (CD-36), auch „*fatty acid translocase*“ (FAT) genannt, gehört zur Klasse B der Scavenger- Rezeptoren und ist ein Rezeptor für verschiedene Stoffe wie Fibronectin und oxidiertes LDL. Daher fördert es die Aufnahme von verestertem Cholesterin z.B. in Makrophagen und Monozyten, wodurch es an der Schaumzellentstehung und somit an Plaquenentwicklung beteiligt ist (Park, 2014). Zudem findet man diesen Rezeptor auf Thrombozyten, Endothel- und Epithelzellen, sowie Adipozyten. Da es bei Entzündungen und angiogenetischen Vorgängen, aber auch beim Fettstoffwechsel und der Fettsorption eine wichtige Rolle spielt, kommt diesem Oberflächenprotein eine große Bedeutung zu (Park, 2014).

ABCG-1: Der „*ATP binding cassette transporter G- 1*“ (ABCG-1) ist ein intrazellulärer Steroltransporter, der an Endozytosevesikel gebunden ist und die Umverteilung von bestimmten Sterolen erleichtert, vor allem den Abtransport vom endoplasmatischen Retikulum (Tarling and Edwards, 2011). Seine Hauptaufgabe besteht darin, unter ATP-Verbrauch Cholesterin aus der Zelle zu schleusen, wo es anschließend von HDL aufgenommen und abtransportiert wird. Dieser hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten exprimierte Transporter nimmt eine antiatherogene Funktion ein, da er Cholesterinabtransport fördert und auch gegen endotheliale Dysfunktion vorbeugt (Terasaka et al., 2008).

1.2.5 PBMC und Zytokinproduktion bei OSAS

Wie bereits beschrieben, besteht eine wichtige Funktion der mononukleären Zellen in der Produktion von Zytokinen. Diese wird durch viele verschiedene Reize ausgelöst, wobei v.a. Entzündungen einen starken Trigger darstellen. Hierzu zählen neben Zellschädigungen auch Lipopolysaccharide (Schildberger et al., 2013).

Es ist bereits in einige Studien das Zytokinprofil von Patienten bei OSAS und weiteren Erkrankungen wie Diabetes mellitus untersucht worden (Guasti et al., 2011; Kritikou et al., 2014; Bonaterra et al., 2007; Yokoe et al., 2003; Nadeem et al., 2013). Meist werden die Plasmakonzentrationen der jeweiligen Zytokine und Enzyme bestimmt. Zur Quantifizierung der Genexpression bieten sich molekulargenetische Methoden (z.B. „*polymerase chain reaction*“ PCR) an.

OSAS-Patienten und Kontrollprobanden mit ähnlichem kardiovaskulären Risikoprofil werden für eine Zytokinuntersuchung von Guasti 2011 in Gruppen eingeteilt. Als Grenzwert für OSAS wird ein AHI>20 N/h festgelegt und die Produktion von TNF- α durch PBMCs und IL-8 durch neutrophile Granulozyten untersucht (Guasti et al., 2011). Hierbei besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Probanden und Patienten. In mononukleäre Zellen des Blutes bei adipösen Probanden hingegen kann eine deutlich erhöhte Expression von Inflammationsmarkern (IL-2, TNF- α , IFN- γ , CD36, CD68, CD40) im Vergleich zu nicht-adipösen Kontrollen festgestellt werden, bei denen die Prävalenz von OSAS allerdings unbekannt war (Dicker et al., 2013).

Der Studie von Guasti stehen einige Studien gegenüber, die ein verändertes Zytokinprofil durch OSAS beschreiben. Eine Untersuchung der Serumkonzentrationen von CRP und IL-6, sowie die Produktion von IL-6 durch Monozyten, zeigt, dass bei adipösen OSAS-Patienten signifikant erhöhte Werte gegenüber adipösen Kontrollen vorliegen (Yokoe et al., 2003). Allerdings sind in dieser Studie OSAS-Patienten mit verschiedenen Schweregraden der Erkrankung (mild, moderat, schwerwiegend) zusammen analysiert und keine Gruppe mit nicht-adipösen Patienten bzw. Probanden untersucht worden.

Eine Metaanalyse mit 51 eingeschlossenen Studien untersucht unter anderem die Serumkonzentrationen von CRP, IL-6, IL-8 und TNF- α bei OSAS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen und zeigt eine Erhöhung dieser Inflammationsmarker (Nadeem et al., 2013). Hierbei ergibt sich ein Bild, das auf inflammatorische Effekte durch OSAS hinweist. Da zumindest eine Studie zudem über eine Reversibilität von erhöhten Entzündungsmarkern unter „*continous positive airway pressure*“ (cPAP)-Therapie berichtet, ergibt sich insgesamt ein Hinweis auf OSAS als Ursache dieser Veränderung (Jin et al., 2017).

1.2.6 OSAS und Insulinresistenz

Einige klinische Studien demonstrieren, dass OSAS unabhängig von Adipositas zu Insulinresistenz (Ip et al., 2002; Borel et al., 2013) und so zu Diabetes mellitus II führen kann. Insulinresistenz könnte dabei ähnliche proinflammatorische bzw. prooxidative Ursachen haben wie Gefäßrisiken oder durch gestörte Mikrozirkulation selbst verursacht sein.

„*The Cardiovascular Health Study*“ zeigt, dass Schlafapnoe und Schnarchen unter den Bedingungen eines standardisierten oralen Glucosetoleranztests mit erhöhten Glucosewerten (0 min, 120 min) bei älteren Erwachsenen einhergehen. Das bedeutet eine erhöhte Insulinausschüttung bei geringerer Insulinsensitivität (Strand et al., 2015). Studien der letzten zwei Jahrzehnte beschreiben, dass einerseits OSAS, bzw. die damit einhergehende nächtliche Hypoxie die periphere Insulinresistenz erhöht und dass andererseits Diabetes mellitus Typ II auch die Entstehung von nächtlichen schlafbezogenen Atemstörungen fördert (Aurora and Punjabi, 2013). Einige Studien an OSAS-Patienten legen nahe, dass Schlafunterbrechungen und die hierdurch aktivierte sympathische Erregung sowie die darauffolgende intermittierende Hypoxie und der oxidative Stress den Glucosemetabolismus beeinträchtigen (Kent et al., 2015; Yildirim et al., 2015). Ein systemisches Screening im klinischen Alltag bei Vorliegen einer dieser Erkrankungen für die jeweils andere wird diskutiert, da eventuellen Spätfolgen frühzeitig durch Lebensumstellung, medikamentöse- oder cPAP- Therapie entgegengewirkt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass eine über zwei Wochen durchgeführte cPAP-Therapie (>8h/Nacht) zu einer Verbesserung des Glukosemetabolismus durch Erhöhung der Insulinsensitivität bei Patienten mit Prädiabetes führt (Pamidi et al., 2015). Darüber hinaus wurde eine Assoziation zwischen starker Tagesschläfrigkeit und Insulinresistenz gefunden, die nicht durch die Schwere des OSAS, Alter oder Körpergewicht beeinflusst wird. Mit Hilfe dieser Tagesmüdigkeit ist es folglich möglich, OSAS-Patienten zu identifizieren, die ansonsten noch viele weitere Symptome des metabolischen Syndroms aufweisen (Barcelo et al., 2008). Es ist dabei jedoch zu beachten, dass viele OSAS-Patienten das Hauptsymptom der Tagesmüdigkeit nicht oder nur in geringem Maße aufweisen. Zudem gibt es viele weitere Erkrankungen und Lebensgewohnheiten (z.B. mangelnde Schlafhygiene, organische und psychiatrische Erkrankungen), die zu Tagesschläfrigkeit führen können (Mayer et al. (2017), S. 115). Wichtig für die Ergebnisse der vorliegenden Studie ist somit eine vom Körpergewicht oder Diabetes mellitus Typ II unabhängige Betrachtung von OSAS. Aus diesem Grund sind ein manifester Diabetes mellitus und erhöhte Blutglucose Ausschlusskriterien dieser Studie.

1.3 Therapie von OSAS

Die Aufklärung des Patienten über Ursachen und mögliche Einflussfaktoren der Erkrankung stehen an erster Stelle der Therapie. Die Studienlage zeigt, dass bereits eine Gewichtsreduktion um 10 - 15% den AHI bei männlichen moderat übergewichtigen Patienten um 50% senken kann (Young et al., 2002a). Da hingegen andere Studien keine sicheren Erfolge durch Gewichtsreduktion zeigen konnten, ist dies zwar eine wichtige begleitende, allerdings nicht alleinige Therapiemaßnahme (Harvey et al., 2001; Chirinos et al., 2014). Darüber hinaus sollte auf Nikotin und Alkohol verzichtet, sowie sedierende Medikamente vermieden werden (Mayer et al. (2017), S.122).

cPAP - *Continuous positive airway pressure therapy*

Die Methode der Wahl zur Therapie des obstruktiven Schlafapnoe- Syndroms ist die oben bereits erwähnte cPAP- Therapie. Hierbei handelt es sich um ein Beatmungsverfahren, das durch erhöhten Druck die Inspiration von Raumluft erleichtert. Hierbei wird durch einen leichten Überdruck, der individuell auf den Patienten in einem Bereich von 4 - 9 mmHg eingestellt wird, die im Schlaf entspannte Rachen- und Schlundmuskulatur stabilisiert und offen gehalten, was auch als „*pneumatischen Schienung*“ bezeichnet wird (Harrison et al. (2012), S.2364). Es werden Gesichts-, Mund-Nase- und reine Nasenmasken verwendet, die für eine ausreichende arterielle Oxygenierung der Patientenblutes sorgen. Die Atemarbeit wird reduziert und das Verhältnis von Ventilation zu Perfusion in der Lunge entscheidend verbessert. Als Weiterentwicklung der cPAP- Therapie existiert die sog. „*Automatic positive airway pressure therapy*“ (aPAP), die die notwendigen Druckbedürfnisse pro Atemzug ermittelt und anpasst. Darüber hinaus gibt es noch Sonderformen wie das „*Biphasic*“ und „*Variable positive airway pressure therapy*“ (BIPAP- und VPAP- Therapie), die jedoch deutlich seltener Anwendung finden.

Es ist allerdings zu beachten, dass das nächtliche Tragen der Maske den Schlafkomfort deutlich vermindert und eine soziale Belastung z.B. für Ehepaare darstellen kann.

Der ausschlaggebendste Punkt für den mitunter limitierenden Erfolg der cPAP- Therapie stellt die durchschnittliche Zeit der nächtlichen Anwendung und somit die Compliance dar. Diese ist wiederum von Schwere der Erkrankung und der Besserung der Symptomatik innerhalb der ersten Wochen abhängig. Die Compliance wird international mit 40- 60% angegeben. 5- 50% der Patienten brechen die Therapie innerhalb der ersten Woche ab (Mayer et al. (2017), S.111). Somit werden engmaschige Nachbetreuung und Langzeitkontrollen empfohlen (Kushida et al., 2006a). Die Compliance kann zudem durch Vermeiden bzw. Beheben typischer Nebenwirkungen wie Rhinitis und

Hautreizung erhöht werden. Die Compliance der Patienten bezüglich der Dauer der nächtlichen cPAP- Therapie, sowie der Länge der Therapieanwendung hat maßgeblichen Einfluss auf den Benefit und die Risikoreduktion späterer Folgeerkrankungen (Barbe et al., 2010).

Wenn eine gute Compliance gegeben ist (>4h/Nacht), wirkt sich die Therapie positiv auf den mit OSAS assoziierten erhöhten Blutdruck aus (Coughlin et al., 2007; Chirinos et al., 2014; Milleron et al., 2004). Je länger die Therapie pro Nacht genutzt wird, umso höher ist zudem die Reduktion des Blutdrucks (Barbe et al., 2010). Die cPAP- Therapie wirkt dämpfend auf die Aktivierung des Sympathikus und somit auf die Entstehung von erhöhtem Blutdruck (Somers et al., 1995) und verbessert zusätzlich Symptome wie Tagesschläfrigkeit und Konzentrationsfähigkeit. Eine Studie untersucht den Einfluss einer durchschnittlich 3,3 stündigen cPAP-Therapie pro Nacht auf die Häufigkeit bzw. das Risiko von kardiovaskulären Vorfällen bei über 2700 Patienten mit moderater oder schwerer OSAS und koronarer oder zerebrovaskulärer Erkrankung. Hierbei findet sich kein Benefit durch eine cPAP-Therapie (McEvoy et al., 2016). Metaanalysen zeigen jedoch, dass Patienten, die an OSAS leiden und mittels cPAP therapiert werden, signifikant weniger Vorhofflimmern bekommen als Patienten ohne Therapie. Hieraus ergeben sich Empfehlungen, mehrere an Vorhofflimmern erkrankte Personen auf Schlafstörungen zu untersuchen und zu therapieren (Qureshi et al., 2015). Die größten Effekte ergeben sich bei jungen, adipösen Männern.

Zudem stellt sich heraus, dass die Therapie eine Veränderung in Bezug auf Insulinempfindlichkeit sowie den peripheren Glucose-Uptake mit sich bringt (Salord et al., 2015). Die durch OSAS geförderte Entstehung von Diabetes mellitus Typ II könnte hierdurch gebremst oder sogar verhindert werden. Eine Studie vergleicht eine 8- stündige cPAP-Therapie mit einem oralen Placebo (30 Minuten vor der Schlafenszeit) bei Patienten mit OSAS und Prädiabetes. Es wird der Glucosemetabolismus mittels oralem und intravenösem Glucosetoleranztest untersucht und festgestellt, dass die 8-stündige cPAP-Therapie pro Nacht den Glucosemetabolismus und die Insulinsensitivität innerhalb weniger Wochen signifikant verbessert (Pamidi et al., 2015). Unbekannt ist bisher, inwiefern und ob der Glucosemetabolismus bei kürzerer Therapiedauer bereits verändert wird.

Darüber hinaus untersucht eine Studie die Auswirkungen einer Langzeit- cPAP- Therapie. Die Therapie wird über $13,9 \pm 6,5$ Monate mit einer nächtlichen Anwendung von $5,5 \pm 1,6$ Stunden durchgeführt. Es zeigt sich eine Erhöhung des sog. „*plasma total antioxidant status*“ (PATS), also der antioxidativen Kapazität des Körpers. PATS könnte eventuell als sensitiver Biomarker für die Effektivität der cPAP- Therapie ver-

wendet werden (Monneret et al., 2016).

In Studien, die sich auf die inflammatorischen Auswirkungen von OSAS konzentrieren, wird festgestellt, dass diese Erkrankung mit erhöhten Plasmaspiegeln von Entzündungsmarkern wie CRP einhergehen und diese durch cPAP gesenkt werden können (Yokoe et al., 2003; Baessler et al., 2013). Dies wird unterstützt durch eine Interventionsstudie der University of Pennsylvania, die die Auswirkungen von Gewichtsreduktion, cPAP- Therapie und deren Kombination untersucht hat. Hierbei ergibt sich, dass diese drei Maßnahmen zu einer gleichmäßigen Reduktion des CRP- Wertes führen. Ein erhöhter Blutdruck kann am besten durch eine Kombinationstherapie gesenkt werden (Chirinos et al., 2014). Auch bezüglich der Insulinresistenz und der Triglyceridkonzentration im Blut zeigen die Kombinationstherapie, sowie Gewichtsreduktion im Vergleich zur cPAP-Therapie bessere Erfolge. Die durchschnittliche cPAP-Therapiedauer beträgt in dieser Studie ca. 4 h/Nacht.

Obwohl eine cPAP-Therapie zu einer Erhöhung der Lebensqualität („*quality of life*“, QoL) in den Bereichen physische Aktivität und Vitalität (Giles et al., 2006) führt und sich, laut kohortenbasierte Verlaufsstudien, positiv auf die Lebensdauer auswirkt (Marin et al., 2005), ist ein limitierender Faktor vieler Studien die geringe Compliance der Patienten, u.a. aufgrund eines geringeren Schlafkomforts, sodass die durchschnittliche Anwendungsdauer in den meisten Fälle bei weniger als 5 h/Nacht liegt (Stuck et al., 2012).

Weitere Therapiemöglichkeiten

Eine weitere Therapiemöglichkeit besteht in einer sog. *Unterkieferprotrusionsschiene*. Diese, bei Patienten mit leichtem bis moderatem OSAS eingesetzte Schiene, wird nach entsprechenden Abdrücken von Zahnmedizinern mit schlafmedizinischer Fortbildung hergestellt. Sie ist vor allem bei Ablehnung beziehungsweise Versagen einer cPAP- Therapie indiziert (Kushida et al. (2006b); Mayer et al. (2017), S.115).

In seltenen Fällen ist es angezeigt, OSAS mittels operativer Eingriffe zu therapieren, v.a. wenn die cPAP- Therapie versagt oder die nötige Patienten- Compliance hierfür fehlt. Liegen zum Beispiel vergrößerte Mandeln bzw. Rachenpolypen vor, die das Atmen erschweren, kann nach strenger Indikationsstellung eine pharyngeale, resektive Operation in Betracht gezogen werden (Chen and Kong, 2015). Bei extrem schwerer OSAS (AHI>100 N/h) zeigen maxillomandibuläre Operationen gegenüber cPAP-Therapie deutlich bessere Erfolge (Goodday et al., 2015). Eine Uvulopalatopharyngoplastik geht zwar mit einer Verbesserung der Symptomatik einher, allerdings birgt sie auch ein erhöhtes Risiko für Komplikationen wie Blutungen (Won et al., 2008).

Bei der Behandlung von Kindern gibt es Empfehlungen, die operativen Therapien wie Adenotonsillektomie den medikamentösen vorzuziehen (Yu et al., 2015). Bei der letztgenannten Therapiemöglichkeit kommen Substanzen wie Montelukast und Leukotrienrezeptorantagonisten zum Einsatz, die v.a. in der Asthmatherapie eingesetzt werden und die Atmung erleichtern. Die medikamentöse Therapie zeigt bei normalgewichtigen OSAS-Patienten größere Erfolge als bei adipösen Patienten (Suzuki et al., 2014).

Zudem gibt es nicht-resektive operative Therapien wie Weichgaumenimplantate. Als weitere operative Therapien werden Osteotomien des Ober- und Unterkiefers bei kraniofazialen Dysplasien durchgeführt (Gungor, 2017).

1.4 Fragestellung

Bei OSAS-Patienten besteht häufig eine starke Überschneidung mit dem metabolischen Syndrom. Zudem deuten einige Studien darauf hin, dass zwischen OSAS und dem metabolischen Syndrom eine bidirektionale Interaktion besteht (Guasti et al., 2011; Dumitrascu et al., 2013; Schulz et al., 2000, 2002). Somit ist eine klare Ursachenfindung für kardiovaskuläre und metabolische Risiken von OSAS und Adipositas erheblich erschwert, sodass vor allem bezüglich proatherogenen Veränderungen Klärungsbedarf besteht. Bisherige Studien zu OSAS haben nicht oder nicht ausreichend für Adipositas kontrolliert. So ist unklar, ob z.B. OSAS unabhängig von Adipositas im Vergleich zu gesunden Kontrollen bereits allein relevante Veränderungen von proatherogene Geneexpressionen in PBMCs hervorrufen, zumal meist OSAS bei Adipositas-assoziierten Studien nicht ausgeschlossen wurde.

Die vorliegende Arbeit untersucht welche proinflammatorischen, prooxidativen und proangiogenen Genexpressionen in zirkulierenden Blutzellen bei OSAS-Patienten nachweisbar sind, wie sie mit vaskulären und metabolischem Risiko zusammenhängen, und insbesondere, ob sie entweder separat OSAS, dem häufig assoziierten Adipositas, oder deren Synergismus zuzuschreiben sind.

Das Querschnittsdesign der Studie ermöglicht den Vergleich von adipösen und nicht-adipösen Patienten mit mittel- bis schwergradigem OSAS (definiert nach AHI) und Kontrollprobanden. Hierfür wurden OSAS-Patienten und Kontrollprobanden - mit polysomnographischem, state of the art, OSAS- Ausschluss - in nach BMI stratifizierte Gruppen eingeteilt, um die Genexpression proatherogener und hypoxieinduzierter Zytokine und Enzyme in deren PBMC zu untersuchen. Des Weiteren wurde bei der gesamten Studienpopulation ein manifester Diabetes mellitus II, ein Hypertonus und einige weitere Komorbiditäten (s. Kapitel 2.1) ausgeschlossen, um Effekte durch OSAS, möglichst ohne den Einfluss von Confoundern, zu analysieren.

Zusätzlich wurde der Effekt einer drei- bis fünfmonatigen cPAP- Therapie im Längsschnittsdesign der Studie untersucht, um den ursächlichen Effekt von (nicht therapiertem) OSAS und eine Reversibilität von durch OSAS induzierten Veränderungen der Genexpression unter Therapie intraindividuell zu prüfen.

Zugleich wurden neben den Veränderungen des intrazellulären antioxidativen Hauptfaktors Glutathion, die intra- und extrazellulären Konzentration der drei Vorläuferaminosäuren von Glutathion (Cystein, Glycin und Glutamat) bestimmt, um mögliche pro- oder antioxidative Veränderungen des intrazellulären Milieus zu beschreiben, die Ursache oder Folge von Inflammation sein könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign und Studienpopulation

2.1.1 Ethik und Rekrutierung

Die Studie wurde geleitet von Prof. Dr. med. Wulf Hildebrandt und der dieser Arbeit zugrundeliegender Ethikantrag erhielt ein positives Votum am 12.9.2011 durch das Ethikkomitee der Philipps-Universität Marburg (FB20, 63/11).

Die Rekrutierung der OSAS Patienten fand in enger Zusammenarbeit mit dem Schlafmedizinischen Zentrum der Abteilung Pneumologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (Standort Marburg) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Koehler statt. Es erfolgte eine Überweisung der Patienten aufgrund von ambulanter Vordiagnostik zur Polysomnographie und cPAP- Therapie- Einstellung an das schlafmedizinische Zentrum. Die Patienten wurden aufgrund der Vorinformation mit Verdacht auf OSAS gescreent und kontaktiert, auch mit dem Ziel durch vorzeitige stationäre Aufnahme studienbedingte Verzögerungen des Behandlungsbeginns zu vermeiden.

Die Rekrutierung der Kontrollprobanden erfolgte mittels Aushängen in den jeweiligen klinischen Einrichtungen, Zeitungsanzeigen (Oberhessische Presse) sowie auf der Internetseite des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg.

Die Aufwandsentschädigung für Patienten und Probanden betrug 400 Euro, da für die durchzuführenden Untersuchungen der stationäre Aufenthalt jeweils 3 Tage dauerte mit einer studienbezogenen Untersuchungszeit von 20 Stunden (inkl. weiterer hier nicht thematisierter Untersuchungen).

2.1.2 Patienten und Probanden

Die Studie kann in insgesamt zwei Studiendesigns aufgeteilt werden: Der Querschnittstudienteil vergleicht zwischen OSAS-Patienten und Kontrollprobanden (insgesamt $N=53$), wohingegen der Längsschnittstudienteil intraindividuelle Veränderungen nach 3-5- monatiger cPAP-Therapie in Subgruppen erfasst ($N=17$). Insgesamt wurden sechs Gruppen erstellt:

Kontrollprobanden 1: $N = 12$, $BMI < 30\text{kg}/\text{m}^2$

Kontrollprobanden 2: $N = 13$, $BMI \geq 30\text{kg}/\text{m}^2$

OSAS-Patienten 1: $N = 8$, $BMI < 30\text{kg}/\text{m}^2$

OSAS-Patienten 2: $N = 20$, $BMI \geq 30\text{kg}/\text{m}^2$

Therapiegruppe 1: $N = 3$, $BMI < 30 \text{ kg/m}^2$
Therapiegruppe 2: $N = 14$, $BMI < 30 \text{ kg/m}^2$

Die Kontrollen wurden bezüglich Alter, Geschlecht und BMI der OSAS-Patienten gematcht und entsprechend dem Procedere bei überwiesenen OSAS-Patienten hinsichtlich Ein- und Ausschlusskriterien (s. unten) stationär aufgenommen. Bei allen Kontrollprobanden wurde OSAS schlafdiagnostisch (2 Nächte) ausgeschlossen.

Für die Untersuchung der Genexpression von proatherogenen Zytokinen im Quer- und Längsschnitt mussten allerdings Gruppen mit geringerer Fallzahl gebildet werden, da aufgrund von z.B. ungenügender RNA- Qualität, etc. nicht die gesamte Studienpopulation eingeschlossen werden konnte (s. Kapitel 3.1). Im Längsschnittdesign war zusätzlich eine mangelnde cPAP-Therapie- Compliance limitierend.

2.1.3 Venöse Blutwertanalyse

Es erfolgte die Untersuchung der Proben unter der Leitung von Herr Prof. Dr. H. Renz im Zentrallabor des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM).

Die Entnahme von 25 ml peripher-venösen Blutproben im nüchternen Zustand erfolgte zur Bestimmung von Routinelaborparametern bei Aufnahme inkl. Gesamt-Cholesterin, LDL-, HDL- Cholesterin, Glykohämoglobin (HbA1c), Triglyceride, u.v.m.. Blutglucose und Insulin dienten dabei u.a. der Berechnung des „*Homeostasis Model Assessment Index*“ (HOMA-Index) als etabliertem Index der Insulinresistenz. Berechnet wird dieser durch:

$\text{Insulin}(\mu\text{U/ml}) * \text{Blutzucker}(mg/dl) / 405$ und stellt einen Marker für frühzeitige Artherosklerose und Insulinresistenz dar (Matthews et al., 1985). Weitere 30 ml Blut wurden verwendet, um z.B. PBMCs für die in dieser Arbeit untersuchten Genexpressionen zu gewinnen.

2.1.4 Polysomnographie

Das Schlaflabor in Marburg ist Partner im „*Interdisziplinären Schlafmedizinischen Zentrum Hessen*“ (ISZH) und ist bei der „*Deutschen Gesellschaft für Schlafforschung und Schlafmedizin*“ (DGSM) offiziell akkreditiert. Die Untersuchung im schlafmedizinischen Zentrum erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Nächten, um den sog. „*First-night-effect*“ auszuschließen. In der ersten Nacht in einer fremden Umgebung ist der Schlafrhythmus meist verändert, wodurch Ergebnisse verfälscht sein können. Aufgrund dessen wurden ausschließlich Messwerte der zweiten Nacht berücksichtigt, um zum einen die Schwere der OSAS-Erkrankung bei Patienten zu diagnostizieren,

und zum anderen bei Kontrollprobanden die Erkrankung sicher auszuschließen. Nach Abschluss aller für die Studie geplanten Untersuchungen wurden die Patienten auf die häusliche nicht-invasive Maskenbeatmung eingestellt. Die Compliance wird durch das Beatmungsgerät erfasst. Eine Wiederholungsmessung war für einen Zeitpunkt nach 3-5 Monaten cPAP-Therapie geplant.

Die **Polysomnographie** umfasste:

- 2 Kanäle Elektroenzephalogramm (C3A2, C4A1)
- 2 Kanäle Elektrokulogramm (rechtes und linkes Auge)
- 2 Kanäle Elektromyografie (EMG1 submental, EMG2 prätibial)
- 1 Kanal Elektrokardiogramm (EKG)
- oronasaler Atemfluss (Thermistor)
- Atemexkursionen Thorax und Abdomen mittels induktionsplethysmographischem Gürtel
- Schnarchen (Mikrofon)
- SaO₂ (Finger- Pulsoxymeter)

Bestimmt wurden die folgenden Parameter, mit denen unter anderem eine Einteilung in die Schwere der OSAS-Erkrankung ermöglicht wurde:

- Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI, N/h Schlaf)
- Typ der Atmungsstörung (obstruktiv, zentral, gemischt, komplex)
- SaO₂ im Mittel (%), minimal (%) sowie < 90% der Schlafzeit (min/„*total sleep time*“(TST))
- Schlafeffizienz
- Einschlaf- und REM-Schlaf latenzen (min)
- Anteil Leichtschlaf (NREM1 + 2 in % der Schlafzeit)
- Arousalindex (n/h Schlaf)
- Periodic leg movements- Index (n/h Schlaf)

2.1.5 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien für Patienten

- Moderates-schweres OSAS: AHI > 15 N/h
- Gesundheit abgesehen von OSAS

Einschlusskriterien für Probanden

- Polysomnographisch ausgeschlossenes OSAS
- Anthropometrische Eignung zum Matchen bei identischen Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien für Probanden und Patienten

- Zentrale und gemischte Schlaf-Apnoe
- Alter: < 18, > 80 Jahre
- Arterielle Hypertonie Grad 2/3 (RR_{sys}/RR_{dia}: $\geq 160/105$ mmHg)
- Rauchen
- Hyperlipidämie
- Diabetes mellitus
- Bekannte kardiovaskuläre Erkrankungen: Myokardinfarkt, Klappenvitium, Herzrhythmusstörungen, koronare Herzkrankheit, arterielle Verschlusskrankheit
- Schwere „*chronisch obstruktive Lungenerkrankung*“ (COPD): insbesondere respiratorische Globalinsuffizienz, respiratorische Hypoxie (Sättigung <90%)
- chronische oder akute entzündliche Autoimmun- oder Infektionserkrankungen
- Lebererkrankungen
- Neuropathie
- psychiatrische oder Suchterkrankung (Alkohol, Pharmaka)
- Klaustrophobie bezüglich einer Magnetresonanztomographie (MRT)
- Keine Einwilligung und mangelnde Kooperation
- Medikation, insbesondere mit Aspirin, Ibuprofen, Kortikosteroiden, anderen antiinflammatorischen oder analgetischen Pharmaka, Statin-Therapie
- Gerinnungsstörungen wegen Biopsie (paralleler Studienteil)
- Antikoagulation
- Unklare Erhöhung der Kreatinkinase oder Myoglobin, bekannte Myopathien (wegen hier nicht fokussierter Muskeluntersuchungen)
- Unverträglichkeit des US-Kontrastmittel Sonovue® (parallele, hier allerdings nicht fokussierte Untersuchung)

2.1.6 Ablauf der Untersuchung

Nach stationärer Aufnahme erfolgten bei OSAS-Patienten (klinische Abklärung) und Kontrollprobanden (studienbedingt nach Studieneinschluss) orientierende internistische Untersuchungen (inklusive mehrfacher RR-Messungen), das Ausfüllen etablierter Sleepiness- Fragebogen- Inventarien, sowie eine Echokardiographie. Bei OSAS-Patienten wurde in der darauffolgenden Nacht eine erste diagnostische Polysomnographie auf der Basis des sowohl in Marburg wie auch in Gießen etablierten, PC-gestützten SIDAS-GS-Systems durchgeführt. Nach Studieneinschluss der OSAS- Patienten (verlängerter oder erneuter stationärer Aufenthalt) lief das Untersuchungsprogramm bei beiden Gruppen streng parallel jeweils an zwei aufeinanderfolgenden Studientagen, wobei die mit * markierten Punkte für die vorliegende Arbeit verwendet wurden:

Studientag 1

- Orientierende internistische Untersuchungen*
- Mehrmalige, beidseitige RR-Messungen im Sitzen (Omron HEM 705 CP)*
- US- Untersuchung der Karotiden mit Messung der „*Intima-Media-Dicke*“ (IMT) (Logiq E9 system, General Electric GE, conneticat, USA)*
- Lungenfunktionsprüfung
- Ruhe-EKG*
- Echokardiographie
- Spiroergometrie zur Bestimmung der maximalen Sauerstoffaufnahme (VO_2max)
- Messung der Maximalkraft des Kniestreckers durch das Einwiederholungsmaximum

Studientag 2

- Mehrmalige beidseitige RR-Messungen im Sitzen*
- Peripher-venöse Blutentnahme im nüchternen Zustand*
- „*Contrast enhanced ultrasound*“ (CEUS) der Mikrozirkulation am Musculus vastus lateralis mittels Kontrastmittel Sonovue in Ruhe und unter Belastung
- Messung des femoralarteriellen Dopplerflusses in Ruhe und unter Belastung
- MRT des M. vastus lateralis (Feldstärke: 1,5 Tesla)
- 1H -Magnetresonanz-Spektroskopie des M. vastus lateralis (Abt. Strahlendiagnostik Marburg) (Forschungs- MRT mit 3 Tesla Feldstärke)
- Muskelbiopsie am M. vastus lateralis im nüchternen Zustand (identische Lokalisation wie bei CEUS- Messung und 1H -MRS)

Für Kontrollprobanden endete hier der stationäre Aufenthalt. 7 Tage später wurde jedoch die Abheilung der Biopsiestelle telefonisch erfragt und die Wundheilung kontrolliert.

Bei OSAS-Patienten konnte die anschließende Nacht für die schlafdiagnostische Einstellung auf die häusliche cPAP-Therapie genutzt werden. Am nächsten Morgen erfolgte vor Entlassung eine Kontrollinspektion der Biopsiestelle und im Rahmen einer Abschlussbesprechung die Mitgabe von Pflastern, Kontaktdaten, Termin für die Zweituntersuchung sowie eine umfassende Erläuterung der cPAP-Therapie zur Maximierung der Compliance.

Die Längsschnittstudie beinhaltete die Wiederholung aller oben genannten Untersuchungen bei OSAS-Patienten nach einer dreimonatigen cPAP-Behandlungsphase nach Geräteinterner Compliance Prüfung.

2.2 Untersuchung proatherogener Genexpression in mononukleären Zellen mittels qRT-PCR

2.2.1 Gewinnung der PBMC aus EDTA-Blut

Um die Expression proatherogener Gene in PBMC zu untersuchen, mussten diese zuerst aus dem an Studientag 2 in nüchternem Zustand gewonnenen, venösen „Ethylendiamintetraacetat- Blut“ (EDTA- Blut) (27 ml) extrahiert und aufbereitet werden. Hierfür wurde das Blut 1:1 mit „Phosphate-buffered saline“ (PBS) verdünnt, wobei es sich bei PBS um eine isoionische und isoosmolare und somit gegenüber Zellen nicht toxische auf Salz basierende Lösung handelte, die hierdurch zur Gewinnung von PBMC geeignet war. Die hergestellte Blut- PBS Mischung wurde anschließend in einem neuen Falcon-Röhrchen auf Ficoll („Lymphocyte Separation Medium“ LSM) vorsichtig aufgeschichtet und daraufhin 30 min (20°C, 2000 rpm) zentrifugiert. Durch unterschiedliche Dichten entstanden drei Phasen (s. Abbildung 2). Bei den Zellen mit der höchsten Dichte handelte es sich zum weitaus größten Teil um Erythrozyten, die wiederum durch PBMCs überlagert wurden. Diese Trennung beruht auf dem Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation, wobei als Trennlösung bei PBMC neben den hier verwendeten synthetischen Polymeren aus Saccharose (Ficoll) oder Kieselgel auch isotonische Lösungen Anwendung finden können.

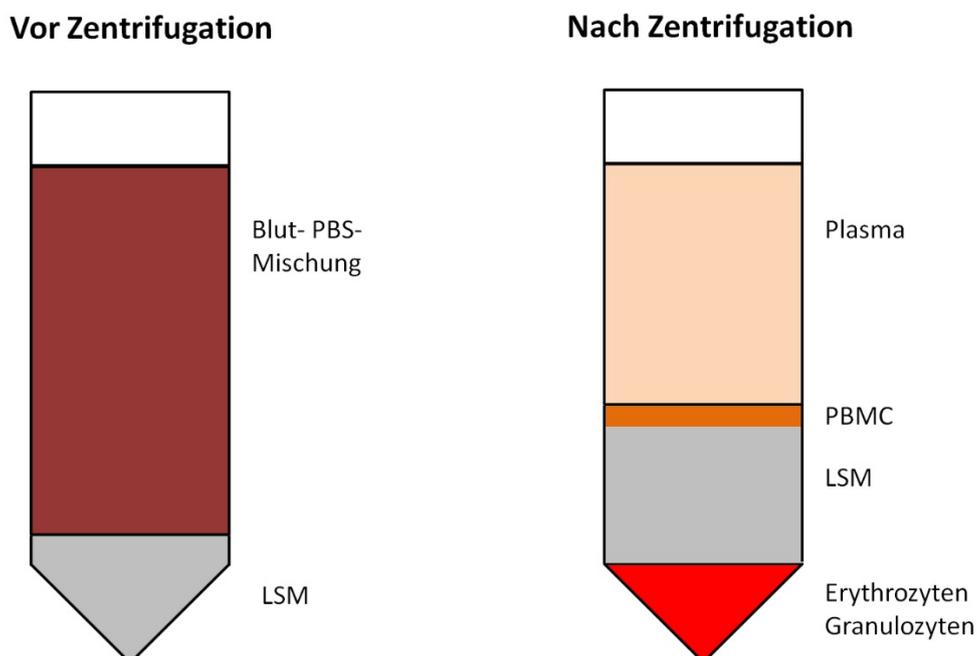


Abbildung 2: Schematische Darstellung der EDTA- Blut Auftrennung mittels Ficoll-Gradient

LSM: Lymphocyte Separation Medium, PBS: Phosphate-buffered saline

Die mittlere, PBMC enthaltende Schicht wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Falcon- Röhrchen überführt und daraufhin mit PBS gewaschen. Dies geschah durch 10 minütige Zentrifugation (20°C, 1000 rpm) und Verwerfen des PBS- Überstandes. Das entstandene Pellet wurde daraufhin in neuer PBS-Lösung gelöst und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt um ein möglichst nur aus PBMC bestehendes Pellet zu gewinnen.

Dieses Pellet wurde, nach Lösen in 1ml PBS, auf zwei Eppendorf Cups aufgeteilt und wiederum zentrifugiert (10 min, 250g, 18°C). Der Überstand wurde abpipettiert. Eines der entstandenen Pellets wurde für die intrazelluläre Aminosäurenanalyse mit 500µl 2,5% 5- sulfosalicylic acid dihydrate (SSA) und das andere für die RNA- Untersuchung mit 1ml peqGOLD TriFast™ versetzt, beide bei ca. -80°C nach entsprechender Beschriftung kryokonserviert. Die Extraktion von RNA wurde mittels Trifast (Chemische Bezeichnung: Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform Extraktion, Chomczynski and Sacchi 1987) vorgenommen.

2.2.2 RNA-Isolation aus mononukleären Zellen

Da RNA sehr empfindlich gegenüber vielen Enzymen, v.a. „RNA- spaltenden Enzymen“ (RNasen) ist, wurde sorgfältig auf das Arbeiten mit Latexhandschuhen an einem RNase freien Arbeitsplatz unter Verwenden von UltraPure™ DNase/RNase- free Water und RNase freien Geräten und Materialien, geachtet.

Durchführung:

Das zuvor eingefrorene, aus PBMC bestehende und mit Trifast versetzte Pellet wurde anschließend mit 0,2ml Chloroform/ ml Trifast versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 5 min bei 4°C, 13000 rpm zentrifugiert, wodurch sich 3 Phasen bildeten. Zwei dieser Phasen, nämlich die Inter- und Phenolphase enthielten gelöste DNA, während in der wässrigen Phase die gewünschte RNA enthalten war. Diese wurde abpipettiert und erneut mit Chloroform gewaschen. Schließlich wurde die wässrige, RNA- enthaltende Phase mit Isopropanol (0,5 ml/ ml eingesetztem Trifast) verdünnt, vorsichtig aber gut gemischt und 15 min auf Eis gestellt. Daraufhin erfolgte ein 40- minütiges Zentrifugieren (4°C, 13000 rpm). Der hierdurch entstandene Überstand wurde entfernt und das gebildete Pellet mit 0,5 ml Ethanol (70%) versetzt, um Salze aus dem Pellet zu lösen. Nach kurzem Zentrifugieren und Abpipettieren des Ethanols wurde das Pellet zum Trocknen 30 min unter den Abzug gestellt. Anschließend wurde RNase Inhibitor (Inhibitor von RNA- spaltenden Enzymen) hinzugefügt (1 U/µg RNA) und 10 min bei 60 °C im Heizblock erwärmt, um RNA zu lösen.

2.2.3 Nachweis der RNA mittels Gelelektrophorese

Um die Qualität des RNA- Probenmaterials für die spätere „*quantitative real time PCR*“ (qRT-PCR) zu überprüfen, wurden Agarose-Gelelektrophoresen der gesamten RNA mittels des 2100 Bioanalyzers von Agilent Technologies vorgenommen. Hierbei wurde das Agilent RNA 6000 Nano Kit eingesetzt. Es handelt sich um eine sog. „*Lab-on-Chip Technik*“, eine automatisierte Kapillarelektrophorese, die die einzelnen Fraktionen der rRNA, mRNA sowie fragmentierte RNA-Stücke durch Gelbilder darstellt (Becker et al., 2009). Zudem wird die „*RNA Integrity Number*“ (RIN) ausgegeben, die die Degradierung und Fragmentierung der RNA widerspiegelt. Ein Wert von 10 bedeutet, dass es sich um eine vollständig intakte RNA handelt. Je geringer die Zahl ist, desto fragmentierter ist die RNA. In dieser Studie wurden RIN-Werte < 6 aus der Studie ausgeschlossen.

Durchführung:

Zur Gelvorbereitung wurden $550\mu\text{l}$ „*RNA gel matrix*“ zentrifugiert (1500g, 10 min, Raumtemperatur) und anschließend $65\mu\text{l}$ gefiltertes Gel (mittels Filtertube) mit $1\mu\text{l}$ RNA- Farbkonzentrat vermischt. Der sich nun anschließende Schritt beinhaltet die Beladung des Chips mit Gel-Farbstoff-Mischung ($9\mu\text{l}$) in die hierfür vorgesehenen Wells. Danach wurden $5\mu\text{l}$ RNA Marker in alle 12 Probenwells und zum Schluss noch $1\mu\text{l}$ RNA, sowie eine Kontrolle („*Ladder*“) pipettiert (s. Abbildung 3). Nach 1-minütigem horizontalem Vortexen (2000 rpm, MS3 Vortexer, Heidolph, Schwabach, Deutschland) erfolgte die Untersuchung des gegossenen Gels durch den Bioanalyser von Agilent Technologies.



