

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Abteilung Medizinische Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Effekt chronisch-intermittierender Hypoxie auf
inflammatorische Parameter der Leber im Wildtyp und iNOS-
KO-Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Annika Katharina Peters (geb. Stuft)
aus Neuss

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. W. Hildebrandt

Korreferent: Prof. (apl.) Dr. rer nat. M. Buchholz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	11
1 Einleitung	12
1.1 Definition des Obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms (OSAS)	12
1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren des OSAS	13
1.3 Pathophysiologie des OSAS	14
1.4 Diagnose und Symptomatik des OSAS	15
1.5 OSAS als kardiovaskulärer Risikofaktor	16
1.6 Leberveränderungen bei OSAS	19
1.7 Therapie des OSAS	22
1.8 CIH-Mausmodell des OSAS	25
1.9 NO-Synthasen und das OSAS	26
1.10 Leberveränderungen bei iNOS-gendefizienten (KO-)Mäusen	28
1.11 Ziel der Arbeit	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.2 Methoden	37
3 Ergebnisse	50
3.1 Effekt von CIH auf die hepatische Expression proinflammatorischer Marker im WT	50
3.2 Effekt von CIH auf den hepatischen Glykogenspeicher im WT	56
3.3 Effekt von CIH auf die hepatische Expression von Ki-67 auf Proteinebene im WT	59
3.4 Effekt von CIH auf die hepatische Expression der Glutaminsynthetase (GS) auf Proteinebene im WT	62
3.5 Effekt von CIH auf die hepatische Expression von iNOS-RNA	63
3.6 Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die hepatische Expression von proinflammatorischen Transkripten (COX-1, CD68, Il-1 β , Il-6 und TNF- α)	63

Inhaltsverzeichnis

3.7	Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die hepatische Expression von SOCS-3-RNA	65
3.8	Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die hepatische Expression von angiogenen Transkripten (KDR, VEGF-A und VEGF-B)	66
3.9	Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die hepatische Expression von Transkripten der Scavenger-Rezeptoren (CD36 und LOX-1)	67
4	Diskussion	69
4.1	Das Mausmodell der CIH	69
4.2	Effekt von CIH auf die hepatische Expression von iNOS im WT.....	71
4.3	Effekt von CIH und iNOS-KO auf Inflammationsmarker (COX-1, COX-2, CD68, Il-1 β , Il-6, TNF- α)	72
4.4	Effekt von CIH und iNOS-KO auf SOCS-3.....	78
4.5	Effekt von CIH und iNOS-KO auf die Angiogenese in der Leber.....	79
4.6	Effekt von CIH und iNOS-KO auf Scavenger-Rezeptoren in der Leber	80
4.7	Effekt von CIH auf die Speicherung und zonale Verteilung von Glykogen im WT	82
4.8	Effekt von CIH auf Ki-67 und die zonale Verteilung von Ki-67 im WT.....	84
4.9	Effekt von CIH auf die Glutaminsynthetase (GS)	85
5	Zusammenfassung.....	87
6	Summary.....	89
7	Literaturverzeichnis	91
8	Ehrenwörtliche Erklärung	114
9	Tabellarischer Lebenslauf	115
10	Verzeichnis der akademischen Lehrer	117
11	Danksagung.....	118

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
A.	Arterie (Arteria)
AASM	The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force
Abb.	Abbildung
AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
Aqua dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BMI	Body-Mass-Index
bzgl.	bezüglich
C°	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalziumion
CD36 (FAT)	Cluster of Differentiation 36 (fatty acid translocase)
CD68	Cluster of Differentiation 68
cDNA	komplementäre DNS (complementary DNA)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphat)
CIH	chronisch-intermittierende Hypoxie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EMG	Elektromyogramm
EOG	Elektrookulogramm
et al.	und andere (et alii/aliae/aliam)