Abbildung 3: Chip für RNA- Nachweis mittels Gelelektrophorese

2.2.4 Umschreiben der RNA in cDNA durch Reverse Transkriptase Reaktion

Durchführung:

Um die RNA in cDNA umschreiben zu können, mussten zuerst zwei weitere Schritte folgen:

Nach der Messung des Gehaltes an RNA mittels Nanodrop wurde von jeder Probe genau 1 μg RNA entnommen, zum „DNA- Verdau“ mit DNaseI und DNaseI- Puffer versetzt und im Heizblock 30 min bei 37°C behandelt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von EDTA und 10 minütiges Kühlen bei 10 °C beendet.

Als nächster Schritt wurde zu jeder Probe ein Oligo(dT)₁₈- Primer- Wasser- Gemisch hinzugegeben, deren Anlagerung an die mRNA zuerst durch 5 min bei 65°C und anschließend durch 10 min bei 20°C unterstützt wird. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass sich am 3'-Ende der mRNA ein Poly(A)- Schwanz befindet, an den sich der Oligo(dT)- Primer hybridisieren kann.

Anschließend folgte als dritter Schritt, die eigentliche cDNA- Synthese. Hierfür wurde ein Mastermix aus Script Puffer, DTT, dNTP- Mix, Ribolock RNase Inhibitor, sowie das Enzym „Reverse Transkriptase“ hinzugefügt, um die Umschreibung von RNA in cDNA zuerst bei 42°C für 60 min und zum Schluss 15 min bei 70°C durchzuführen. Für das Mischverhältnis dieser genannten Schritte s. Tabelle 1.

Tabelle 1: Reagenzien zur cDNA- Synthese

RNA	x μl
H ₂ O	x μl
Zwischenvolumen	7,5 μl
DNase I und DNaseI- Puffer	2,5 μl
EDTA	1 μl
Zwischenvolumen	11 μl
Oligo(dT) ₁₈ - Primer	1 μl
H ₂ O	1,7 μl
Zwischenvolumen	13,7 μl
Script Puffer	2 μl
DTT	2 μl
dNTP-Mix	0,8 μl
Ribolock RNase Inhibitor	0,5 μl
Reverse Transkriptase	1 μl
Endvolumen	20 μl

Somit wurden durch die eben genannten Schritte aus 1 μg RNA 20 μl cDNA- Proben hergestellt, die jetzt mit Wasser 1:10 verdünnt und bei ca. -22°C eingefroren wurden.

2.2.5 Prinzip der quantitativen Real Time-PCR

Die vorliegende Studie bediente sich der qRT-PCR. Bei der Polymerasekettenreaktion handelt es sich um eine gängige Methode, die die exponentielle Amplifikation spezifischer DNA- Sequenzen ermöglicht (hier cDNA). Da diese Sequenzen mit Primern flankiert werden mussten, wurde die DNA zuerst bei 95°C denaturiert um danach ein sog. „*Annealing*“, also die Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge, zu ermöglichen. Dies geschah bei genau 60°C. Ein Unterschreiten dieser sog. „*Annealing-temperatur*“ hätte unspezifische Basenpaarungen und somit unerwünschte Nebenprodukte zur Folge. Bei den Primern handelte es sich um 15 - 30 Basen lange, synthetische Oligodesoxyribonukleotide, die an ihrem 3'-Ende durch eine thermostabile DNA- Polymerase verlängert wurden.

Bei der hier durchgeführten PCR- Messung handelte es sich um ein sog. 2 Step Cycling, da der Amplifikationsvorgang in nur 2 Segmente aufgeteilt ist. Die jeweiligen Reaktion und Zyklusschritte sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Temperatur- und Zyklusprotokoll der qRT-PCR

Denaturierung	95°C - 3 min
Annealing und Elongation	95°C - 10s 60°C - 20s

Diese hier erwähnten Schritte wurden in 42 - 45 Zyklen wiederholt, wobei sich bei jedem Schritt die gewünschte DNA verdoppelte. Dies ergab eine exponentielle Amplifizierung der gewünschten DNA um den Faktor 2^{42} , bzw. 2^{45} .

Da es sich um cDNA handelte, die mittels Reverser Transkriptase aus mRNA gewonnen wurde, konnte auf die Expression eines bestimmten Genes geschlossen werden. Das zugrunde liegende Prinzip der qRT-PCR ist die Messung eines Fluoreszenzsignals, das durch einen an die Doppelstrang-DNA gebundenen Farbstoff emittiert wurde. Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff „*Brilliant III Ultra- Fast SYBR Green QPCR*“ verwendet, dessen Exzitationsmaximum bei 494 nm und sein Emissionsmaximum bei 521 nm liegen. Je höher der Gehalt an durch PCR gebildeter dsDNA ist, desto stärker ist auch die Intensität des Fluoreszenzsignals. Die Anzahl der Amplifikationszyklen wurden gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen (Abb. 4), wobei sich somit eine sigmoidale Amplifikationskurve ergab, die die quantitative Bestimmung des cDNA- Gehaltes ermöglichte (s. Kapitel: 2.2.7).

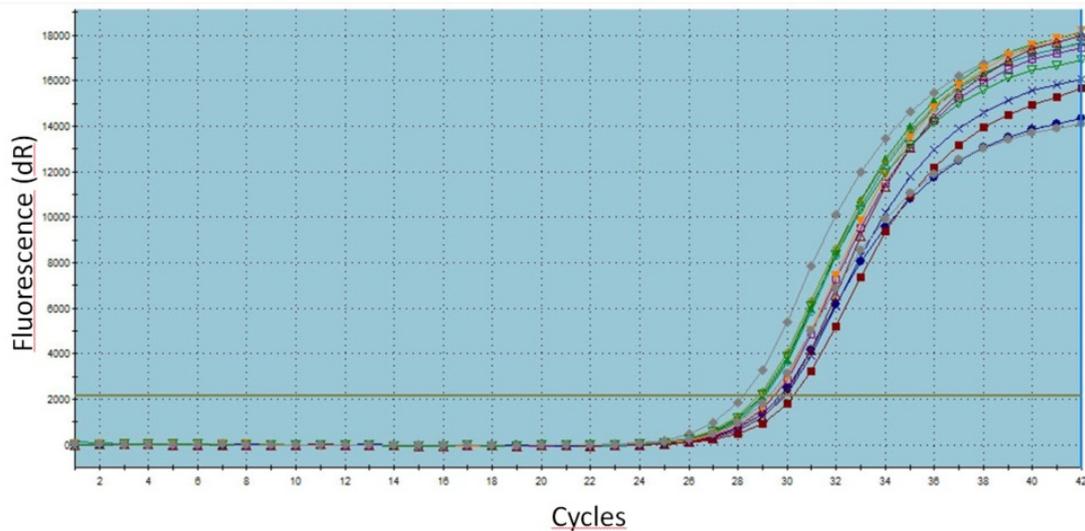


Abbildung 4: Beispiel für Amplifikationskurven

Durchführung:

Die folgenden Arbeitsschritte wurden an einer Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation von PEQLAB (Hauptsitz: Radnor, Pennsylvania, USA) durchgeführt, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden.

Zunächst wurde ein Standard hergestellt, indem von jeder cDNA- Probe $5\mu\text{l}$ in einem Pool zusammengeführt wurden. Daraus wurde eine Standardreihe durch Verdünnungen mit UltraPure DNase/RNase- free Distilled Water[®] erstellt (s. Kapitel 2.2.7).

Von jedem Standardverhältnis und von jeder Probe wurden stets zweifach $5\mu\text{l}$ für einen Primer auf die 96 Multiply[®] PCR- Platte pipettiert, um bei der Auswertung den *Mittelwert* (M) der Expression der Doppelbestimmung zu bilden. Neben der Standardreihe wurde als Negativ-Kontrolle immer eine cDNA- freie Kontrolle mituntersucht.

Die Primer der Firma QIAGEN N.V. (Hauptsitz: 40724 Hilden, Deutschland) wurden für die qRT-PCR vorbereitet, indem das Primerpulver in $1100\mu\text{l}$ Tris-EDTA (TE)-Puffer gelöst wurde.

Das Mischverhältnis für die sich anschließende qRT-PCR war wie folgt:

Es wurden jeweils $5\mu\text{l}$ cDNA- Probe bzw. Standard mit $7,5\mu\text{l}$ Brilliant III Ultra- Fast SYBR Green, $1,5\mu\text{l}$ Primer und $1\mu\text{l}$ H₂O pro Well auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Um nicht den Fluoreszenzfarbstoff, den Primer und das Wasser einzeln zugeben zu müssen, wurde zuvor eine Mischung aus diesen im oben genannten Verhältnis erstellt und diese mittels Multipette plus von Eppendorf zu den $5\mu\text{l}$ cDNA- Proben bzw. Standards gegeben.

Nachdem die Platte vervollständigt war, wurde sie mittels 8er Kette (optisch klar, flacher Deckel) verschlossen, kurz zentrifugiert und anschließend mit Hilfe des

Mx3005P QPCR Systems von Agilent Technologies nach folgendem Temperatur- und Zyklusprofil untersucht (Abb.: 5):

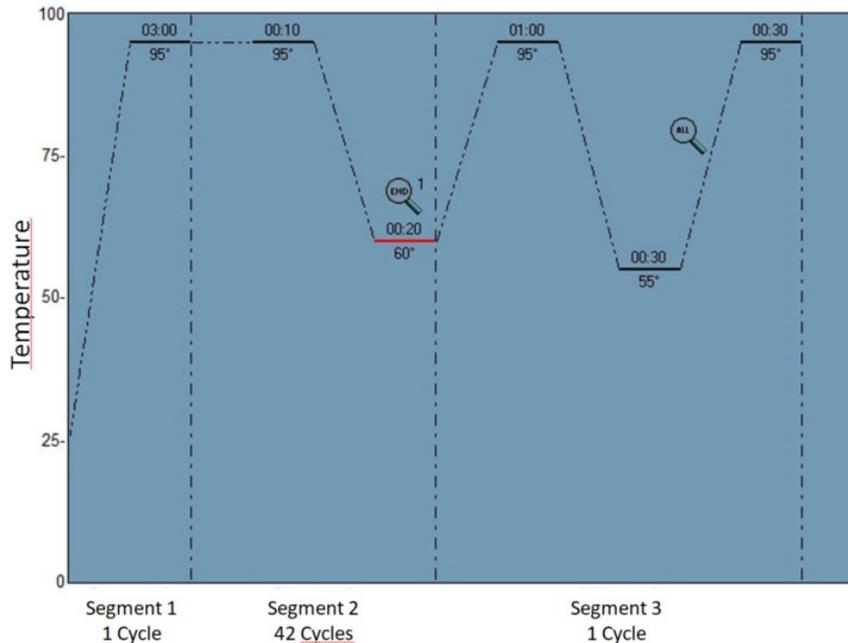


Abbildung 5: Temperatur- und Zyklusprofil

2.2.6 Referenzgen

Um Fehler, die durch Differenzen in der Behandlung der Proben, des RNA-Gehaltes und der Effizienz der RT-Reaktion bei der PCR- Untersuchung entstanden sind und somit interventionelle Zielgenveränderungen vortäuschen oder maskieren können, zu reduzieren, ist es unerlässlich, die Proben- mRNA- Werte mit einem sog. „Housekeeping“ bzw. „Referenzgen“ zu normalisieren (Karge et al., 1998). Eine weitere Methode besteht darin, die „Gene-of-interest“- mRNA- Werte mit der kompletten RNA zu normalisieren, wobei hier ein höheres Fehlerpotential gegeben ist (Bustin, 2000). Als Grundvoraussetzung für die Eignung eines Gens als Housekeeper ist, dass sich dessen Expression nicht durch die zu untersuchenden experimentellen Bedingungen (z.B. Hypoxie vs. Normoxie) verändert, sondern möglichst konstant bleibt (Thellin et al., 1999). Bei der Suche nach einem geeigneten Referenzgen wurden unter anderem die Primer „beta-2-Mikroglobulin“ (B₂M), „human acidic ribosomal protein“ (HuPO), „TATAA box binding protein“ (TBP), „60S acidic ribosomal protein P0“ (RPLP0) und „β- Glucuronidase“ (GUSB) untersucht, wobei diese eine statistisch signifikante Schwankung zwischen den Gruppen ergaben (s. Kapitel 3.5.1).

Dabei ergab die Validierung dieser verschiedener Primer jedoch, dass **GUSB** die geringsten Schwankungen in der Genexpression bei PBMCs aufweist und somit als zuverlässigster Housekeeper anzusehen war.

2.2.7 Auswertung

Die sigmoidale Amplifikationskurve ermöglicht im linearen Bereich die quantitative Bestimmung des cDNA- Gehaltes der Probe (s. Abbildung 4). Für jeden Primer wurde eine eigene Intensitätsschwelle festgelegt. Am Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dieser Schwelle kann die Anzahl der Amplifikationszyklen (C_T - Wert) abgelesen werden. An diesem ist ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht und in allen Wells befindet sich die gleiche Menge neu synthetisierter DNA. Je höher dieser C_T - Wert , also die Anzahl der benötigten Zyklen an dieser Schwelle ist, desto geringer ist die Ausgangskonzentration der cDNA.

Um diese Ausgangskonzentration zu berechnen, wurde, wie bereits erwähnt, eine Standardkurve verwendet, die für jeden Primer mittels Verdünnungsreihe erstellt wurde. Hierfür mussten die C_T - Mittelwerte (Doppelbestimmung) der Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 bestimmt und die Standardkurve ($y=mx + b$; mit m : Steigung und b : y-Achsenabschnitt) dargestellt werden. Mittels dieser konnte nun die Menge der jeweiligen cDNA der Probe in ng berechnet werden.

1. $\log \text{ Input Menge} = ((C_T)-b)/m$
2. Bestimmung der absolute eingesetzten Menge (ng mRNA der Probe)

Diese Berechnung wurde auch mit dem Referenzgen „*GUSB*“ durchgeführt, um im Anschluss den Quotienten aus der absoluten Menge mRNA der Zytokine und der absoluten Menge „*GUSB*“ zu bilden, um somit eine Normalisierung zu erreichen.

Zur Darstellung der relativen Genexpression bezüglich der Kontrollgruppe wurden zuerst die gegen „*GUSB*“- normalisierten Werte der Patienten in einer Gruppe als Gruppenmittelwert zusammengefasst und der Standardfehler hiervon berechnet („*standard error of the mean*“, SEM). Diese Gruppenmittelwerte wurden dann relativ zur Gruppe 'Kontrolle, $BMI < 30kg/m^2$ ' dargestellt, um relative Expressionsdifferenzen der OSAS-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu zeigen.

2.2.8 Untersuchte Primer

Tabelle 3: Bezeichnung der verwendeten Primer

Amplifikation der TNFα - cDNA	
Assay Name	Hs_TNF_1_SG
Offizieller Name	tumor necrosis factor
Fragmentlänge (bp)	98
GenBank Accession N°	NM_000594
Cat.-Nr.:	QT00029162
Amplifikation der IL-1β - cDNA	
Assay Name	Hs_IL1B_1_SG
Offizieller Name	Interleukin 1 β
Fragmentlänge (bp)	117
GenBank Accession N°	NM_000576
Cat.-Nr.:	QT00021385
Amplifikation der IL-6 - cDNA	
Assay Name	Hs_IL6_1_SG
Offizieller Name	Interleukin 6
Fragmentlänge (bp)	107
GenBank Accession N°	NM_000600
Cat.-Nr.:	QT00083720
Amplifikation der GDF- 15 - cDNA	
Assay Name	Hs_GDF15_1_SG
Offizieller Name	growth differentiation factor 15
Fragmentlänge (bp)	114
GenBank Accession N°	NM_004864
Cat.-Nr.:	QT00082558
Amplifikation der PTGS- 2 - cDNA	
Assay Name	Hs_PTGS2_2_SG
Offizieller Name	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
Fragmentlänge (bp)	68
GenBank Accession N°	NM_000963
Cat.-Nr.:	QT00040586
Amplifikation der ABCG-1 - cDNA	
Assay Name	Hs_ABCG1_1_SG
Offizieller Name	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
Fragmentlänge (bp)	63
GenBank Accession N°	NM_004915, NM_016818, NM_207174, NM_207627, NM_207628, NM_207629, NM_207630
Cat.-Nr.:	QT00021035

Amplifikation der VEGFA - cDNA	
Assay Name	Hs_VEGFA_6_SG
Offizieller Name	vascular endothelial growth factor A
Fragmentlänge (bp)	99
GenBank Accession N°	NM_001025366, NM_001025367, NM_001025368, NM_001025369, NM_001025370, NM_001033756, NM_001171622, NM_001171623, NM_001171624, NM_001171625, NM_001171626, NM_001171627, NM_001171628, NM_001171629, NM_001171630, NM_001204384, NM_001204385, NM_003376, NM_001287044
Cat.-Nr.:	QT01682072
Amplifikation der SOD- 2 - cDNA	
Assay Name	Hs_SOD2_1_SG
Offizieller Name	superoxide dismutase 2, mitochondrial
Fragmentlänge (bp)	189
GenBank Accession N°	NM_000636, NM_001024465
Cat.-Nr.:	QT01008693
Amplifikation der SOCS- 3 - cDNA	
Assay Name	Hs_SOCS3_1_SG
Offizieller Name	suppressor of cytokine signaling 3
Fragmentlänge (bp)	112
GenBank Accession N°	NM_003955
Cat.-Nr.:	QT00244580
Amplifikation der CD 36 - cDNA	
Assay Name	Hs_CD36_1_SG
Offizieller Name	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
Fragmentlänge (bp)	90
GenBank Accession N°	NM_001001548, XM_005250713, XM_005250714
Cat.-Nr.:	QT00020181
Amplifikation der GSS- cDNA	
Assay Name	Hs_GSS_1_SG
Offizieller Name	glutathione synthetase
Fragmentlänge (bp)	75
GenBank Accession N°	NM_000178, XM_005260406
Cat.-Nr.:	QT00014413
Amplifikation der GSR- cDNA	
Assay Name	Hs_GSR_1_SG
Offizieller Name	glutathione reductase
Fragmentlänge (bp)	143
GenBank Accession N°	NM_000637, NM_001195102, NM_001195103, NM_001195104
Cat.-Nr.:	QT00038325

Referenzgene:	
Amplifikation der RPLPO - cDNA	
Assay Name	Hs_RPLPO_2_SG
Offizieller Name	ribosomal protein, large, P0
Fragmentlänge (bp)	170
GenBank Accession N°	NM_001002, NM_053275
Cat.-Nr.:	QT01839887
Amplifikation der TBP - cDNA	
Assay Name	Hs_TBP_1_SG
Offizieller Name	TATA box binding protein
Fragmentlänge (bp)	132
GenBank Accession N°	NM_001172085, NM_003194
Cat.-Nr.:	QT00000721
Amplifikation der GUSB - cDNA	
Assay Name	Hs_GUSB_1_SG
Offizieller Name	glucuronidase, beta
Fragmentlänge (bp)	96
GenBank Accession N°	NM_000181, NM_001284290, NM_001293104, NM_001293105, XM_005250297
Cat.-Nr.:	QT00046046
Amplifikation der B2M - cDNA	
Assay Name	Hs_B2M_1_SG
Offizieller Name	beta-2-microglobulin
Fragmentlänge (bp)	98
GenBank Accession N°	NM_004048, XM_005254549, XM_006725182
Cat.-Nr.:	QT00088935

2.3 Bestimmung von GSSG und GSH in PBMC mittels Enzymtest

2.3.1 Funktionsprinzip

Zur Bestimmung des antioxidativ wirksamen Tripeptids GSH und dessen oxidiertes Disulfid-Form GSSG, wurde ein Enzymtest genutzt, der auf Arbeiten von Tietze (1969) beruht. Als Probenmaterial diente der auch später für die Aminosäureanalyse verwendete 2,5% SSA Überstand aus dem gelösten Pellet, wobei eine Untersuchung von gepoolten Gruppen (Kontrollprobanden, OSAS-Patienten ohne und OSAS-Patienten nach Therapie jeweils mit $\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$, $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) stattfand.

Es handelt sich um einen kinetischen Enzymtest. Mittels GSH, GSSG und GSR wird „5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)“ (DTNB) kontinuierlich unter Oxidation von „Nicotinamidadenindinukleotidphosphat“ (NADPH) zu „5-Thio-2-Nitrobenzoat“ (TNB) reduziert und dies photometrisch bei 412 nm anhand der Extinktion gemessen (s. Abbildung 6). Somit wird bei dieser Messung das gesamte GSH bestimmt, da neben dem bereits vorhandenen GSH auch das gesamte GSSG durch die GSR und NADPH in die reduzierte Form GSH überführt wird.

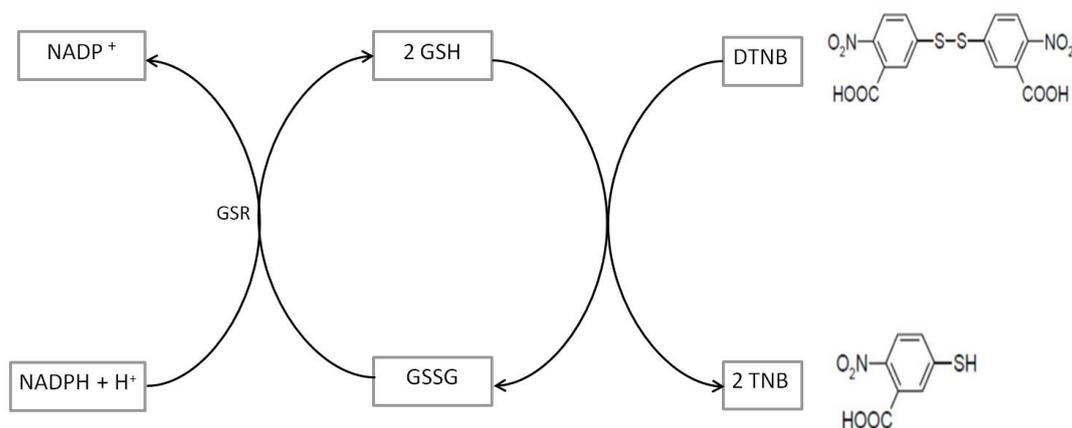


Abbildung 6: Prinzip des Enzymtests: Reduktion des DTNB zu TNB in Anwesenheit von GSH/GSSG unter NADPH- Abhängigkeit (Tietze, 1969)

Die Extinktionszunahme durch die Reduktion von DTNB zu TNB in einer bestimmte Zeit ist proportional zur GSH- Konzentration, wobei die anschließende Berechnung anhand von Standardlösungen erfolgte.

Für die GSSG Bestimmung muss das bereits vorhandene GSH mittels 2- Vinylpyridin vorab derivatisiert werden. Anschließend wird das GSSG, wie oben bereits beschrieben, in die reduzierte Form GSH umgewandelt und anschließend photometrisch bestimmt und die Ausgangskonzentration des Disulfids als die Hälfte der GSH- Konzentration berechnet. So kann auf die Ausgangskonzentration geschlossen werden.

2.3.2 Vorbereitung der Proben und Durchführung

Zur Messung der GSH- Konzentration wurden zu 288 μ l Aufschlussgemisch, bestehend aus 2,5%iger SSA-Lösung und „Tris-(-2-hydroxyethyl)-amin“ (TEA) (Verhältnis 1:15), 30 μ l Probenmaterial hinzugegeben, wobei hieraus jeweils 100 μ l mit 500 μ l Puffer (pH=7,5) in entsprechenden Küvetten versehen wurden. Nach Vorbereitung von Referenz-, Standard- und Blankküvetten wurden im 15-Sekunden-Takt jeweils 200 μ l DTNB und Glutathionreduktasegemisch hinzugegeben, die Extinktion nach exakt 6 Minuten gemessen und mit der gleichen Frequenz unter Zugabe von NADPH die Messung wiederholt.

Zur Messung der GSSG- Konzentration wurden zuerst 250 μ l Probe mit 5 μ l Vinylpyridin versetzt, wobei zu dieser nach 30- minütiger Inkubationszeit jeweils 15 μ l TEA hinzugegeben wurde. Von diesem Gemisch wurden anschließend wieder 100 μ l entnommen, mit 500 μ l Puffer versehen und die oben dargestellte, kinetische Messung wiederholt.

Zur Berechnung der Konzentrationen muss mangels Kenntnis des intrazellulären Lösungsvolumen die Proteinmenge der gesamten Pellet-Menge bestimmt werden. Hierfür wurden die jeweiligen Pellets in NaOH gelöst, hieraus gepoolte Gruppen gebildet und mittels BCA- Test untersucht (s. Kapitel 2.4.2). Somit werden die Ergebnisse der GSH/GSSG- Bestimmung in nmol/mg ausgegeben.

2.4 Aminosäurenuntersuchung in mononukleären Zellen mittels ASA

2.4.1 Funktionsprinzip der Aminosäurenanalyse

Das Grundprinzip der Aminosäurenanalyse geht auf Arbeiten von Spackman, Moore und Stein zurück (Moore et al., 1958). Hierbei handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren („*High performance liquid chromatography*“ HPLC), das sich verschiedener Pufferlösungen (s. Tabelle 4) (mobile Phase) und einer Kationenaustauscher - Säule (stationäre Phase) bedient (Aminosäurenanalysator Serie Biochrom 30lus, Laborservice Onken GmbH, Cambridge CB40FJ). Dabei wird das Probenmaterial zusammen mit verschiedenen Puffern durch diese Säule gepumpt, wobei hier die chromatographische Trennung der Aminosäuren bei unterschiedlichen Säulentemperaturen stattfindet. Dies geschieht durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen der jeweiligen Aminosäure mit der stationären Phase. Je stärker eine Aminosäure mit der Kationenaustauscher - Säule interagiert, desto länger verbleibt sie in dieser und wird erst zu einem späteren Zeitpunkt am Ende der Trennsäule detektiert. Somit ergeben sich unterschiedliche „*Laufzeiten*“ für verschiedene Aminosäuren (Engelhardt, 1986).

Tabelle 4: Chemische Reagenzien für Aminosäurenanalyse

	Chemische Substanz	pH-Wert	Molarität
Puffer 1 (A)	Li-Citrat	2,80	0,20
Puffer 2 (B)	Li-Citrat	3,00	0,30
Puffer 3 (C)	Li-Citrat	3,15	0,50
Puffer 4 (D)	Li-Citrat	3,50	0,90
Puffer 5 (E)	Li-Citrat	3,55	1,65
Regenierlsg. 6 (F)	LiOH	13 - 14	0,3
Reagenz	Ninhydrin		
Coilflush	70% H_2O / 30%MeOH		
Kolbenhinterspülung	70% H_2O / 30%MeOH		

Im anschließenden Schritt werden die aufgetrennten Aminosäuren mit „*Ninhydrin-Reagenz*“ versetzt und durch den Hochtemperatur- Reaktionscoil gepumpt. Das Ninhydrin- Reagenz wird zuvor aus Ultra Ninhydrin Solution und Ultrasolve Plus unter Helium Begasung hergestellt. In einer chemischen Reaktion werden je nach Aminosäure zwei Farbstoffe gebildet, deren Intensität von der Menge der jeweiligen Aminosäure abhängig sind.

Hiernach erfolgt die Messung in der Durchflussmesszelle des Photometers bei zwei verschiedenen Wellenlängen. Primäre Aminosäuren haben ein Absorptionsmaximum

bei 570 nm, sekundäre bei 440 nm. Die gemessene Extinktion ist der Konzentration des Farbstoffs gemäß des „*Lambert-Beerschen Gesetzes*“ direkt proportional. Zur Regenerierung der Säule wird sie mit starker Lauge durchspült und anschließend mit Puffer 1 wieder konditioniert.

2.4.2 Vorbereitung des Probenmaterials

Die zuvor aus peripherem, venösem Blut gewonnenen PBMCs wurden mit 500 μ l 2,5% SSA im Ultraschallbad behandelt und anschließend zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 5°C). Der entstandene SSA-Überstand wurde mittels Zentrifugenfilter gefiltert (10 min, 10000 rpm, 5°C), 150 μ l dieser Lösung mit 15 μ l Lithium Loading Buffer versetzt (Verhältnis 1:10) und im Aminosäurenanalysator untersucht.

Für die Bestimmung der extrazellulären Aminosäurenkonzentration wurde nach Zentrifugation (10 min, 250g) des venösen EDTA-Blutes 930 μ l Plasma in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 70 μ l 50% SSA-Lösung versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation, sowie anschließender Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 5°C) wurde der Überstand mittels Zentrifugenfilter erneut gefiltert (10 min, 10000 rpm, 5°C), 150 μ l dieser Lösung mit 15 μ l Lithium Loading Buffer versetzt (Verhältnis 1:10) und im Aminosäurenanalysator untersucht.

Proteinbestimmung mittels BCA- Test:

Das Pellet wurde mit 500 μ l NaOH versetzt, homogenisiert bzw. vollständig in Lösung gebracht und somit für den sog. „*bicinchoninic acid assay*“ (BCA- assay) vorbereitet, mit dem die enthaltene Proteinmenge bestimmt wurde.

Hierfür wurden auf eine 96-Well Platte jeweils 25 μ l Standard und Probe aufgebracht und mit 200 μ l „*Pierce BCA Protein Assay Kit*“ von Thermo Scientific versetzt. Diese wurde daraufhin 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Elisa Reader gemessen. Zur Berechnung der Proteinmenge wurde darüber hinaus noch eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen untersucht.

2.5 Statistik

Statistische Analysen und Darstellungen erfolgten mittels „SPSS“ (Version 19.0. und updates, Firma IBM in Armonk, New York).

Bei ANOVA handelt es sich um die sog. „*Analysis of variances*“. In der vorliegenden Arbeit wurde eine „*two factorial*“ ANOVA durchgeführt, da zum einen die Effekte der Faktoren „OSAS“ und „Adipositas“ und zum anderen deren Interaktion bestimmt wurde. Voraussetzung für die Durchführung einer ANOVA ist die Varianzhomogenität, die stets mittels Levene- Test auf Signifikanz geprüft wurde. In der Längsschnittanalyse erfolgte zudem die Durchführung einer ANOVA für Messwiederholungen (mit Delta RIN als Kovariate), um interventionsbedingte Unterschiede zu detektieren.

Das Signifikanzniveau der Studie wird mit $p < 0,05$ festgelegt. Im Querschnittstudienteil erfolgen ungepaarte T-Tests, wobei die entsprechenden Signifikanzen mittels * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) in Abbildungen und Tabellen gekennzeichnet sind. Im Längsschnittstudienteil werden entsprechend gepaarte T-Tests verwendet, wobei hier die Signifikanzen mittels § ($p < 0,05$), §§ ($p < 0,01$) und §§§ ($p < 0,001$) abgebildet sind. Eine Bonferroni-Korrektur wurde angesichts des explorativen Charakters dieser als (aufgrund der limitierten Fallzahl) Hypothesen-generierend einzustufenden Studie nicht vorgenommen.

Um den möglichen linearen Zusammenhang zweier Variablen zu bestimmen, erfolgte eine Bestimmung der Korrelation nach Pearson (Korrelationskoeffizient R und Signifikanz p) und die Darstellung anhand einer Regressionsgerade.

2.6 Materialien und Geräte

Allgemeine Materialien und Geräte

Name	Informationen
Handschuhe Shield Skin, Category III, Orange NITRILE™ 260	REF.: 676234
Terraline®liquid disinfection	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt LOT.-Nr.: 1147695
Fireboy plus	IBS - Integra Biosciences AG Pat.-Nr.: 144006
UltraPure™ H ₂ O DNase/RNase frei	Invitrogen Gibco/ 10977
Biofuge fresco	Haraeus
Biosphere®plus - Qualitätsspitzen	Sarstedt AG & Co, 51588 Nümbrecht
10 µl	LOT.-Nr.: 5050711
2 - 20 µl	LOT.-Nr.: 4051001
2 - 200 µl	LOT.-Nr.: 4051001
Multipette®plus	Eppendorf
Pipetman (2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1250µl)	Gilson
Reagiergefäße 1,5 ml SafeSeal	REF: 72.706.400 LOT.-Nr.: 3082901

Gewinnung der PBMC aus EDTA-Blut

Name	Informationen
Phosphate- buffered saline (10x) BioWhittaker®	Lonza, 4800 Verviers, Belgien Cat.-Nr.: BE17-517Q LOT.-Nr.: 3MB110
Dulbecco's PBS Powdered Buffer	PAA Laboratorius GmbH LOT.-Nr.: G100111-1130
Ampuwa®Spüllösung, 1000 ml Plastipur®	Fresenius Kabi, 92310 Sèvres, France LOT.-Nr.: 13HBP121
Lymphocyte Separation Medium 1077, light sensitive	GE Healthcare PAA Laboratorius GmbH, 4061 Pasching LOT.Nr.: J00413-1442
SSA: 5- sulfosalicylicaciddihydrate, 100g Flasche	Sigma- Aldrich Chemie GmbH 89555 Steinheim LOT.-Nr.: BCBG6773V

SafeSeal Gefäß 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co LOT.-Nr.: 0000/0306001
Röhre 15 ml	SARSTEDT AG & Co REF: 62.554.502
CELLSTAR® Tubes, 50 ml	greiner bio-one, 72636 Frickenhausen Cat.-Nr.: 227261
Pipettenspitzen	greiner bio-one LOT.-Nr.: A13101/8 und 0984702
Einweg- Pasteurpipetten mit Mikrospitze	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe Art.: 6424.1
Vortexgerät	Heidolph
Biofuge primo	Haraeus, 37520 Osterode Best.Nr.: 75005181
Waage: Model CS200	Ohaus Corporation, USA
pipetus®-akku	Hirschmann® Laborgeräte

RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Name	Informationen
peqGoLD TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH 91052 Erlangen Best.-Nr.: 30-2010 - 100ml
DNA Engine PT C-200, Peltier Thermal Cycler	MJ Research
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies 76337 Waldbronn Serial.-Nr.: DE72905313
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies reorder number: 5067-1511
Kit zur cDNA- Synthese:	Thermo Scientific:
10s Reaction Buffer with MgCl ₂ for DNase I, 1ml	B43, LOT.-Nr.: 00222155
DNaseI, RNase free 1U/μl, 1000 U	EN0521, LOT.-Nr.: 00223905
50mM EDTA, 1ml	LOT.-Nr.: 00222122
Oligo(dT) ₁₈ - Primer, 0,5 μg/μl, 120μl	SO132, LOT.-Nr.: 00225999
RiboLock RNase Inhibitor 40 U/μl, 2500 U	00381, LOT.-Nr.: 00262644
100mM DTT 200μl	Agilent Technologies: Cat.-Nr.: 600100-53 LOT.-Nr.: 0006182807
10x Affinity Script RTBuffer, 1,0 ml	Cat.-Nr.: 600100-52

100mM dNTP Mix (25mM each dNTP), 400µl	LOT.-Nr.: 0006189418 Cat.-Nr.: 200415-51
Affinity Script Multi-Temp RT, 50 rxm	LOT.-Nr.: 0006147816 Cat.-Nr.: 600107-51 LOT.-Nr.: 0006216974
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, pewlab Serial Nr.: 6561

qRT-PCR

Name	Informationen
Mx3005P QPCR System	Agilent Technologies
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies Cat.-Nr.:600882, LOT.-Nr.: 0006225765
Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab Biotechnologie GmbH
96 Multiply®PCR-Platte, natur, neutral	Sarstedt AG & Co REF: 72.1979.102 LOT.-Nr.: 110164
8er Kette opt. klar fl. Deckel	Sarstedt AG & Co REF: 65.1998.400 LOT.-Nr.: 110164
Combitips advanced®, Eppendorf Biopur® 0,5 ml 0,2 ml	Eppendorf AG Cat.-Nr.: 0030089634 Cat.-Nr.: 0030089626
Perfect Spin Plate Spinner	Peqlab Biotechnologie GmbH SERIAL: K1091072

Aminosäurenanalyse

Name	Informationen
Aminosäureanalysator Serie Biochrom 30plus	Laborservice Onken GmbH Cambridge CB40FJ Certification Nr.: 890333
Zentrifugenfilter für die Probenaufbereitung	Laborservice Onkogen GmbH: LOT.-Nr.: 04315000
Micro-Probenröhrchen 0,3 ml, Kunststoff	REF: 6.021.232
Septum- Deckel für Kunststoffprobenröhrchen	REF: 6.021.233
Lithium Loading Buffer	LOT.-Nr.: 20867
Puffer1 (A)/ Li-Citrat/ pH=2,80/ 0,20m	LOT.-Nr.: 21482

Puffer2 (B)/ Li-Citrat/ pH=3,00/ 0,30m	LOT.-Nr.: 21281
Puffer3 (C)/ Li-Citrat/ pH=3,15/ 0,50m	LOT.-Nr.: 21295
Puffer4 (D)/ Li-Citrat/ pH=3,50/ 0,90m	LOT.-Nr.: 21366
Puffer5 (E)/ Li-Citrat/ pH=3,55/ 1,65m	LOT.-Nr.: 21457
Regenierlsg. 6 (F)/ LiOH/ pH= 13 - 14/ 0,3m	LOT.-Nr.: 21457
Coilflush/ 70%H ₂ O/ 30%MeOH	
Kolbenhinterspülung/ 70%H ₂ O/ 30%MeOH	
Ultra Ninhydrin Solution	LOT.-Nr.: 21455
Ultrasolve Plus	LOT.-Nr.: 21288
Methanol	Merck KgaA
	LOT.-Nr.: I616818149
Haraeus Biofuge PrimoR Centrifuge	Thermo Scientific

BCA-Test

Name	Informationen
Inkubator HeraCell	Haraeus
Elisa- Reader Tecan sunris™	TECAN
BCA Reagent A, 1000 ml	Thermo Scientific Prod.-Nr.: 23225
BCA Reagent B, 25 ml	Thermo Scientific
Microplates, 96 well, flat bottom	Greiner bio-one GmbH 72636 Frickenhausen Cat.-Nr.: 655101

Enzymtest zur Glutathionbestimmung

Name	Informationen
Photometer Ultrospec III	Pharmacia LKB
L-Glutathion reduziert	Carl Roth GmbH + Co.Kg 76185 Karlsruhe Art.: 6382.1
L-Glutathion oxidiert	Sigma Aldrich Art.: G4376-1G
5,5-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure)	Art.: 6334.1
Tris-(2-hydroxyethyl)-amin	Cat.-Nr.: 203-049-8
Glutathion Reductase from Bakers Yeast, 25U/55µl	Sigma Aldrich LOT.: SLBC0752
Einmal- Küvetten	Plastibrand® Cat.-Nr.: 759015

3 Ergebnisse

3.1 Anthropometrische Daten

Die Untersuchung der Genexpression in PBMCs konnte, wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, nicht bei allen in die Studie eingeschlossenen Probanden und Patienten durchgeführt werden. Dadurch kamen in der Gesamtpopulation zunächst nicht existierende Unterschiede, etwa beim BMI oder Alter zustande, die als Limitation der Studie anzusehen sind. Die Anthropometrie ($M \pm SEM$) inklusive der IMT und der „Herzfrequenz“ (HF) der in dieser Arbeit analysierten Studienpopulation ist in Tabellen 5 und 6 dargestellt.

Anthropometrie der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten:

Tabelle 5: Anthropometrische Daten der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten

Anthropometrie		Kontrollen	OSAS-Patienten	p(ANOVA)		
				OSAS	Adipo.	Interakt.
N		13	15	28	28	28
Alter	[Jahre]	44,0 ± 2,0	48,5 ± 1,8	0,060	0,786	0,089
Größe	[cm]	182,1 ± 1,6	175,5 ± 5,1	0,382	0,241	0,883
Gewicht	[kg]	92,5 ± 2,9	108,9 ± 7,7	0,198	0,000	0,106
BMI	[kg/m ²]	28,3 ± 1,2	31,8 ± 1,3	0,048	0,000	0,176
RR syst.	[mmHg]	136,5 ± 2,2	147,8 ± 4,0*	0,057	0,352	0,562
RR diast.	[mmHg]	88,8 ± 1,5	96,1 ± 2,6*	0,064	0,035	0,845
HF	[min ⁻¹]	64,6 ± 3,2	73,6 ± 3,3	0,052	0,210	0,134
IMT	[mm]	0,62 ± 0,03	0,76 ± 0,04**	0,014	0,627	0,684

Dargestellte Daten als $M \pm SEM$; ungepaarter T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ OSAS-Pat. vs. Kontrollen; Two-factorial ANOVA für den Einfluss von OSAS, Adipositas oder deren Interaktion

Bei der Betrachtung der anthropometrischen Daten in Tabelle 5 fällt auf, dass der BMI von OSAS-Patienten um 8,3% höher ist und laut ANOVA durch OSAS signifikant beeinflusst wird, was als Bias der Studie zu betrachten ist, aber sich posthoc knapp als nicht signifikant darstellt.

Mittels ANOVA ergibt sich bei der Herzfrequenz, sowie beim systolischen Blutdruck kein Einfluss durch Adipositas, OSAS oder deren Interaktion. Bei beiden ist der Einfluss von OSAS allerdings nur knapp nicht signifikant (HF: $p = 0,052$; syst. RR: $p = 0,057$). Der diastolische Blutdruck erfährt laut ANOVA einen signifikanten Einfluss durch den BMI ($p = 0,035$), wohingegen die IMT signifikant durch OSAS ($p = 0,014$), allerdings nicht durch Adipositas oder deren Interaktion, beeinflusst wird.

Der systolische und diastolische Blutdruck bei OSAS- Patienten ist laut T-Test im

Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant erhöht. Die Werte der OSAS-Patienten liegen bereits im hypertonen Bereich, allerdings werden systolische Werte von 160 mmHg von keinem Teilnehmer erreicht, da dies zum Ausschluss aus der Studie geführt hätte. Zudem findet sich auch ein hochsignifikanter Unterschied in der IMT der A. carotis communis zwischen OSAS-Patienten und Kontrollprobanden. Die Werte des Gewichts und der Herzfrequenz von OSAS-Patienten sind zwar gegenüber Kontrollprobanden etwas erhöht, eine Signifikanz besteht jedoch nicht.