Abkürzungsverzeichnis

e.V.	eingetragener Verein
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion (fraction of inspired oxygen)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GT	Glissontrias
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor)
HIF	Hypoxia inducible factor
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1-alpha
HIF-2 α	Hypoxia inducible factor-2-alpha
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IFN- γ	Interferon gamma
Il-1 β	Interleukin-1-beta
Il-6	Interleukin-6
K ⁺	Kaliumion
KDR	Kinase insert domain receptor
kg	Kilogramm
KO	knockout
l	Liter
LAUP	Laser-assistierte Uvulopalatoplastik
LOX-1 (OLR-1)	lectin-type oxidized LDL receptor 1 (Oxidized low-density lipoprotein receptor 1)
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
m ²	Quadratmeter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
N ₂	Stickstoff
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAFL	nichtalkoholische Fettleber (nonalcoholic liver)
NAFLD	nichtalkoholische Fettlebererkrankung (nonalcoholic fatty liver disease)
NASH	nichtalkoholische Fettleberhepatitis (nonalcoholic steatohepatitis)
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoff-Synthase
NOS1 (nNOS)	neuronale Stickstoff-Synthase
NOS2 (iNOS)	induzierbare Stickstoff-Synthase
NOS3 (eNOS)	endotheliale Stickstoff-Synthase
NOX	Normoxie
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NSS	Normal-Schweineserum
NPS	Normal-Pferdeserum
O ₂	Sauerstoff
ODI	oxygen desaturation index
o. g.	oben genannte

Abkürzungsverzeichnis

ONOO ⁻	Peroxinitrit (peroxynitrite)
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
ox-LDL	oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
PAS-Reaktion	Period acid-Schiff reaction
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real time quantitative polymerase chain reaction)
REM	Rapid eye movement
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0
rpm	Umdrehung pro Minute (revolutions per minute)
s	Sekunde
SaO ₂	Sauerstoffsättigung
SBAS	Schlafbezogene Atmungsstörungen
SCD-1	Stearoyl coenzyme A desaturase 1
sGC	lösliche Guanylatzyklase (Soluble guanylyl cyclase)
SOCS-3	Suppressor of cytokine signaling-3
sog.	sogenannt
SREBP1	Sterol regulatory element binding protein 1
Tbp	TATA-binding protein
TE	Tonsillektomie
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
u. a.	unter anderem
u. a. m.	und andere(s) mehr
UPPP	Uvulopalatopharyngoplastik
UPS	Unterkieferprotrusionsschiene
V.	Vene (Vena)
VEGF-A/B	Vascular Endothelial Growth Factor-A/B
vgl.	vergleiche

Abkürzungsverzeichnis

VLDL	Very-low-Density-Lipoprotein
vs.	versus
WT	Wildtyp
x-fold change	x-fache Veränderung
z. B.	zum Beispiel
ZV	Zentralvene
zw.	zwischen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnosekriterien OSAS

Für die Diagnose des OSAS müssen mindestens ein $AHI \geq 5$ sowie OSAS-typische Symptome vorliegen (Banno und Kryger, 2007).

Abbildung 2: OSAS als kardiovaskulärer Risikofaktor

Schematische Zusammenfassung der Pathomechanismen der kardiovaskulären Erkrankungen und OSAS (Zamarron et al., 2013).

Abbildung 3: Darstellung der Vorgehensweise bei der Auswertung der (immun-)histologischen Bilder am Beispiel von CD68; Vergrößerung 10-fach

ZV unbearbeitet (links), ZV-Lumen vermessen und positive Zellen markiert (rechts)
a: maximaler Durchmesser, b: senkrechte Lumenweite zum maximalen Durchmesser, c (Radius) = $a + b$, d: Kreis, x: positive Zellen.

Abbildung 4: GS, Immunhistochemie im WT

Immunhistochemie GS original (oben links), Gesamtfläche (oben rechts), positiv gefärbte Zellen (unten links).

Abbildung 5: Effekt von CIH auf COX-2 im WT

Anteil (in %) der COX-2-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche im Lebergewebe unter NOX (n = 8) und unter CIH (n = 8). Gezeigt sind MW +/- SD; NOX vs. CIH $p = 0,12$.

Abbildung 6: Effekt von CIH auf COX-2 im WT

Immunlokalisation von COX-2-positiven Zellen in Beispielen für A) ZV, NOX; B) GT, NOX; C) ZV, CIH und D) GT, CIH
Vergrößerung 10-fach. Positiv gefärbte Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet.

Abbildung 7: Effekt von CIH auf CD68 im WT

Anteil (Zellzahl/ m^2) der CD68-positiven Zellen pro Fläche im Lebergewebe unter NOX (n = 8) und unter CIH (n = 8). Gezeigt sind MW +/- SD; NOX vs. CIH $p = 0,92$.