Anthropometrie der nicht-adipösen und adipösen Strata:

Tabelle 6: Anthropometrische Daten der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe

Anthropometrie		Kontrollen nicht-adipös	Kontrollen adipös	OSAS-Pat nicht-adipös	OSAS-Pat adipös
N		7	6	5	10
Alter	[Jahre]	42,1 ± 2,7	46,2 ± 3,0	52,2 ± 2,8*	46,7 ± 2,2
Größe	[cm]	185,7 ± 1,3	177,8 ± 1,9 ##	179,6 ± 3,8	173,4 ± 7,5
Gewicht	[kg]	84,6 ± 2,4	101,7 ± 2,2###	82,2 ± 3,7	122,2 ± 8,6##
BMI	[kg/m ²]	25,0 ± 0,9	32,2 ± 0,5 ###	25,5 ± 0,9	35,0 ± 0,7*###
RR syst.	[mmHg]	135,7 ± 2,4	137,5 ± 3,3	142,7 ± 9,1	150,3 ± 4,0*
RR diast.	[mmHg]	85,9 ± 1,5	92,1 ± 2,0 #	91,2 ± 4,8	98,6 ± 2,9
HF	[min ⁻¹]	70,6 ± 4,2	57,7 ± 3,1#	72,8 ± 7,4	74,0 ± 3,4**
IMT	[mm]	0,60 ± 0,06	0,60 ± 0,02	0,80 ± 0,09	0,80 ± 0,04*

Dargestellte Daten als M ± SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 adipöse vs. nicht-adipöse Strata

Der Vergleich zwischen den nicht-adipösen Strata der Probanden und Patientengruppe zeigt, dass ein signifikanter Altersunterschied zwischen den Gruppen besteht (s. Tabelle 6).

Beim Vergleich der Strata der adipösen OSAS-Patientengruppe mit der Kontrollgruppe zeigen sich beim Alter, bei der Größe und dem Gewicht keine signifikanten Unterschiede. Signifikanzen finden sich zum einen bei der Herzfrequenz und zum anderen beim BMI, beim systolischen Blutdruck und bei der IMT. Der BMI von adipösen OSAS-Patienten liegt 8,7 % oberhalb der entsprechenden Kontrollprobanden, wobei beide Werte deutlich im adipösen Bereich liegen und somit vergleichbare Strata gegeben sind.

Beim Vergleich der adipösen und der nicht-adipösen Kontrollprobanden zeigen sich signifikante Unterschiede bei der Größe, dem diastolischen Blutdruck sowie der Herzfrequenz.

3.2 Polysomnographische Untersuchungen

Schlafdiagnostische Ergebnisse der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten:

Tabelle 7: Polysomnographische Untersuchungsergebnisse der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten

Schlafdiag. Ergebnisse		Kontrollen	OSAS-Pat	p(ANOVA)		
				OSAS	Adipo.	Interakt.
N		13	15	28	28	28
AHI	[N/h]	6,01±1,31	49,53±6,08***	0,000	0,290	0,373
SaO ₂ mean REM	[%]	94,40±0,33	91,82±0,66**	0,003	0,035	0,700
SaO ₂ mean NREM	[%]	93,86±0,22	91,97±0,54**	0,010	0,243	0,648
SaO ₂ mean gesamt	[%]	94,16±0,25	91,95±0,49***	0,002	0,056	0,685
Zeit < 90% O ₂	[min/TST]	3,05±1,33	69,25±20,81**	0,017	0,411	0,506
Zeit < 80% O ₂	[min/TST]	0,39±0,27	2,97±1,74	0,326	0,359	0,347

Dargestellte Daten als M ± SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen; Two-factorial ANOVA für den Einfluss von OSAS, Adipositas oder deren Interaktion

Die zweifaktorielle ANOVA zeigt für alle Parameter mit Ausnahme der *Zeit < 80% O₂* einen signifikanten bis hochsignifikanten Einfluss des Faktors OSAS. Die mittlere Sauerstoffsättigung während der REM-Schlafphase wird zudem noch durch den Faktor Adipositas signifikant beeinflusst. Die Interaktion der Faktoren zeigt sich bei keinem Parameter signifikant.

Da OSAS bei gesunden Kontrollprobanden schlafdiagnostisch ausgeschlossen wurde, sind die polysomnographischen Parameter im Normbereich und die der OSAS-Patienten hochsignifikant von diesen Kontrollen verschieden (s. Tabelle 7). Die OSAS-Patienten leiden mit einem AHI von 49,53 ± 6,08 N/h unter schwerwiegendem OSAS (s. Tabelle 7). Beachtet werden muss allerdings, dass der mittlere AHI der Kontrollprobanden sich zwar sehr deutlich von den Werten der OSAS-Patienten unterscheidet und unterhalb 15 N/h liegt, sich aber dennoch mit 6,01 ± 1,31 N/h bereits an der Grenze zur Diagnose „mildes OSAS“ befindet. OSAS-Patienten sind im Durchschnitt über eine Stunde pro gesamter Schlafdauer deutlicher Hypoxie (SaO₂ < 90%) ausgesetzt, wohingegen bei ihnen extreme Hypoxie (SaO₂ < 80%) nur kurz auftritt.

Schlafdiagnostische Ergebnisse der nicht-adipösen und adipösen Strata:

Tabelle 8: Polysomnographische Untersuchungsergebnisse der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe

Schlafdiagnostische Ergebnisse		Kontrollen nicht-adipös	Kontrollen adipös	OSAS-Pat nicht-adipös	OSAS-Pat adipös
N		7	6	5	10
AHI	[N/h]	5,46±2,15	6,65±1,51	40,44±11,84*	54,08±6,94***
SaO ₂ mean REM	[%]	95,07±0,44	93,73±0,32#	92,98±0,50*	91,09±0,96*
SaO ₂ mean NREM	[%]	94,12±0,38	93,65±0,29	92,62±0,74	91,56±0,74*
SaO ₂ mean ges	[%]	94,59±0,34	93,67±0,29	92,88±0,68*	91,49±0,63*
Zeit < 90% O ₂	[min/TST]	1,29±0,75	5,10±2,61	45,54±19,45	81,10±29,66*
Zeit < 80% O ₂	[min/TST]	0,41±0,41	0,37±0,37	0,50±0,43	4,20±2,55

Dargestellte Daten als M ± SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 adipöse vs. nicht-adipöse Strata

Wie in Tabelle 8 gezeigt wird, sind die AHI-Werte bei OSAS-Patienten signifikant höher (s. Abbildung 7). Die Zeit, in der die Sauerstoffsättigung unter 90% beträgt, ist bei OSAS-Patienten zwar deutlich höher, allerdings bei kleiner Gruppengröße und hoher Variabilität innerhalb der Patientengruppe nicht signifikant (s. Abbildung 8).

In den adipösen Strata ist der AHI bei OSAS-Patienten gegenüber Kontrollprobanden hochsignifikant erhöht, wobei es beinahe minütlich zu einem atembezogenen Ereignis kommt (s. Abbildung 7). OSAS-Patienten sind zudem 1,5 h/Nacht deutlicher Hypoxie ausgesetzt. Dies trägt zu der niedrigen mittleren Sauerstoffsättigung von ca. 91,5% bei. Zwischen adipösen und nicht-adipösen Kontrollprobanden ergibt sich ein signifikanter Unterschied nur bei der mittleren Sauerstoffsättigung während des REM-Schlafes. Zwischen den zwei Patientengruppen finden sich keine signifikanten Unterschiede, wodurch eine Vergleichbarkeit gegeben ist.

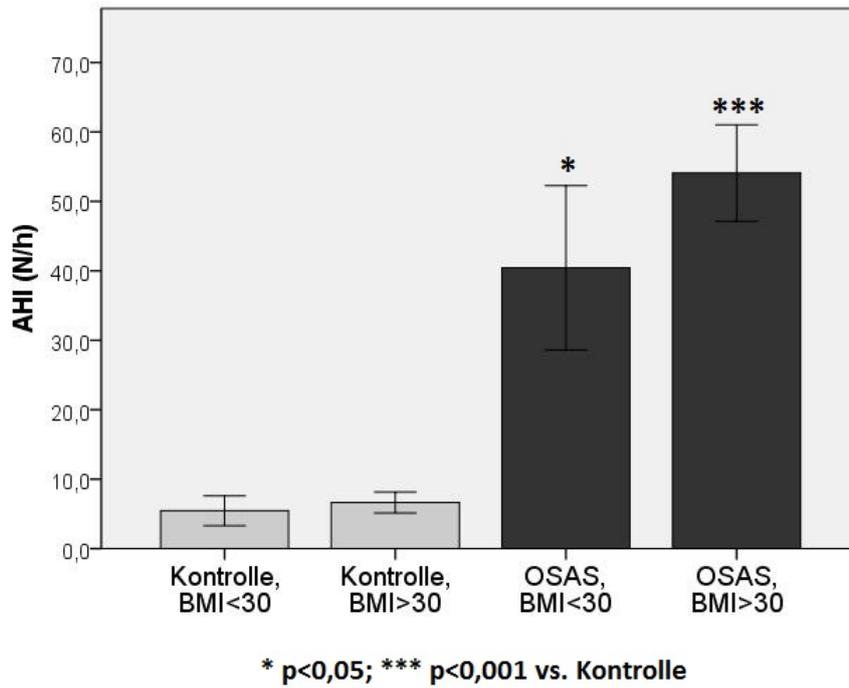


Abbildung 7: AHI (N/h) der adipösen und nicht-adipösen Kontrollprobanden und OSAS-Patienten

ANOVA: Signifikante Einflüsse durch OSAS (p=0,000), jedoch nicht durch Adipositas (p=0,290) oder deren Interaktion (p=0,373)

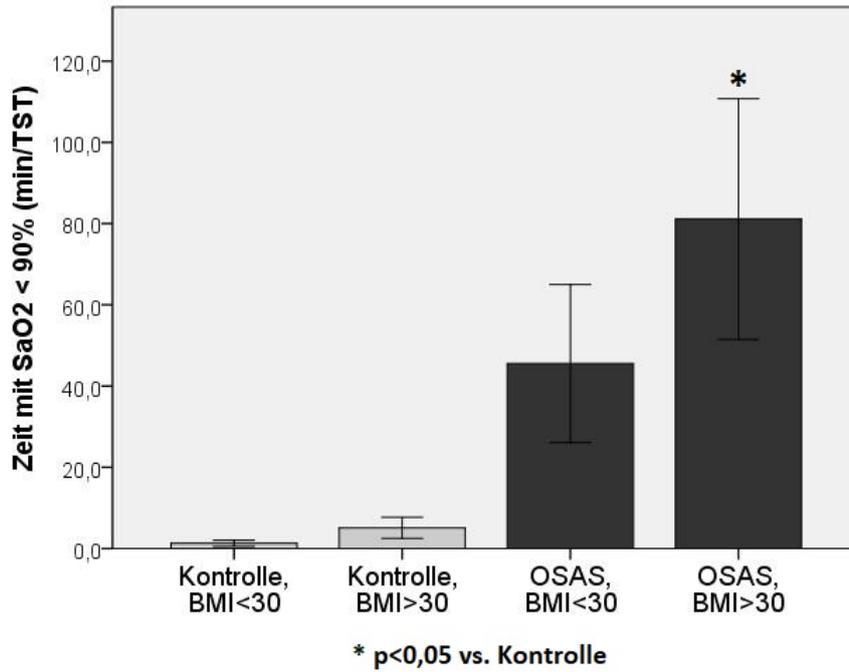


Abbildung 8: Zeit (min/TST) während der die Sauerstoffsättigung unter 90% bei adipösen und nicht-adipösen Kontrollprobanden und OSAS-Patienten liegt

ANOVA: Signifikante Einflüsse durch OSAS (p=0,017), jedoch nicht durch Adipositas (p=0,411) oder deren Interaktion (p=0,506)

3.3 Venöse Blutparameter

Venöse Blutparameter der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten:

Tabelle 9: Nüchtern- Blutparameter der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten

Blutparameter		Kontrollen	OSAS-Patienten	p(ANOVA)		
				OSAS	Adipo.	Interakt.
N		13	15	28	28	28
HbA1c	[%]	5,47 ± 0,06	5,74 ± 0,11	0,052	0,626	0,817
Blutglucose	[mg/dl]	92,2±1,9	101,1±2,1*	0,002	0,459	0,116
Insulin	[μU/ml]	11,07 ± 3,49	16,18 ± 3,08	0,207	0,357	0,598
HOMA-IR	<i>Index</i>	1,68 ± 0,37	4,36 ± 0,98*	0,012	0,668	0,108
ges Chol	[mg/dl]	192,2 ± 9,9	214,3 ± 11,1	0,031	0,004	0,964
HDL	[mg/dl]	46,7 ± 2,7	43,6 ± 2,5	0,516	0,246	0,535
LDL	[mg/dl]	130,2 ± 7,9	150,4 ± 10,4	0,067	0,042	0,674
Triglyc	[mg/dl]	88,3 ± 11,6	149,5 ± 21,1*	0,002	0,065	0,020
TNF-α	[pg/ml]	9,16 ± 1,89	6,92 ± 0,38	0,267	0,783	0,639
IL-6	[pg/ml]	3,23 ± 3,09	3,27 ± 4,91	0,902	0,982	0,250
Homocys	[μmol/l]	11,41 ± 2,31	9,42 ± 0,69	0,252	0,520	0,135

Dargestellte Daten als M ± SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen; Two-factorial ANOVA für den Einfluss von OSAS, Adipositas oder deren Interaktion

Wie in Tabelle 9 zu sehen ist, wird die Blutglucose und der HOMA-IR laut ANOVA signifikant durch OSAS beeinflusst, wobei dieser Einfluss auf den HbA1c nur knapp nicht signifikant ist. Laut T-Test sind die Blutglucose und der HOMA-IR, der zum Nachweis einer Insulinresistenz dient, signifikant unterschiedlich (s. Abbildung 9). Die Werte für den Langzeitblutglucose (HbA1c) sind zwischen den Gruppen nur knapp (p=0,051) nicht-signifikant unterschiedlich. Die Blutglucose- und HbA1c-Werte sind bei OSAS-Patienten jeweils höher als bei Kontrollprobanden. Dennoch liegen beide HbA1c-Werte im Normbereich, da ein manifester Diabetes mellitus II ein Ausschlusskriterium aus der vorliegenden Studie darstellt.

Beim Gesamt-Cholesterin hingegen zeigt sich laut ANOVA ein signifikanter Einfluss sowohl durch OSAS als auch durch Adipositas, allerdings ohne Interaktion. Der Faktor Adipositas hat, neben dem Faktor OSAS, nur bei den Triglyceriden einen signifikanten Einfluss. LDL wird dagegen signifikant durch Adipositas beeinflusst ohne signifikanten Effekt durch OSAS oder deren Interaktion.

Die Parameter für den Fettstoffwechsel zeigen bei den Triglyceriden, dem Gesamt-Cholesterin und beim LDL erhöhte Werte, die jedoch laut T-Test nur eine Signifikanz bei den Triglyceriden aufweisen. Die HDL- Werte sind bei OSAS- Patienten leicht und nicht signifikant erniedrigt.

Die zwei proatherogenen Zytokine TNF- α und IL-6 weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Der Homocystein- Wert, ein kardiovaskulärer Risikofaktor, ist bei Kontrollprobanden tendenziell höher als bei OSAS-Patienten, wobei keine Signifikanz gegeben ist.

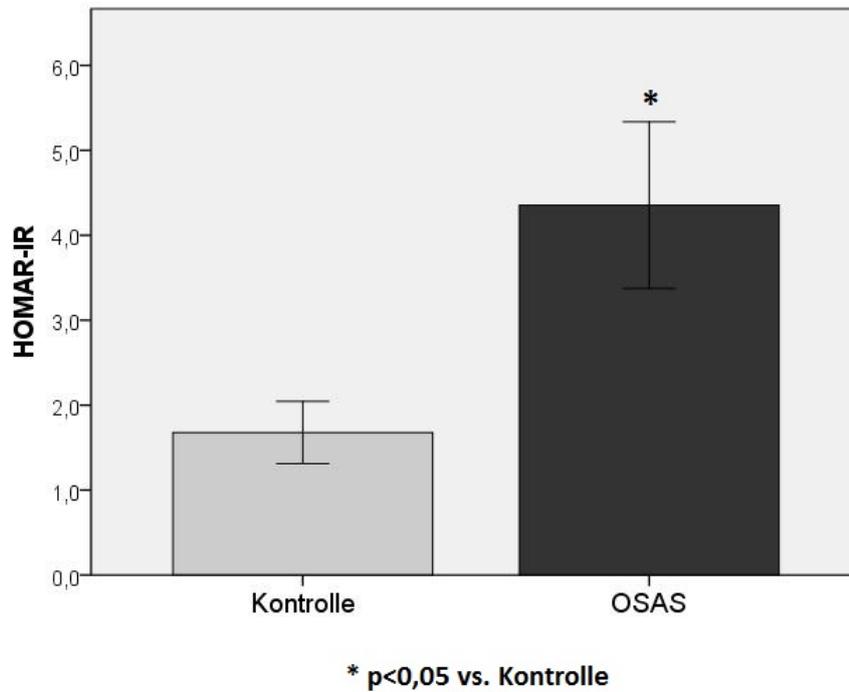


Abbildung 9: HOMAR-IR

Venöse Blutparameter (nüchtern) der nicht-adipösen und adipösen Strata:

Tabelle 10: Nüchtern- Blutparameter der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe

Blutparameter		Kontrollen nicht-adipös	Kontrollen adipös	OSAS-Pat nicht-adipös	OSAS-Pat adipös
N		7	6	5	10
HbA1c	[%]	5,49 ± 0,10	5,45 ± 0,06	5,80 ± 0,06*	5,70 ± 0,18
Blutglucose	[mg/dl]	91,0 ± 1,4	93,5 ± 3,9	105,6 ± 4,8**	98,8 ± 1,8
Insulin	[μU/ml]	12,05 ± 6,83	10,09 ± 2,57	20,95 ± 8,28	13,80 ± 2,23
HOMA-IR	Index	1,06 ± 0,24	2,40 ± 0,65	5,82 ± 2,58	3,54 ± 0,59
ges Chol	[mg/dl]	212,3 ± 10,9	168,7 ± 11,5#	242,6 ± 20,2	200,2 ± 11,3
HDL	[mg/dl]	49,9 ± 3,7	43,0 ± 3,8	45,0 ± 2,8	42,9 ± 3,6
LDL	[mg/dl]	145,4 ± 6,8	112,5 ± 12,0	164,6 ± 25,2	142,6 ± 8,6
Triglyc	[mg/dl]	82,6 ± 8,2	95,0 ± 24,3	216,2 ± 31,5*	116,2 ± 21,2
TNF-α	[pg/ml]	9,76 ± 3,26	8,32 ± 0,90	6,68 ± 0,57	7,06 ± 0,52
IL-6	[pg/ml]	4,14 ± 1,53	2,17 ± 0,31	2,00 ± 0,00	3,90 ± 1,90
Homocystein	[μmol/l]	14,12 ± 5,01	9,15 ± 0,76	7,98 ± 0,50	10,00 ± 0,89

Dargestellte Daten als $M \pm SEM$; ungepaarter T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ OSAS vs. Kontrollen; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ adipöse vs. nicht-adipöse Strata

Bei den nicht-adipösen Strata (s. Tabelle 10) ergeben sich für OSAS-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden signifikant erhöhte Werte für den HbA1c, die Blutglucose sowie die Triglyceride. Der HOMA-IR und der Insulinwert sind zwar auch bei OSAS deutlich erhöht, allerdings nicht signifikant.

Zudem ergibt sich eine Tendenz zu höheren LDL und Gesamt- Cholesterin- Werten bei OSAS-Patienten.

Der Vergleich zwischen adipösen Patienten mit Probanden zeigt keine signifikanten Unterschiede. Die Werte der Blutglucose, des HbA1cs (s. Abbildung 10) und des HOMA-IRs sind bei OSAS-Patienten tendenziell höher. Für das Gesamt-Cholesterin ($p=0,087$; s. Abbildung 11) und das LDL ($p=0,056$) ergeben sich knapp nicht-signifikant höhere Werte.

Im Vergleich der Cholesterinwerte der adipösen mit nicht-adipösen Kontrollen zeigen sich signifikant niedrigere Werte bei adipösen Kontrollen (s. Abbildung 11). Zwischen adipösen und nicht-adipösen OSAS-Patienten finden sich keine signifikanten Unterschiede.

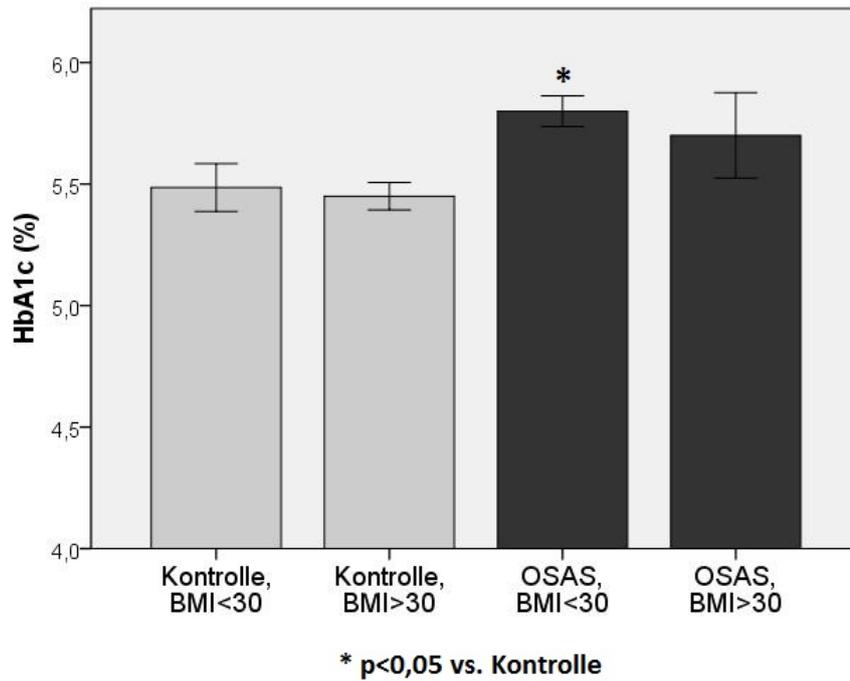


Abbildung 10: HbA1c- Werte [%] der adipösen und nicht-adipösen Strata
ANOVA: Keine signifikanten Einflüsse durch OSAS, Adipositas oder deren Interaktion

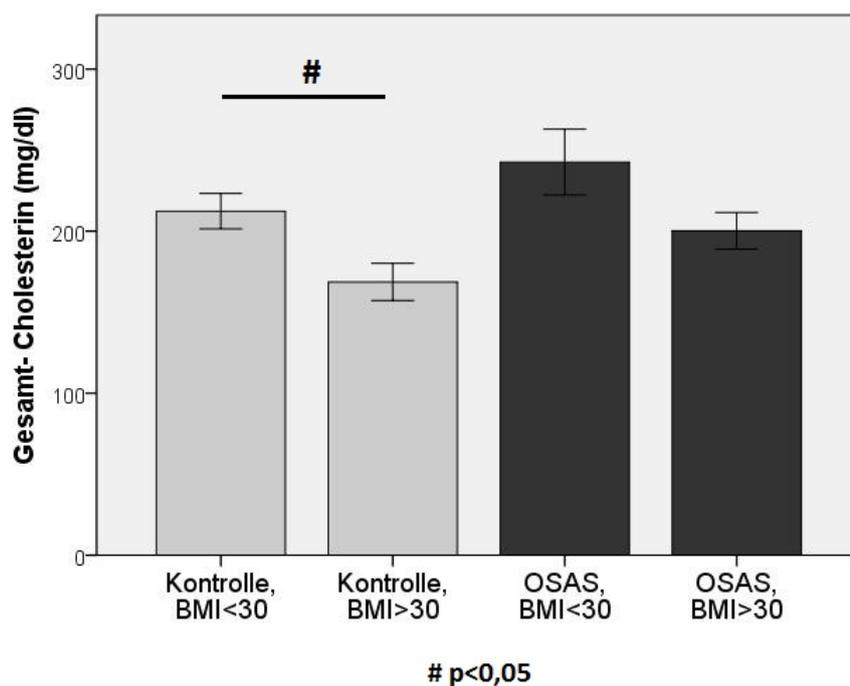


Abbildung 11: Gesamt- Cholesterin [mg/dl] der adipösen und nicht-adipösen Strata
ANOVA: Signifikante Einflüsse durch OSAS (p=0,031) und Adipositas (p=0,004), jedoch nicht durch deren Interaktion (p=0,964)

3.4 Korrelationen von vaskulären Risikofaktoren mit schlafdiagnostischen Ergebnissen und BMI

	AHI	SaO ₂ mean	Zeit<90% O ₂	Zeit<80% O ₂	BMI
IMT					
R	0,520	-0,634	0,605	0,497	0,323
p- Wert	0,005	0,000	0,001	0,007	0,094
BMI					
R	0,457	-0,495	0,320	0,290	1
p- Wert	0,014	0,007	0,096	0,135	
RR syst.					
R	0,415	-0,484	0,523	0,383	0,382
p- Wert	0,028	0,009	0,004	0,044	0,045
RR diast.					
R	0,427	-0,371	0,439	0,331	0,506
p- Wert	0,023	0,052	0,020	0,086	0,006
HDL					
R	-0,317	0,186	-0,154	-0,279	-0,356
p- Wert	0,107	0,353	0,442	0,158	0,069
LDL					
R	0,471	-0,129	0,265	0,170	-0,215
p- Wert	0,013	0,522	0,181	0,397	0,281
Triglyceride					
R	0,241	-0,211	0,118	0,293	-0,150
p- Wert	0,216	0,280	0,550	0,130	0,922
Cholesterin					
R	0,262	-0,094	0,160	0,203	0,351
p- Wert	0,178	0,634	0,417	0,299	0,067
Homocystein					
R	-0,126	0,280	-0,060	0,102	-0,142
p- Wert	0,548	0,175	0,776	0,628	0,498
HbA1c					
R	0,448	-0,291	0,309	0,116	0,149
p- Wert	0,019	0,140	0,117	0,564	0,460
Blutglucose					
R	0,398	-0,327	0,247	0,095	-0,013
p- Wert	0,036	0,090	0,206	0,631	0,948
Insulin					
R	0,145	0,045	-0,056	-0,067	-0,124
p- Wert	0,471	0,825	0,780	0,739	0,539
HOMA-IR					
R	0,296	-0,084	0,035	-0,036	0,043
p- Wert	0,126	0,672	0,859	0,855	0,828

Tabelle 11: Korrelationen vaskulärer Risikofaktoren mit polysomnographischen Ergebnissen und BMI

Angegeben sind R (Korrelationskoeffizient nach Pearson) und p-Wert; signifikante Korrelationen sind fett gedruckt

In Tabelle 11 sind bivariate Korrelationen innerhalb der für die PCR-Untersuchung eingeschlossenen Studienpopulation (N=28) zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und den polysomnographischen Messwerten und BMI dargestellt.

Die IMT korreliert mit allen schlafdiagnostischen Parametern hochsignifikant. In Abbildung 12 ist die Korrelation der IMT mit dem AHI dargestellt. Da OSAS anhand des AHI eingeteilt wird, kann die Aussage getroffen werden, dass die Schwere der Erkrankung positiv und signifikant mit der IMT korreliert. Eine größere IMT ist wiederum Ausdruck eines kardiovaskulären Risikos. Die Dicke der IMT korreliert darüber hinaus mit der Zeit, in der die Sauerstoffsättigung unter 90% liegt.

Der BMI korreliert positiv signifikant mit dem AHI und negativ signifikant mit der mittleren Sauerstoffsättigung, allerdings nicht mit der Zeit < 90% O₂.

Der systolische und diastolische Blutdruck weisen signifikante, bzw. knapp nicht signifikante Korrelationen (RR diast. mit SaO₂ mean und Zeit < 80% O₂) mit den relevanten schlafdiagnostischen Ergebnissen auf. Zudem korrelieren beide Blutdruckwerte signifikant mit dem BMI.

Während die HDL-, Triglycerid-, Cholesterin- und Homocysteinwerte keine signifikanten Korrelationen mit den polysomnographischen Messwerten oder dem BMI aufweisen, korrelieren die LDL-Werte signifikant mit dem AHI.

Bei den Werten des Glucosemetabolismus finden sich zwischen dem AHI und den HbA1c-, bzw. Blutglucosewerten signifikante Korrelationen. Der HOMA-IR und die Insulinwerte zeigen keine Korrelationen mit den schlafdiagnostischen Messwerten oder dem BMI.

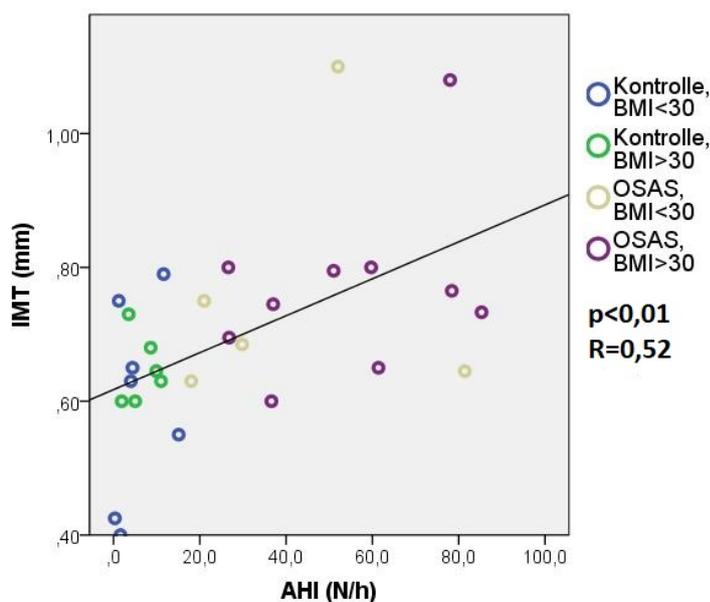


Abbildung 12: Korrelation zwischen IMT und AHI

3.5 Quantitative Real Time-PCR

Die Ergebnisse der qRT-PCR werden als relative Expressionen von proatherogenen und proinflammatorischen Zytokinen bezogen auf die nicht- adipöse Kontrollstrata untersucht. Zur Fehlerreduktion werden die Proben- mRNA- Werte mit einem Referenzgen normalisiert (s. Kapitel 2.2.6).

3.5.1 Referenzgen

Die Suche nach einem geeigneten, d.h. für diese Arbeit hypoxiestabilen Referenzgen erwies sich als schwierig, da viele der in anderen OSAS- bzw. Hypoxie- Studien verwendeten Housekeeping- Gene in dieser Analyse eine signifikante Hypoxie- Abhängigkeit aufweisen und die Expression verändert ist (5-10 fach). Für die üblicherweise verwendeten „*B₂M*“, „*TBP*“ und „*RPLP0*“ ergeben sich laut T-Test signifikante Änderungen der Genexpressionen (s. Abbildung 13 und 14). Die Ergebnisse sind als $M \pm SEM$ dargestellt.

Dabei zeigen TBP und RPLP0 ein vergleichbares Bild: Die ANOVA zeigt, dass Adipositas keinen signifikanten Effekt auf die relative Expression dieser zwei Gene hat (TBP: $p=0,809$, RPLP0: $0,822$). OSAS hingegen führt mit $p<0,01$ zu einer signifikanten Änderung der Genexpression (TBP: $p=0,005$, RPLP0: $0,009$). Nur knapp nicht signifikant ist zudem die Interaktion von OSAS und Adipositas (TBP: $p=0,089$, RPLP0: $p=0,053$). Zudem weist RPLP0 bei ungepaartem T-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Kontrollgruppen auf ($p=0,04$) und erfüllt somit nicht die Bedingungen eines Referenzgens, möglichst stabil unter denen im Experiment gegebenen Bedingungen (z.B. Hypoxie) zu sein.

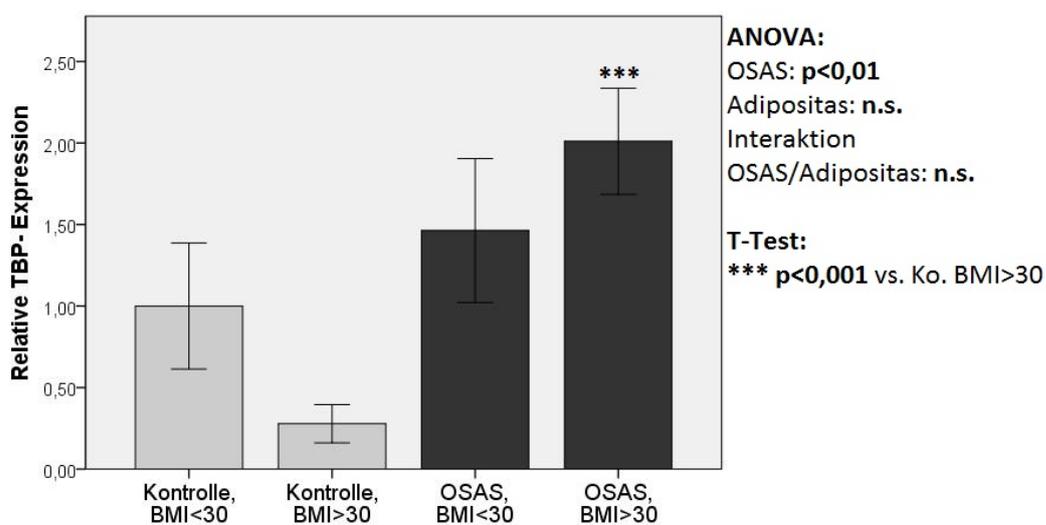


Abbildung 13: Relative Expression des TBP in den Strata ($M \pm SEM$)

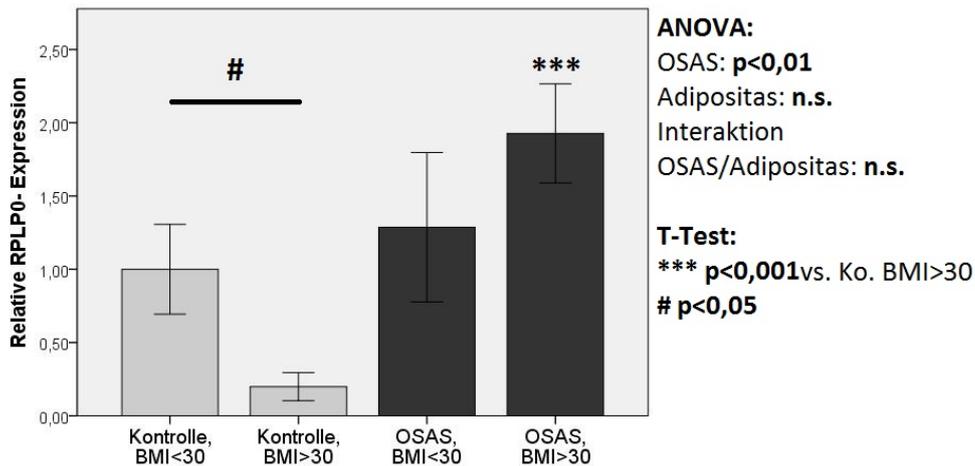


Abbildung 14: Relative Expression des RPLP0 in den Strata (M ± SEM)

Anhand der „NormFinder“ Software wird GUSB als der stabilste Housekeeper identifiziert (s. Abb.: 15). Weitere Gene konnten aufgrund begrenzten Probenmaterials nicht untersucht werden. Die Expression der proatherogenen und proinflammatorischen Zytokine und Enzyme sind mit diesem Referenzgen normalisiert.

Nach Testung der Homogenität der Varianzen mittels Levene-Test (Signifikanz= 0,802) wird eine ANOVA- Testung durchgeführt, die auch hier einen signifikanten Einfluss durch OSAS ergibt (p=0,010), allerdings nicht durch Adipositas (0,548) oder deren Interaktion (p=0,233) (s. Abbildung 15). Der Einfluss durch OSAS ist allerdings deutlich geringer als bei den oben besprochenen Referenzgenen. Im Falle einer Hochregulation von relevanten inflammatorischen Genen durch OSAS wird somit kein falsch positiver Befund vorgetäuscht, sondern ein Effekt, der sich gegen diesen moderaten Einfluss von OSAS „durchsetzt“.

In Abbildung 15 sind die Expressionen des Houskeepers in den Strata dargestellt. Mittels T-Test zeigt sich in den adipösen Strata ein signifikanter Unterschied in der GUSB-Genexpression.

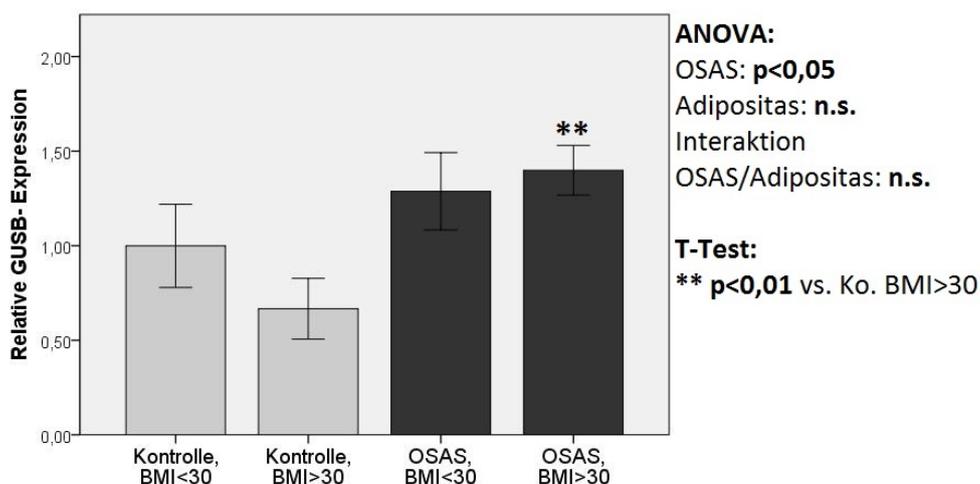


Abbildung 15: Relative Expression von GUSB in den Strata (M ± SEM)

Auch in der Längsschnittuntersuchung der vorliegenden Studie erfolgt der Vergleich mehrerer Referenzgene, wobei sich GUSB erneut als stabilster Housekeeper erweist. Abbildung 16 zeigt die relative Genexpression bei Patienten vor und nach cPAP-Therapie. Da die Anzahl der eingeschlossenen Patienten, die nach dreimonatiger cPAP-Therapie wiederkamen, gering ist (N=7), werden entsprechend dieser Fallzahl OSAS-Patienten vor Therapie berücksichtigt. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Unterschied im gepaarten T-Test. Jedoch erfolgt in einer selbstkritischen Analyse mit Berücksichtigung der unterschiedlichen RNA-Qualität eine ANOVA für Messwiederholung (Faktor Zeit, also Effekt von cPAP) mit Delta RIN als Kovariate. Hierbei zeigt sich weder ein signifikanter Einfluss durch cPAP-Therapie noch durch die RIN-Qualität, sodass GUSB zur Normalisierung geeignet ist. TBP hingegen wird signifikant durch den RIN-Wert, also die RNA-Qualität beeinflusst.

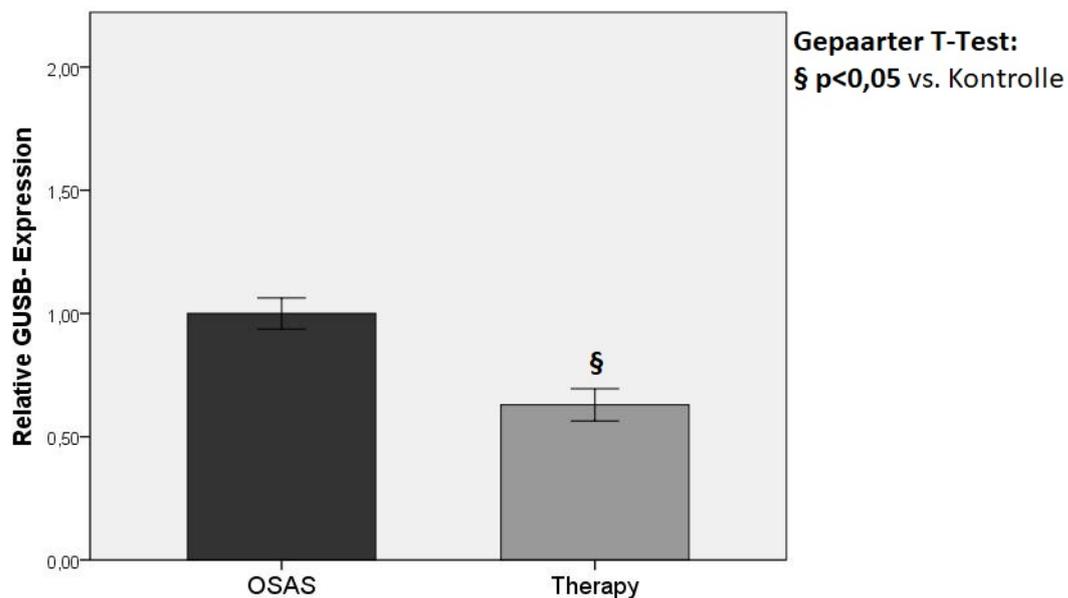


Abbildung 16: Relative Expression von GUSB bei Patienten ohne und mit Therapie (M ± SEM)

3.5.2 Ergebnisse Teil 1: Querschnittuntersuchung

Zunächst werden die Ergebnisse des Querschnittsstudienteils gezeigt, wobei jeweils die relativen Genexpressionen (normalisiert für GUSB und relativ zu Kontrollen) im Gesamtstudienkollektiv und seiner Strata dargestellt sind (s. Tabellen 12 und 13)

Relative Genexpression aller eingeschlossener Probanden und Patienten:

In Tabelle 12 sind die relativen Genexpressionen aller in die PCR-Untersuchung eingeschlossener Probanden und Patienten gezeigt. Laut ANOVA hat OSAS einen signifikanten steigernden Einfluss auf die Genexpression von IL-1 β , IL-6, COX-2 und SOCS-3, wohingegen ein Einfluss von Adipositas außer bei der GSR-Genexpression nur in der Interaktion mit OSAS besteht, und zwar bei IL-1 β und VEGF-A.