Abbildung 8: Effekt von CIH auf CD68 im WT

Immunlokalisation von CD68-positiven Zellen in Beispielen für A) ZV, NOX; B) GT, NOX; C) ZV, CIH und D) GT, CIH
Vergrößerung 10-fach. Positiv gefärbte Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet.

Abbildung 9: Effekt von CIH auf die zonale Verteilung von COX-2 im WT

Anteil (in %) der COX-2-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche um ZV (n = 8) und GT (n = 8) im Lebergewebe unter NOX und unter CIH. Gezeigt sind MW +/- SD.

Abbildung 10: Effekt von CIH auf die zonale Verteilung von CD68 im WT

Anteil (Zellzahl/ m^2) der CD68-positiven Zellen pro Fläche um ZV (n = 8) und GT (n = 8) im Lebergewebe unter NOX und unter CIH. Gezeigt sind MW +/- SD.

Abbildung 11: Effekt von CIH auf Glykogen im WT

Anteil (in %) der PAS-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche im Lebergewebe unter NOX (n = 8) und unter CIH (n = 8). Gezeigt sind MW +/- SD; NOX vs. CIH p = 0,93.

Abbildung 12: Effekt von CIH auf Glykogen im WT

Darstellung PAS-positiver Zellen in Beispielen für A) ZV, NOX; B) GT, NOX; C) ZV, CIH und D) GT, CIH
Vergrößerung 10-fach. Positiv gefärbte Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet.

Abbildung 13: Effekt von CIH auf die zonale Verteilung von Glykogen im WT

Anteil (in %) der PAS-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche um ZV (n = 8) und GT (n = 8) im Lebergewebe unter NOX und unter CIH. Gezeigt sind MW +/- SD.

Abbildung 14: Effekt von CIH auf Ki-67 im WT

Anteil (in %) der Ki-67-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche im Lebergewebe unter NOX (n = 8) und unter CIH (n = 8). Gezeigt sind MW +/- SD; NOX vs. CIH: p = 0,85.

Abbildung 15: Effekt von CIH auf Ki-67 im WT

Immunlokalisation von Ki-67-positiven Zellen in Beispielen für A) ZV, NOX; B) GT, NOX; C) ZV, CIH und D) GT, CIH
Vergrößerung 10-fach. Positiv gefärbte Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet.

Abbildung 16: Effekt von CIH auf die zonale Verteilung von Ki-67 IM WT

Anteil (in %) der Ki-67-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche um GT (n = 8) und ZV (n = 8) im Lebergewebe unter NOX und unter CIH. Gezeigt sind MW +/- SD.

Abbildung 17: Effekt von CIH auf die GS im WT

Anteil (in %) der immunhistochemisch GS-positiven Fläche bezogen auf die Gesamtfläche im Lebergewebe unter NOX (n = 8) und unter CIH (n = 8) Mäusen. Gezeigt sind MW +/- SD; NOX vs. CIH p = 0,70.

Abbildung 18: Effekt von CIH auf die Expression von iNOS im WT

iNOS-Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im Lebergewebe unter CIH relativ zu NOX (Referenzgruppe).

Abbildung 19: Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die RNA-Expression von COX-1, CD68, Il-1β, Il-6 und TNF-α

Relative Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) der proinflammatorischen Marker (COX-1, CD68, Il-1β, Il-6 und TNF-α) im Lebergewebe von WT CIH, iNOS-KO NOX und iNOS-KO CIH bezogen auf WT NOX (Referenzgruppe).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die RNA-Expression von SOCS-3

Relative SOCS-3-Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im Lebergewebe von WT CIH, iNOS-KO NOX und iNOS-KO CIH bezogen auf WT NOX (Referenzgruppe).

Abbildung 21: Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die RNA-Expression von KDR, VEGF-A und VEGF-B

Relative Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) der angiogenen Transkripte (KDR, VEGF-A und VEGF-B) im Lebergewebe von WT CIH, iNOS-KO NOX und iNOS-KO CIH bezogen auf WT NOX (Referenzgruppe).

Abbildung 22: Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die RNA-Expression von CD36 und LOX-1

Relative Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) der Scavenger-Rezeptoren (CD36 und LOX-1) im Lebergewebe von WT CIH, iNOS-KO NOX und iNOS-KO CIH bezogen auf WT NOX (Referenzgruppe).