Bei IL-1 β und IL-6 zeigt sich ein signifikanter und bei COX-2 eine hochsignifikanter Unterschied zwischen OSAS-Patienten und Kontrollprobanden laut T-Test. Auch für SOCS-3 ergibt sich eine signifikante Veränderung der Genexpression bei OSAS-Patienten.

Darüber hinaus fällt auf, dass auch im Falle nicht signifikanter Veränderungen der Genexpressionen bei OSAS-Patienten eine Zunahme gegenüber Kontrollprobanden nachgewiesen werden kann.

Tabelle 12: Relative Genexpression der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten

	Kontrollen	OSAS-Patienten	p(ANOVA)		
			OSAS	Adipo.	Interakt.
N	13	15	28	28	28
IL-1 β	1,00 \pm 0,20	3,70 \pm 0,75**	0,008	0,125	0,046
IL-6	1,00 \pm 0,17	1,64 \pm 0,17*	0,014	0,348	0,138
COX-2	1,00 \pm 0,59	4,63 \pm 0,67***	0,001	0,474	0,293
TNF- α	1,00 \pm 0,51	1,87 \pm 0,49	0,394	0,403	0,235
GDF-15	1,00 \pm 0,28	1,06 \pm 0,29	0,960	0,789	0,244
SOD-2	1,00 \pm 0,45	1,38 \pm 0,28	0,517	0,831	0,531
SOCS-3	1,00 \pm 0,63	3,10 \pm 0,65*	0,034	0,441	0,278
VEGF-A	1,00 \pm 0,26	1,46 \pm 0,17	0,161	0,476	0,009
ABCG-1	1,00 \pm 0,54	1,37 \pm 0,25	0,463	0,156	0,074
CD-36	1,00 \pm 0,20	1,53 \pm 0,31	0,205	0,485	0,188
GSS	1,00 \pm 0,76	0,58 \pm 0,14	0,598	0,273	0,174
GSR	1,00 \pm 0,59	0,43 \pm 0,09	0,297	0,042	0,099

Dargestellte Daten als relativer M \pm SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen; Two-factorial ANOVA für den Einfluss von OSAS, Adipositas oder deren Interaktion

Relative Genexpression der nicht-adipösen und adipösen Strata:

In Tabelle 13 ist abzulesen, dass bei nicht-adipösen Patienten im Vergleich zu nicht-adipösen Kontrollen 0,24- bis 2,48-fache Veränderungen der Genexpressionen auftreten, ohne bei gegebener Fallzahl Signifikanz zu erreichen. Dabei fallen, im Gegensatz zum Gesamtstudienkollektiv, einige Expressionen geringer aus (z.B. GDF-15, VEGF-A, GSS, GSR). Wichtige proinflammatorische und -atherogene Zytokine und Enzyme wie IL-1 β , IL-6 und COX-2 sind dabei allerdings bei nicht-adipösen OSAS-Patienten in der Tendenz erhöht. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse der adipösen Strata (s. Tabelle 13): Die Genexpressionen von IL-1 β , IL-6, COX-2, SOCS-3, VEGF-A, ABCG-1, CD-36, GSS und GSR sind bei OSAS-Patienten gegenüber Kontrollprobanden, entsprechend der ANOVA, signifikant bis hochsignifikant erhöht. Nur bei TNF- α , GDF-15 und SOD-2 findet sich kein signifikanter Unterschied. Die Werte von GSS und GSR sind hier, im Gegensatz zu den nicht-adipösen Strata, bei OSAS-Patienten erhöht.

Adipöse Kontrollen weisen dabei geringere Mittelwerte der Genexpressionen auf als nicht-adipöse Kontrollen. Zwischen adipösen und nicht-adipösen Kontrollprobanden findet sich jedoch nur bei VEGF-A und CD-36 ein signifikanter Unterschied.

Tabelle 13: Relative Genexpression der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe

	Kontrollen nicht-adipös	Kontrollen adipös	OSAS-Patienten nicht-adipös	OSAS-Patienten adipös
N	7	6	5	10
IL-1 β	1,00 \pm 0,26	0,66 \pm 0,22	1,50 \pm 0,37	3,93 \pm 0,82***#
IL-6	1,00 \pm 0,14	0,53 \pm 0,21	1,21 \pm 0,22	1,32 \pm 0,17*
COX-2	1,00 \pm 0,58	0,05 \pm 0,01	2,48 \pm 0,55	2,66 \pm 0,51***
TNF- α	1,00 \pm 0,61	0,76 \pm 0,74	0,77 \pm 0,70	2,11 \pm 0,52
GDF-15	1,00 \pm 0,32	0,52 \pm 0,27	0,62 \pm 0,33	0,93 \pm 0,31
SOD-2	1,00 \pm 0,50	0,61 \pm 0,60	1,01 \pm 0,40	1,20 \pm 0,30
SOCS-3	1,00 \pm 0,60	0,02 \pm 0,01	1,59 \pm 0,64	1,76 \pm 0,46**
VEGF-A	1,00 \pm 0,26	0,32 \pm 0,13#	0,73 \pm 0,22	1,14 \pm 0,13***
ABCG-1	1,00 \pm 0,49	0,01 \pm 0,01	0,67 \pm 0,29	0,79 \pm 0,15***
CD-36	1,00 \pm 0,13	0,41 \pm 0,23#	0,99 \pm 0,55	1,20 \pm 0,23*
GSS	1,00 \pm 0,74	0,01 \pm 0,01	0,24 \pm 0,12	0,35 \pm 0,10**
GSR	1,00 \pm 0,55	0,01 \pm 0,00	0,29 \pm 0,07	0,18 \pm 0,00*

Dargestellte Daten als relativer M \pm SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 adipöse vs. nicht-adipöse Strata

Interleukin 1- β

Die relative IL-1 β Expression ist bei allen OSAS-Patienten im Vergleich zu allen Kontrollprobanden signifikant erhöht ($p=0,003$) (s. Abbildung 17). Diese Expression soll als Beispiel für durch OSAS und nicht durch Adipositas, allerdings durch deren Interaktion beeinflusst herausgestellt werden.

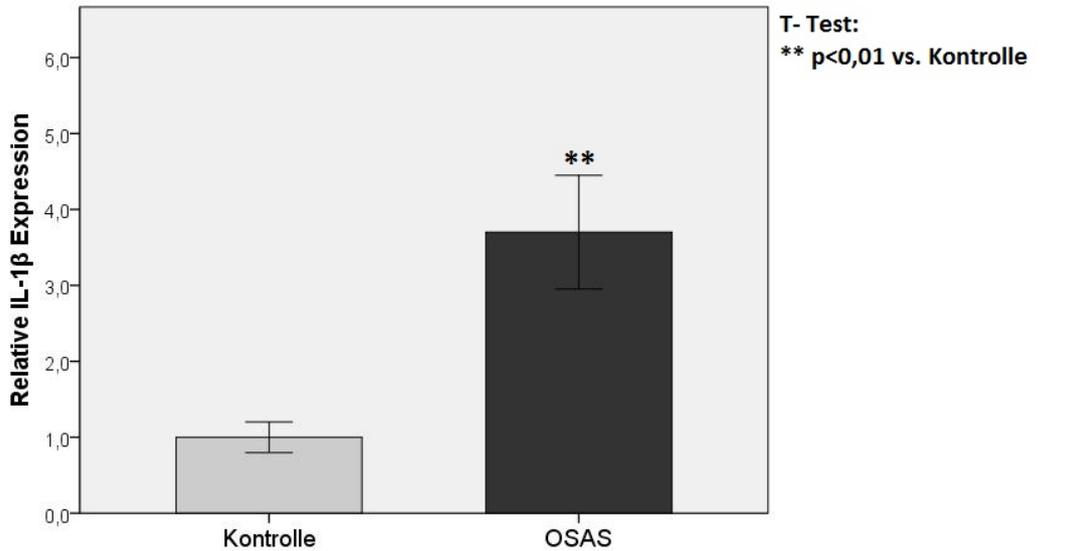


Abbildung 17: Relative Genexpression von IL-1 β im Gesamtkollektiv (M ± SEM)

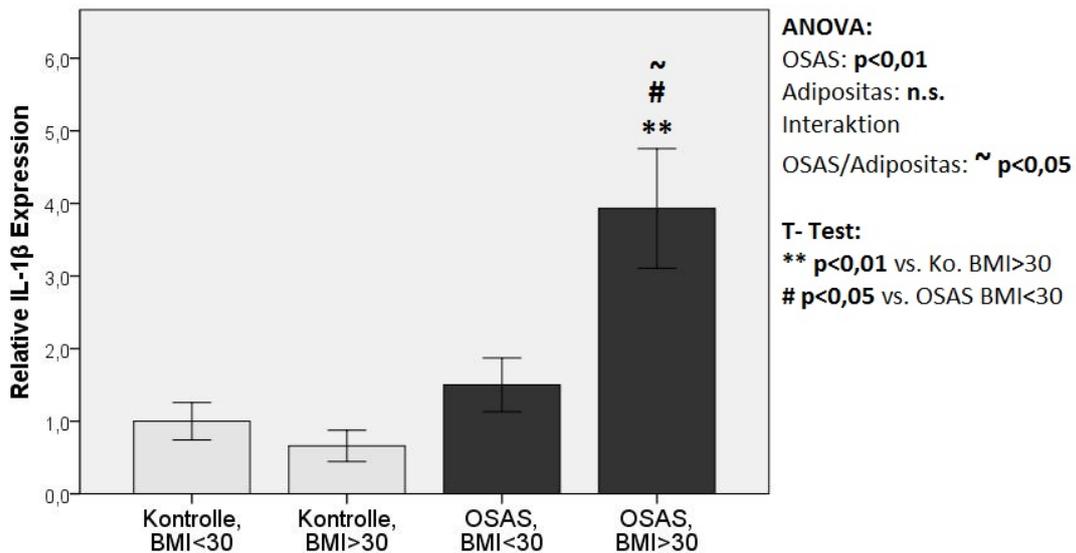


Abbildung 18: Relative Genexpression von IL-1 β in den Strata (M ± SEM)

Wie auch bereits in Tabelle 12 dargestellt, zeigt sich mittels ANOVA, dass ein signifikanter Synergismus zwischen Adipositas und OSAS besteht ($p=0,046$). Der Parameter OSAS hat ebenfalls signifikanten Einfluss ($p=0,008$), wohingegen der Faktor „Adipositas“ keine Signifikanz ($p=0,125$) aufweist. So ergibt sich durch ungepaarten T-Test eine signifikant erhöhte Genexpression bei adipösen Patienten ($p=0,003$). Zudem ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden OSAS-Gruppen ($p=0,020$), nicht jedoch zwischen den beiden Kontrollgruppen gegeben ($p=0,343$).

Zugleich existieren für die relative $IL-1\beta$ Expression signifikante, positive Korrelationen mit dem AHI ($R=0,476$; $p=0,010$) und dem HbA1c ($R=0,426$; $p=0,027$) (s. Abbildungen 19, 20). Die Korrelation mit IMT ist mit $p=0,084$ knapp nicht signifikant.

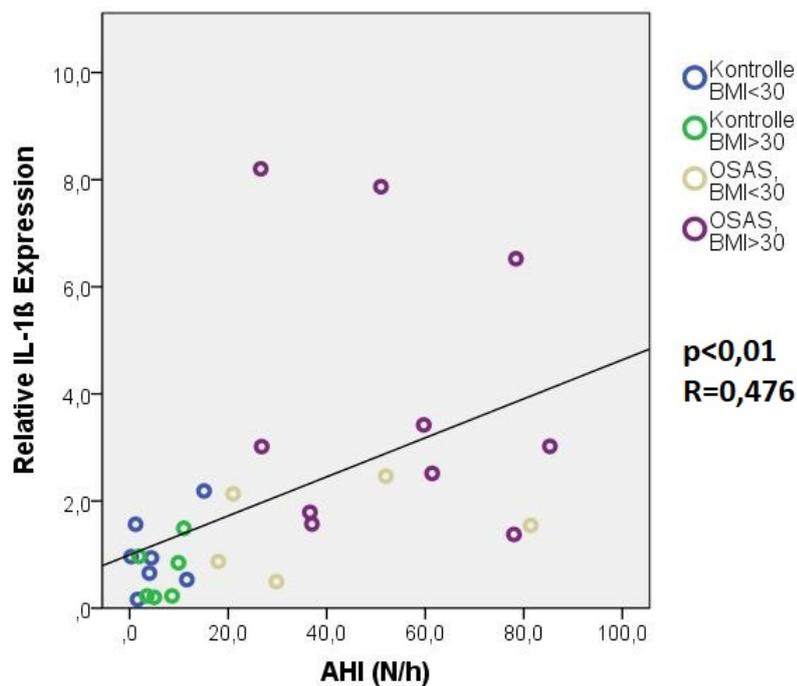


Abbildung 19: Korrelation der relativen Genexpression von $IL-1\beta$ und AHI aller untersuchten Probanden und Patienten

Cyclooxygenase 2

Im Gesamtkollektiv erweist sich die relative COX-2 Expression auch als hochsignifikant erhöht bei OSAS-Patienten (ca. 5-fach) im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (s. Abbildung 21).

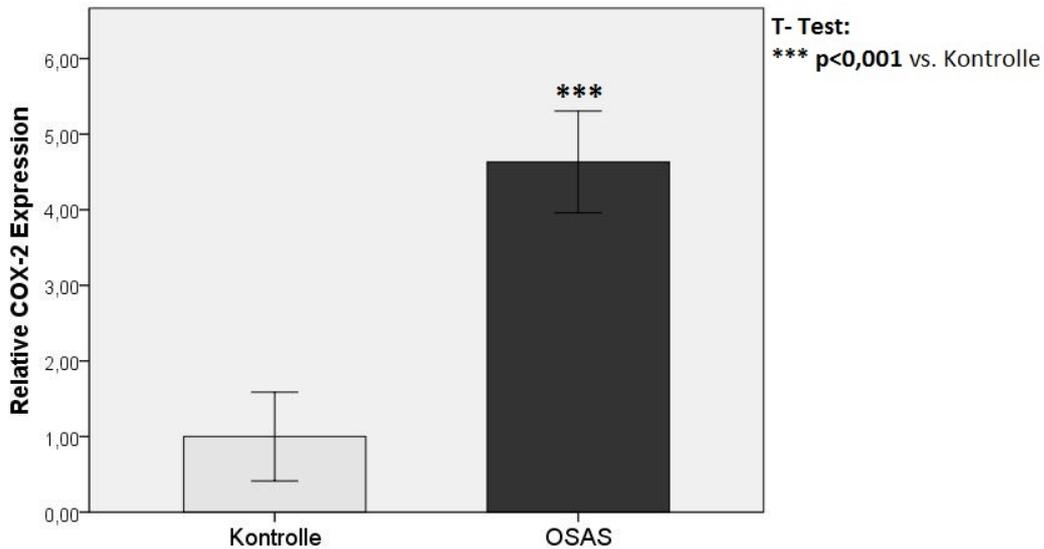


Abbildung 21: Relative Genexpression von COX-2 im Gesamtkollektiv (M ± SEM)

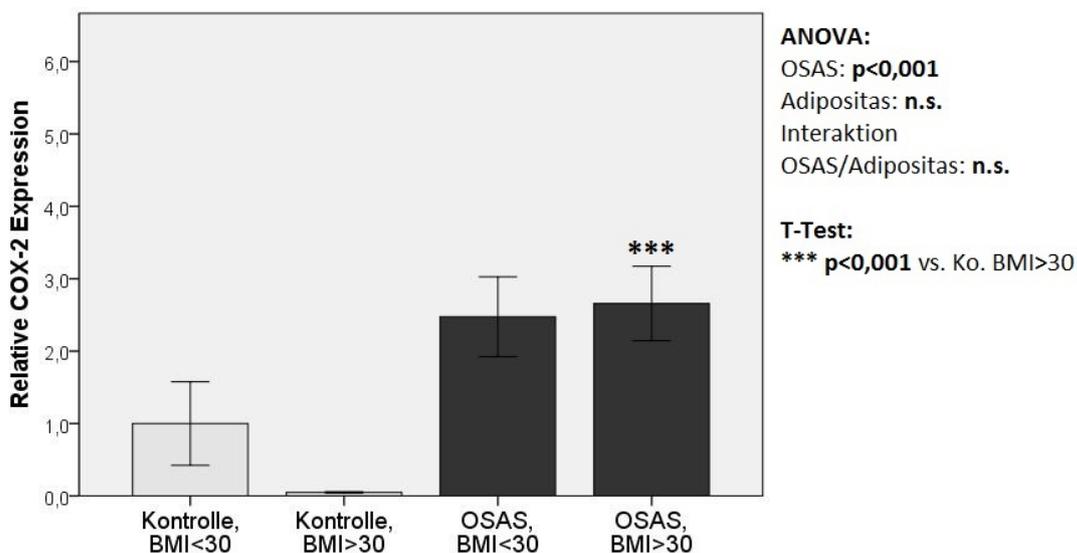


Abbildung 22: Relative Genexpression von COX-2 in den Strata (M ± SEM)

Mittels ANOVA zeigt sich für das Gesamtkollektiv, dass COX-2 durch OSAS signifikant beeinflusst wird ($p=0,001$), nicht jedoch durch Adipositas ($p=0,474$). Es findet sich zudem, im Gegensatz zu $Il-1\beta$, keine signifikante Interaktion zwischen diesen Faktoren ($p=0,293$), sodass COX-2 als Beispiel für einen reinen OSAS-Effekt steht (s. Abbildung 21). Entsprechend zeigt der T-Test einen hochsignifikanten Unterschied zwischen adipösen OSAS-Patienten und deren Kontrollen besteht ($p=0,001$). Keine

Signifikanzen konnten zwischen den nicht-adipösen OSAS-Patienten und deren Kontrollen, sowie auch zwischen beiden Kontrollgruppen bzw. OSAS-Patientengruppen nachgewiesen werden (s. Abbildung 22), wobei die adipösen gegenüber nicht-adipösen Kontrollen mehrfach erniedrigte Werte aufweisen (s. Abbildung 22).

Dementsprechend zeigt Abbildung 23 eine positive signifikante Korrelation der COX-2- Expression mit dem AHI ($R=0,408$; $p=0,031$). Die Schwere der OSAS-Erkrankung korreliert mit der Expression des Enzyms. Eine signifikante Korrelation der COX-2 Expression mit dem BMI besteht nicht. Allerdings ergibt sich eine positive Korrelation der COX-2- und der IL-1 β - Expression ($R=0,338$; $p=0,024$) (s. Abbildung 24).

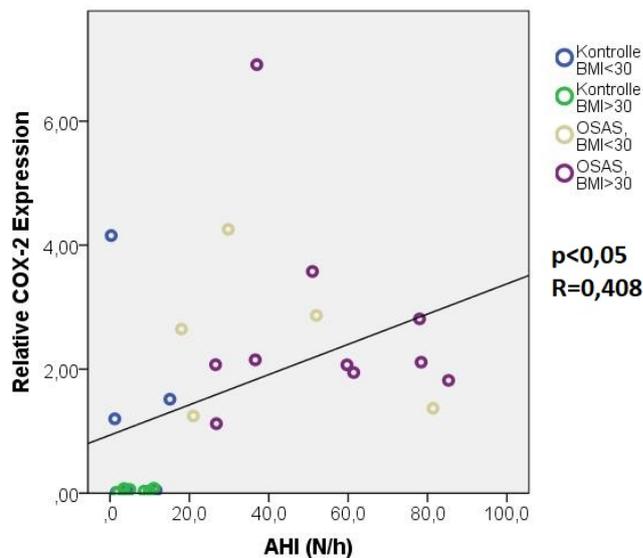


Abbildung 23: Korrelation der relativen Genexpression von COX-2 und AHI von Probanden und Patienten

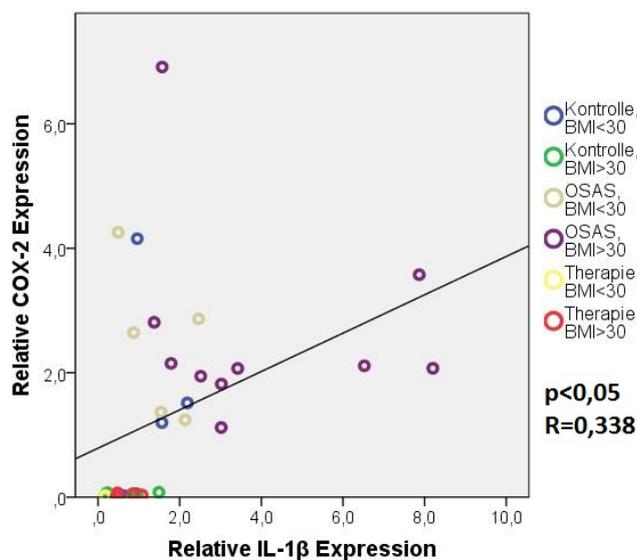


Abbildung 24: Korrelation der relativen Genexpression von COX-2 und IL-1 β von Probanden und Patienten (mit Therapie)

Interleukin 6

Bei IL-6 ergibt sich in der ANOVA ein Einfluss durch OSAS ($p=0,014$), nicht jedoch durch Adipositas ($p=0,348$). Auch deren Interaktion weist keine Signifikanz auf ($p=0,138$). Im Gesamtkollektiv zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Genexpression bei OSAS-Patienten gegenüber Kontrollprobanden ($p=0,013$) laut T-Test (s. Abbildung 25). In den Strata ist eine Signifikanz bei adipösen OSAS-Patienten im Vergleich zu deren Kontrollen zu finden ($p=0,011$), nicht jedoch beim Vergleich zwischen den nicht-adipösen Strata ($p=0,414$) (s. Abbildung 26).

Die Korrelationen mit dem AHI ($R= 0,363$; $p=0,057$) verfehlt knapp die Signifikanz; zum BMI ($R=-0,011$; $p=0,951$) besteht hingegen kein Zusammenhang.

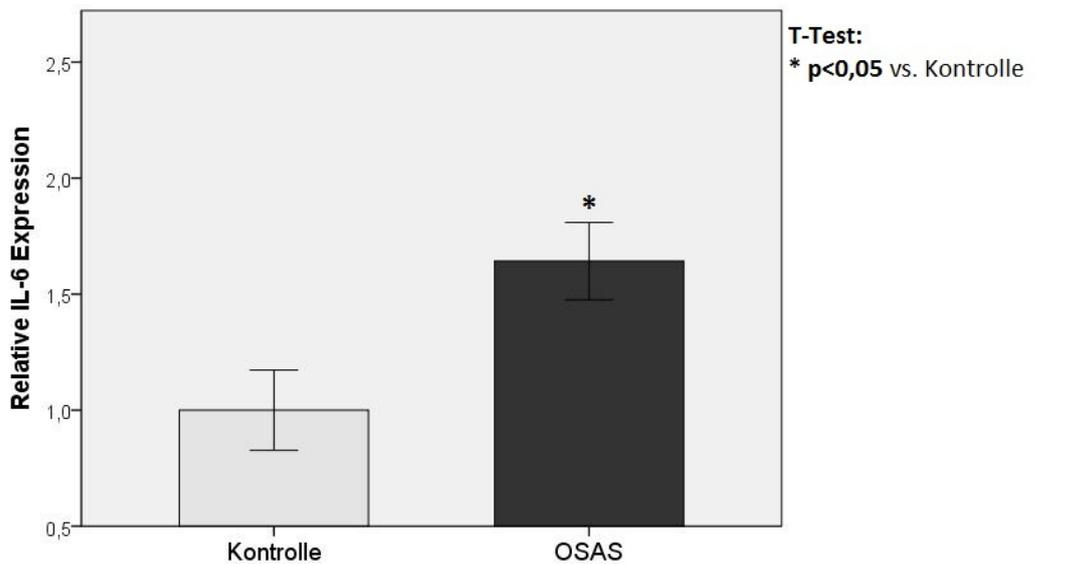


Abbildung 25: Relative Genexpression von IL-6 im Gesamtkollektiv (M ± SEM)

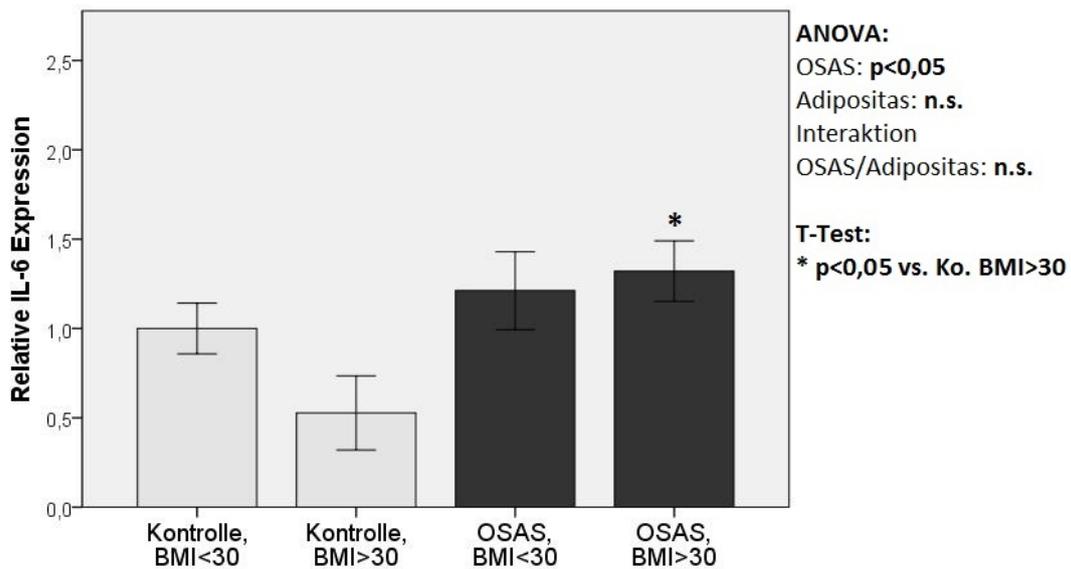


Abbildung 26: Relative Genexpression von IL-6 in den Strata (M ± SEM)

Tumor-necrosis factor α

Als Beispiel eines mit Gefäßrisiken assoziierten Zytokins zeigt TNF- α in der ANOVA keine signifikanten Einflüsse durch OSAS ($p=0,394$) oder Adipositas ($p=0,403$); auch eine Interaktion ($p=0,235$) besteht nicht. Im T-Test kann dementsprechend keine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression durch OSAS im Gesamtstudienkollektiv gezeigt werden ($p=0,230$) (s. Abbildung 27). Auch in den Strata ergibt sich keine signifikante Veränderung der Genexpression (s. Abbildung 28), der Trend weist jedoch auf eine mögliche Interaktion (vgl. Il-1 β) hin.

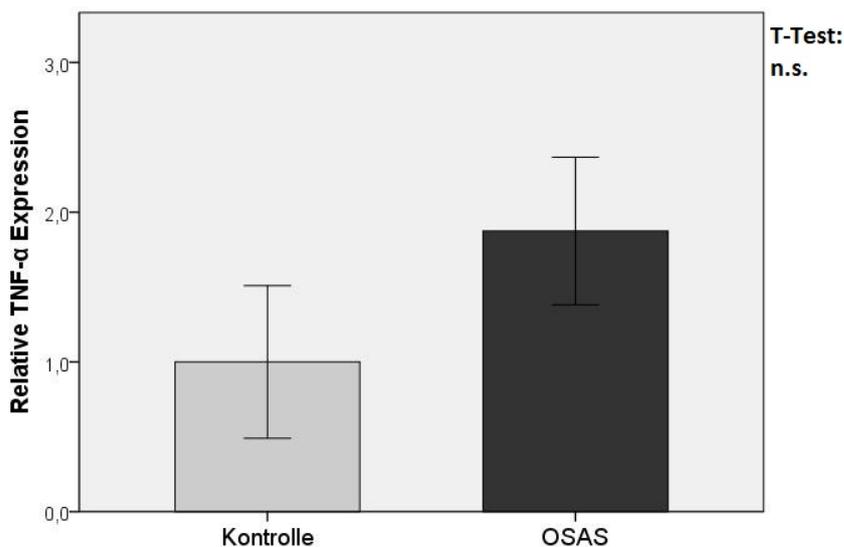


Abbildung 27: Relative Genexpression von TNF- α im Gesamtkollektiv (M \pm SEM)

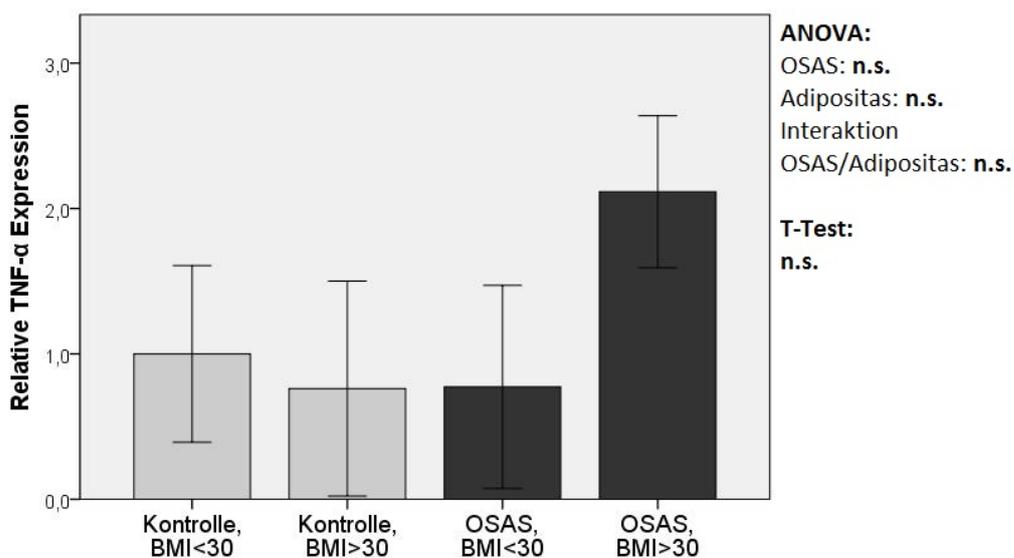


Abbildung 28: Relative Genexpression von TNF- α in den Strata (M \pm SEM)

Dabei existiert eine signifikante, positive Korrelation zwischen der relativen TNF- α Expression und der Zeitspanne (min/TST) unter 90% Sauerstoffsättigung ($R=0,456$; $p=0,015$) im Blut.

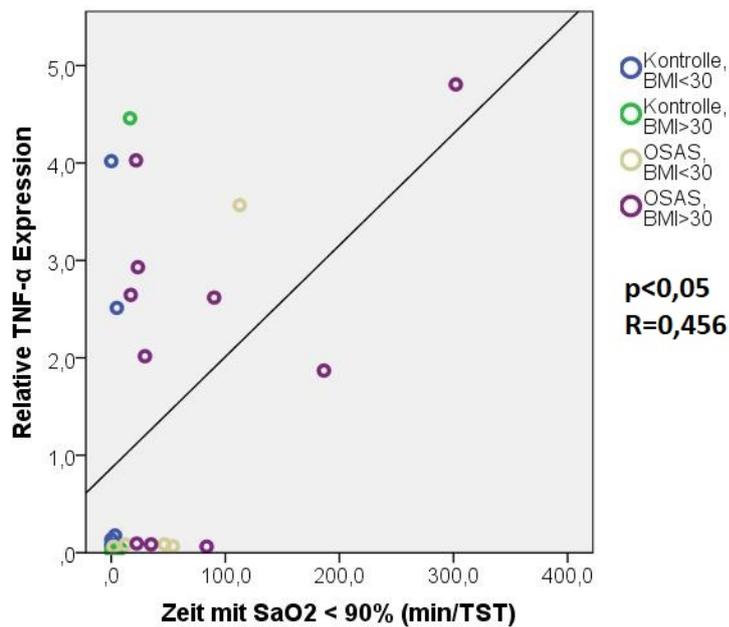


Abbildung 29: Korrelation der relativen Genexpression von TNF- α und der nächtlichen Zeit mit einer Sauerstoffsättigung unter 90% (min/TST) von Probanden und Patienten

Vascular endothelial growth factor-A

Bezüglich des angiogen wirksamen VEGF-A zeigt die ANOVA eine signifikante Interaktion zwischen OSAS und Adipositas ($p=0,009$), wobei weder Adipositas ($p=0,476$), noch OSAS ($p=0,161$) für sich einen signifikanten Einfluss haben.

Entsprechend kann im Gesamtkollektiv keine signifikante Veränderung seiner relativen Genexpression zwischen OSAS-Patienten und Kontrollprobanden ($p=0,138$) gefunden werden (s. Abbildung 30). Die Untersuchung in den Strata weist einen hochsignifikanten höhere VEGF-A Genexpression bei adipösen Patienten im Vergleich zu Probanden auf ($p<0,001$), während nicht-adipöse Patienten tendenziell geringe Werte als ihre Kontrollen aufweisen (s. Abbildung 31).

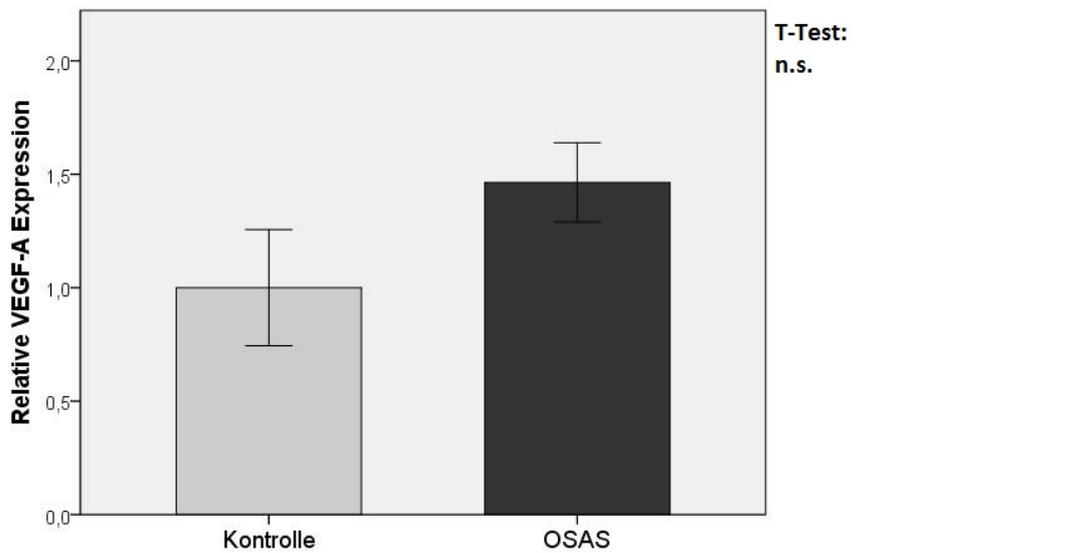


Abbildung 30: Relative Genexpression von VEGF-A im Gesamtkollektiv ($M \pm SEM$)

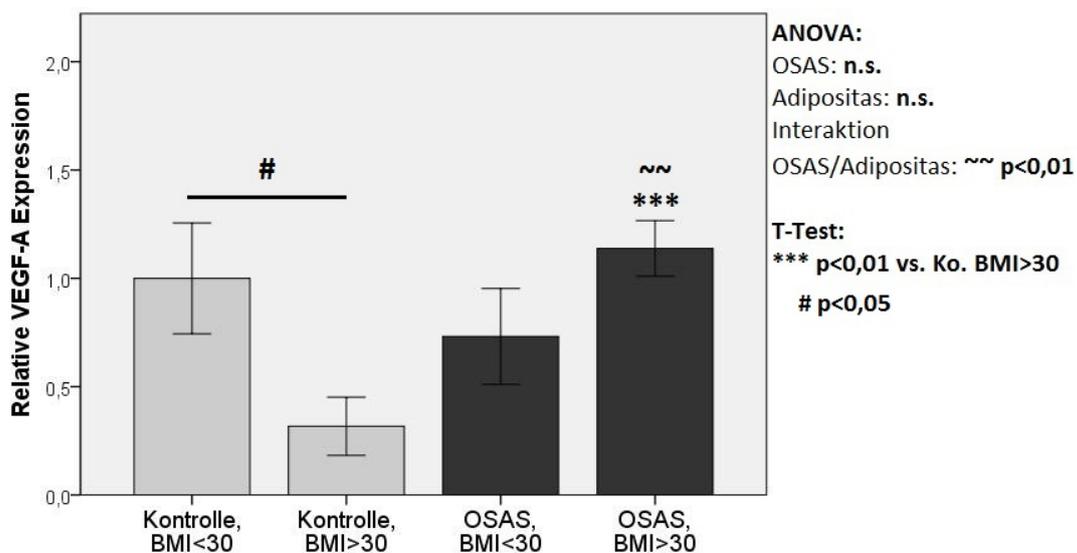


Abbildung 31: Relative Genexpression von VEGF-A in den Strata ($M \pm SEM$)

3.5.3 Ergebnisse Teil 2: Längsschnittuntersuchung

Anthropometrische Daten aller Patienten mit cPAP- Behandlung:

In Tabelle 14 sind die anthropometrische Daten und venöse Blutparameter der Patientengruppe (N=7) dargestellt, die eine 3-5 monatige cPAP-Therapie (5, 1±0, 72h/Nacht (Range: 2,6 - 7,1 h)) durchgeführt haben.

Tabelle 14: Anthropometrische Daten und venöse Blutparameter der OSAS-Patienten vor und nach Therapie

		OSAS-Patienten vor Therapie	OSAS-Patienten nach Therapie
N		7	7
Alter	[Jahre]	48,57 ± 2,09	49,00 ± 1,94
BMI	[kg/m ²]	30,95 ± 2,29	30,96 ± 2,2
RR syst.	[mmHg]	141,29 ± 5,31	141,00 ± 3,82
RR diast.	[mmHg]	88,79 ± 2,51	88,29 ± 3,15
HF	[min ⁻¹]	68,00 ± 2,66	61,57 ± 3,73§
IMT	[mm]	0,70 ± 0,03	0,70 ± 0,07
HbA1c	[%]	5,78 ± 0,21	5,58 ± 0,09
Blutglucose	[mg/dl]	106,57 ± 3,00	99,86 ± 2,82
Insulin	[µU/ml]	22,67 ± 5,67	15,57 ± 2,55
HOMA-IR	Index	6,13 ± 1,74	3,69 ± 0,63
ges Chol	[mg/dl]	208,6 ± 22,6	214,7 ± 23,9
HDL	[mg/dl]	42,5 ± 2,5	46,5 ± 1,8
LDL	[mg/dl]	150,0 ± 23,1	152,8 ± 22,7
Triglyc	[mg/dl]	143,9 ± 31,2	178,9 ± 46,2
TNF-α	[pg/ml]	7,48 ± 0,71	6,72 ± 0,42
IL-6	[pg/ml]	4,71 ± 2,71	3,43 ± 1,27
Homocys	[µmol/l]	9,10 ± 0,95	8,63 ± 0,86

Dargestellte Daten als M ± SEM; gepaarter T-Test: § p<0,05, §§ p<0,01, §§§ p<0,001 OSAS-Patienten vs. Kontrollen

Die anthropometrischen Daten von OSAS-Patienten nach drei- bis fünfmonatiger cPAP-Therapie zeigen bis auf die Herzfrequenz keine signifikante Unterschiede (s. Tabelle 14). Die Werte des HbA1c, der Blutglucose, des Insulins und des HOMA-IR zeigen unter Therapie eine Reduktion, jedoch nicht signifikant.

Die Werte der Lipide zeigen nur geringe, nicht signifikante Veränderungen. Die Serumwerte von TNF-α und IL-6 sind bei OSAS-Patienten mit Therapie niedriger, aber nicht signifikant.

Relative Genexpression vor und nach Therapie:

Die Genexpressionen für diesen Längsschnittstudienteil (s. Tabelle 15) sind für GUSB normalisiert und relativ zu den Ausgangswerten (vor Therapie) der 7 eingeschlossenen Patienten dargestellt ($M \pm SEM$). Die Signifikanz der Veränderung unter Therapie wird mittels gepaartem T-Test geprüft und die p-Werte sind in der 5. Spalte angegeben. Zusätzlich finden sich in der 2. Tabellenspalte die Werte der Kontrollprobanden aus dem Querschnittstudienteil ebenfalls bezüglich OSAS-Patienten vor Therapie normalisiert, um gesunden Kontrollprobanden und therapierten Patienten orientierend vergleichen zu können. Hierfür wird wiederum der ungepaarte T-Test verwendet und die sich hieraus ergebenden Signifikanzen sind mittels \$ gekennzeichnet. Auf eine nach Adipositas stratifizierte Darstellung wird aufgrund zu geringer Fallzahlen verzichtet.