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Klassifikation des Schlafapnoe-Syndroms nach ICD-10 (Krollner, 2020)
- Tabelle 2: Einteilung des Schweregrades des OSAS nach Recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research (AASM, 1999)
- Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte
- Tabelle 4: Liste der verwendeten Gebrauchsartikel
- Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien
- Tabelle 6: Liste der verwendeten Primärantikörper
- Tabelle 7: Liste der verwendeten Sekundärantikörper
- Tabelle 8: Liste der verwendeten Zielgene
- Tabelle 9: Liste der verwendeten Housekeeping-Gene
- Tabelle 10: Liste der verwendeten gebrauchsfertigen Systeme
- Tabelle 11: Liste der verwendeten Software
- Tabelle 12: Primär- und Sekundärantikörper, Verdünnung und Blockierung

1 Einleitung

1.1 Definition des Obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms (OSAS)

Das OSAS gehört zu den schlafbezogenen Atmungsstörungen (SBAS), deren Gemeinsamkeit die im Schlaf auftretenden, erstmalig im Jahre 1976 bei Kindern beschriebenen Atemstillstände (Apnoen) sind (Guilleminault et al., 1976). Hinsichtlich der steigenden Prävalenz in der Weltbevölkerung hat das OSAS an Bedeutung gewonnen (Schäfer et al., 1996; Toraldo et al., 2017; Benjafiel et al., 2019; Faber et al., 2019) und ist die am häufigsten vorkommende SBAS (Sankri-Tarbichi, 2012).

G47.-	Schlafstörungen
G47.3	Schlafapnoe
	Exkl.: Pickwick-Syndrom (E66.29 Schlafapnoe beim Neugeborenen
G47.30	Zentrales Schlafapnoe-Syndrom
G47.31	Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom (OSAS)
G47.38	Sonstige Schlafapnoe
G47.39	Schlafapnoe, nicht näher bezeichnet

Tabelle 1: Klassifikation des Schlafapnoe-Syndroms nach ICD-10 (Krollner, 2020)

Definitionsgemäß wird bei einer Reduktion des Atemflusses um 30–50 % von einer Hypopnoe bzw. um 90 % von einer Apnoe gesprochen, die mit einem signifikanten Abfall der Sauerstoffsättigung einhergehen und schließlich zu einer Weckreaktion (Arousal) führen können (Duchna, 2006; Patil et al., 2007).

Der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) gibt die durchschnittliche Anzahl von Apnoen und Hypopnoen pro Stunde (h) an und wird zur Diagnosestellung wie auch zur Schweregradeinteilung verwendet. Von einem OSAS wird gesprochen, wenn ein AHI von ≥ 5 sowie typische klinische Symptome (z. B. Schnarchen, Tagesmüdigkeit, Konzentrationsschwierigkeiten) vorliegen (Banno und Kryger, 2007; McNicholas, 2018). Je nach Ausprägung des AHI lässt sich das OSAS in die Schweregrade leicht, mittelgradig und schwer einteilen (vgl. Tabelle 2).

Einleitung

Schweregrad	AHI
Leicht	> 5–15
Mittel	> 15–30
Schwer	> 30

Tabelle 2: Einteilung des Schweregrades des OSAS gemäß Recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research (The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force (AASM), 1999)

Ein weiterer Parameter ist der oxygen desaturation index (ODI). Er gibt die Anzahl der peripheren O₂-Sättigungs(SaO₂)-Abfälle von > 4 % pro h Schlafzeit an und korreliert stark mit dem AHI (Chung et al., 2012).

Anhand der unterschiedlichen Mechanismen, die die Entstehung der Apnoephasen hervorrufen, kann das Schlafapnoe-Syndrom des Menschen in zwei Kategorien eingeteilt werden: Während beim zentralen Schlafapnoe-Syndrom (CSAS) durch eine zeitweise fehlende Innervation der Atemmuskulatur die thorakalen und/oder abdominellen Atembewegungen ausbleiben, liegt die Ursache des OSAS in einem Verlust des Tonus der Pharynxmuskulatur, der zu einem inspiratorischen Kollaps und somit zu einer teilweisen (Hypopnoe) oder einem kompletten Verschluss (Apnoe) der oberen Atemwege führt (Banno und Kryger, 2007).

1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren des OSAS

Das OSAS ist eine der häufigsten organisch begründeten SBAS. Seit den 1990er Jahren existieren epidemiologische Studien zur Prävalenz. Während Punjabi von einer Prävalenz in der Weltbevölkerung von OSAS von 3–7 % bei erwachsenen Männern und von 2–5 % bei erwachsenen Frauen ausging (Punjabi, 2008), konnte in jüngeren Studien eine höhere Prävalenz nachgewiesen werden. So beschreiben Benjafield et al. eine Prävalenz von über 50 % bei Frauen und Männern (30–69 Jahre) in einigen Ländern, z. B. Amerika oder Australien (Benjafield et al., 2019). Entsprechend leiden allein in Deutschland über 40 Millionen Menschen an einem OSAS (Benjafield et al.). Dabei nimmt das Erkrankungsrisiko mit dem Lebensalter zu. Patienten über 65 Jahre haben ein dreimal höheres Risiko, von einem OSAS betroffen zu sein (Janssens et al., 2000; Punjabi, 2008), zusätzlich stellt Übergewicht einen der wichtigsten Risikofaktoren für das OSAS dar (Punjabi, 2008;

Mitra et al., 2021), sodass die Prävalenz Alters- und Body-Mass-Index(BMI)-bedingt zunimmt. Mehr als 60 % aller Patienten mit OSAS haben einen BMI $> 28 \text{ kg/m}^2$ (Strohl und Redline, 1996). Taille-Hüft-Verhältnis und Halsumfang (Davies und Stradling, 1990; Grunstein et al., 1993; Ma et al., 2022), ebenso wie eine familiäre Häufung von Schlafapnoe zeigen hierbei eine besonders starke Korrelation mit dem OSAS (Mathur und Douglas, 1995; Holberg et al., 2000). Die asiatische Ethnizität (Ong und Clerk, 1998; Hnin et al., 2018) sowie der Konsum von Tabak und Alkohol (Wetter et al., 1994, Mitra et al., 2021) scheinen das Auftreten und die Schwere des OSAS ebenfalls zu begünstigen.

1.3 Pathophysiologie des OSAS

Das OSAS ist gekennzeichnet durch wiederholte Tonusverluste der Muskulatur der oberen, muskulär stabilisierten Atemwege während des Schlafens (Woodson, 1998). So kommt es zu einem inspiratorischen Kollaps der Pharynxmuskulatur mit einer partiellen oder kompletten Obstruktion der Luftwege oberhalb der Glottis (Somers et al., 2008; Zhang und Si, 2012; Araz et al., 2020).

Durch Apnoe/Hypopnoe während der Obstruktion des Pharynx kommt es zu einer inadäquaten alveolären Ventilation und folglich zu einem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes (Hypoxie) und einem Anstieg des Kohlenstoffdioxidpartialdruckes (Hyperkapnie) im Blut. Dies führt via Stimulation peripherer und zentraler Chemorezeptoren zu einem verstärkten Atemtrieb und zu einer Sympathikusaktivierung mit erhöhtem systemischem und pulmonalem Blutdruck sowie einer gesteigerten Herzfrequenz, was schließlich in einer Weckreaktion (Arousal) resultiert (Maurer und Hörmann, 1998; Somers et al., 2008; Lee und Sundar, 2021). Kennzeichnend ist nach Wiedereröffnen des oberen Atemweges das plötzliche, überschießende Einsetzen der Atmung, was von lautem Schnarchen begleitet wird (Zhang und Si, 2012). Diese sich wiederholenden Hypoventilations-/Apnoe-Hyperventilations-Episoden haben zur Folge, dass die natürliche Schlafarchitektur zerstört wird und REM-Schlaf sowie Tiefschlaf kaum oder gar nicht erreicht werden, obwohl der Betroffene die Arousals nicht bewusst wahrnimmt (Maurer und Hörmann, 1998; Antonaglia und Passuti, 2021). Diese sog. Schlafragmentierung vermag auch die typischen Symptome des OSAS wie Tagesmüdigkeit, verminderte Konzentrationsfähigkeit und psychische Veränderungen zu erklären (Banno und Kryger, 2007).