Tabelle 15: Relative Genexpression der in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten vor und nach Therapie

	Kontrollen	OSAS vor Therapie	OSAS nach Therapie	p (gepaart) nach vs. vor Therapie
N	13	7	7	
IL-1 β	0,31 \pm 0,06	1,00 \pm 0,26	0,19 \pm 0,05	0,012
IL-6	0,62 \pm 0,11	1,00 \pm 0,13	1,07 \pm 0,23	0,720
COX-2	0,29 \pm 0,17	1,00 \pm 0,10	0,02 \pm 0,00	0,000
TNF- α	0,50 \pm 0,25	1,00 \pm 0,36	0,03 \pm 0,01	0,037
VEGF-A	0,64 \pm 0,16	1,00 \pm 0,19	0,46 \pm 0,07	0,020
GDF-15	1,19 \pm 0,33	1,00 \pm 0,35	0,55 \pm 0,30	0,355
ABCG-1	0,69 \pm 0,36	1,00 \pm 0,19	0,02 \pm 0,01	0,002
SOD-2	0,65 \pm 0,30	1,00 \pm 0,27	0,02 \pm 0,00	0,011
SOCS-3	0,24 \pm 0,15	1,00 \pm 0,21	0,02 \pm 0,01	0,003
CD-36	0,53 \pm 0,11	1,00 \pm 0,26	0,22 \pm 0,02 \$	0,028
GSS	1,45 \pm 1,10	1,00 \pm 0,33	0,03 \pm 0,00	0,025
GSR	1,89 \pm 1,13	1,00 \pm 0,25	0,05 \pm 0,00	0,009

Dargestellte Daten als relativer $M \pm SEM$; ungepaarter T-Test: \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ OSAS-Pat. vs. Kontrollen

Die Genexpressionen der OSAS-Patienten nach Therapie zeigen bei IL-1 β , COX-2, TNF- α , VEGF-A, ABCG-1, SOD-2, SOCS-3, CD-36, GSS und GSR eine signifikante bis hochsignifikante Reduktion im Vergleich zu vor Therapie (s. Tabelle 15). Bei IL-6 und GDF-15 findet sich diese Signifikanz nicht.

Alle Genexpressionen mit Ausnahme von IL-6 weisen bei therapierten OSAS-Patienten geringere Werte als bei Kontrollprobanden auf. Eine Signifikanz findet sich jedoch nur bei CD-36, wobei TNF- α mit $p=0,088$ und SOD-2 mit $p=0,054$ nur knapp nicht-signifikanten Unterschiede aufweisen.

Da signifikante Unterschiede im RIN-Wert vor und nach cPAP-Therapie mit bis zu 35% Differenz (OSAS vor Therapie: RIN: $8,4 \pm 0,2$; OSAS nach Therapie: RIN: $6,7 \pm 0,4$) nachweisbar sind, wird mittels ANOVA für Messwiederholung (Faktor Zeit, d.h. Effekt von cPAP ohne Kontrolle) der Einfluss von Delta RIN als Kovariate für die einzelnen Transkripte geprüft. Dies ergibt, dass cPAP (d.h. Faktor Zeit) unabhängig von RIN-Veränderungen einen signifikanten Effekt, also Herunterregulation, auf die Genexpression, z.B. von COX-2 (Faktor Zeit: $p=0,000$; RIN: $P=0,049$) hat. Keine Signifikanzen für den Faktor Zeit und RIN finden sich bei IL-1 β , VEGF-A, GDF-15, IL-6, SOCS-3 und GSR. Bei TNF- α (Faktor Zeit: $p=0,727$; RIN: $P=0,013$), SOD-2 (Faktor Zeit: $p=0,472$; RIN: $P=0,041$), CD-36 (Faktor Zeit: $p=0,962$; RIN: $P=0,019$) und GSS (Faktor Zeit: $p=0,979$; RIN: $P=0,020$) zeigen sich hingegen Signifikanzen für die RIN-Werte.

Hingewiesen sei an dieser Stelle nochmals darauf, dass das Referenzgen GUSB auch signifikanten Einfluss durch die cPAP-Therapie erfährt, also signifikante Befunde eher maskiert als vortäuscht.

3.6 Ergebnisse der GSH- und GSSG-Untersuchung

Da OSAS zu einer intermittierender Hypoxie mit begleitendem oxidativen Stress führt, wurde mittels Enzymtest die intrazelluläre Konzentration von gesamtem und reduziertem Glutathion gemessen und hiermit der Thiol-Redoxstatus bestimmt. Ein weiterer Grund diese intrazelluläre Konzentrationen zu bestimmen, war, die in der PCR-Untersuchung veränderte Expression der GSR und GSS. Das Studienkollektiv der GSH- und GSSG-Untersuchung, sowie auch der Aminosäurenuntersuchung in Kapitel 3.7, konnte komplett (d.h ohne missing value wie bei der PCR-Untersuchung), untersucht werden, da keine Proben qualitätsbedingt auszuschließen waren. Die anthropometrischen Daten, schlafdiagnostische Ergebnisse und blutvenöse Parameter finden sich in Tabellen 16 und 17.

Dies erfolgt jedoch explorativ in gepoolten Gruppen für OSAS-Patienten und Kontrollen, sodass eine Anpassung der Gruppengröße an die in der PCR-Untersuchung nicht nachträglich möglich war. Alle Werte stellen Mittelwerte für jeden Pool aus einer Fünffach- Bestimmung dar.

Tabelle 16: Anthropometrische Daten, schlafdiagnostische Ergebnisse und blutvenöse Parameter aller Kontrollen und Patienten

		Kontrollen	OSAS-Pat	p(ANOVA)		
				OSAS	Adipo.	Interakt.
N		25	28	53	53	53
Alter	[Jahre]	44,5 ± 1,2	48,8 ± 1,3*	0,004	0,378	0,055
BMI	[kg/m ²]	29,5 ± 1,2	31,6 ± 0,9	0,333	0,000	0,216
RR syst.	[mmHg]	137,9 ± 1,8	146,3 ± 2,8*	0,081	0,006	0,210
RR diast.	[mmHg]	88,6 ± 1,3	94,5 ± 1,8*	0,041	0,018	0,470
HF	[min ⁻¹]	66,2 ± 2,1	70,9 ± 2,2	0,163	0,341	0,239
IMT	[mm]	0,62 ± 0,02	0,70 ± 0,03*	0,024	0,719	0,559
AHI	[N/h]	5,0 ± 0,8	48,7 ± 4,47***	0,000	0,335	0,290
Zeit < 90% O ₂	[min/TST]	1,9 ± 0,86	61,8 ± 14,0***	0,001	0,470	0,542
HbA1c	[%]	5,51 ± 0,05	5,74 ± 0,08	0,037	0,720	0,951
Blutglucose	[mg/dl]	92,6 ± 1,4	98,4 ± 2,2	0,049	0,891	0,718
Insulin	[μU/ml]	8,93 ± 1,91	14,16 ± 2,05	0,094	0,800	0,975
HOMA-IR	Index	1,68 ± 0,28	3,57 ± 0,59**	0,008	0,558	0,437
ges Chol	[mg/dl]	203,4 ± 7,2	213,6 ± 7,0	0,178	0,015	0,810
HDL	[mg/dl]	48,1 ± 1,8	45,5 ± 2,0	0,235	0,735	0,087
LDL	[mg/dl]	137,8 ± 6,0	143,6 ± 7,1	0,524	0,093	0,247
Triglyc	[mg/dl]	113,2 ± 12,1	156,9 ± 19,8	0,014	0,270	0,016

Dargestellte Daten als M ± SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen; Two-factorial ANOVA für den Einfluss von OSAS, Adipositas oder deren Interaktion

Tabelle 17: Anthropometrische Daten, schlafdiagnostische Ergebnisse und blutvenöse Parameter der nicht-adipösen und adipösen Strata aller Kontrollen und Patienten

		Kontrollen nicht-adipös	Kontrollen adipös	OSAS-Pat nicht-adipös	OSAS-Pat adipös
N		12	13	8	20
Alter	[Jahre]	43,5 ± 1,8	45,4 ± 1,6	52,6±1,9**	47,3± 1,5
BMI	[kg/m ²]	25,8 ± 0,7	32,8 ± 0,6	25,6 ± 1,0	34,0 ± 0,7*
RR syst.	[mmHg]	135,1 ± 1,6	140,5 ± 3,1	138,1±6,1	149,5±2,9
RR diast.	[mmHg]	86,5 ± 1,4	90,4 ± 2,1	91,0 ± 3,3	95,9 ± 2,1
HF	[min ⁻¹]	69,8 ± 3,3	63,0 ± 2,4	71,5 ± 5,2	70,7 ± 2,3
IMT	[mm]	0,60 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,72 ± 0,06	0,69± 0,03
AHI	[N/h]	5,3 ± 1,3	4,8 ± 1,0	43,8 ± 7,3***	50,8± 5,6***
Zeit<90% O ₂	[min/TST]	1,0 ± 0,5	2,8 ± 1,4	51,6 ± 19,2*	65,8 ± 18,3**
HbA1c	[%]	5,49 ± 0,06	5,52 ± 0,09	5,73±0,06*	5,74±0,11
Blutglucose	[mg/dl]	93,3 ± 1,8	91,9 ± 2,2	98,3±4,9**	98,5±2,5
Insulin	[μU/ml]	9,90 ± 4,10	9,24 ± 1,91	18,81 ± 7,09	13,98 ± 1,81
HOMA-IR	Index	1,18 ± 0,21	2,15 ± 0,47	3,97± 1,79	3,42± 0,45
ges Chol	[mg/dl]	217,8 ± 8,4	190,2 ± 10,4	223,6 ± 16,1	209,6 ± 7,6
HDL	[mg/dl]	51,2 ± 2,9	45,3 ± 2,1	45,3±2,1	42,4±2,8
LDL	[mg/dl]	152,0 ± 6,1	124,8 ± 8,9	144,5 ± 19,3	143,2± 6,5
Triglyc	[mg/dl]	96,2 ± 11,6	128,9 ± 20,3	203,3 ± 44,5*	138,4±20,6

Dargestellte Daten als M ± SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen

In Tabelle 18 ist neben der intrazellulären Konzentration des gesamten GSH auch die des verfügbaren, reduzierten GSH und des GSSG aufgeführt. Hieraus lassen sich die Verhältnisse von gesamtem sowie reduziertem GSH zu GSSG berechnen.

Tabelle 18: Ergebnisse der GSH und GSSG Bestimmung in gepoolten Gruppen

	Kontrollen	Kontrollen	OSAS- Patienten	OSAS- Patienten	Therapie	Therapie
	BMI<30	BMI≥30	BMI<30	BMI≥30	BMI<30	BMI≥30
N	12	13	8	20	3	14
ges. GSH (nmol/mg)	39,42	77,10	77,47	74,45	46,66	69,44
red. GSH (nmol/mg)	34,20	64,42	69,04	66,81	41,86	61,75
GSSG (nmol/mg)	5,22	12,67	8,43	7,64	4,81	7,69
ges. GSH/GSSG	7,56	6,08	9,19	9,74	9,71	9,03
red. GSH/GSSG	6,56	5,08	8,19	8,74	8,71	8,03

Dargestellte Daten als Mittelwert

In Abbildung 32 ist die reduzierte intrazelluläre GSH-Konzentration, also der verfügbare GSH-Anteil dargestellt. Es fällt wider Erwarten auf, dass bei adipösen Kontrollen, sowie bei allen OSAS-Patienten die Konzentration des reduzierten GSH höher ist (ca. 2-fach) als bei nicht-adipösen Kontrollen. Bei Patienten nach Therapie zeigt sich eine niedrigere verfügbare GSH-Konzentration als vor Therapie, wobei dieser Therapieeffekt bei der adipösen Patientengruppe nur gering ausgeprägt ist.

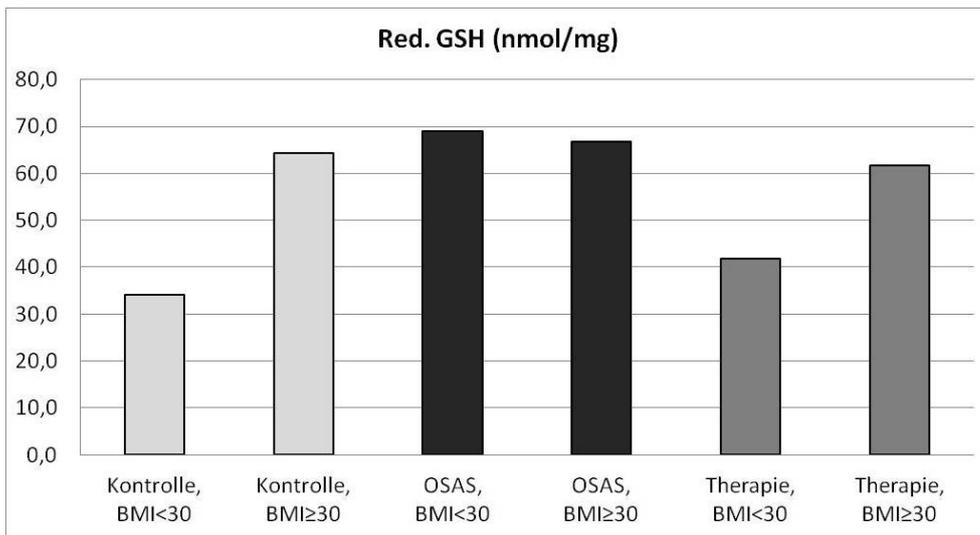


Abbildung 32: Red. GSH in nmol/mg aller Gruppen (Mittelwert)

Das Mengenverhältnis von verfügbarem, also reduziertem GSH zu GSSG gibt den Redoxstatus der Zelle wieder, der physiologisch GSH:GSSG = 9:1 ist (Giustarini et al., 2016). Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 aufgeführt.

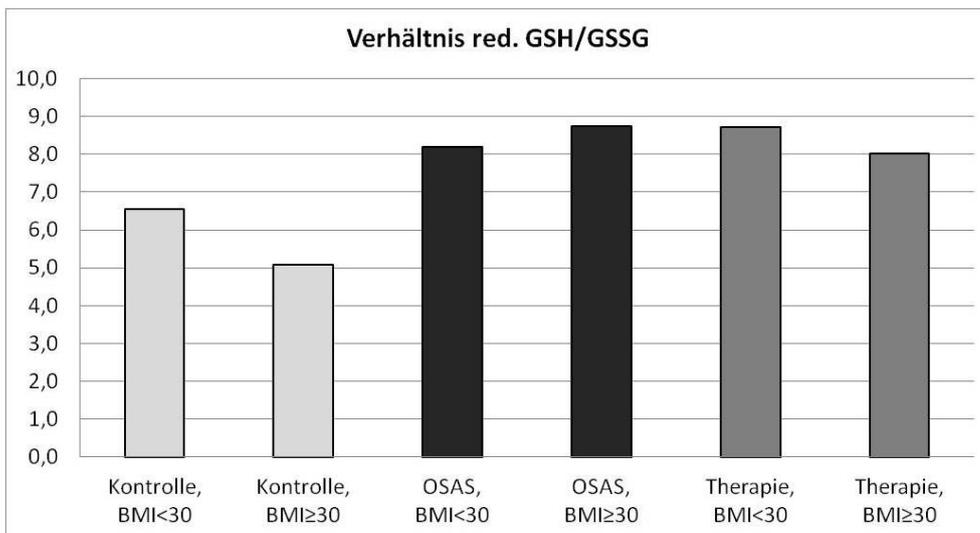


Abbildung 33: Verhältnis red. GSH [nmol/mg]/GSSG[nmol/mg] aller Gruppen (Mittelwert)

3.7 Vorläuferaminosäuren von Glutathion

Neben GSH wird auch das extra- und intrazelluläre Angebot seiner eventuell limitierenden Aminosäurevorläufer bestimmt, wobei Cystin (Cysteindisulfid) die Transportform bei Zellaufnahme darstellt. Die Konzentrationen werden üblicherweise zum einen extrazellulär im Serum als nmol/ml und zum anderen intrazellulär in PBMCs als nmol/mg bestimmt. Bei der Untersuchung der intrazellulären Konzentration der PBMCs kann keine messbare Menge an Cystin detektiert werden.

Das Studienkollektiv der Aminosäurenuntersuchung stimmt mit dem der GSH-Enzymbestimmung überein (s. Kapitel 3.6, Tabellen 16,17), jedoch waren Einzel- statt Pool-Testungen und damit eine Stratifizierung nach Adipositas inklusive zweifaktorieller ANOVA möglich.

Aminosäurenanalyse im Gesamtkollektiv:

Tabelle 19: Extra- und intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen der in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden und Patienten

Aminosäure		Kontrollen	OSAS-Pat	p(ANOVA)		
				OSAS	Adipo.	Interakt.
N		25	28	53	53	53
Glutamat Serum	[nmol/ml]	51,7 ± 7,1	67,2 ± 5,1	0,043	0,007	0,020
Glutamat PBMC	[nmol/mg]	150,0 ± 9,4	162,6 ± 10,6	0,791	0,188	0,081
Glycin Serum	[nmol/ml]	173,0 ± 11,2	163,6 ± 7,5	0,564	0,508	0,297
Glycin PBMC	[nmol/mg]	22,8 ± 2,0	19,8 ± 1,1	0,088	0,986	0,025
Cystin Serum	[nmol/ml]	50,6 ± 3,0	56,7 ± 2,3	0,164	0,000	0,207

Dargestellte Daten als M ± SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen; Two-factorial ANOVA für den Einfluss von OSAS, Adipositas oder deren Interaktion

Für die extrazelluläre Glutamatkonzentration zeigt sich in der ANOVA für OSAS mit p=0,043, Adipositas mit p=0,007 und deren Interaktion mit p=0,020 signifikante Effekte. Dagegen ist das intrazelluläre Glutamat weder durch OSAS, noch Adipositas oder deren Interaktion signifikant beeinflusst.

Bei Glycin zeigt die ANOVA keine Signifikanzen im Serum, intrazellulär allerdings ergibt sich eine signifikante Interaktion von OSAS und Adipositas (p=0,025), wobei diese Faktoren alleine jeweils keinen signifikanten Einfluss zeigen.

Die ANOVA ergibt bei Cystin einen hochsignifikanten Einfluss durch Adipositas (p=0,000), jedoch nicht durch OSAS oder deren Interaktion.

Bei der extrazellulären Messung der GSH-Vorläuferaminosäuren sind in der Gesamtpopulation Glutamat bei OSAS-Patienten um 29,9% erhöht (n.s.), Glycin quasi unverändert und Cystin um 12,1% (n.s.) erhöht. Intrazellulär ergeben sich zudem keine

signifikanten Unterschiede für Glutamat und Glycin, bei fehlender Detektierbarkeit von Cystin (s. Tabelle 19).

Aminosäurenanalyse der nicht-adipösen und adipösen Strata:

Tabelle 20: Extra- und intrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen der nicht-adipösen und adipösen Strata der Probanden- und Patientengruppe

Aminosäure		Kontrollen nicht-adipös	Kontrollen adipös	OSAS-Pat nicht-adipös	OSAS-Pat adipös
N		12	13	8	20
Glutamat Serum	[nmol/ml]	29,0 ± 5,6	70,9 ± 9,4##	68,1 ± 13,4 **	66,8 ± 5,1
Glutamat PBMC	[nmol/mg]	153,3 ± 12,3	146,7 ± 14,8	135,3 ± 26,0	172,6 ± 10,5
Glycin Serum	[nmol/ml]	160,7 ± 13,3	184,3 ± 17,8	169,4 ± 19,7	161,2 ± 7,2
Glycin PBMC	[nmol/mg]	25,4 ± 3,0	20,1 ± 2,4	16,1 ± 3,2	21,2 ± 0,9#
Cystin Serum	[nmol/ml]	41,0 ± 3,8	59,3 ± 3,0##	51,9 ± 4,6	58,6 ± 2,6

Dargestellte Daten als M ± SEM; ungepaarter T-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 OSAS-Pat. vs. Kontrollen; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 adipöse vs. nicht-adipöse Strata

In Tabelle 20 sind die GSH- Vorläuferaminosäuren der nicht-adipösen und adipösen Strata aufgeführt. Bei nicht-adipösen OSAS-Patienten zeigt sich gegenüber ihren nicht-adipösen Kontrollen, dass die extrazelluläre Konzentration von Glutamat um 134,8% erhöht ist, während Glycin nicht-signifikant um <6% und Cystin um 26,6% ansteigen.

Adipöse OSAS-Patienten zeigen extrazellulär bei Glutamat und Cystin quasi keine Veränderung, wobei sich bei Glycin um 12,5% niedrigere, nicht signifikante Konzentration findet.

Bei nicht-adipösen OSAS-Patienten zeigt sich gegenüber ihren nicht-adipösen Kontrollen, dass die intrazelluläre Konzentration von Glutamat hingegen um 11,7% und Glycin um 36,6% erniedrigt ist (n.s.).

Bei adipösen Patienten sind intrazellulär bei Glutamat eine nicht signifikante Erhöhung um 17,7% bei Glycin quasi unveränderte Werte nachweisbar.

In Abbildung 35 ist die intrazellulären Konzentrationen von Glutamat und Glycin dargestellt, wohingegen Abbildung 34 die extrazellulären Konzentrationen von Glutamat, Glycin und Cystin zeigt.

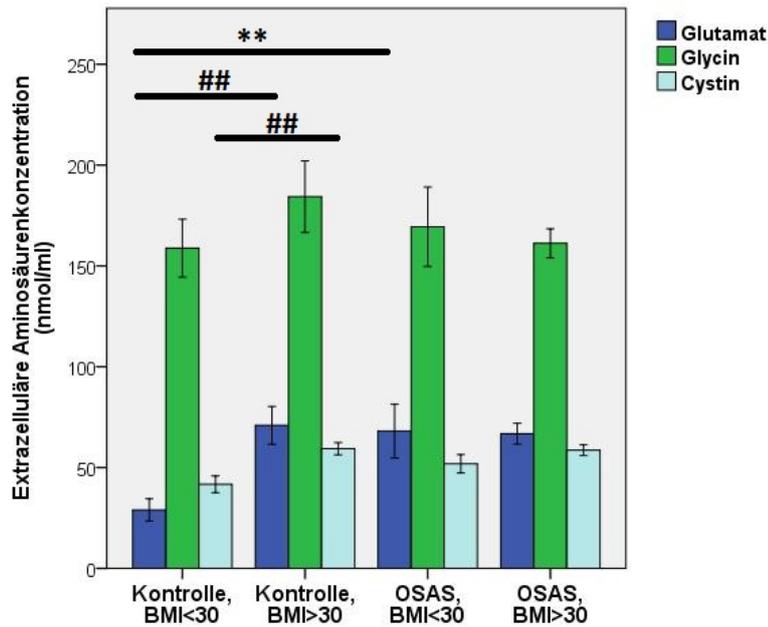


Abbildung 34: Extrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen von Glutamat, Glycin und Cystin ($M \pm SEM$)

Ungepaarter T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ OSAS-Pat. vs. Kontrollen;

$p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ adipöse vs. nicht-adipöse Strata

ANOVA **Glutamat**: OSAS: 0,043, BMI: 0,007, Interaktion: 0,020

ANOVA **Glycin**: OSAS: 0,564, BMI: 0,508, Interaktion: 0,297

ANOVA **Cystin**: OSAS: 0,164, BMI: 0,000, Interaktion: 0,207

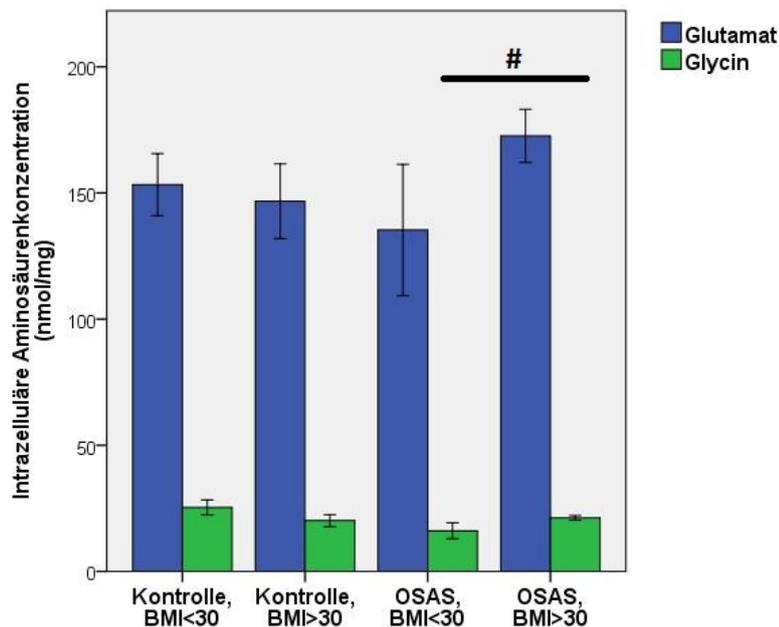


Abbildung 35: Intrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen von Glutamat und Glycin ($M \pm SEM$); Cystin ist intrazellulär nicht nachweisbar

Ungepaarter T-Test: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ adipöse vs. nicht-adipöse Strata

ANOVA **Glutamat**: OSAS: 0,791, BMI: 0,188, Interaktion: 0,081

ANOVA **Glycin**: OSAS: 0,088, BMI: 0,986, Interaktion: 0,025

Aminosäurenanalyse vor und nach Therapie:

Wie bereits bei der PCR-Untersuchung erwähnt, willigten nur ein Teil der Patienten, nämlich N=17 von 28 nach Therapie in eine zweite Untersuchung ein. Nur N=3 gehörten dabei zur nicht-adipösen Gruppe, wohingegen N=14 zu der adipösen Gruppe zählten. Die GSH- Vorläuferamino-säuren sind in Tabellen 21 und 22 aufgeführt. Die Veränderung der Aminosäurenkonzentration werden mittels gepaartem T-Test verglichen. Die Gruppengröße entspricht damit der der GSH-Bestimmung im Pool, nicht derjenigen, die für die PCR-Untersuchung zur Verfügung stand.

Tabelle 21: Aminosäuren aller in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten vor und nach Therapie

Aminosäure		OSAS-Patienten vor Therapie	Therapie nach Therapie
N		17	17
Glutamat Serum	[nmol/ml]	66,08 ± 4,60	51,98 ± 4,60§
Glutamat PBMC	[nmol/mg]	157,56 ± 13,13	143,36 ± 10,52
Glycin Serum	[nmol/ml]	165,15 ± 11,11	134,57 ± 6,82§§
Glycin PBMC	[nmol/mg]	19,15 ± 1,60	17,05 ± 1,16
Cystin Serum	[nmol/ml]	58,53 ± 2,65	26,31 ± 5,69§§§

Dargestellte Daten als M ± SEM; gepaarter T-Test: § p<0,05, §§ p<0,01, §§§ p<0,001 OSAS-Pat. vor Therapie vs. OSAS-Pat. nach Therapie

Wie Tabelle 21 entnommen werden kann, sind die Konzentrationen der drei Aminosäuren Glutamat, Glycin und Cystin im Serum nach Therapie signifikant verringert. Bei allen drei Aminosäuren kommt es extrazellulär zu einem Abfall der Konzentration (Glutamat: 21,4%, Glycin: 18,5%, Cystin: 55,1%), die sich bei Cystin sogar als hochsignifikant erweist. Intrazellulär kommt es auch zu einer Verringerung der Aminosäurenkonzentration nach Therapie; diese sind allerdings nicht signifikant.

In Tabelle 22 sind die Aminosäurenkonzentration der nicht-adipösen und adipösen Strata inklusive gepaartem T-Test aufgeführt. Signifikant verringerte Konzentrationen finden sich nur bei adipösen Patienten, und zwar beim extrazellulären Glutamat, Glycin und Cystin sowie dem intrazellulären Glycin.

In den Abbildungen 37 und 36 sind die Veränderungen der Konzentrationen der Aminosäuren dargestellt.

Tabelle 22: Aminosäuren der nicht-adipösen und adipösen Strata vor und nach Therapie (M ± SEM)

Aminosäure		OSAS-Pat vor Therapie nicht-adipös	OSAS-Pat vor Therapie adipös	OSAS-Pat nach Therapie nicht-adipös	OSAS-Pat nach Therapie adipös
N		3	14	3	14
Glutamat Serum	[nmol/ml]	71,65 ± 10,98	64,89 ± 5,20	49,42 ± 4,70	52,53 ± 5,55 §
Glutamat PBMC	[nmol/mg]	110,04 ± 44,24	168,53 ± 11,68	151,11 ± 25,71	141,70 ± 11,05
Glycin Serum	[nmol/ml]	137,98 ± 30,83	170,97 ± 11,77	109,21 ± 5,28	140,00 ± 7,56§
Glycin PBMC	[nmol/mg]	12,50 ± 4,59	20,69 ± 1,45	18,86 ± 2,71	16,67 ± 1,21§
Cystin Serum	[nmol/ml]	50,47 ± 6,32	60,26 ± 2,81	24,10 ± 12,08	26,79 ± 6,60§§§

Dargestellte Daten als M ± SEM; gepaarter T-Test: § p<0,05, §§ p<0,01, §§§ p<0,001 OSAS-Pat. vor Therapie vs. OSAS-Pat. nach Therapie

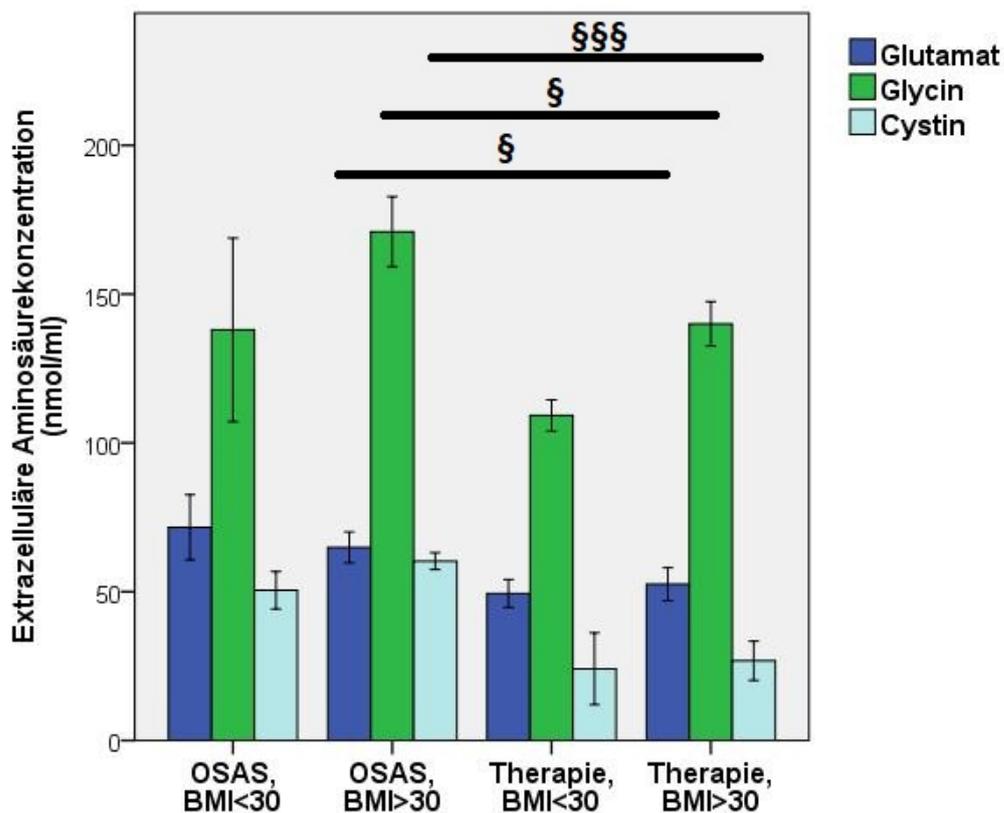


Abbildung 36: Extrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen von Glutamat, Glycin und Cystin (M ± SEM)

Gepaarter T-Test: § p<0,05, §§ p<0,01, §§§ p<0,001 OSAS-Pat. vor Therapie vs. OSAS-Pat. nach Therapie

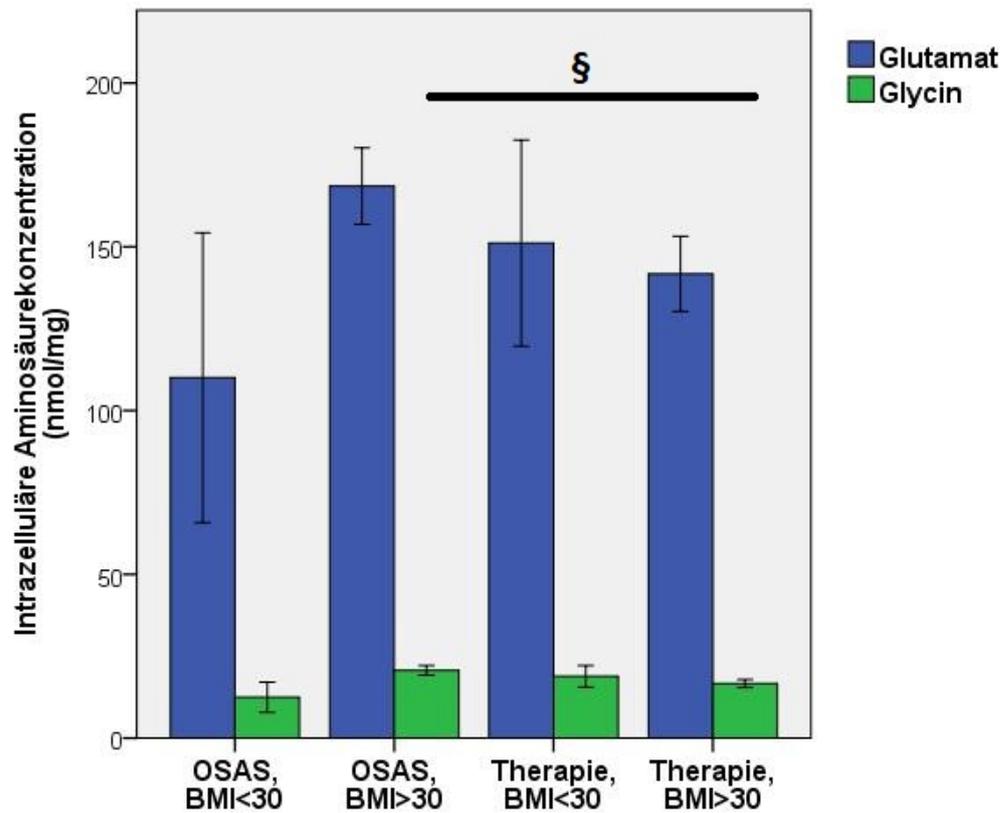


Abbildung 37: Intrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen von Glutamat und Glycin (M ± SEM)

Gepaarter T-Test: § p < 0,05, §§ p < 0,01, §§§ p < 0,001 OSAS-Pat. vor Therapie vs. OSAS-Pat. nach Therapie

4 Diskussion

4.1 Diskussion des Studiendesigns

4.1.1 Stärken des Studiendesigns

Wie bereits in Kapitel 1.2 besprochen zeigt OSAS eine sehr breite Überlappung mit Adipositas und den damit assoziierten Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Insulinresistenz und Arteriosklerose. Hierdurch ist es erschwert, den separaten Einfluss von OSAS auf seine Komorbiditäten beim Menschen zu zeigen.

Eine der Stärken dieser Studie sind die relativ strikten Ausschlusskriterien (s. Kapitel 2.1.5), die nach ausgiebiger Literaturrecherche angesetzt wurden. Sie bieten die Möglichkeit, OSAS in relativ frühem, unbehandeltem Stadium weitgehend frei von zahlreichen, üblichen Confoundern zu untersuchen, d.h. quasi als „alleiniges“ Krankheitsbild zu analysieren. Zudem können Auswirkungen von OSAS auf nicht-adipöse Patienten und Interaktionen der Erkrankungen OSAS und Adipositas gezeigt werden. Häufig wird OSAS als Komorbidität anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren untersucht (z.B.: Gottlieb et al. (2014)) oder der Einfluss weiterer Erkrankungen nur ungenügend berücksichtigt.

Bei gegebener geringer Fallzahl beruhen die Ergebnisse der Studie auf der zweifaktoriellen ANOVA (OSAS, Adipositas) für die eine Stratifizierung nach BMI durchgeführt wurde. Somit können Vergleiche sowohl zwischen OSAS-Patienten und Kontrollen als auch zwischen adipösem und nicht-adipösem Studienkollektiv gezogen werden. Das verwendete Studienkollektiv ermöglicht anhand der Einteilung des BMIs eine stratifizierte Analyse, im Gegensatz zu Adipositas-assoziierten Studien, in denen kein strikter OSAS-Ausschluss bei allen Teilnehmer erfolgt ist, wodurch Ergebnisse verfälscht sein können.

Auch die Durchführung von genauen und aufwändigen stationären polysomnographischen Untersuchungen mit Ausschluss von 'first-night'-Effekt und mit Erhebung von zahlreichen Schlafparametern an einem etablierten Schlafzentrum spricht für die Qualität der Studie. Besonders der große aber notwendige Aufwand zum Ausschluss von OSAS bei Kontrollprobanden (2 Nächte) ist zu betonen.

Darüber hinaus ist eine weitere Stärke der Studie, dass neben einer Querschnittsanalyse auch eine therapeutische Intervention mit cPAP im Längsschnittdesign untersucht wird, obwohl dies nicht kontrolliert geschehen konnte. Somit können nicht nur Aussagen über die Effekte von OSAS auf den Organismus getroffen werden, sondern auch

dazu, inwiefern diese unter Therapie reversibel sind. Zudem ist ein Vergleich von therapierten OSAS-Patienten und gesunden Kontrollprobanden möglich und nicht, wie in anderen cPAP- Studien (z.B. Karamanl et al. (2014)), nur ein Vergleich von untherapierten und therapierten OSAS-Patienten.

4.1.2 Schwächen des Studiendesigns

Die angesetzte Fallzahl von $N=60$ ($N=15$ pro Strata-Gruppe) konnte in der gesamten Studienpopulation knapp erreicht werden. Allerdings ist die limitierte Studienpopulation bezüglich der PCR-Analyse mit hierdurch fehleranfälliger zweifaktorieller ANOVA als wichtigste Einschränkung zu nennen. Sie erlaubt nur eine Einstufung der Studie als Hypothesen-generierend mit der Gefahr eines Fehlers 2. Art. Wünschenswert wäre somit eine höhere Studienpopulation gewesen, besonders bezüglich der Genexpressions-Untersuchungen an PBMC. Die Gruppengröße für die PCR- Untersuchung reduzierte sich durch verschiedene Faktoren:

Hierzu gehört zum einen die teils mangelnde RNA- Qualität in PBMC, die mittels der RIN- Zahl ermittelt wurde. Zu stark fragmentierte, bzw. veränderte RNA wurde von der Untersuchung ausgeschlossen (Ursachen s. Kapitel 4.2.3).

Um Fehler in der PCR-Untersuchungen weiter zu minimieren wurde darüber hinaus das Referenzgen GUSB bestimmt, das sich am stabilsten zeigt, allerdings dennoch einen signifikanten Unterschied in der Expression aufweist (vgl. Kap 4.3.3).

Zum anderen konnten trotz der Dauer von 3-4 Jahren Rekrutierung in dieser monozen-trischen Studie nur vergleichsweise wenige nicht-adipöse OSAS-Patienten gefunden und eingeschlossen werden, da ohnehin die umfangreichen Ausschlusskriterien erwartungsgemäß limitierend wirkten.

Ein laut der Literatur zu erwartendes Problem der Studie im Langsschnitt-Teil ist die im Vergleich zur Schlafdauer kurzen Verwendung der cPAP- Maske pro Nacht (geringe Compliance). Die geringe cPAP-Akzeptanz wird sicherlich verständlich durch eine mögliche Reduzierung des Schlafkomforts sowie eine Belastung für die bzw. den Partner/Partnerin. Allerdings liegt die Verwendungsdauer der Maske in der vorliegenden Studie mit $5,1 \pm 0,7$ h/Nacht noch deutlich über der berichteten Tragedauer im Literaturvergleich (McEvoy et al., 2016; Stuck et al., 2012).

Die Gruppengröße von $N=3$ der nicht-adipösen Patienten nach Therapie lässt kaum sinnvolle Aussagen zu, es gibt jedoch kaum veröffentlichte Studien, die den Effekt einer cPAP-Therapie auf nicht-adipöse OSAS-Patienten explizit untersuchen. Somit sind nur bedingt Aussagen zur Veränderung der Expression verschiedener Zytokine durch cPAP- Therapie möglich, aber Hinweise für zukünftige Studienplanungen gebend.

4.2 Diskussion der Methodik

4.2.1 Anthropometrische Daten, Blutanalyse und Diagnostik

Die Grenze des BMI wurde zwischen „adipös“ und „nicht-adipös“ auf 30 kg/m^2 festgelegt, da dieser Trennwert für Stratifikation für Adipositas den meisten Studien entspricht. Aufgrund zu geringer Fallzahlen kann in der vorliegenden Studie nicht zwischen „Präadipositas“ ($BMI \geq 25$ und $< 30 \text{ kg/m}^2$), „Adipositas“ ($BMI \geq 30$ und $< 40 \text{ kg/m}^2$) und „Adipositas per magna“ ($BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$) unterschieden werden. Für zukünftige Studien wäre es somit wünschenswert, eine größere Studienpopulation mit Einteilung in „nicht-adipös“, „präadipös“, „adipös“ und „sehr adipös“ zu betrachten. (Zur weiteren Unterteilung anhand des AHI s. Kapitel 4.2.2.)

Die Bestimmung der Blutparameter erfolgte standardisiert im Routinelabor des UKGM, wobei intraindividuelle Schwankungen durch morgendliche Blutentnahmen im nüchternen Zustand minimiert werden konnten.

Die teils Untersucher-abhängigen, diagnostischen Untersuchungen wie Ultraschall der Karotiden, Lungenfunktionsprüfung, Blutdruckmessungen u.v.m. wurden nach „state of the art“ standardisiert durchgeführt.

4.2.2 Polysomnographie und Cut-off des AHI

Die polysomnographischen Untersuchungen erfolgten im zertifizierten interdisziplinären Schlafmedizinischen Zentrum des UKGMs unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Koehler.

Alle Probanden und Patienten verbrachten leitliniengerecht mindestens zwei aufeinander folgende Nächte im schlafdiagnostischen Zentrum, um einen sog. „*First-Night effect*“ mit schlafarchitektonischen Veränderungen wie Verlängerung der REM-Latenz auszuschließen (Basner et al. (2000); Mayer et al. (2017)). Dabei wurde bei wenigen Kontrollprobanden anlässlich eines vermeintlichen Ausschluss von OSAS die Krankheit erst diagnostiziert, wodurch die Fallzahl der OSAS-Patienten in der Studie stieg, die der Kontrollprobanden jedoch abnahm. Nach der Diagnostik in der zweiten Nacht wurden den Patienten die Handhabung und Notwendigkeit der Verwendung des cPAP-Therapiegerätes erklärt und je nach gemessenen Werten und Schlafprofil der passende Druck der Luftzufuhr eingestellt und die Maske angepasst. Dies war so organisiert, dass es zu keiner Verzögerung des Therapiebeginns aufgrund studienbedingter Handlungen kam. Mittels eingebauter Aufzeichnung konnte die nächtliche Verwendungsdauer und somit die Compliance der Patienten überprüft werden.