1.4 Diagnose und Symptomatik des OSAS

Durch Eigen- und Fremdanamnese bzgl. der o. g. Symptomatik wird die Verdachtsdiagnose gestellt und ein Schlafapnoe-Screening mittels häuslicher Messung mit portablen Systemen oder eine stationäre Diagnosestellung in einem Schlaflabor mittels Polysomnographie angeschlossen. Seit 1968 besteht die Möglichkeit, sich an einem standardisierten internationalen Manual zu orientieren, das auf eine Veröffentlichung von Allan Rechtschaffen und Anthony Kales zurückgeht (Becker et al., 2009). Demnach werden mindestens Pulsfrequenz, pulsoxymetrisch periphere-SaO₂, Schnarchgeräusche oder Atemfluss und Körperlage registriert. Aus den Aufzeichnungen lässt sich der o. g. AHI berechnen und anhand dessen der Schweregrad des OSAS bestimmen (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2006; Duchna, 2006).

Die stationäre Polysomnographie umfasst u. a. außerdem die nächtliche Aufzeichnung von Hirnströmen (Elektroenzephalographie), Augenbewegungen (Elektrookulographie, EOG), Elektromyogramm (EMG) des M. mentalis, Thorax- und Abdomenbewegungen sowie eine Elektrokardiographie (EKG) (Banno und Kryger, 2007).

Neben einem AHI von ≥ 5 müssen OSAS-typische Symptome wie Tagesmüdigkeit und nächtliches Schnarchen für die Diagnose vorliegen (vgl. Abb. 1). Darüber hinaus berichten einige Patienten von morgendlichen Kopfschmerzen oder depressiven Verstimmungen, die mit den wiederkehrenden Arousals und der resultierenden Schlafragmentierung begründet werden (Banno und Kryger, 2007). Schließlich ist bei manchen Betroffenen eine neurokognitive Einschränkung festzustellen, was u.a. auf eine durch die hypoxischen Zustände hervorgerufene Volumenreduktion des Hippocampus zurückgeführt wird. Weitere betroffene Hirnregionen umfassen den Frontal- und Parietallappen (Lal et al., 2012).

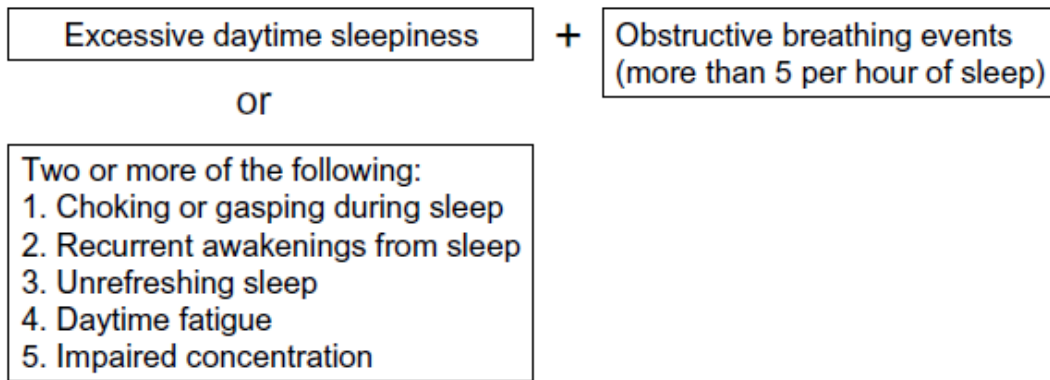


Abbildung 1: Diagnosekriterien OSAS

Für die Diagnose des OSAS müssen mindestens ein $AHI \geq 5$ sowie OSAS-typische Symptome vorliegen (Banno und Kryger, 2007).

1.5 OSAS als kardiovaskulärer Risikofaktor

Neben den schlafbezogenen Symptomen gibt es die nicht schlafbezogenen Symptome und langfristige Risiken. Hier ist das klinische Bild vielfältig und betrifft verschiedene Organsysteme (Banno und Kryger, 2007; McNicholas, 2007; Abbasi et al., 2021). Das OSAS ist mit dem Risiko assoziiert, an kardiovaskulären Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und zerebrovaskulärem Insult zu erkranken (Coughlin et al., 2004; Marin et al., 2005; West et al., 2006; Botros et al., 2009; Patil et al., 2019; Tietjens et al., 2019).