In dieser Studie wurde OSAS ab einem AHI von $>15 \text{ N/h}$ diagnostiziert, was klinischen Empfehlungen entspricht, wobei hier die Grenzen der Therapie-Indikationen re-

lativ sind, da diese von Symptomatiken wie Tagesmüdigkeit abhängig sind. Um eventuelle Veränderungen auf z.B. Genexpressionen, etc. bei AHI-Werten von 5-15 N/h analysieren zu können, wäre es in zukünftigen Studien mit größerem Studienkollektiv wünschenswert, weitere Unterteilungen nach der Schwere der Erkrankung anhand des AHI („mild“, „moderat“, „schwerwiegend“) und der Zeitspanne unter 90% Sauerstoffsättigung pro Nacht vorzunehmen, da auch und gerade ein sehr hoher AHI mit nur kurzer kumulativer Hypoxiezeit einhergehen kann.

4.2.3 RNA-Qualität und Real time RT-PCR

Die PBMC-Isolation aus EDTA-Blut, die RNA-Extraktion und das Umschreiben in cDNA durch Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde mit standardisierten Methoden und äußerster Sorgfalt durchgeführt. Die deutlich verminderten Fallzahlen bei der PCR-Untersuchung sind, wie bereits beschrieben, auf eine teilweise verminderte Qualität der RNA zurückzuführen. Dies könnte u.a. auf untersucherabhängige Unterschiede in der Isolationszeit und verschiedenes Personal zurückzuführen sein. Da die Studie über 4 Jahre durchgeführt wurde, konnten unterschiedliche Lagerzeiten mit mehrmaligem Auftauen für Untersuchungen nicht vermieden werden. Trotz standardisierten Bedingungen sind die durchgeführten Schritte durch geringe Produktionsunterschiede (z.B. der Pipetten, der Primer) bereits fehleranfällig. Um die Einflüsse dieser Faktoren auf die RIN-Qualität zu berücksichtigen wurde in der Längsschnittuntersuchung in einer selbstkritischen Analyse eine ANOVA für Messwiederholung mit Delta RIN als Kovariate durchgeführt (s. Kapitel 3.5.3).

Bei der Real-time-RT-PCR (Standardmethode in der molekularen Medizin) wurde ein gängiges und lange erprobtes Gerät von Agilent Technologies verwendet (Mx3005P QPCR System). Zudem erfolgte bei jeder Probe eine Doppelbestimmung mit anschließender Mittelwertbildung, und es wurde für jeden Primer eine Standardkurve erstellt. Um Schwankungen, die durch Analysefehler entstehen, auszugleichen, wurden zahlreiche Referenzgene mit möglichst konstanter Expression in PBMC bestimmt. Nach Analyse dieser unterschiedlichen Referenzgene wurde schließlich GUSB als das unter den geforderten Bedingungen stabilste Gen ausgewählt, mit welchem die Proben normalisiert werden konnten. (s. Kapitel 4.3.3).

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Anthropometrie

Die bereits erwähnte ausfallsbedingte Limitierung des Studienkollektivs bezüglich der qRT-PCR Untersuchung ist als kritisch zu betrachten und qualifiziert die Studie als allenfalls Hypothesen-generierend (s. auch Kapitel 4.2.1):

Anders als im Gesamtkollektiv oder der nicht-adipösen Strata zeigt sich aufgrund der geringen Fallzahl bei der PCR-Untersuchung in den adipösen Strata, dass für den BMI ein geringfügiger aber signifikanter Unterschied ($p=0,016$) zwischen Patienten und Probanden existiert, wobei sich die beiden mittleren BMI-Werte deutlich im adipösen Bereich befinden und somit der Unterschied nur eine untergeordnete Rolle spielt (s. Tabellen 5 und 6 in Kapitel 3.1). Die BMI-Werte der nicht-adipösen Kontrollen und Patienten sind mit einem Wert von ca. 25 kg/m^2 an der Grenze zu „präadipös“. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den adipösen und nicht-adipösen Gruppen mit Differenzen von $7,2 \pm 0,4 \text{ kg/m}^2$ (adipös) und $4,5 \pm 0,2 \text{ kg/m}^2$ (nicht-adipös) deutlich. Die systolischen Blutdruckwerte zeigen vor allem bei adipösen OSAS-Patienten einen signifikant erhöhten Wert, wobei die ANOVA global grenzwertige Signifikanzen für den Faktor OSAS aufzeigt, ohne einen signifikanten BMI-Effekt oder deren Interaktion nachzuweisen (s. Tabellen 5 und 6 in Kapitel 3.1). Eine Erhöhung des Blutdrucks als Folge des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms ist mehrfach in der Literatur beschrieben (Tietjens et al., 2019; Dempsey et al., 2010; Nieto et al., 2000; Gottlieb et al., 2014; Tamisier et al., 2011). Aufgrund der Ergebnisse der ANOVA in dieser Studie kann somit vermutet werden, dass OSAS einen ähnlich ausgeprägten oder sogar stärkeren Einfluss auf die Erhöhung des systolischen Blutdrucks hat als der Faktor Adipositas.

Anders verhält es sich mit dem diastolischen Blutdruck der laut ANOVA einen signifikanten Einfluss durch Adipositas erfährt; ein Einfluss durch OSAS ist knapp nicht gegeben (s. Kapitel 3.1, Tabelle 5). Dabei sei daran erinnert, dass bezüglich arterieller Hypertonie Ausschlusskriterien existieren und Patienten mit Blutdruckwerten $\geq 160/105 \text{ mmHg}$ somit nicht eingeschlossen waren.

Bei der Untersuchung der IMT zeigt die ANOVA einen signifikanten Einfluss durch OSAS, der auch in der Literatur beschrieben wird (Asker et al. (2016)). Zudem zeigt sich ein Einfluss von OSAS auf die IMT, die einen klinischen Endpunkt und einen frühen Indikator für kardiovaskuläres Risiko darstellt.

Diese Daten zeigen, dass eine Stratifizierung nach BMI wichtig ist und Effekte von OSAS durch Adipositas, bzw. Effekte von Adipositas durch OSAS verschleiert oder suggeriert werden können.

4.3.2 Venöse Blutwertanalyse

Nach den Richtlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft wird die Diagnose „Manifeste Diabetes mellitus“ ab einem HbA1c-Wert von $>6,5\%$ gestellt und $<5,7\%$ ausgeschlossen (Kellerer and Matthaei, 2012).

Der HbA1c-Mittelwert der Probanden für die PCR-Analyse ist deutlich unter dem Grenzwert $5,7\%$, wohingegen OSAS-Patienten einen Mittelwert aufweisen, der knapp über diesem liegen. Der HbA1c wird durch OSAS, laut ANOVA, nur knapp nicht signifikant beeinflusst. OSAS hat zudem, unabhängig von Adipositas, signifikanten Einfluss auf die Blutglucose und den HOMA-Index (s. Tabellen 9 und 10 in Kapitel 3.3). Die Blutglucose weist in der nicht-adipösen Gruppe mittels T-Test signifikante Unterschiede zwischen OSAS-Patienten und Kontrollen auf ($p=0,007$) (s. Tabelle 10).

Wie in Kapitel 1.2.6 beschrieben, ist OSAS häufig mit Insulinresistenz und entsprechend erhöhter Blutglucose assoziiert (Ip et al., 2002; Borel et al., 2013). Dies kann durch die Daten dieser Studie bestätigt werden. Trotz Ausschluss eines manifesten Diabetes, ist im kleineren HbA1c-Bereich eine Korrelation mit dem AHI nachweisbar (s. Kapitel 3.4, Tabelle 11). Allerdings kann bei gegebener limitierter Compliance kein signifikanter cPAP-Therapie Effekt nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.5.3, Tabelle 14).

Niedrige HDL- und hohe LDL- sowie Gesamt-Cholesterin-Spiegel gehen mit einem deutlich erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen durch proatherogene Veränderung des Endothels einher und sind häufig bei adipösen Patienten zu finden (Schulte et al. (1999); Graefe et al. (2011), S. 417). Die ANOVA zeigt, dass OSAS einen von Adipositas unabhängigen Effekt auf das Gesamt-Cholesterin, nicht jedoch LDL hat. HDL, LDL und das Gesamt-Cholesterin zeigen allerdings in dieser Studie zwischen Patienten und Probanden keine signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 9, 10).

Bei nicht-adipösen OSAS-Patienten finden sich signifikant erhöhte Triglyceridwerte, die ANOVA bestätigt einen signifikanten Einfluss durch OSAS, sowie durch die Interaktion von OSAS und Adipositas. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass OSAS zu Episoden mit nächtlicher Lipolyse führt (Alzoughaibi and Bahammam, 2012; Chopra et al., 2017), worauf die erhöhten Werte zurückzuführen sein könnten.

4.3.3 Referenzgen

Damit ein Gen als geeigneter Housekeeper (Referenzgen) verwendet werden kann, müssen zwei Kriterien erfüllt sein: Zum einen sollte es durch die primär untersuchten Bedingungen (z.B. Hypopnoe, Hypoxie) möglichst wenig beeinflusst werden und zum anderen bereits bei weniger Zyklen der PCR-Untersuchung als die Zielgene detektierbar sein. Eine Validierung und genaue Analyse verschiedener Gene ist bei jedem Experiment notwendig, da ansonsten durch eine unüberprüfte „Normalisierung“ Ergebnisse stark verändert bzw. verfälscht sein können und somit Veränderungen der Genexpression übersehen oder suggeriert werden können. In vielen Studien wird einerseits nicht über die Qualität der Referenzgene und andererseits nicht über eine durchgeführte Validierung des richtigen Gens berichtet (Takahashi et al., 2005; Liang et al., 2013).

Validierungsstudien zum passenden Housekeeper bei PBMC unter den in der vorliegenden Studie untersuchten Bedingungen (CIH, Hyp-Reox-Stress) sind bisher nicht genügend durchgeführt worden. Bei der Untersuchung von Leukozyten von Asthmatikern vor und nach der Therapie zeigt sich, dass der Mittelwert aus β -Actin, B₂M und „Glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase“ (GAPDH) am besten zur Normalisierung geeignet ist. Es wird jedoch gezeigt, dass GAPDH Hypoxie-sensitiv ist, indem es zu einer Hochregulation kommt (Zhong and Simons, 1999). Somit ist GAPDH für die vorliegende Studie ungeeignet. Unter Hypoxie und Hyperglykämie verändern sich die Referenzgene RPLP0 und TFRC in Endothelzellen der Umbilikalvene am wenigsten (Bakhashab et al., 2014). Validierungsstudien, die jedoch keine hypoxischen Bedingungen untersuchen, zeigen zudem, dass eine adäquate Normalisierung oft nur durch Mittelwertbildung mehrerer Referenzgene erfolgen kann (Vandesompele et al., 2002).

In der vorliegenden Studie wurde schließlich „GUSB“ als Housekeeper verwendet, da er die höchste Stabilität für die geforderten Bedingungen, also OSAS, d.h. CIH aufwies (s. Kapitel 2.2.6 und 3.5.1) und bereits in hypoxierelevanten Studien, die Genexpressionen in PBMCs untersuchten, verwendet wurde (Zampieri et al., 2010). Diese Entscheidung wurde zudem durch die NormFinder Software gestützt. Die ANOVA gibt an, dass ein knapp signifikanter Einfluss durch OSAS gegeben ist, nicht jedoch durch Adipositas oder deren Interaktion. Dieser Einfluss ist bei den restlich analysierten Referenzgenen hochsignifikant ausgeprägt. GUSB ist im Gesamtkollektiv bei OSAS-Patienten ca. 1,5-fach signifikant erhöht, was dem geringsten Unterschied aller möglichen Referenzgene entspricht (bis 15-fach). Zudem würden hierdurch Erhöhungen von inflammatorischen Genexpressionen eher verschleiert als suggeriert werden. In den nicht-adipösen Strata zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Probanden, wohl aber in den adipösen Strata.

Intraindividuelle, signifikante Veränderungen der GUSB-Expression unter cPAP-Therapie wurden durch gepaarten T-Test gezeigt (s. Abbildung 16). Durch die geringen Fallzahlen besteht allerdings die Gefahr eines Fehlers 2. Art. Eine ANOVA für Messwiederholungen für den Faktor Zeit, also cPAP-Therapiedauer mit der Kovariate Delta RIN ergibt dabei keinen signifikanten Einfluss der Therapie noch des RIN-Wertes auf die GUSB-Expression. Somit ist GUSB als Referenzgen in dieser Studie am besten geeignet.

Die sorgfältige Auswahl eines geeigneten Referenzgens hat eine sehr hohe Priorität, ist für das Auswerten von PCR-Ergebnissen unerlässlich und wurde in der vorliegenden Studie bezüglich OSAS bzw. Adipositas optimiert. Speziell für den Querschnittsteil bleibt dieses Referenzgen jedoch kritikwürdig. Zukünftige Studien sollten sorgfältig nach passenden Referenzgenen suchen, um unverfälschte Aussagen treffen zu können.

4.3.4 Diskussion der PCR-Ergebnisse der Querschnittsuntersuchung

Proinflammatorische Genexpressionen

Die Zytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β und SOCS-3 sowie das Enzym COX-2 unterliegen einer gegenseitigen Beeinflussung und stellen häufige, proatherogene Entzündungsmediatoren dar. Neben der Induktion von Akut-Phase-Proteinen sind sie auch maßgeblich an der Entstehung von Sepsis beteiligt. So steigert IL-1 β zum Beispiel die Aktivität der COX-2 (Liu et al., 2003), die aus Arachidonsäure der Zellmembran verschiedene Prostaglandine bildet, die wiederum für Fieberentstehung, Vasodilatation und Steigerung der Schmerzempfindens verantwortlich sind (Rassow et al. (2012), S.628). Chronische Entzündungen, die durch Rauchen und Hyperlipidämie verursacht werden, gehen mit einer erhöhten Aktivität der COX-2 einher (Bonaterra et al., 2005). Zudem werden diesem Enzym unterstützende Funktionen im Karzinomwachstum zugeschrieben (Hugo et al., 2015). Es werden durch die Cyclooxygenase neben proinflammatorischen auch antiatherogene Zytokine wie Prostaglandin I₂ gebildet. Die Rolle von COX-2 bei OSAS ist bisher nicht untersucht.

Bezüglich IL-6 hingegen beschreiben Studien, die schlafbezogene Atmungsstörungen untersuchen, eine Erhöhung der Plasmakonzentration von IL-6 bei OSAS-Patienten (Maeder et al., 2015; Nizam et al., 2014). Eine Metaanalyse, die 47 Studien bezüglich der TNF- α Plasmakonzentration bei OSAS-Patienten zusammenfasst, kommt zu dem Ergebnis, dass dieses Zytokin bei OSAS-Patienten mit erhöhten Plasmakonzentrationen vorliegt und zudem von der Schwere der Erkrankung abhängig ist (Li and Zheng, 2017). Dabei erweist sich die OSAS-bedingte Konzentrationserhöhung als BMI-unabhängig (Ryan et al., 2006).

TNF- α steigert darüberhinaus die Expression von SOCS-3, das vermutlich an der Entstehung und Entwicklung von Atherosklerose beteiligt ist und in die Insulinresistenz peripherer Zellen involviert ist. Studien, die die Genexpression in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie untersuchen, berichten über eine verstärkte Expression von SOCS-3 bereits nach 2h unter konstanten, hypoxischen Bedingungen (Bai et al., 2006). In Gehirntumoren hingegen wird durch konstante Hypoxie eine Reduktion der SOCS-3 Expression gezeigt (Yokogami et al., 2013). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, inwiefern sich die Genexpression von SOCS-3 in PBMC bei OSAS-Patienten, die CIH ausgesetzt sind, je nach BMI-Strata verändert.

TNF- α

In dieser Studie konnten keine signifikanten OSAS- oder Adipositas- bedingten Unterschiede in der Plasmakonzentration von TNF- α gezeigt werden (s. Kapitel 3.5.2, Abbildungen 27, 28). Dies trifft auch auf die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchung zu: Laut ANOVA ergibt sich kein Einfluss durch OSAS, Adipositas oder deren Interaktion. Die Genexpressionen sind im Gesamtkollektiv sowie in den Strata nicht signifikant verändert.

Allerdings liegen Korrelationen mit einem schlafdiagnostischen Parameter vor: Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen den Werten der TNF- α Expression und der Dauer, die Patienten einer Sauerstoffsättigung von unter 90% ausgesetzt sind ($R=0,456$, $p=0,015$) (s. Abbildung 29). Längere kumulative Hypoxieexposition scheint somit zu einer erhöhten Genexpression von TNF- α in PBMCs zu führen. Allerdings besteht keine signifikante Korrelation mit dem AHI ($R=0,256$, $p=0,188$).

Zukünftige Studien sollten somit berücksichtigen, dass Intensität (Zeit und Grad) der kumulativen Hypoxämie wesentlicher für die Genexpression des proatherogene TNF- α sein könnte, als die Anzahl atembezogener Episoden pro Zeit, denn kurze häufige Apnoephasen können weniger Hypoxämie bedingen, als lange und seltenere Phasen.

IL-1 β

Laut ANOVA kommt es durch OSAS alleine, sowie in der Interaktion der Faktoren OSAS und Adipositas zu einer signifikant erhöhten Genexpression von IL-1 β , nicht jedoch durch Adipositas alleine. OSAS, sowie das gleichzeitige Vorliegen von OSAS und Adipositas haben somit eine deutlich höhere atherogenetische Potenz und gehen vermutlich mit einem höheren kardiovaskulären Risiko einher, als das alleinige Vorliegen Adipositas. Die vorliegende Studie zeigt eine signifikante Hochregulation von IL-1 β um ca. den Faktor 4 im Gesamtkollektiv (s. Kapitel 3.5.2, Tabellen 12, 13), mit nachweisbarer Signifikanz in den adipösen Strata.

Makrophagen, die mittels Lipopolysaccharide in Zellkulturen unter konstanter Hypoxie stimuliert werden, weisen eine signifikant höhere Expression von 'pro-IL-1 β protein' im Vergleich zu Makrophagen unter Normoxie auf (Folco et al., 2014). Diese Studie zeigt zwar keine erhöhte mRNA-Expression, berichtet allerdings auch nicht über eine kritische Auswahl von Hypoxie-stabilen Housekeeper-Genen (s. Kapitel 4.3.3). Ähnliche Effekte zeigen sich bei Makrophagen von Mäusen unter konstanter Hypoxie (Tannahill et al., 2013). Ein Punkt, der diese zwei Studien von der vorliegenden unterscheidet, ist neben der untersuchten Spezies, die Art der Hypoxie: während die Zellen der eben genannten Untersuchungen chronischer Hypoxie ausgesetzt sind, leiden die in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten unter CIH mit Reoxygenierungsstress. Inwiefern dies die Genexpression von proatherogenen Zytokinen in PBMC beeinflusst, bedarf insbesondere beim Menschen weitere Studien.

Die Intima-Media-Dicke stellt bis heute, trotz aufkommender Kritik, einen gängigen Parameter zur Beurteilung des vaskulären Status von Patienten dar und wird als Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Events verwendet. Eine bereits beschriebene positive Korrelation zwischen AHI und IMT kann mit dieser Studie bestätigt ($R=0.50$, $p=0,002$) werden (s. Kapitel 3.4, Abbildung 12) (Ciccone et al., 2012). Allerdings handelt es sich in der vorliegende Studie um explorative Analysen ohne Bonferroni-Korrektur. Zugleich findet sich auf Ebene der Genexpression eine positive Korrelation zwischen IL-1 β und den AHI-Werten ($R=0,48$, $p<0,05$) (s. Kapitel 3.5.2, Abbildung 19). Dies zeigt, dass eine Erhöhung der IL-1 β -Genexpression, wie auch die IMT (s. Abbildung 12) maßgeblich von der Schwere des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms (definiert nach AHI) beeinflusst wird. Eine positive signifikante Korrelation von IL-1 β und der IMT wird knapp verpasst ($R=0,333$, $p=0,084$), wobei dies auf die geringen Fallzahlen zurückzuführen sein könnte. Demnach könnte IL-1 β ein mögliches inflammatorisches Bindeglied zwischen OSAS-Schweregrad und vaskulärem Risiko, gemessen an der IMT, darstellen.

Zusätzlich besteht eine signifikante positive Korrelation der HbA1c-Werte und der IL-1 β -Expression ($R=0,43$, $p<0,05$) (s. Abbildung 20, Kapitel 3.5.2). Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist bereits eine erhöhte Konzentration von IL-1 β , TNF- α , IL-6 und weiteren Entzündungsmarkern im Serum nachgewiesen worden (Ruscitti et al., 2015; Volpe et al., 2014). Manifester Diabetes mellitus Typ 2 war ein Ausschlusskriterium für diese Studie. Dennoch könnte OSAS unabhängig von Adipositas nur knapp nicht signifikant die HbA1c-Werte beeinflussen (s. Tabelle 10). Somit könnte bereits eine geringe Hyperglykämie Einfluss auf die Genexpression von PBMC haben, wobei dies in weiteren Studien überprüft werden sollte.

COX-2

Mittels ANOVA wird gezeigt, dass OSAS einen hochsignifikanten Effekt auf die Genexpression von COX-2 hat, während Adipositas weder direkt noch durch Interaktion einen signifikanten Einfluss ausübt.

Entsprechend ist im Gesamtkollektiv zwischen OSAS-Patienten und Kontrollprobanden ein hochsignifikanter Unterschied der COX-2 Expression zu sehen, der sich in den adipösen Strata wiederfindet (s. Abbildungen 21, 22). Zwischen COX-2 Expressionen und den BMI-Werten besteht keine signifikante Korrelation, wohingegen die dargestellte positive, signifikante Korrelation von COX-2 und AHI (s. Kapitel 3.5.2, Abbildung 23) die oben getroffene Aussage unterstützt, dass OSAS einen von Adipositas unabhängigen Effekt auf die COX-2 Expression haben könnte. Somit könnte die Schwere der Erkrankung mit der Expression dieses Enzyms korrelieren.

Obwohl als Hypothesen-generierendes Ergebnis zu werten, ist ein solcher Zusammenhang neu und in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Wie oben bereits erwähnt, steht die Aktivität der COX-2 unter dem Einfluss zahlreicher Mediatoren, darunter auch IL-1 β . Dieser Zusammenhang konnte in dieser Studie bestärkt werden, da eine signifikante positive Korrelation der Genexpressionen von IL-1 β und COX-2 zu sehen ist (s. Kapitel 3.5.2, Abbildung 24).

Die COX-2 könnte in diesem Zusammenhang zu einem weiteren potentiellen Therapietarget bei OSAS werden, denn durch unselektive Hemmung der COX-1 und 2 kann der Blutdruck bei Patienten mit chronisch intermittierender Hypoxie gesenkt und somit kardiovaskuläre Morbidität reduziert werden (Beaudin et al., 2014). Vor allem Patienten mit weiteren kardiovaskulären Erkrankungen bzw. Risikofaktoren könnten, unter strenger Berücksichtigung der zahlreichen Nebenwirkungen und Kontraindikationen, von einer selektiven COX-hemmenden Therapie profitieren und individuelle Spätfolgen verringert werden. Somit liefert diese Studie, bei allen Limitierungen, mögliche neue Forschungsansätze für zukünftige Studien.

IL-6

Die ANOVA zeigt einen signifikanten Einfluss von OSAS, nicht jedoch von Adipositas auf die PBMC-Expression von IL-6, sodass erneut von einem alleinigen, signifikanten Effekt durch OSAS ausgegangen werden kann. Entsprechend zeigt sich beim Vergleich von allen OSAS-Patienten mit deren Kontrollen eine signifikante Erhöhung (Kapitel 3.5.2, Abbildung 25), die sich nur in den adipösen Strata wiederfindet (s. Abbildungen 25, 26). Demgegenüber zeigen die Serumkonzentrationen von IL-6 keinen Unterschied zwischen OSAS-Patienten und Kontrollprobanden (Kapitel 3.3). Dies könnte u.a. auf der sehr kurzen Halbwertszeit von wenigen Sekunden beruhen, wobei eine Metaanalyse von erhöhten Serum- und Plasmakonzentrationen berichtet (Imani et al., 2020).

Die Genexpression von IL-6, das einen wichtigen Mediator bei Inflammationen und eine Schlüsselrolle in dem Übergang von angeborener zur erworbener Immunantwort darstellt, wird somit durch OSAS signifikant beeinflusst (Jones, 2005), was wiederum auf einen inflammatorischen Effekt durch CIH hinweisen könnte.

Weitere Studien sollten somit bei Hypoxie und weiteren chronischen Erkrankungen die Genexpression von IL-6 z.B. in Makrophagen oder auch in Endothelzellen untersuchen und Aussagen allein anhand der Serumkonzentrationen nur mit großer Vorsicht treffen.

SOCS-3

Die ANOVA zeigt einen signifikanten Einfluss durch OSAS auf die Expression von SOCS-3, wohingegen Adipositas allein oder durch Interaktion diese Genexpressionen nicht beeinflusst. Erneut ist eine signifikante Veränderung im Gesamtkollektiv sowie in den adipösen Strata gegeben (s. Tabelle 12). Die zwei Kontrollgruppen weisen deutliche, wenn auch nicht signifikante Unterschiede auf (s. Tabellen 13).

In der Literatur wird beschrieben, dass TNF- α eine Stabilisierung der mRNA von SOCS-3 bewirkt, wohingegen IL-6 hier als Antagonist tätig ist (Ehltling et al., 2007). In der vorliegenden Studie korrelieren die Genexpressionen, sowie die Serumkonzentrationen von TNF- α und SOCS-3 signifikant. Somit kann eine Korrelation bereits auf der Ebene der Genexpression gezeigt und die in Studien beschriebene Assoziation, wenn auch nur explorativ, bestätigt werden (Ehltling et al., 2007).

In Studien findet sich darüber hinaus eine verminderte SOCS-3- Genexpression in Lymphozyten bei diabetischen Patienten (Gokulakrishnan et al., 2009), wohingegen Tierstudien belegen, dass SOCS-3 zu einer peripheren Insulinresistenz im Mausmodell führt (Jorgensen et al., 2013). Bisher in Studien noch kaum beschrieben ist eine Korrelation zwischen dem HbA1c und der Expression von SOCS-3 in PBMC, die in der vorliegenden Studie signifikant ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass zum einen TNF- α maßgeblich an der Regulation der SOCS-3 Genexpression beteiligt ist, und zum anderen die SOCS-3- Expression, die unter dem Einfluss von OSAS steht, bei diesen Patienten an der Insulinresistenzentstehung mitwirken könnte.

Angiogene Zytokine

VEGF-A

VEGF-A ist als angiogenes Zytokin maßgeblich an physiologischen sowie pathologischen Neovaskularisierungen bei Wundheilungen, Tumorwachstum sowie Plaqueentstehung beteiligt (s. Kapitel 1.2.3).

Die ANOVA zeigt, dass kein signifikanter Einfluss durch OSAS oder Adipositas alleine besteht, eine Interaktion dieser beiden allerdings einen signifikanten Einfluss hat (s. Abbildung 31). Dies bedeutet, dass OSAS und Adipositas auch als jeweilige Komorbidität eine deutliche Veränderung der Expression von VEGF-A bewirken und somit zu angiogenen Veränderungen führen. Im Gesamtkollektiv, sowie in den nicht-adipösen Strata zeigen sich keine signifikanten Änderungen der Genexpression, wohingegen in den adipösen Strata ein hochsignifikanter Unterschied vorliegt (s. Abbildung 30). Ohne Stratifizierung wäre der Effekt von OSAS und Adipositas nicht klar erkennbar gewesen. Es findet sich zudem eine signifikant höhere VEGF-A Genexpression bei nicht-adipösen im Vergleich zu adipösen Kontrollprobanden (s. Kapitel 3.5.2, Abbildung 31), die hier nicht weiter diskutiert wird.

In einigen OSAS- Studien wird über eine Erhöhung der Serumkonzentrationen von VEGF-A berichtet (Maeder et al., 2015; Teramoto et al., 2003). Takahashi et al. (2005) zeigen sowohl eine erhöhte Genexpressionen in PBMC als auch erhöhte VEGF-A- Serumlevel bei OSAS-Patienten. Dies kann in der vorliegenden Studie nur in den adipösen Strata bestätigt werden. Ein durch VEGF-A vermitteltes kardiovaskuläres Risiko scheint, wenn auch nur explorativ untersucht, vor allem adipöse OSAS-Patienten zu betreffen. VEGF-A ist an der Plaquentstehung beteiligt, indem durch apoptotische mononukleäre Zellen in der Gefäßwand ein hypoxischer Bereich entsteht, in dem die Ausschüttung von VEGF-A eine Neubildung von Mikrogefäßen mit inflammatorischer Infiltration fördern kann (Harrison et al. (2012), S. 2127). Signifikante Korrelationen mit dem BMI oder mit polysomnographischen Ergebnissen bestehen allerdings nicht. Studien mit einem größeren Studienkollektiv sollten die Interaktion von OSAS und Adipositas auf die Genexpression von VEGF-A näher analysieren.

GDF-15

In der vorliegenden Studie können im Gesamtkollektiv sowie in den Strata keine signifikanten OSAS- oder Adipositas- bedingten Veränderungen der GDF-15 Expressionen anhand T-Test oder ANOVA festgestellt werden. Bei GDF-15 handelt es sich, wie bereits in Kapitel 1.2.4 beschrieben, um ein vermutlich antiatherogenes Zytokin, das laut Studien als Marker zum Screening von kardiovaskulärem Risiko dienen könnte (Gopal et al., 2014). Die genaue Funktion und die klinische Anwendung von GDF-15 ist bis-

her unklar (Adela and Banerjee, 2015). Es wird beschrieben, dass die Freisetzung dieses Zytokins durch vaskuläre Läsionen induziert wird und es pathophysiologisch via IL-6 an z.B. Entzündung, Ischämie und Atherosklerose, beteiligt ist (Bonaterra et al., 2012). Eine Studie, die die Serumkonzentrationen von GDF-15 bei OSAS-Patienten, die nach BMI kontrolliert wurden, untersucht, berichtet über signifikante Korrelationen mit dem Alter der Patienten, wobei weitere signifikante Assoziationen nicht bestehen (Sari et al., 2015).

Signifikante Korrelationen der GDF-15 Genexpression mit dem BMI, mit dem AHI und der Zeitspanne mit einer Sauerstoffsättigung unter 90% bestehen in der vorliegenden Studie nicht. Allerdings zeigt sich eine signifikante Korrelation der Expression von GDF-15 und IL-6. Dies unterstützt die im Mausmodell getroffene Aussage, dass GDF-15 über IL-6 Freisetzung an der Entwicklung von Plaques beteiligt ist (Bonaterra et al., 2012). Durch die vorliegende Studie kann durch OSAS keine Veränderung der Genexpression von GDF-15 gezeigt werden. Somit scheint GDF-15 kein geeigneter kardiovaskulärer Marker für diese Krankheitsentität zu sein. Da jedoch OSAS bei kardiovaskulär Vorerkrankten eine alarmierend erhöhte Prävalenz hat, sollte GDF-15 weiter bei OSAS im Auge behalten werden, um seine Rolle bei kardiovaskulären Endpunkten besser zu verstehen.

3. Faktoren des Lipidmetabolismus

CD-36

CD-36 ist ein Oberflächen- Klasse B Scavenger- Rezeptor, der neben angiogenen und inflammatorischen Vorgängen maßgeblich am Fettsäurestoffwechsel mit Aufnahme von verestertem Cholesterin in z.B. Makrophagen beteiligt ist. Durch die Aufnahme von oxidativ verändertem LDL ist es ein wichtiger Regulator der Schaumzell- und somit der Plaquentstehung (Park, 2014).

In dieser Studie konnte zunächst kein signifikanter Einfluss durch OSAS, Adipositas oder deren Interaktion auf die Genexpression von CD-36 gefunden werden. In den Strata finden sich jedoch zwischen adipösen Patienten und Probanden eine signifikante Differenz, die in den nicht-adipösen Strata nicht gegeben ist (s. Tabellen 12, 13). Paradoxerweise besteht zwischen den zwei Kontrollgruppen ein signifikanter Unterschied mit geringerer Expression bei adipösen Kontrollen, während adipöse OSAS-Patienten gegenüber nicht-adipösen erhöhte Werte aufweisen (n.s.). Diese Ergebnisse sind in diesem Rahmen schwer einzuordnen.

Allerdings wird in der Literatur berichtet, dass konstante Hypoxie zu einer vermehrten Lipidaufnahme (Cholesterin, oxLDL) in Makrophagen führt, wobei dies allerdings nicht durch eine Hochregulation von CD-36 mRNA, sondern vielmehr über eine ver-

mehrte Expression des „*lectin-like oxLDL Rezeptor*“ (Lox-1)- Gens zu erklären ist (Crucet et al., 2013). Dieses Gen konnte in der vorliegenden Studie aufgrund begrenzten Probenmaterials nicht untersucht werden.

Der hier nachgewiesene signifikante Unterschied zwischen adipösen OSAS-Patienten und Probanden wäre im nicht-stratifizierten Gesamtkollektiv nicht ersichtlich gewesen. Dies zeigt, dass die Wirkung des CD-36 vermutlich vor allem bei adipösen OSAS-Patienten zum Tragen kommt und sein atherogenes Potential entfaltet, wobei hier möglicherweise ein Fehler 2. Art vorliegen könnte und die Ergebnisse erneut in einem größeren Studienkollektiv überprüft werden sollten.

ABCG1

Der antiatherogene Transporter ABCG1 ist an der ATP- abhängigen Ausschleusung von Cholesterin aus Makrophagen und der Aufnahme in HDL beteiligt (Terasaka et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit zeigen sich keine signifikanten Einflüsse durch OSAS, Adipositas oder deren Interaktion (ANOVA). Laut T-Test finden sich signifikante Differenzen der Genexpression zwischen Patienten und Probanden nur in den adipösen Strata (s. Tabelle 12, 13). Die adipöse zeigt gegenüber der nicht-adipösen Kontrollgruppe eine nicht signifikant geringere Expression des antiatherogenen Transporters ABCG1, was sicherlich mit größeren Fallzahlen zu überprüfen ist.

In der Literatur existiert der Hinweis auf eine Glucose-abhängige Erhöhung des ABCG1-mRNA-Gehalts in Leukozyten von Diabetes mellitus Patienten, wobei hier nicht nach BMI stratifiziert wurde (Spartano et al., 2014). In der vorliegenden Studie findet sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der ABCG1- Expression und dem HbA1c ($R=0,300$; $p=0,90$). Da der HbA1c vermutlich durch OSAS erhöht sein kann, sollte dieser Frage unter Kontrolle für Adipositas in einem größeren Studienkollektiv weiter nachgegangen werden.

4. Antioxidatives Enzym und Enzyme des Glutathionmetabolismus

SOD-2

Das im Mitochondrium lokalisierte Enzym MnSOD katalysiert die Umwandlung von Superoxid- Anionen zu Wasserstoffperoxid (s. Kapitel 1.1.3) und ist somit bei der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffverbindungen beteiligt.

Die vorliegende Studie detektiert keinen signifikanten Einfluss durch OSAS, Adipositas oder deren Interaktion (ANOVA, T-Test) (s. Tabellen 12, 13).

Dieser, bei geringer Fallzahl negative Befund, ist in die Datenlage der Literatur nicht sicher einzuordnen. Eine Studie berichtet über eine verringerte Konzentration von SOD im Plasma bei präadipösen und adipösen OSAS- Patienten im Vergleich zu Kon-

trollprobanden (Wysocka et al., 2008). Die Quelle der SOD bleibt unklar; nach den vorliegend gemessenen Genexpressionen in PBMC, ist diese Zellpopulation vorläufig eher nicht als Quelle anzusehen.

Die Aktivität der MnSOD wird durch die „*dual specificity phosphatase 1*“ (DUSP1) erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass nächtliche, chronisch intermittierende Hypoxie bei OSAS Patienten zu einer erhöhten Expression von DUSP1 führt, das wiederum die Aktivität der MnSOD steigert, womit ROS besser neutralisiert werden können (Hoffmann et al., 2013). DUSP1 konnte allerdings aufgrund begrenzten Probenmaterials in der vorliegenden Studie nicht untersucht werden. Zukünftige, größer angelegte Studien sollten zusätzlich zu SOD-2 auch DUSP1 mit Stratifizierung nach BMI untersuchen, um Effekte von OSAS und Adipositas auf diese Genexpressionen differenzieren zu können.

GSS und GSR

Die vorliegende Arbeit zeigt bezüglich der Expression der GSR einen signifikanten Einfluss durch Adipositas, allerdings nicht durch OSAS oder deren Interaktion. Bei GSS sind keine Signifikanzen laut ANOVA nachweisbar.

Diese Daten sind der aktuellen Literatur kaum einzuordnen und müssen mit höheren Fallzahlen überprüft werden. Eine Studie, die den oxidativen Status in Patienten mit verschiedenen kardiovaskulären Risiken untersucht, berichtet bei hypertensiven Patienten ebenso über eine Reduktion der antioxidativen Genexpression (u.a. GSS, GSR) in mononukleären Zellen, sowie über eine hohe Aktivität pro-oxidativer Enzyme (Komponenten der NADPH- Oxidase) (Mansego et al., 2011).

Ergänzend zu diesen PCR-Analysen wurde darüber hinaus explorativ in gepoolten Gruppen der GSH/GSSG- Status in PBMC mittels Enzymtest und die Vorläuferamino-säuren des Glutathions mittels HPLC untersucht. Diese werden in Kapitel 4.3.6 und 4.3.7 diskutiert.

Zusammenfassung zur Querschnittsuntersuchung der PBMC-Genexpression

Die unerwartet geringen Fallzahlen der einzelnen Gruppen stellen die größte Limitation bezüglich der Interpretation der Ergebnisse dar, wodurch die Studie als Hypothese-generierend eingestuft werden muss. Die Untersuchung proinflammatorischer Zytokine und Enzyme zeigt, dass OSAS mit einer Adipositas- unabhängigen Hochregulation der proatherogenen Genexpressionen von IL-6, COX-2 und SOCS-3 assoziiert ist. TNF- α und GDF-15 werden durch OSAS hingegen wenig beeinflusst. Zudem finden sich zahlreiche Korrelationen von kardiovaskulären und schlafdiagnostischen Parametern mit den untersuchten inflammatorischen Genexpressionen, die die Assoziation von OSAS und proatherogenen Veränderungen verdeutlichen. Eine signifikante Interaktion von OSAS und Adipositas kann bei IL-1 β und VEGF-A gezeigt werden. Diese Erkrankungen beeinflussen sich somit bidirektional und erhöhen synergistisch das Risiko für Komplikationen und Folgeerkrankungen. Die Expression von SOD-2 hingegen wird offenbar durch OSAS nicht wesentlich verändert. Somit müssen zur Entgiftung von ROS durch chronisch intermittierende Hypoxie, andere antioxidativen Systeme zum Tragen kommen (s. Kapitel 4.3.6).

Zudem zeigt sich am Beispiel der Expression von IL-1 β , COX-2, IL-6, VEGF-A, SOCS-3 und CD-36, wie relevant eine Kontrolle für Adipositas ist, da im Gesamtkollektiv der separate Einfluss von OSAS ohne Stratifizierung nicht erkennbar gewesen wären. So finden sich signifikant erhöhte Genexpressionen (z.B.: IL-1 β , IL-6, COX-2) meist nur in adipösen, nicht jedoch in nicht-adipösen Strata. Viele OSAS-Studien mit größeren Fallzahlen haben oft nicht genügend nach BMI stratifiziert oder kontrolliert. Darüber hinaus ist in vielen Studien, die Auswirkungen von Adipositas untersuchen, OSAS schlafdiagnostisch nicht ausgeschlossen oder diagnostiziert worden, sodass z.B. ein signifikanter Einfluss seitens OSAS auf die Genexpression fälschlich Adipositas zugeschrieben werden kann. Somit stellt sich die Frage, ob OSAS, das mit einer Prävalenz bis zu 24 - 49,7% in der erwachsenen Bevölkerung vorkommt (Young et al., 1993; Heinzer et al., 2015), einen maßgeblichen Confounder vieler Adipositas-Studien darstellt, sodass deren Ergebnisse teils neu bewertet werden müssen.

4.3.5 Diskussion der PCR- Ergebnisse der Längsschnittuntersuchung

In Kapitel 3.5.3 sind die Genexpressionsveränderungen durch cPAP dargestellt. Für diese Untersuchung waren nur geringe Fallzahlen (nicht-adipös: N=3, adipös: N=4) verfügbar, sodass diese Ergebnisse nur im Gesamtkollektiv und nicht nach BMI stratifiziert dargestellt sind und als rein Hypothesen-generierend gewertet werden müssen. Die anthropometrischen Daten (s. Tabelle 15) zeigen außer der Herzfrequenz keine signifikanten, cPAP- interventionsbedingten Unterschiede. Da insbesondere auch der BMI stabil bleibt, kann der Effekt der cPAP-Therapie ohne Einfluss dieses Confounders untersucht werden. Die nächtlichen cPAP-Anwendungszeiten von $5,1 \pm 0,7$ h/Nacht liegen oberhalb der in vielen OSAS-Studien angegebenen Zeiten (McEvoy et al., 2016; Stuck et al., 2012).

Der RIN-Wert als Maß für die RNA-Qualität weist unter Therapie im gepaarten T-Test mit $p=0,041$ eine signifikante Veränderung auf, wodurch die Ergebnisse der Genexpression systematisch verfälscht sein können. Mittels einer ANOVA für Messwiederholungen (Faktor Zeit als Effekt von CPAP mit Delta RIN als Kovariate) für die einzelnen Genexpressionen, konnte ein signifikanter cPAP-Effekt unabhängig von einem RIN-Einfluss teilweise bestätigt, d.h. eine Verfälschung ausgeschlossen werden. Zudem erweist sich GUSB anhand dieser ANOVA als stabilster Houskeeper und wird nicht durch den Faktor Zeit oder den RIN-Wert signifikant beeinflusst.

Die durch OSAS im Querschnitt relevant erhöhten IL-1 β und COX-2 Expressionen weisen unter dreimonatiger cPAP-Therapie vergleichbare Veränderungen auf:

Bei beiden zeigt sich eine signifikante (IL-1 β) bzw. hochsignifikante (COX-2) Reduktion der Genexpression. Gemäß der ANOVA für Messwiederholungen nach Berücksichtigung des RIN-Wertes sind die Veränderungen der Genexpressionen signifikant durch die cPAP-Therapie beeinflusst. Ein ähnliches Bild der Genexpression findet sich zwar auch bei ABCG-1 und SOCS-3, die beide eine signifikante Reduktion aufweisen (s. Tabelle 15), jedoch laut ANOVA für Messwiederholungen mit Berücksichtigung des RIN-Wertes nicht signifikant separat durch den Faktor Zeit beeinflusst werden. Um diese Ergebnisse zu verifizieren sind dringend Studien mit einem größeren Fallzahlen notwendig.

Die Expressionen von IL-6 und GDF-15 lassen in der vorliegenden Studie keine signifikanten Veränderungen nach dreimonatiger cPAP-Therapie erkennen.

Bei den TNF- α , VEGF-A, SOD-2 und CD-36 Genexpressionen zeigen sich signifikante Reduktionen unter Therapie (s. Kapitel 3.5.3, Tabelle 15), wobei die ANOVA für Messwiederholung mit Berücksichtigung von RIN diesen Effekt für VEGF-A als

nicht signifikant ausweist.

Eine Metaanalyse mit fast 2000 Patienten beschreibt eine Reduktion von inflammatorischen Biomarkern im Serum unter cPAP-Therapie (≥ 3 Monate, ≥ 4 h/Nacht), darunter IL-6 und TNF- α (Xie et al., 2013; Jin et al., 2017). Dem gegenüber stehen jedoch einige Studien, die keine Veränderung verschiedener Zytokinkonzentrationen (z.B. IL-6, TNF- α) zeigen (Kritikou et al., 2014; Karamanl et al., 2014; Kohler et al., 2009). Diese Aussagen werden auch durch eine Metaanalyse über die Veränderung von IL-6 unterstützt (Zhong et al., 2016). Die Ergebnisse dieser Studien können durch die vorliegende Studie gestützt werden: Die fehlende Veränderung der IL-6 Serumkonzentration unter cPAP-Therapie könnte der der fehlenden Veränderung der Genexpression in PBMC entsprechen.

Eine von Steiropoulos 2009 publizierte Studie unterteilt die Therapiegruppe in zwei Subgruppen, die nach cPAP-Dauer pro Nacht (\geq oder < 4 h/Nacht) eingeteilt sind. Nur bei der Subgruppe mit hoher nächtlicher Anwendungsdauer (≥ 4 h/Nacht) kann eine Reduktion der TNF- α Level nachgewiesen werden, nicht aber weitere Inflammationsmarker (Steiropoulos et al., 2009). Neben der Dauer der nächtlichen Anwendung spielt auch die Dauer der Therapie eine große Rolle, da ein längerer Zeitraum vermutlich zu größeren Veränderungen führt. Dies stellt den Hauptaspekt bei der Diskussion über den Nutzen der cPAP- Therapie dar und könnte ein Grund für das inhomogene Bild der Serumkonzentrationen verschiedener Zytokine in vielen Studien sein. In der vorliegenden Studie finden sich nächtliche Anwendungszeiten von $5,1 \pm 0,7$ h/Nacht, die hiermit oberhalb der in vielen OSAS-Studien angegebenen Zeiten liegen. Darüber hinaus werden Therapieeffekte oft bereits nach vierwöchiger cPAP-Therapie gemessen (vorliegende Studie: ≥ 3 Monate), wodurch Vergleiche zwischen einzelnen Studien erschwert werden (Kohler et al., 2009).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine überdurchschnittliche Compliance und somit Anwendungsdauer der Therapie nicht nur zu geringeren Serumkonzentrationen verschiedener Zytokine und Enzyme führt, sondern vermutlich auch deren Genexpression (IL-1 β , TNF- α) maßgeblich beeinflusst wird, was zu langfristigen Verbesserung des kardiovaskulären Risikos führen könnte. Allerdings darf im Rahmen dieser Überlegungen nicht vergessen werden, dass eine cPAP-Therapie gleichzeitig zu einem verminderten Schlafkomfort sowie zu einer sozialen Belastung führen kann. GSS und GSR werden in Kapitel 4.3.6 diskutiert, um Aussagen im Kontext mit GSH bzw. GS-SG und den Vorläuferaminosäuren zu treffen.

In der Tabelle 15 in Kapitel 3.5.3 sind zusätzlich zu den eben beschriebenen Ergebnissen der OSAS-Patienten vor und nach Therapie auch die Werte der Genexpression aller Kontrollprobanden aus dem Querschnittsdesign der Studie erneut aufgelistet, die hier

allerdings relativ zu den für die Längsschnittanalyse angepassten nicht-therapierten OSAS-Patienten dargestellt sind. Die Werte der OSAS-Patienten nach Therapie und der Kontrollprobanden (nachweislich ohne OSAS) können so explorativ mittels ungepaartem T-Test verglichen werden.

Es finden sich bei fast allen untersuchten Hypoxie-induzierten und proatherogenen Enzym- und Zytokinexpressionen (außer IL-6) deutlich geringere Werte bei den therapierten OSAS-Patienten als bei Kontrollprobanden, wobei eine Signifikanz nur bei CD-36 erreicht wird. Dies ist möglicherweise u.a. dadurch zu erklären, dass der durchschnittliche AHI-Wert aller Probanden, bei denen OSAS polysomnographisch ausgeschlossen wurde, bei $6,1 \pm 1,31$ N/h liegt, unter Therapie aber ein AHI von nur $4,7 \pm 3,0$ vorliegt, wobei zwischen diesen Werten keine signifikante Differenz besteht. Allerdings fallen die Werte der Kontrollprobanden teilweise bereits unter die Definition des „milden“ OSAS. Durch diese Ergebnisse stellt sich auch bei Fallzahllimitierung somit die Frage, ob nicht bereits ein $AHI \geq 5$ N/h anstatt $AHI \geq 15$ N/h eine Therapieindikation darstellen sollte, um mögliche Langzeitfolgen von OSAS minimieren zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhöhte Genexpression von Patienten unter Therapie meist ein Niveau erreicht, das unterhalb der von polysomnographisch charakterisierten Kontrollprobanden liegt. Dies lässt die Aussage zu, dass bereits ein $AHI \geq 5$ N/h (mildes OSAS) von Kontrollprobanden, bei denen schlafdiagnostisch OSAS zwar ausgeschlossen wurde, behandlungsbedürftige inflammatorische Auswirkungen auf den Körper haben könnten.

Zukünftige Studien sollten die hier getroffenen Aussagen bezüglich der cPAP-Therapie mit einem größeren Studienkollektiv und mit Stratifizierung nach BMI überprüfen, um, im Sinne der Patienten, eine bestmögliche, individuelle Therapie anbieten zu können.

4.3.6 Diskussion der Ergebnisse der Glutathionanalyse

OSAS führt durch CIH, wie bereits eingangs erwähnt, zu oxidativem Stress, der u.a. durch die in der Atmungskette entstehende ROS vermittelt wird. Um dem oxidativen Stress entgegenzuwirken, sind mehrere Schutzsysteme vorhanden, von denen das intrazelluläre Glutathionsystem das wichtigste darstellt. Da die Ergebnisse der enzymatischen GSH- sowie der GSSG- Bestimmung in PBMC zwar von großem Kollektiv aber in gepoolten Gruppen erhoben wurden, ist eine statistische Auswertung nicht möglich und die Daten sind Hypothesen-generierend.

Als unerwarteter Befund weist die intrazelluläre Konzentration des reduzierten GSH (somit verfügbares GSH) bei nicht-adipösen und adipösen OSAS-Patienten, sowie bei adipösen Kontrollen den 2-fach erhöhten Wert gegenüber nicht-adipösen Kontrollen auf (s. Abbildung 32, Kapitel 3.6). OSAS und Adipositas scheinen somit beide einen GSH erhöhenden Effekt zu haben. Der physiologische Redoxstatus GSH:GSSG von 9:1 ist in dieser Studie bei adipösen sowie nicht-adipösen OSAS-Patienten gegeben, allerdings nicht bei Kontrollprobanden, die Verhältnisse von ca. 6,5:1 bei $BMI < 30\text{kg}/\text{m}^2$ bzw. ca. 5:1 bei $BMI \geq 30\text{kg}/\text{m}^2$ aufweisen.

In leukämischen Zelllinien, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt wurden, ist eine Hochregulation der GSH-Synthese mit erhöhter intrazellulärer GSH/GSSG Ratio gegenüber Zelllinien unter Normoxie nachgewiesen (Goto et al., 2014). Dabei wird hier von durch den Transkriptionsfaktor „*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*“ (NRF2)- vermittelten gegenregulatorischen Maßnahmen ausgegangen, die unter chronischer Hypoxie und oxidativem Stress in Kraft treten. Dieser führt neben einer Hochregulation der Glutathionsynthese-limitierenden, hier leider nicht bestimmbar GCL (Syu et al., 2016), auch über eine vermehrte Expression des Cystein-Glutamat Austauschsystems X_c^- (SLC7A11) zu einer kontrollierenden Funktion bei intrazellulärer Cystin- Aufnahme (Mysona et al., 2009). Diese antioxidative Antwort könnte somit für die hohen intrazellulären GSH-Konzentrationen mitverantwortlich sein. Inwiefern dies unter CIH stattfindet, ist in der Literatur nicht beschrieben.

Studien, die sich mit dem durch OSAS ausgelösten oxidativen Stress befassen, untersuchen die Aktivität der Glutathionperoxidase im Serum, die die GSH-abhängige Umwandlung von H_2O_2 in H_2O und GSSG katalysiert. Hierbei werden allerdings unterschiedliche Ergebnisse beschrieben: Während einige Studien über keine Veränderung der Serumlevel der Glutathionperoxidase berichten, beschreiben andere OSAS-bedingt niedrigere Level dieses Enzyms gegenüber Kontrollprobanden (Asker et al., 2015; Barcelo et al., 2006; Kilic et al., 2016).

Unter cPAP-Therapie zeigt sich eine Abnahme des reduzierten GSH bei nicht-adipösen um 39,4% und bei adipösen Patienten um 7,6%. Das Verhältnis von GSH/GSSG wandelt sich hingegen kaum durch die Therapie und bleibt mit 8:1 (nicht-adipös) bzw. 9:1 (adipös) konstant (s. Kapitel 3.6). Somit scheint eine cPAP-Therapie senkend auf die intrazelluläre Gesamt-GSH-Konzentration (v.a. der nicht-adipösen Patienten) zu wirken, wodurch ähnliche Werte wie bei Kontrollprobanden erreicht werden.

Studien, die die Reversibilität des oxidativen Stresses durch cPAP untersuchen, zeigen meist einen Anstieg der intrazellulären antioxidativen Kapazität, teilweise bereits nach einmonatiger Therapiedauer (Singh et al., 2009; Murri et al., 2011). Zudem wird ein Anstieg der Glutathionperoxidase in Erythrozyten unter Therapie beschrieben (Dorkova et al., 2008).

In dieser Studie konnte die Expression der oben beschriebenen GCL als limitierendes Enzym der GSH-Synthese nicht untersucht werden, allerdings die von GSS und GSR untersucht. Diese Enzyme sind, wie oben beschrieben, maßgeblich an der Bildung bzw. der Wiedergewinnung von Glutathion beteiligt. Hierbei zeigt sich, dass nicht-adipöse OSAS-Patienten gegenüber ihren Kontrollen eine geringere Expression von GSS und GSR aufweisen, wobei dies insofern verwunderlich ist, da unter Belastung mit ROS vermehrt Enzyme benötigt werden, die GSH bereitstellen können und GSH tatsächlich (s.o.) vermehrt verfügbar ist.

Bei den Enzymen GSS und GSR ergibt sich eine signifikante Reduktion der Genexpression in der PCR-Analyse nach cPAP-Therapie im Längsschnittdesign (s. Tabelle 15), die allerdings der ANOVA für Messwiederholung unter Berücksichtigung von RIN nicht standhält.

4.3.7 Diskussion der Vorläuferamino­säuren von Glutathion

Extrazelluläre Aminosäurekonzentrationen:

OSAS und Adipositas scheinen unabhängig voneinander zu einer Erhöhung des extrazellulären Glutamats bei OSAS-Patienten gegenüber Kontrollprobanden zu führen (vgl. ANOVA, T-Test). Unter Therapie zeigen sich eine Verringerung der extrazellulären Glutamatkonzentrationen (in den adipösen Strata signifikant laut gepaartem T-Test), was als Beleg für einen kausalen unabhängigen OSAS-Effekt auf die extrazelluläre Glutamatkonzentration angesehen werden kann.

Die extrazelluläre Glycinkonzentration wird dabei laut ANOVA weder durch OSAS oder Adipositas noch deren Interaktion signifikant beeinflusst. Zudem finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen OSAS-Patienten und Probanden im Gesamtkollektiv noch in den Strata. Somit scheinen die Glycinwerte nicht durch OSAS oder Adipositas beeinflusst zu werden. Unter Therapie hingegen zeigt sich eine signifikante Reduktion der extrazellulären Glycinkonzentration. Dies könnte auf einen Effekt von bereits gering erhöhten AHI-Werten bei Kontrollprobanden zurückzuführen sein, da, wie bereits beschrieben (s. Kapitel 4.3.5), sich diese AHI-Werte im Gegensatz zu therapierten OSAS-Patienten knapp im Definitionsbereich von mildem OSAS befinden.

Cystin, das Disulfid des Cystein, kann nur im Serum, nicht jedoch in PBMC nachgewiesen werden. Neben seiner Aufgabe als Bestandteils des Tripeptids GSH kann Cystein direkt durch Disulfidbildung mit einem weiteren Cystein-Molekül ROS entgiften und somit oxidativem Stress entgegenwirken. Laut ANOVA ergibt sich ein signifikanter Einfluss von Adipositas auf die Cystinkonzentration, jedoch nicht durch OSAS oder deren Interaktion. Dabei besteht allerdings eine hochsignifikante, positive Korrelation der Cystinkonzentration sowohl mit dem BMI als auch dem AHI. Dies zeigt, dass die extrazellulären Cystinwerte, die einen neuen kardiovaskulären Risikofaktor darstellen (Patel et al., 2016), vermutlich neben Adipositas eventuell auch durch OSAS beeinflusst werden, wobei dies durch ein größeres Studienkollektiv zu prüfen ist. Ein Confounder könnte, wie in der Literatur beschrieben, das Alter darstellen (Hildebrandt et al., 2002), wobei in der vorliegenden Studie keine signifikante Korrelation zwischen der Cystinkonzentration und dem Alter besteht. Darüber hinaus werden erhöhte Cysteinplasmaspiegel auch bei weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hyperlipidämie beschrieben (Kinscherf et al., 2003; Hildebrandt et al., 2002, 2015; Bonaterra et al., 2005). Es besteht in der vorliegenden Studie zudem eine signifikante positive Korrelation der Cystinkonzentration mit dem systolischen und dem diastolischen Blutdruck, was die Relevanz als kardiovaskulärer Risikofaktor unterstreichen könnte.

Die bei OSAS-Patienten nicht-signifikant erhöhten Cystinkonzentrationen sind anhand der Daten nicht zu interpretieren. Die nicht nachweisbare, intrazelluläre Konzentration könnte sowohl durch verminderte Aufnahme als auch durch vermehrten Verbrauch durch gesteigerte GSH-Synthese erklärt werden. Das erhöhte extrazelluläre Cystinangebot kann zur Zeit nicht erklärt werden, da andere Kompartimente wie Muskulatur große Auswirkungen haben. Des Weiteren besteht eine hochsignifikante Korrelation zwischen der extrazellulären Cystinkonzentration mit der extrazellulären Glutamatkonzentration, wobei Glutamat über das oben beschriebene X_c -System als Inhibitor der Cysteinaufnahme insbesondere der Skelettmuskulatur zu den hohen extrazellulären Cystinkonzentrationen beigetragen haben könnte (Zhu et al., 2008). Um die genauen Mechanismen der antioxidativen Antwort zu verstehen bedarf es weiterer Studien.

Unter cPAP-Therapie zeigt sich im Gesamtkollektiv sowie in den Strata eine Reduktion der extrazellulären Cystinkonzentration. Diese ist im Gesamtkollektiv und in der adipösen Gruppe laut gepaartem T-Test hochsignifikant; in den nicht-adipösen Strata hingegen wird eine Signifikanz, eventuell fallzahlbedingt, knapp nicht erreicht (s. Tabellen 21 und 22). Durch diesen deutlichen Einfluss von cPAP auf die Cystinkonzentration und der oben beschriebenen Korrelation von AHI und Cystinwerten ist ein OSAS-Effekt wahrscheinlich. Zudem kann die Annahme bestätigt werden, dass die cPAP-Therapie oxidativen Stress zumindest extrazellulär reduziert (Singh et al., 2009). Somit müssen intra- und extrazelluläre Kompartimente bezüglich oxidativem Stress und antioxidativer Kapazität offenbar differenzierter betrachtet werden.

Intrazelluläre Aminosäurenkonzentrationen:

Die ANOVA für die intrazelluläre Glutamatkonzentration zeigt keine signifikante Einflüsse durch OSAS, Adipositas oder deren Interaktion, auch Strata bezogene Unterschiede fehlen. Zudem ist ein cPAP-Effekt im Gegensatz zum extrazellulären Glutamat nicht nachweisbar.

Auch für die intrazelluläre Glycinkonzentration ergibt sich laut ANOVA kein OSAS- oder Adipositas-Effekt, abgesehen von deren Interaktion. Die nicht-signifikant verringerten Konzentrationen bei OSAS-Patienten gegenüber Kontrollen könnte auf einen Verbrauch von Glycin für die Glutathionsynthese hindeuten. Unter Therapie kommt es nur in den adipösen Strata zu einer signifikant verringerten Glycinkonzentration, dessen Ursache unklar bleibt.

Cystin ist intrazellulär nicht nachweisbar.

5 Zusammenfassung

Hintergrund, Ziele und Methode: Eine der wichtigsten schlafbezogenen Atmungsstörungen stellt das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) dar, das durch chronisch intermittierende Hypoxie (CIH) zu Entzündungen und Endothelschädigungen sowie Insulinresistenz und Arteriosklerose führen kann. Nur wenige OSAS-bezogenen Studien untersuchen bisher die proatherogene Genexpression in zirkulierenden, peripheren mononukleären Zellen (PBMC), insbesondere den separaten Einfluss von OSAS oder Adipositas, die bei den meisten Patienten gleichzeitig vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wird in einem Querschnittsdesign untersucht, ob proatherogene und Hypoxie-induzierbare Genexpressionen (IL-6, IL-1 β , COX-2, TNF- α , VEGF-A, SOCS-3, SOD-2, GDF-15, GSS, GSR) in PBMC bei Patienten mit moderatem bis schwerwiegendem OSAS (Apnoe-hypopnoe Index ≥ 15 N/h) durch OSAS, dem häufig assoziierten Adipositas, oder durch deren Synergismus beeinflusst werden. Hierfür werden die Patienten anhand ihres BMIs stratifiziert (BMI < 30 kg/m²: N=5, BMI ≥ 30 kg/m²: N=10) und mit Kontrollprobanden (BMI < 30 kg/m²: N=7, BMI ≥ 30 kg/m²: N=6) verglichen. In einem Längsschnittsdesign wird zusätzlich der Effekt einer drei- bis fünfmonatigen cPAP-Therapie in kleineren Subgruppen (N=7) untersucht. Um die Antwort auf durch OSAS ausgelösten oxidativen Stress zu charakterisieren, wird neben der Genexpression der Glutathionsynthase sowie der Glutathionreduktase auch die intrazelluläre Glutathionkonzentration in PBMC mit einem größeren Studienkollektiv in gepoolten Gruppen (Kontrollen: BMI < 30 kg/m²: N=12, BMI ≥ 30 kg/m²: N=13; OSAS-Patienten: BMI < 30 kg/m²: N=8, BMI ≥ 30 kg/m²: N=20) bestimmt. Darüber hinaus erfolgt in diesem Kollektiv die individuelle Bestimmung der drei Vorläuferaminosäuren (Glutamat, Glycin, Cystein) von Glutathion in PBMC und im Plasma.

Ergebnisse: Im Studienkollektiv der PCR-Untersuchung finden sich höhere Expressionen für IL-1 β , IL-6, COX-2 und SOCS-3 bei OSAS-Patienten als bei Probanden. Während sich in den kleineren nicht-adipösen Strata keine Signifikanzen finden, zeigen sich in den adipösen Strata signifikante Unterschiede für IL-1 β , IL-6, COX-2, VEGFa, ABCG-1, SOCS-3, CD-36, GSS and GSR. Wie die *analysis of variances* (ANOVA) zeigt, werden IL-1 β , VEGF-A, COX-2 und SOCS-3 signifikant durch den Faktor OSAS beeinflusst, wohingegen der Faktor Adipositas nur die Genexpression der GSR signifikant verändert. Zudem zeigt die ANOVA eine signifikante Interaktion der Faktoren OSAS und Adipositas für IL-1 β und VEGF-A. Eine 3- bis 5-monatige cPAP-Therapie (5.1 ± 0.7 h/total sleep time) bewirkt eine signifikante Reduktion bei nahezu allen Genexpressionen (außer IL-6 und GDF-15), die teilweise durch die ANOVA für Messwiederholung unter der Berücksichtigung der RIN-Qualität bestätigt wird.

Als unerwarteter Befund weist die intrazelluläre Konzentration des reduzierten GSH einen ca. 2-fach erhöhten Wert bei adipösen Kontrollen, sowie nicht-adipösen und adipösen OSAS-Patienten gegenüber nicht-adipösen Kontrollen auf. Das Verhältnis von reduziertem Glutathion zu Glutathiondisulfid (GSH:GSSG) beträgt bei OSAS-Patienten, entgegen der Erwartungen, das physiologische Verhältnis von 8-9:1, im Gegensatz zu Kontrollprobanden (5-6,5:1).

Die ANOVA zeigt einen signifikanten Einfluss von OSAS und Adipositas auf die extrazellulären Glutamatkonzentrationen, die bei nicht-adipösen OSAS-Patienten signifikant erhöht sind. Die extrazelluläre Cystinkonzentration wird signifikant durch Adipositas beeinflusst.

Diskussion und Schlussfolgerung: Bei gegebener Fallzahl-Limitierung, die allenfalls Hypothesen-Generierung zulässt, weist die vorliegende Studie darauf hin, dass OSAS teils unabhängig von Adipositas zu einer Hochregulation von proatherogenen und proinflammatorischen Genexpressionen (z.B. COX-2, VEGF-A) in PBMC führen kann und somit das kardiovaskuläre Risiko erhöht. Dies ist unter anderem für viele Adipositas bezogenen Studien relevant, die OSAS nicht ausgeschlossen haben. Ein weiteres, bisher wenig berücksichtigtes Problem der Methodik ist dabei die Suche nach einem unter den geforderten Bedingungen (z.B. CIH) stabilen Referenzgen, da sich in der Literatur beschriebene Referenzgene (z.B. β -actin und TBP) als stark Hypoxie-sensitiv erwiesen. Das Gen β -Glucuronidase zeigt sich hier als stabilstes Referenzgen. Die 3- bis 5-monatige cPAP-Therapie senkt viele der erhöhten Genexpressionen (außer IL-6 und GDF-15) teilweise sogar unter das Niveau der Kontrollprobanden (z.B. CD-36, $p < 0,01$). Dies könnte auf den AHI von $6.01 \pm 1,31$ N/h der Kontrollprobanden zurückzuführen sein, der hiermit bereits im Definitionsbereich ($\text{AHI} \geq 5$ N/h, aber < 15 N/h) des *milden* OSAS liegt und höher als der AHI-Wert von OSAS-Patienten ist. Die proinflammatorische PBMC-Aktivierung durch OSAS findet dabei offenbar trotz gesteigerter Verfügbarkeit von GSH in PBMC statt. Die Werte der GSH-Untersuchung könnten auf das durch den Hypoxie-sensitiven NRF2 aktivierte X_c - System zurückzuführen sein. Allerdings können auch in Zusammenschau all dieser Befunde die verschiedenen Wege der antioxidativen Antwort noch nicht bis ins Detail verstanden werden, geben allerdings Hinweise für weitere Studien.

Zukünftige, ausreichend große Studien sollten die möglichen separaten und synergistischen proinflammatorischen Effekte von Adipositas und OSAS, aber auch die antioxidativ wirksamen Prozesse (wie GSH-Synthese) detaillierter untersuchen. Eine ausreichende Stratifizierung nach BMI und nach AHI sowie kontrollierte cPAP-Interventionen erscheinen sinnvoll, um den separaten Beitrag von OSAS und Adipositas auf proatherogene Faktoren zu verstehen.

6 Summary

Background, aims and method: The highly prevalent obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) that leads to chronic intermittent hypoxia (CIH) independently disposes for arteriosclerosis and related cardiovascular endpoints by inducing inflammation, endothelial dysfunction, and insulin resistance. Only few preliminary studies have shown a pro-atherogenic gene expression in circulating peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with OSAS. However, the individual contribution of OSAS and obesity, i.e. mostly overlapping conditions, are presently unknown. Furthermore, the bidirectional interaction between metabolic syndrome and OSAS is a major difficulty in previous studies. Therefore the effect of OSAS on gene expression in PBMC without confounding factors (e.g. obesity) is currently not well understood.

The aim of this study was to identify, if the gene expression of pro-atherogenic and hypoxia-inducible cytokines and enzymes like IL-6, IL-1 β , COX-2, TNF- α , VEGF-A, SOCS-3, SOD-2, GDF-15, GSS and GSR in peripheral blood mononuclear cells of patients with moderate to severe OSAS (Apnea-hypopnea index, AHI>15 N/h) can be attributed to OSAS, obesity or the interaction of both. Therefore, patients were stratified for BMI < 30 kg/m² (n=5) and BMI \geq 30 kg/m² (n=10) and compared to age- and BMI-matched healthy control subjects (BMI < 30 kg/m²: n=7, BMI \geq 30 kg/m²: n=6). In addition, the effect of 3-5 months home-based CPAP therapy was analysed in smaller subgroups (n=7, because of deficient compliance) in a longitudinal-sectional study design. In order to understand the reaction to oxidative stress caused by OSAS and the analysed gene expression of GSS and GSR, the intracellular concentrations of glutathione were measured in pooled groups with higher number of cases (controls: BMI < 30 kg/m²: n=12, BMI \geq 30 kg/m²: n=13; OSAS-patients: BMI < 30 kg/m²: n=8, BMI \geq 30 kg/m²: n=20). Moreover, the three precursor amino acids (glycine, glutamate, cystein) of glutathione were analysed in PBMC and plasma in these groups.

Results: In the study population for the PCR-analysis, significant higher gene expressions were found for IL-1 β , IL-6, COX-2 and SOCS-3 between OSAS-patients and controls. In stratification no significance could be shown between non-obese patients and controls, whereas the obese strata have multiple significant differences (IL-1 β , IL-6, COX-2, VEGF α , ABCG-1, SOCS-3, CD-36, GSS and GSR). As the 'analysis of variances' (ANOVA) shows, IL-1 β , VEGF-A, COX-2 and SOCS-3 are influenced by OSAS, whereas obesity only has impact on GSR. Furthermore the ANOVA shows an interaction of obesity and OSAS in the expression of IL-1 β and VEGF-A. The duration of the application of the cPAP-therapy was 5.1 \pm 0.7 h/total sleep time for all patients (n=7). Except for IL-6 and GDF-15, all gene expressions show a significant reduction after 3-5 months of home-based cPAP therapy.

Surprisingly the intracellular concentration of reduced glutathione was twice as high in

obese controls, non-obese and obese patients as in non-obese controls. The results of the glutathione measurement are furthermore reflected in the ratio of reduced glutathione to glutathione disulfide (GSH:GSSG). In contrast to our expectation, the ratio of OSAS patients is 8-9:1 and matches their physiological status, whereas control subjects show rates of 5-6.5:1. Analysing the amino acids, ANOVA shows a significant influence of OSAS, obesity and their interaction on extracellular glutamate levels. Furthermore, the extracellular cystine concentration is significantly influenced by obesity.

Discussion and conclusions: Because of the limited number of cases the findings of this study are only indicative and can be the basis of a hypothesis. However as a main result of this study we show that OSAS independently causes an up-regulation of the relevant pro-atherogenic and pro-inflammatory gene expression in PBMC with or without interaction of obesity and increases cardiovascular risk. This is important as numerous studies on obesity and low level inflammation have not controlled for OSAS by exclusion or grading. It is important to highlight that we, unlike other studies, critically chose a reference (house-keeping) gene, that was relatively stable under both tested conditions, of which hypoxia (as inherent in OSAS-conditions) may putatively have the most profound and general effect on most cells. Among the gene products tested, we found that the most commonly published ones in the field of OSAS and PBMCs (i.e. β -actin and TBP) were hypoxia-sensitive to a considerable degree. The most stable and reliable reference gene we found was β -Glucuronidase (GUSB), which is only used and published in a few studies dealing with PBMCs. The application duration of 3 to 5 months of home-based cPAP therapy lowers most of the elevated gene expressions (except IL-6 and GDF-15), in some cases even below control levels. This might be due to the AHI of control subjects (6.01 ± 1.31 N/h) that is slightly higher than that of patients in therapy. This leads us to the conclusion that already mild OSAS ($AHI \geq 5$ N/h, but < 15 N/h) might imply a change in gene expression levels of pro-atherogenic cytokines and might increase the risk for cardiovascular events. The physiological status of GSH:GSSG and high concentration of reduced GSH might be due to the hypoxia-inducible via NRF2 activated X_c^- system. But even with all these results, it is difficult to fully understand and gauge the effects of oxidative stress caused by OSAS. An in-depth analysis of this effect, as well as further studies of other antioxidative protective systems are needed.

All in all larger future studies should take into account the potentially significant interaction of BMI and OSAS. A stratification for BMI and AHI as well as controlled cPAP therapy seems to help understand the separate influences of obesity and OSAS on proatherogenic factors. We propose that studies on obesity and low inflammation should control carefully for OSAS as it might be a strong and often ignored confounder.

Literatur

- Adela, R. and Banerjee, S. K. (2015). GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *J Diabetes Res*, 2015:490842.
- Alberti, K. G. and Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.*, 15(7):539–553.
- Alzoghbi, M. A. and Bahammam, A. S. (2012). The effect of one night of continuous positive airway pressure therapy on oxidative stress and antioxidant defense in hypertensive patients with severe obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*, 16(2):499–504.
- Arnardottir, E. S., Mackiewicz, M., Gislason, T., Teff, K. L., and Pack, A. I. (2009). Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: a review and perspective. *Sleep*, 32(4):447–470.
- Arnaud, C., Beguin, P. C., Lantuejoul, S., Pepin, J. L., Guillermet, C., Pelli, G., Burger, F., Buatois, V., Ribuot, C., Bague, J. P., Mach, F., Levy, P., and Dematteis, M. (2011). The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 184(6):724–731.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schemtman, G., and Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302):964–967.
- Asker, S., Asker, M., Ozigokce, M., and Ozbay, B. (2016). Association of Intermittent and Continuous Hypoxaemia with Carotid and Brachial Arterial Intima-media Thicknesses. *West Indian Med J*.
- Asker, S., Asker, M., Sarikaya, E., Sunnetcioglu, A., Aslan, M., and Demir, H. (2015). Oxidative stress parameters and their correlation with clinical, metabolic and polysomnographic parameters in severe obstructive sleep apnea syndrome. *Int J Clin Exp Med*, 8(7):11449–11455.
- Aurora, R. N. and Punjabi, N. M. (2013). Obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes mellitus: a bidirectional association. *Lancet Respir Med*, 1(4):329–338.
- Baessler, A., Nadeem, R., Harvey, M., Madbouly, E., Younus, A., Sajid, H., Naseem, J., Asif, A., and Bawaadam, H. (2013). Treatment for sleep apnea by continuous positive airway pressure improves levels of inflammatory markers - a meta-analysis. *J Inflamm (Lond)*, 10:13.
- Bai, L., Yu, Z., Qian, G., Qian, P., Jiang, J., Wang, G., and Bai, C. (2006). SOCS3 was induced by hypoxia and suppressed STAT3 phosphorylation in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Respir Physiol Neurobiol*, 152(1):83–91.
- Bakhashab, S., Lary, S., Ahmed, F., Schulten, H. J., Bashir, A., Ahmed, F. W., Al-Malki, A. L., Jamal, H. S., Gari, M. A., and Weaver, J. U. (2014). Reference genes for expression studies in hypoxia and hyperglycemia models in human umbilical vein endothelial cells. *G3 (Bethesda)*, 4(11):2159–2165.
- Baldan, A., Ferronato, S., Olivato, S., Malerba, G., Scuro, A., Veraldi, G. F., Gelati, M., Ferrari, S., Mariotto, S., Pignatti, P. F., Mazzucco, S., and Gomez-Lira, M. (2014). Cyclooxygenase 2, toll-like receptor 4 and interleukin 1 mRNA expression in atherosclerotic plaques of type 2 diabetic patients. *Inflamm. Res.*, 63(10):851–858.

- Barbe, F., Duran-Cantolla, J., Capote, F., de la Pena, M., Chiner, E., Masa, J. F., Gonzalez, M., Marin, J. M., Garcia-Rio, F., de Atauri, J. D., Teran, J., Mayos, M., Monasterio, C., del Campo, F., Gomez, S., de la Torre, M. S., Martinez, M., Montserrat, J. M., Rubio, R., Carmona, C., Sanchez-Armengol, A., Somoza, M., Lumbierres, M., Morante, F., Jimenez, A., Alvarez, M. L., Hernandez, L., Barcelo, A., Carrizo, S., Martinez-Null, C., Llombart, M., Mediano, O., Rubio, M., and Corral, J. (2010). Long-term effect of continuous positive airway pressure in hypertensive patients with sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 181(7):718–726.
- Barcelo, A., Barbe, F., de la Pena, M., Martinez, P., Soriano, J. B., Pierola, J., and Agusti, A. G. (2008). Insulin resistance and daytime sleepiness in patients with sleep apnoea. *Thorax*, 63(11):946–950.
- Barcelo, A., Barbe, F., de la Pena, M., Vila, M., Perez, G., Pierola, J., Duran, J., and Agusti, A. G. (2006). Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur. Respir. J.*, 27(4):756–760.
- Basner, M., Mueller, E., Plath, G., Wenzel, J., and Samel, A. (2000). Neues zum first night effect. *DLR-Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, 51147 Köln, Linder Höhe*.
- Beaudin, A. E., Pun, M., Yang, C., Nicholl, D. D., Steinback, C. D., Slater, D. M., Wynne-Edwards, K. E., Hanly, P. J., Ahmed, S. B., and Poulin, M. J. (2014). Cyclooxygenases 1 and 2 differentially regulate blood pressure and cerebrovascular responses to acute and chronic intermittent hypoxia: implications for sleep apnea. *J Am Heart Assoc*, 3(3):e000875.
- Becker, C., RIEDMAIER, I., and PFAFFL, M. (2009). MIQE- Guidelines: RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BIOspektrum*, 15.Jahrgang.
- Bonaterra, G. A., Hildebrandt, W., Bodens, A., Sauer, R., Dugi, K. A., Deigner, H. P., Droge, W., Metz, J., and Kinscherf, R. (2005). Increased cyclooxygenase-2 expression in peripheral blood mononuclear cells of smokers and hyperlipidemic subjects. *Free Radic. Biol. Med.*, 38(2):235–242.
- Bonaterra, G. A., Hildebrandt, W., Bodens, A., Sauer, R., Dugi, K. A., Deigner, H. P., Turcanu, D., Heinle, H., Droge, W., Metz, J., and Kinscherf, R. (2007). Increased gene expression of scavenger receptors and proinflammatory markers in peripheral blood mononuclear cells of hyperlipidemic males. *J. Mol. Med.*, 85(2):181–190.
- Bonaterra, G. A., Zugel, S., Thogersen, J., Walter, S. A., Haberkorn, U., Strelau, J., and Kinscherf, R. (2012). Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury. *J Am Heart Assoc*, 1(6):e002550.
- Borel, A. L., Monneret, D., Tamisier, R., Baguet, J. P., Faure, P., Levy, P., Halimi, S., and Pepin, J. L. (2013). The severity of nocturnal hypoxia but not abdominal adiposity is associated with insulin resistance in non-obese men with sleep apnea. *PLoS ONE*, 8(8):e71000.
- Bozkurt, N. C., Beysel, S., Karbek, B., Unsal, . O., Cakir, E., and Delibasi, T. (2016). Visceral Obesity Mediates the Association Between Metabolic Syndrome and Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*, 14(4):217–221.
- Breit, S. N., Johnen, H., Cook, A. D., Tsai, V. W., Mohammad, M. G., Kuffner, T., Zhang, H. P., Marquis, C. P., Jiang, L., Lockwood, G., Lee-Ng, M., Husaini, Y., Wu, L., Hamilton, J. A., and Brown,

- D. A. (2011). The TGF superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: a pleiotropic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism. *Growth Factors*, 29(5):187–195.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.*, 25(2):169–193.
- Caples, S. M., Gami, A. S., and Somers, V. K. (2005). Obstructive sleep apnea. *Ann. Intern. Med.*, 142(3):187–197.
- Chen, X. and Kong, W. (2015). [Improving the surgical technology in treatment of OSAHS]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 29(6):495–498.
- Chirinos, J. A., Gurubhagavatula, I., Teff, K., Rader, D. J., Wadden, T. A., Townsend, R., Foster, G. D., Maislin, G., Saif, H., Broderick, P., Chittams, J., Hanlon, A. L., and Pack, A. I. (2014). CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea. *N. Engl. J. Med.*, 370(24):2265–2275.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1):156–159.
- Chopra, S., Rathore, A., Younas, H., Pham, L. V., Gu, C., Beselman, A., Kim, I. Y., Wolfe, R. R., Perin, J., Polotsky, V. Y., and Jun, J. C. (2017). Obstructive Sleep Apnea Dynamically Increases Nocturnal Plasma Free Fatty Acids, Glucose, and Cortisol During Sleep. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 102(9):3172–3181.
- Chung, H. Y., Baek, B. S., Song, S. H., Kim, M. S., Huh, J. I., Shim, K. H., Kim, K. W., and Lee, K. H. (1997). Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha)*, 20(3):127–140.
- Ciccione, M. M., Scicchitano, P., Mitacchione, G., Zito, A., Gesualdo, M., Caputo, P., Damiani, M. F., Sassara, M., Favale, S., Resta, O., and Carratu, P. (2012). Is there a correlation between OSAS duration/severity and carotid intima-media thickness? *Respir Med*, 106(5):740–746.
- Cizza, G., de Jonge, L., Piaggi, P., Mattingly, M., Zhao, X., Lucassen, E., Rother, K. I., Sumner, A. E., and Csako, G. (2014). Neck circumference is a predictor of metabolic syndrome and obstructive sleep apnea in short-sleeping obese men and women. *Metab Syndr Relat Disord*, 12(4):231–241.
- Coughlin, S. R., Mawdsley, L., Mugarza, J. A., Calverley, P. M., and Wilding, J. P. (2004). Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur. Heart J.*, 25(9):735–741.
- Coughlin, S. R., Mawdsley, L., Mugarza, J. A., Wilding, J. P., and Calverley, P. M. (2007). Cardiovascular and metabolic effects of CPAP in obese males with OSA. *Eur. Respir. J.*, 29(4):720–727.
- Crucet, M., Wust, S. J., Spielmann, P., Luscher, T. F., Wenger, R. H., and Matter, C. M. (2013). Hypoxia enhances lipid uptake in macrophages: role of the scavenger receptors Lox1, SRA, and CD36. *Atherosclerosis*, 229(1):110–117.
- Damiani, M. F., Zito, A., Carratu, P., Falcone, V. A., Bega, E., Scicchitano, P., Ciccione, M. M., and Resta, O. (2015). Obstructive Sleep Apnea, Hypertension, and Their Additive Effects on Atherosclerosis. *Biochem Res Int*, 2015:984193.

- Damon, L. E. and Damon, L. E. (2009). Mobilization of hematopoietic stem cells into the peripheral blood. *Expert Rev Hematol*, 2(6):717–733.
- Dempsey, J. A., Veasey, S. C., Morgan, B. J., and O'Donnell, C. P. (2010). Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol. Rev.*, 90(1):47–112.
- Deneke, S. M. (2000). Thiol-based antioxidants. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 36:151–180.
- Dicker, D., Salook, M. A., Marcoviciu, D., Djaldetti, M., and Bessler, H. (2013). Role of peripheral blood mononuclear cells in the predisposition of obese individuals to inflammation and infection. *Obes Facts*, 6(2):146–151.
- Dorkova, Z., Petrasova, D., Molcanyiova, A., Popovnakova, M., and Tkacova, R. (2008). Effects of continuous positive airway pressure on cardiovascular risk profile in patients with severe obstructive sleep apnea and metabolic syndrome. *Chest*, 134(4):686–692.
- Dumitrascu, R., Heitmann, J., Seeger, W., Weissmann, N., and Schulz, R. (2013). Obstructive sleep apnea, oxidative stress and cardiovascular disease: lessons from animal studies. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:234631.
- Ehltng, C., Lai, W. S., Schaper, F., Brenndorfer, E. D., Matthes, R. J., Heinrich, P. C., Ludwig, S., Blackshear, P. J., Gaestel, M., Haussinger, D., and Bode, J. G. (2007). Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J. Immunol.*, 178(5):2813–2826.
- Engelhardt, H. (1986). *Practice of High Performance Liquid Chromatography. Applications, Equipment and Quantitative Analysis*. Springer, Berlin.
- Fenyo, I. M. and Gafencu, A. V. (2013). The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology*, 218(11):1376–1384.
- Folco, E. J., Sukhova, G. K., Quillard, T., and Libby, P. (2014). Moderate hypoxia potentiates interleukin-1 production in activated human macrophages. *Circ. Res.*, 115(10):875–883.
- Ghazal, A., Roghani, F., Sadeghi, M., Amra, B., and Kermani-Alghoraishi, M. (2015). Obstructive sleep apnea, diagnosed by the Berlin questionnaire and association with coronary artery disease severity. *ARYA Atheroscler*, 11(5):275–280.
- Gilat, H., Vinker, S., Buda, I., Soudry, E., Shani, M., and Bachar, G. (2014). Obstructive sleep apnea and cardiovascular comorbidities: a large epidemiologic study. *Medicine (Baltimore)*, 93(9):e45.
- Giles, T. L., Lasserson, T. J., Smith, B. H., White, J., Wright, J., and Cates, C. J. (2006). Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnoea in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):CD001106.
- Giustarini, D., Tsikas, D., Colombo, G., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Fanti, P., and Rossi, R. (2016). Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1019:21–28.

- Gokulakrishnan, K., Mohanavalli, K. T., Monickaraj, F., Mohan, V., and Balasubramanyam, M. (2009). Subclinical inflammation/oxidation as revealed by altered gene expression profiles in subjects with impaired glucose tolerance and Type 2 diabetes patients. *Mol. Cell. Biochem.*, 324(1-2):173–181.
- Goodday, R. H., Bourque, S. E., and Edwards, P. B. (2015). Objective and Subjective Outcomes Following Maxillomandibular Advancement Surgery for Treatment of Patients With Extremely Severe Obstructive Sleep Apnea (Apnea-Hypopnea Index >100). *J. Oral Maxillofac. Surg.*
- Gopal, D. M., Larson, M. G., Januzzi, J. L., Cheng, S., Ghorbani, A., Wollert, K. C., Kempf, T., D'Agostino, R. B., Polak, J. F., Ramachandran, V. S., Wang, T. J., and Ho, J. E. (2014). Biomarkers of cardiovascular stress and subclinical atherosclerosis in the community. *Clin. Chem.*, 60(11):1402–1408.
- Goto, M., Miwa, H., Suganuma, K., Tsunekawa-Imai, N., Shikami, M., Mizutani, M., Mizuno, S., Hanamura, I., and Nitta, M. (2014). Adaptation of leukemia cells to hypoxic condition through switching the energy metabolism or avoiding the oxidative stress. *BMC Cancer*, 14:76.
- Gottlieb, D. J., Punjabi, N. M., Mehra, R., Patel, S. R., Quan, S. F., Babineau, D. C., Tracy, R. P., Rueschman, M., Blumenthal, R. S., Lewis, E. F., Bhatt, D. L., and Redline, S. (2014). CPAP versus oxygen in obstructive sleep apnea. *N. Engl. J. Med.*, 370(24):2276–2285.
- Graefe, K. H., Lutz, W., and Bönisch, H. (2011). *Duale Reihe - Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme, Stuttgart.
- Guasti, L., Marino, F., Cosentino, M., Maroni, L., Maresca, A. M., Colombo, F., Maio, R. C., Castiglioni, L., Saporiti, F., Loraschi, A., Gaudio, G., Bernasconi, A., Laurita, E., Grandi, A. M., and Venco, A. (2011). Cytokine production from peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear leukocytes in patients studied for suspected obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*, 15(1):3–11.
- Gui, T., Shimokado, A., Sun, Y., Akasaka, T., and Muragaki, Y. (2012). Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm.*, 2012:693083.
- Gungor, A. (2017). Advanced airway management strategies for severe OSAS and craniofacial anomalies. *Am J Otolaryngol*, 38(1):77–81.
- Haddad, J. J. (2002). Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor-kappaB. *Crit Care*, 6(6):481–490.
- Hajjar, D. P. and Haberland, M. E. (1997). Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J. Biol. Chem.*, 272(37):22975–22978.
- Harrison, T. R., Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, L., and Loscalzo, M. (2012). *Harrisons Innere Medizin - 18. Auflage*. ABW Wissenschaftsverlag, Berlin.
- Harvey, E. L., Glenny, A., Kirk, S. F., and Summerbell, C. D. (2001). Improving health professionals' management and the organisation of care for overweight and obese people. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD000984.

- Heinzer, R., Vat, S., Marques-Vidal, P., Marti-Soler, H., Andries, D., Tobback, N., Mooser, V., Preisig, M., Malhotra, A., Waeber, G., Vollenweider, P., Tafti, M., and Haba-Rubio, J. (2015). Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir Med*, 3(4):310–318.
- Hildebrandt, W., Kinscherf, R., Hauer, K., Holm, E., and Droge, W. (2002). Plasma cystine concentration and redox state in aging and physical exercise. *Mech. Ageing Dev.*, 123(9):1269–1281.
- Hildebrandt, W., Sauer, R., Bonaterra, G., Dugi, K. A., Edler, L., and Kinscherf, R. (2015). Oral N-acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentrations regardless of lipid or smoking status. *Am. J. Clin. Nutr.*, 102(5):1014–1024.
- Hla, K. M., Young, T., Hagen, E. W., Stein, J. H., Finn, L. A., Nieto, F. J., and Peppard, P. E. (2015). Coronary heart disease incidence in sleep disordered breathing: the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Sleep*, 38(5):677–684.
- Hoffmann, M. S., Singh, P., Wolk, R., Narkiewicz, K., and Somers, V. K. (2013). Obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia increase expression of dual specificity phosphatase 1. *Atherosclerosis*, 231(2):378–383.
- Hoffmann, M. S., Singh, P., Wolk, R., Romero-Corral, A., Raghavakaimal, S., and Somers, V. K. (2007). Microarray studies of genomic oxidative stress and cell cycle responses in obstructive sleep apnea. *Antioxid. Redox Signal.*, 9(6):661–669.
- Hopps, E. and Caimi, G. (2015). Obstructive Sleep Apnea Syndrome: Links Between Pathophysiology and Cardiovascular Complications. *Clin Invest Med*, 38(6):E362–370.
- Hugo, H. J., Saunders, C., Ramsay, R. G., and Thompson, E. W. (2015). New Insights on COX-2 in Chronic Inflammation Driving Breast Cancer Growth and Metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 20(3-4):109–119.
- Hung, J., Whitford, E. G., Parsons, R. W., and Hillman, D. R. (1990). Association of sleep apnoea with myocardial infarction in men. *Lancet*, 336(8710):261–264.
- Imani, M. M., Sadeghi, M., Khazaie, H., Emami, M., Sadeghi Bahmani, D., and Brand, S. (2020). Evaluation of Serum and Plasma Interleukin-6 Levels in Obstructive Sleep Apnea Syndrome: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *Front Immunol*, 11:1343.
- Ip, M. S., Lam, B., Ng, M. M., Lam, W. K., Tsang, K. W., and Lam, K. S. (2002). Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 165(5):670–676.
- Jaipersad, A. S., Lip, G. Y., Silverman, S., and Shantsila, E. (2014). The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 63(1):1–11.
- Jelic, S., Lederer, D. J., Adams, T., Padeletti, M., Colombo, P. C., Factor, P. H., and Le Jemtel, T. H. (2010). Vascular inflammation in obesity and sleep apnea. *Circulation*, 121(8):1014–1021.
- Jin, F., Liu, J., Zhang, X., Cai, W., Zhang, Y., Zhang, W., Yang, J., Lu, G., and Zhang, X. (2017). Effect of continuous positive airway pressure therapy on inflammatory cytokines and atherosclerosis in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Mol Med Rep*, 16(5):6334–6339.

- Jones, S. A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.*, 175(6):3463–3468.
- Jorgensen, S. B., O'Neill, H. M., Sylow, L., Honeyman, J., Hewitt, K. A., Palanivel, R., Fullerton, M. D., Oberg, L., Balendran, A., Galic, S., van der Poel, C., Trounce, I. A., Lynch, G. S., Schertzer, J. D., and Steinberg, G. R. (2013). Deletion of skeletal muscle SOCS3 prevents insulin resistance in obesity. *Diabetes*, 62(1):56–64.
- Karamanl, H., Ozol, D., Ugur, K. S., Yildirim, Z., Armutcu, F., Bozkurt, B., and Yigitoglu, R. (2014). Influence of CPAP treatment on airway and systemic inflammation in OSAS patients. *Sleep Breath*, 18(2):251–256.
- Karge, W. H., Schaefer, E. J., and Ordovas, J. M. (1998). Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method. *Methods Mol. Biol.*, 110:43–61.
- Kato, M., Roberts-Thomson, P., Phillips, B. G., Haynes, W. G., Winnicki, M., Accurso, V., and Somers, V. K. (2000). Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation*, 102(21):2607–2610.
- Kellerer, M. and Matthaei, S. (2012). Praxisempfehlungen der deutschen diabetes gesellschaft.
- Kent, B. D., McNicholas, W. T., and Ryan, S. (2015). Insulin resistance, glucose intolerance and diabetes mellitus in obstructive sleep apnoea. *J Thorac Dis*, 7(8):1343–1357.
- Kilic, K., Aktan, B., Sedat-Sakat, M., K?z?ltunc, A., and Yoruk, O. (2016). Vascular Endothelial Dysfunction Caused by Oxidative Stress is a Predictor Factor for Complications of Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *West Indian Med J*.
- Kinscherf, R., Cafaltzis, K., Roder, F., Hildebrandt, W., Edler, L., Deigner, H. P., Breikreutz, R., Feussner, G., Kreuzer, J., Werle, E., Michel, G., Metz, J., and Droge, W. (2003). Cholesterol levels linked to abnormal plasma thiol concentrations and thiol/disulfide redox status in hyperlipidemic subjects. *Free Radic. Biol. Med.*, 35(10):1286–1292.
- Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., and Silbernagl, S. (2010). *Physiologie*. Thieme, Stuttgart.
- Kohler, M., Ayers, L., Pepperell, J. C., Packwood, K. L., Ferry, B., Crosthwaite, N., Craig, S., Siccoli, M. M., Davies, R. J., and Stradling, J. R. (2009). Effects of continuous positive airway pressure on systemic inflammation in patients with moderate to severe obstructive sleep apnoea: a randomised controlled trial. *Thorax*, 64(1):67–73.
- Kraiczi, H., Caidahl, K., Samuelsson, A., Peker, Y., and Hedner, J. (2001). Impairment of vascular endothelial function and left ventricular filling : association with the severity of apnea-induced hypoxemia during sleep. *Chest*, 119(4):1085–1091.
- Kritikou, I., Basta, M., Vgontzas, A. N., Pejovic, S., Liao, D., Tsaoussoglou, M., Bixler, E. O., Stefanakis, Z., and Chrousos, G. P. (2014). Sleep apnoea, sleepiness, inflammation and insulin resistance in middle-aged males and females. *Eur. Respir. J.*, 43(1):145–155.

- Kumor, M., Bielicki, P., Barna, M., Przybyowski, T., Zieliski, J., and Chazan, R. (2013). Prevalence of metabolic syndrome diagnosis in patients with obstructive sleep apnoea syndrome according to adopted definition. *Pneumonol Alergol Pol*, 81(5):417–423.
- Kushida, C. A., Littner, M. R., Hirshkowitz, M., Morgenthaler, T. I., Alessi, C. A., Bailey, D., Boehlecke, B., Brown, T. M., Coleman, J., Friedman, L., Kapen, S., Kapur, V. K., Kramer, M., Lee-Chiong, T., Owens, J., Pancer, J. P., Swick, T. J., and Wise, M. S. (2006a). Practice parameters for the use of continuous and bilevel positive airway pressure devices to treat adult patients with sleep-related breathing disorders. *Sleep*, 29(3):375–380.
- Kushida, C. A., Morgenthaler, T. I., Littner, M. R., Alessi, C. A., Bailey, D., Coleman, J., Friedman, L., Hirshkowitz, M., Kapen, S., Kramer, M., Lee-Chiong, T., Owens, J., and Pancer, J. P. (2006b). Practice parameters for the treatment of snoring and Obstructive Sleep Apnea with oral appliances: an update for 2005. *Sleep*, 29(2):240–243.
- Lakka, H. M., Laaksonen, D. E., Lakka, T. A., Niskanen, L. K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., and Salonen, J. T. (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*, 288(21):2709–2716.
- Lavie, L., Dyugovskaya, L., and Lavie, P. (2005). Sleep-apnea-related intermittent hypoxia and atherogenesis: adhesion molecules and monocytes/endothelial cells interactions. *Atherosclerosis*, 183(1):183–184.
- Levy, P., Kohler, M., McNicholas, W. T., Barbe, F., McEvoy, R. D., Somers, V. K., Lavie, L., and Pepin, J. L. (2015). Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers*, 1:15015.
- Li, Q. and Zheng, X. (2017). Tumor necrosis factor alpha is a promising circulating biomarker for the development of obstructive sleep apnea syndrome: a meta-analysis. *Oncotarget*.
- Liang, X., He, M., Chen, T., Liu, Y., Tian, Y. L., Wu, Y. L., Zhao, Y., Shen, Y., and Yuan, Z. Y. (2013). Multiple roles of SOCS proteins: differential expression of SOCS1 and SOCS3 in atherosclerosis. *Int. J. Mol. Med.*, 31(5):1066–1074.
- Libby, P. and Aikawa, M. (2002). Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat. Med.*, 8(11):1257–1262.
- Liu, W., Reinmuth, N., Stoeltzing, O., Parikh, A. A., Tellez, C., Williams, S., Jung, Y. D., Fan, F., Takeda, A., Akagi, M., Bar-Eli, M., Gallick, G. E., and Ellis, L. M. (2003). Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res.*, 63(13):3632–3636.
- Loo, G., Koo, C. Y., Zhang, J., Li, R., Sethi, R., Ong, T. H., Tai, B. C., and Lee, C. H. (2014). Impact of obstructive sleep apnea on cardiovascular outcomes in patients treated with percutaneous coronary intervention: rationale and design of the sleep and stent study. *Clin Cardiol*, 37(5):261–269.
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.*, 30(1-2):42–59.
- Maeder, M. T., Strobel, W., Christ, M., Todd, J., Estis, J., Wildi, K., Thalmann, G., Hilti, J., Brutsche, M., Twerenbold, R., Rickli, H., and Mueller, C. (2015). Comprehensive biomarker profiling in patients with obstructive sleep apnea. *Clin. Biochem.*, 48(4-5):340–346.

- Mansego, M. L., Redon, J., Martinez-Hervas, S., Real, J. T., Martinez, F., Blesa, S., Gonzalez-Albert, V., Saez, G. T., Carmena, R., and Chaves, F. J. (2011). Different impacts of cardiovascular risk factors on oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 12(9):6146–6163.
- Marin, J. M., Carrizo, S. J., Vicente, E., and Agusti, A. G. (2005). Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet*, 365(9464):1046–1053.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., and Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7):412–419.
- Mayer, G., Arzt, M., Braumann, B., Ficker, J., Fietze, I., Frohnhofen, H., Galetke, W., Maurer, J., Orth, M., Penzel, T., Randerath, W., Rösslein, M., Sitter, H., and Stuck, B. (2017). *S3- Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen, Kapitel „Schlafbezogene Atmungsstörungen bei Erwachsenen“*. Springer, Berlin.
- McEvoy, R. D., Antic, N. A., Heeley, E., Luo, Y., Ou, Q., Zhang, X., Mediano, O., Chen, R., Drager, L. F., Liu, Z., Chen, G., Du, B., McArdle, N., Mukherjee, S., Tripathi, M., Billot, L., Li, Q., Lorenzi-Filho, G., Barbe, F., Redline, S., Wang, J., Arima, H., Neal, B., White, D. P., Grunstein, R. R., Zhong, N., and Anderson, C. S. (2016). CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N. Engl. J. Med.*, 375(10):919–931.
- Mesarwi, O. A., Sharma, E. V., Jun, J. C., and Polotsky, V. Y. (2015). Metabolic dysfunction in obstructive sleep apnea: A critical examination of underlying mechanisms. *Sleep Biol Rhythms*, 13(1):2–17.
- Milleron, O., Pilliere, R., Foucher, A., de Roquefeuil, F., Aegerter, P., Jondeau, G., Raffestin, B. G., and Dubourg, O. (2004). Benefits of obstructive sleep apnoea treatment in coronary artery disease: a long-term follow-up study. *Eur. Heart J.*, 25(9):728–734.
- Mohamed, K. M., Le, A., Duong, H., Wu, Y., Zhang, Q., and Messadi, D. V. (2004). Correlation between VEGF and HIF-1alpha expression in human oral squamous cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.*, 76(2):143–152.
- Monneret, D., Tamisier, R., Ducros, V., Faure, P., Halimi, S., Baguet, J. P., Levy, P., Pepin, J. L., and Borel, A. L. (2016). Glucose tolerance and cardiovascular risk biomarkers in non-diabetic non-obese obstructive sleep apnea patients: Effects of long-term continuous positive airway pressure. *Respir Med*, 112:119–125.
- Moore, T., Franklin, K. A., Holmstrom, K., Rabben, T., and Wiklund, U. (2001). Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 164(10 Pt 1):1910–1913.
- Moore, T., Rabben, T., Wiklund, U., Franklin, K. A., and Eriksson, P. (1996). Sleep-disordered breathing in men with coronary artery disease. *Chest*, 109(3):659–663.
- Moore, K. J. and Freeman, M. W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26(8):1702–1711.

- Moore, S., Spackman, D. H., and Stein, W. H. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed. Proc.*, 17(4):1107–1115.
- Mor, F., Quintana, F. J., and Cohen, I. R. (2004). Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J. Immunol.*, 172(7):4618–4623.
- Morishita, R., Franco, M. D., Souza, F. I., Sole, D., Puccini, R. F., and Strufaldi, M. W. (2015). Body mass index, adipokines and insulin resistance in asthmatic children and adolescents. *J Asthma*, pages 1–24.
- Murri, M., Garcia-Delgado, R., Alcazar-Ramirez, J., Fernandez de Rota, L., Fernandez-Ramos, A., Cardona, F., and Tinahones, F. J. (2011). Continuous positive airway pressure therapy reduces oxidative stress markers and blood pressure in sleep apnea-hypopnea syndrome patients. *Biol Trace Elem Res*, 143(3):1289–1301.
- Mysona, B., Dun, Y., Duplantier, J., Ganapathy, V., and Smith, S. B. (2009). Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system xc- in mouse retinal Müller glial cells. *Cell Tissue Res.*, 335(3):477–488.
- Nadeem, R., Molnar, J., Madbouly, E. M., Nida, M., Aggarwal, S., Sajid, H., Naseem, J., and Loomba, R. (2013). Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J Clin Sleep Med*, 9(10):1003–1012.
- Nieto, F. J., Young, T. B., Lind, B. K., Shahar, E., Samet, J. M., Redline, S., D'Agostino, R. B., Newman, A. B., Lebowitz, M. D., and Pickering, T. G. (2000). Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA*, 283(14):1829–1836.
- Nizam, N., Basoglu, O. K., Tasbakan, M. S., Nalbantsoy, A., and Buduneli, N. (2014). Salivary cytokines and the association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease. *J. Periodontol.*, 85(7):e251–258.
- O'Connor, G. T., Caffo, B., Newman, A. B., Quan, S. F., Rapoport, D. M., Redline, S., Resnick, H. E., Samet, J., and Shahar, E. (2009). Prospective study of sleep-disordered breathing and hypertension: the Sleep Heart Health Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 179(12):1159–1164.
- Pamidi, S., Wroblewski, K., Stepien, M., Sharif-Sidi, K., Kilkus, J., Whitmore, H., and Tasali, E. (2015). Eight Hours of Nightly Continuous Positive Airway Pressure Treatment of Obstructive Sleep Apnea Improves Glucose Metabolism in Patients with Prediabetes. A Randomized Controlled Trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 192(1):96–105.
- Park, Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.*, 46:e99.
- Parlapiano, C., Borgia, M. C., Minni, A., Alessandri, N., Basal, I., and Saponara, M. (2005). Cortisol circadian rhythm and 24-hour Holter arterial pressure in OSAS patients. *Endocr. Res.*, 31(4):371–374.
- Passali, D., Corallo, G., Yaremchuk, S., Longini, M., Proietti, F., Passali, G. C., and Bellussi, L. (2015). Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 35(6):420–425.

- Patel, R. S., Ghasemzadeh, N., Eapen, D. J., Sher, S., Arshad, S., Ko, Y. A., Veledar, E., Samady, H., Zafari, A. M., Sperling, L., Vaccarino, V., Jones, D. P., and Quyyumi, A. A. (2016). Novel Biomarker of Oxidative Stress Is Associated With Risk of Death in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*, 133(4):361–369.
- Peled, N., Shitrit, D., Bendayan, D., Peled, E., and Kramer, M. R. (2007). Association of elevated levels of vascular endothelial growth factor in obstructive sleep apnea syndrome with patient age rather than with obstructive sleep apnea syndrome severity. *Respiration*, 74(1):50–55.
- Peppard, P. E., Young, T., Palta, M., and Skatrud, J. (2000). Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 342(19):1378–1384.
- Preusch, M. R., Baeuerle, M., Albrecht, C., Blessing, E., Bischof, M., Katus, H. A., and Bea, F. (2013). GDF-15 protects from macrophage accumulation in a mousemodel of advanced atherosclerosis. *Eur. J. Med. Res.*, 18:19.
- Punjabi, N. M. and Beamer, B. A. (2007). C-reactive protein is associated with sleep disordered breathing independent of adiposity. *Sleep*, 30(1):29–34.
- Punjabi, N. M., Sorkin, J. D., Katzell, L. I., Goldberg, A. P., Schwartz, A. R., and Smith, P. L. (2002). Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 165(5):677–682.
- Qureshi, W. T., Nasir, U. B., Alqalyoobi, S., O'Neal, W. T., Mawri, S., Sabbagh, S., Soliman, E. Z., and Al-Mallah, M. H. (2015). Meta-Analysis of Continuous Positive Airway Pressure as a Therapy of Atrial Fibrillation in Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Cardiol.*
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., and Deutzmann, R. (2012). Duale reihe - biochemie. 3. Auflage:689–692.
- Ruscitti, P., Cipriani, P., Di Benedetto, P., Liakouli, V., Berardicurti, O., Carubbi, F., Ciccia, F., Alvaro, S., Triolo, G., and Giacomelli, R. (2015). Monocytes from patients with rheumatoid arthritis and type 2 diabetes mellitus display an increased production of interleukin (IL)-1 via the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing family pyrin 3(NLRP3)-inflammasome activation: a possible implication for therapeutic decision in these patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 182(1):35–44.
- Ryan, S., Taylor, C. T., and McNicholas, W. T. (2006). Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 174(7):824–830.
- Salord, N., Fortuna, A. M., Monasterio, C., Gasa, M., Perez, A., Bonsignore, M. R., Vilarrasa, N., Montserrat, J. M., and Mayos, M. (2015). A Randomized Controlled Trial of Continuous Positive Airway Pressure on Glucose Tolerance in Obese Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Sleep*.
- Sari, K., Ede, H., Kapusuz Gencer, Z., Ozkiris, M., Gocmen, A. Y., and Intepe, Y. S. (2015). The correlation of serum growth differentiation factor-15 level in patients with obstructive sleep apnea. *Biomed Res Int*, 2015:807683.
- Schildberger, A., Rossmannith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., and Weber, V. (2013). Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.*, 2013:697972.

- Schulte, H., Cullen, P., and Assmann, G. (1999). Obesity, mortality and cardiovascular disease in the Münster Heart Study (PROCAM). *Atherosclerosis*, 144(1):199–209.
- Schulz, R., Hummel, C., Heinemann, S., Seeger, W., and Grimminger, F. (2002). Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 165(1):67–70.
- Schulz, R., Schmidt, D., Blum, A., Lopes-Ribeiro, X., Lucke, C., Mayer, K., Olschewski, H., Seeger, W., and Grimminger, F. (2000). Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax*, 55(12):1046–1051.
- Shahar, E., Whitney, C. W., Redline, S., Lee, E. T., Newman, A. B., Nieto, F. J., O'Connor, G. T., Bolland, L. L., Schwartz, J. E., and Samet, J. M. (2001). Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 163(1):19–25.
- Shamsuzzaman, A. S., Winnicki, M., Lanfranchi, P., Wolk, R., Kara, T., Accurso, V., and Somers, V. K. (2002). Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation*, 105(21):2462–2464.
- Singh, T. D., Patial, K., Vijayan, V. K., and Ravi, K. (2009). Oxidative stress and obstructive sleep apnoea syndrome. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 51(4):217–224.
- Somers, V. K., Dyken, M. E., Clary, M. P., and Abboud, F. M. (1995). Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J. Clin. Invest.*, 96(4):1897–1904.
- Spartano, N. L., Lamon-Fava, S., Matthan, N. R., Ronxhi, J., Greenberg, A. S., Obin, M. S., and Lichtenstein, A. H. (2014). Regulation of ATP-binding cassette transporters and cholesterol efflux by glucose in primary human monocytes and murine bone marrow-derived macrophages. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 122(8):463–468.
- Steiropoulos, P., Kotsianidis, I., Nena, E., Tsara, V., Gounari, E., Hatzizisi, O., Kyriazis, G., Christaki, P., Froudarakis, M., and Bouros, D. (2009). Long-term effect of continuous positive airway pressure therapy on inflammation markers of patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep*, 32(4):537–543.
- Strand, L. B., Carnethon, M., Biggs, M. L., Djousse, L., Kaplan, R. C., Siscovick, D. S., Robbins, J. A., Redline, S., Patel, S. R., Janszky, I., and Mukamal, K. J. (2015). Sleep Disturbances and Glucose Metabolism in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Diabetes Care*.
- Strollo, P. J. and Rogers, R. M. (1996). Obstructive sleep apnea. *N. Engl. J. Med.*, 334(2):99–104.
- Stuck, B. A., Leitzbach, S., and Maurer, J. T. (2012). Effects of continuous positive airway pressure on apnea-hypopnea index in obstructive sleep apnea based on long-term compliance. *Sleep Breath*, 16(2):467–471.
- Sullivan, K. E., Reddy, A. B., Dietzmann, K., Suriano, A. R., Kocieda, V. P., Stewart, M., and Bhatia, M. (2007). Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell. Biol.*, 27(14):5147–5160.

- Suzuki, K., Nakata, S., Tagaya, M., Yasuma, F., Moral, S., Miyao, E., Tsuiki, S., and Nakashima, T. (2014). Prediction of oral appliance treatment outcome in obstructive sleep apnoea syndrome: a preliminary study. *B-ENT*, 10(3):185–191.
- Syu, J. P., Chi, J. T., and Kung, H. N. (2016). Nrf2 is the key to chemotherapy resistance in MCF7 breast cancer cells under hypoxia. *Oncotarget*, 7(12):14659–14672.
- Takahashi, S., Nakamura, Y., Nishijima, T., Sakurai, S., and Inoue, H. (2005). Essential roles of angiotensin II in vascular endothelial growth factor expression in sleep apnea syndrome. *Respir Med*, 99(9):1125–1131.
- Tamisier, R., Pepin, J. L., Remy, J., Baguet, J. P., Taylor, J. A., Weiss, J. W., and Levy, P. (2011). 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur. Respir. J.*, 37(1):119–128.
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F. C., Cummins, E., Nizet, V., Whyte, M., Taylor, C. T., Lin, H., Masters, S. L., Gottlieb, E., Kelly, V. P., Clish, C., Auron, P. E., Xavier, R. J., and O'Neill, L. A. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 through HIF-1. *Nature*, 496(7444):238–242.
- Tarling, E. J. and Edwards, P. A. (2011). ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(49):19719–19724.
- Teramoto, S., Kume, H., Yamamoto, H., Ishii, T., Miyashita, A., Matsuse, T., Akishita, M., Toba, K., and Ouchi, Y. (2003). Effects of oxygen administration on the circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern. Med.*, 42(8):681–685.
- Terasaka, N., Yu, S., Yvan-Charvet, L., Wang, N., Mzhavia, N., Langlois, R., Pagler, T., Li, R., Welch, C. L., Goldberg, I. J., and Tall, A. R. (2008). ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J. Clin. Invest.*, 118(11):3701–3713.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, 75(2-3):291–295.
- Tietjens, J. R., Claman, D., Kezirian, E. J., De Marco, T., Mirzayan, A., Sadroonri, B., Goldberg, A. N., Long, C., Gerstenfeld, E. P., and Yeghiazarians, Y. (2019). Obstructive Sleep Apnea in Cardiovascular Disease: A Review of the Literature and Proposed Multidisciplinary Clinical Management Strategy. *J Am Heart Assoc*, 8(1):e010440.
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, 27(3):502–522.
- Tsai, V. W., Macia, L., Johnen, H., Kuffner, T., Manadhar, R., Jørgensen, S. B., Lee-Ng, K. K., Zhang, H. P., Wu, L., Marquis, C. P., Jiang, L., Husaini, Y., Lin, S., Herzog, H., Brown, D. A., Sainsbury, A.,

- and Breit, S. N. (2013). TGF- β superfamily cytokine MIC-1/GDF15 is a physiological appetite and body weight regulator. *PLoS ONE*, 8(2):e55174.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3(7):RESEARCH0034.
- Volpe, C. M., Abreu, L. F., Gomes, P. S., Gonzaga, R. M., Veloso, C. A., and Nogueira-Machado, J. A. (2014). The production of nitric oxide, IL-6, and TNF- α in palmitate-stimulated PBMNCs is enhanced through hyperglycemia in diabetes. *Oxid Med Cell Longev*, 2014:479587.
- Wahlin Larsson, B., Kadi, F., Ulfberg, J., and Piehl Aulin, K. (2008). Skeletal muscle morphology and aerobic capacity in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Respiration*, 76(1):21–27.
- Won, C. H., Li, K. K., and Guilleminault, C. (2008). Surgical treatment of obstructive sleep apnea: upper airway and maxillomandibular surgery. *Proc Am Thorac Soc*, 5(2):193–199.
- Wong, H. R., Ryan, M., and Wispe, J. R. (1997). Stress response decreases NF- κ B nuclear translocation and increases I- κ B α expression in A549 cells. *J. Clin. Invest.*, 99(10):2423–2428.
- Wu, S. H., Hui, W. S., Liu, Z., and Ho, S. C. (2010). Metabolic syndrome and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Epidemiol.*, 25(6):375–384.
- Wysocka, E., Cofta, S., Cymerys, M., Gozdzik, J., Torlinski, L., and Batura-Gabryel, H. (2008). The impact of the sleep apnea syndrome on oxidant-antioxidant balance in the blood of overweight and obese patients. *J. Physiol. Pharmacol.*, 59 Suppl 6:761–769.
- Xie, W., Zheng, F., and Song, X. (2014). Obstructive sleep apnea and serious adverse outcomes in patients with cardiovascular or cerebrovascular disease: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 93(29):e336.
- Xie, X., Pan, L., Ren, D., Du, C., and Guo, Y. (2013). Effects of continuous positive airway pressure therapy on systemic inflammation in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Med.*, 14(11):1139–1150.
- Yaggi, H. K., Concato, J., Kernan, W. N., Lichtman, J. H., Brass, L. M., and Mohsenin, V. (2005). Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N. Engl. J. Med.*, 353(19):2034–2041.
- Yamauchi, M., Nakano, H., Maekawa, J., Okamoto, Y., Ohnishi, Y., Suzuki, T., and Kimura, H. (2005). Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest*, 127(5):1674–1679.
- Yang, X. H., Liu, X., Shang, J., Liu, H. G., and Xu, Y. J. (2013). [Correlation between the serum level of advanced oxidation protein products and the cognitive function in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 36(4):274–279.
- Yaranov, D. M., Smyrlis, A., Usatii, N., Butler, A., Petrini, J. R., Mendez, J., and Warshofsky, M. K. (2015). Effect of obstructive sleep apnea on frequency of stroke in patients with atrial fibrillation. *Am. J. Cardiol.*, 115(4):461–465.

- Yatsuga, S., Fujita, Y., Ishii, A., Fukumoto, Y., Arahata, H., Kakuma, T., Kojima, T., Ito, M., Tanaka, M., Saiki, R., and Koga, Y. (2015). Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann. Neurol.*, 78(5):814–823.
- Yehuda, H., Szuchman-Sapir, A., Khatib, S., Musa, R., and Tamir, S. (2011). Human atherosclerotic plaque lipid extract promotes expression of proinflammatory factors in human monocytes and macrophage-like cells. *Atherosclerosis*, 218(2):339–343.
- Yildirim, Y., Yilmaz, S., Guven, M., Klnç, F., Kara, A. V., Yilmaz, Z., K?rba?, G., Tuzcu, A. K., and Yilmaz Aydn, F. (2015). Evaluation of Anthropometric and Metabolic Parameters in Obstructive Sleep Apnea. *Pulm Med*, 2015:189761.
- Yla-Herttuala, S., Rissanen, T. T., Vajanto, I., and Hartikainen, J. (2007). Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 49(10):1015–1026.
- Yokoe, T., Minoguchi, K., Matsuo, H., Oda, N., Minoguchi, H., Yoshino, G., Hirano, T., and Adachi, M. (2003). Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation*, 107(8):1129–1134.
- Yokogami, K., Yamashita, S., and Takeshima, H. (2013). Hypoxia-induced decreases in SOCS3 increase STAT3 activation and upregulate VEGF gene expression. *Brain Tumor Pathol*, 30(3):135–143.
- Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., and Badr, S. (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N. Engl. J. Med.*, 328(17):1230–1235.
- Young, T., Peppard, P. E., and Gottlieb, D. J. (2002a). Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 165(9):1217–1239.
- Young, T., Shahar, E., Nieto, F. J., Redline, S., Newman, A. B., Gottlieb, D. J., Walsleben, J. A., Finn, L., Enright, P., and Samet, J. M. (2002b). Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch. Intern. Med.*, 162(8):893–900.
- Yu, C., Cai, X., Wen, Z., Liang, D., Hu, Q., Ni, L., and Lin, J. (2015). [A comparative study on efficiency of different therapeutics methods used for obstructive sleep apnea hypopnea syndrome in children]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 53(3):172–177.
- Zampieri, M., Ciccarone, F., Guastafierro, T., Bacalini, M. G., Calabrese, R., Moreno-Villanueva, M., Reale, A., Chevanne, M., Burkle, A., and Caiafa, P. (2010). Validation of suitable internal control genes for expression studies in aging. *Mech. Ageing Dev.*, 131(2):89–95.
- Zhang, M. and Huang, B. (2012). The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res Ther*, 3(6):48.
- Zhang, X., Liu, R. Y., Lei, Z., Zhu, Y., Huang, J. A., Jiang, X., Liu, Z., Liu, X., Peng, X., Hu, H., and Zhang, H. T. (2009). Genetic variants in interleukin-6 modified risk of obstructive sleep apnea syndrome. *Int. J. Mol. Med.*, 23(4):485–493.

- Zhong, A., Xiong, X., Shi, M., and Xu, H. (2016). Roles of interleukin (IL)-6 gene polymorphisms, serum IL-6 levels, and treatment in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath*, 20(2):719–731.
- Zhong, H. and Simons, J. W. (1999). Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 259(3):523–526.
- Zhu, J., Li, S., Marshall, Z. M., and Whorton, A. R. (2008). A cystine-cysteine shuttle mediated by xCT facilitates cellular responses to S-nitrosoalbumin. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 294(4):C1012–1020.
- Zimmers, T. A., Jin, X., Hsiao, E. C., McGrath, S. A., Esquela, A. F., and Koniaris, L. G. (2005). Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock*, 23(6):543–548.
- Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A., and Maini, R. N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.*, 2(6):477–488.

Eigene Publikationen

Abstracts und Poster:

Boneberg R., Pawlak D., Bonaterra G., Keppler C., Schwarzbach H., Pardun A., Hannemann L., Bogs B., Hildebrandt O., Koehler U., Wilhelm B., Kinscherf R., Hildebrandt W. (2016)

„Pro-atherogenic gene expression of peripheral blood mononuclear cells in patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS): Impact of obesity and CPAP“;

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V. in Rauschholzhausen 2016

Abstract book: 65

König A., Hildebrandt O., Koehler U., Hannemann L., Bogs B., **Boneberg R.**, Mahnken A.H., Kinscherf R., Hildebrandt W. (2016)

„IH-MRS von Lipid-Akkumulation im Skelettmuskel bei obstruktiver Schlafapnoe mit/ohne Adipositas“;

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V. in Rauschholzhausen 2016

Hildebrandt W., Schwarzbach H., Bogs B., Pardun A., Hannemann L., Pawlak D., **Boneberg R.**, Dreher M., Bonaterra G., Wilhelm B., Mayr P., Hildebrandt O., Koehler U., Kinscherf R.

„Impaired capillarisation and in-vivo microcirculation of skeletal muscle with obstructive sleep apnea: A novel link to insulin resistance?“

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V. in Rauschholzhausen 2016

Hannemann L., Schwarzbach H., Bogs B., Pardun A., **Boneberg R.**, Pawlak D., Mayr P., Hildebrandt O., Koehler U., Kinscherf R., Hildebrandt W.

„Non-invasive limb microvascular parameters in obese and non-obese patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS): Relation to muscle capillarisation“

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademische Lehrer waren die folgenden Damen und Herren in Marburg:

Im ersten Studienabschnitt: Adamkiewicz, Baranovski, Baranovski, Bauer, Baum, Becker, Berger, Bertoune, Bette, Brehm, Cetin, Decher, Del Rey, Feuser, Grundmann, Grzeschik, Hemmeter, Hildebrandt, Jerrentrup, Kill, Kinscherf, Koolman, Lill, Mueller, Mutters, Müller, Neumüller, Oberthür, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Quint, Reese, Renz, Rivera Gil, Rost, Sahmland, Schäfer, Schratt, Seitz, Schütz, Stahl, Steiniger, Steinmetzer, Thieme, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wrocklage, Wulf

Im zweiten Studienabschnitt: Adarkwah, Albers, Arhelger, Baum, Bäumlein, Bartsch, Becker, Berger, Birk, Bliemel, Bösner, Bücking, Burchert, Carl, Cassebaum, Czubayko, Dettmeyer, Dodel, Donner- Banzhoff, Duda, Eberhardt, Eggers, Eggert, Ehlenz, Eickmann, Ermisch, Fuchs-Winkelmann, Franz, Frink, Fritz, Fuest, Geks, Geraedts, Gousias, Grgic, Hartinger, Häußermann, Hemeter, Hertl, Hoch, Hoß, Hoyer, Hundt, Irsusi, Jansen, Jaques, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kanngießer, Kerl, Kircher, Kirschbaum, Klose, Kluge, Knake, Knipper, Knöppel, Koehler, Köhler, Kolb-Niemann, Kortus-Götze, Kühnert, Kruse, Leonhardt, Lohoff, Lübbe, Luster, Maier, Maier, Maisner, Menzler, Metzelder, Mirow, Moll, Neubauer, Neubert, Nimsky, Nockher, Oberkircher, Oertel, Pagenstecher, Pankuweit, Pehl, Peterlein, Pfaar, Pfeiffer, Pfestroff, Pfützner, Plant, Prntz, Reese, Renz, Richter, Riße, Roeßler, Rose, Röttgers, Ruchholtz, Schäger, Schieffer, Schlößler, Schneider, Schreinert, Schu, Schulze, Schüttler, Schröder, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevnic, Sommer, Stula, Tackenberg, Thiemer, Timmermann, Vogel, Völlger, Wagner, Waldthausen, Walter, Westhoff, Wittig, Worzfeld, Wulff, Zavarotnyy, Zeisberger, Ziller, Zink, Ziring, Zwiorek

Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf Kinscherf für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie absolvieren zu dürfen. Darüber hinaus danke ich für die Übernahme meiner Arbeit und die zur Verfügungstellung des Arbeitsplatzes sowie der Materialien.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wulf Hildebrandt für die Bereitstellung des Themas, die zahlreichen Ideen, fachlichen Ratschläge und seine exzellente Betreuung über die gesamten Jahre hinweg. Zudem danke ich ihm für seine Geduld, die Korrekturvorschläge, die zahlreichen kreativen Gespräche und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Auch möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Arbeit auf der Jahrestagung 2016 der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V. vorstellen durfte.

Herr Dr. Bonaterra danke ich für seine stetige Hilfsbereitschaft und seine zahlreichen Tipps, die zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Köhler für die intensive Zusammenarbeit mit dem Schlaflabor. Danken möchte ich auch dem gesamten Team des interdisziplinären schlafmedizinischen Zentrums in Marburg für die kollegiale Zusammenarbeit.

Großer Dank geht an Frau Claudia Keppler für ihre unermüdlichen Erklärungen, Hilfestellungen und Tipps bei der Durchführung der Untersuchungen im Labor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie. Zudem möchte ich ihr für die sehr freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Dem gesamten Team des Instituts danke ich für die Hilfsbereitschaft und die kollegiale Zusammenarbeit.

Großen Dank möchte ich meiner Schwester, Dominika Sörgel, aussprechen, die mit ihrer unermüdlichen Bereitschaft und Hilfe mir den Umgang mit dem Programm LaTeX sehr erleichtert hat. Zudem danke ich ihr für die zahlreichen Korrekturvorschläge und ihre Unterstützung bei statistischen Fragen.

Des Weiteren möchte ich meinen Freundinnen und Freunden danken, die mich während der gesamten Zeit sehr unterstützt und motiviert haben. Ganz besonders danke ich meiner Frau Aline Boneberg und Fjodor Bobka für ihre tatkräftige Unterstützung und ihre Korrekturvorschläge.

Ebenso geht an alle ein Dankeschön, die nicht namentliche Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung, Liebe und Geduld die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.