Die zugrundeliegenden Pathomechanismen, die bei OSAS zu kardiovaskulären Erkrankungen führen, sind komplex und vielfältig (vgl. Abb. 2). Unter anderem tragen eine Sympathikusaktivierung, oxidativer Stress, Inflammation, eine gesteigerte Gerinnungsaktivität und eine teilweise daraus resultierende endotheliale Dysfunktion zum erhöhten kardiovaskulären Risiko von OSAS-Patienten bei. Eine Schädigung der Endothelfunktion, die die Modulation des Gefäßtonus, die Permeabilität sowie antikoagulatorische und fibrinolytische Eigenschaften umfasst, ist außerdem ein potentieller Faktor in der Entstehung der Arteriosklerose (Zamarron et al., 2013; Salman et al., 2020).

Einleitung

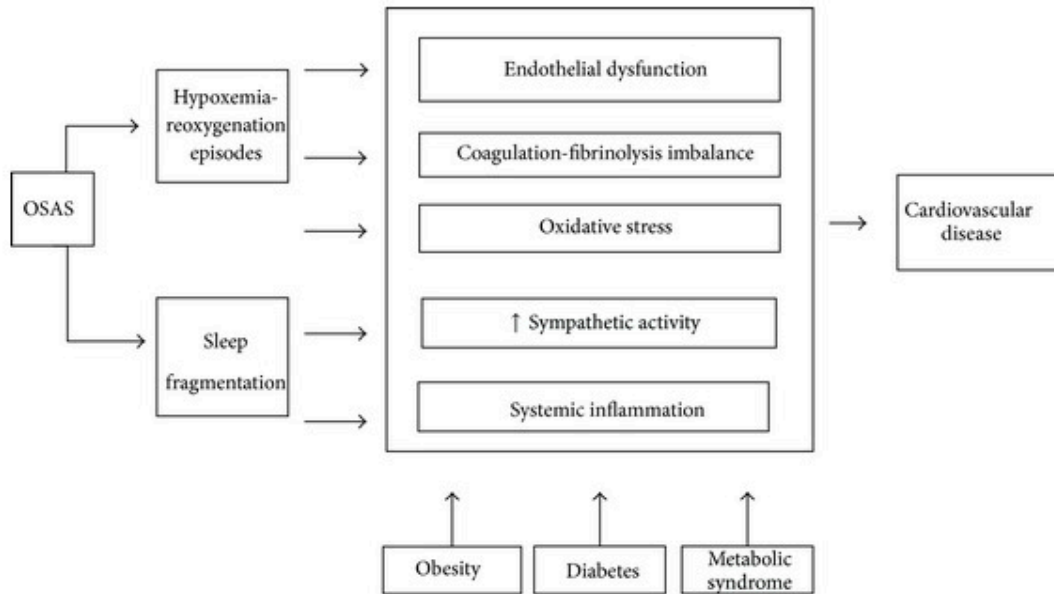


Abbildung 2: OSAS als kardiovaskulärer Risikofaktor

Schematische Zusammenfassung der Pathomechanismen der kardiovaskulären Erkrankungen und OSAS (Zamarron et al., 2013).

Zahlreiche Studien haben dabei gezeigt, dass OSAS, unabhängig von Adipositas, als eigenständiger Faktor zur Entstehung der arteriellen Hypertonie beiträgt (Nieto et al. 2000; Peppard et al., 2000; Duran et al., 2001; Yacoub et al., 2017; Abbasi et al., 2021; Boneberg et al., 2021).

Eine hypoxiebedingte Hochregulierung der beiden bedeutendsten Scavenger-Rezeptoren Cluster of Differentiation (CD) 36 und lectin-type oxidized LDL receptor (LOX) 1 spielt möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese von Arteriosklerose (Febbraio et al., 2000; Crucet et al., 2013). Angelockt von aktivierten Endothelzellen, infiltrieren Monozyten die Intima und differenzieren sich zu Makrophagen (de Winther et al., 2000; Takahashi et al., 2002). Makrophagen exprimieren Rezeptoren, u. a. Scavenger-Rezeptoren, worüber sie an oxidiertes LDL gebundenes Cholesterin aufnehmen. Durch eine Akkumulation von Cholesterin im Zytoplasma führt dies zur Bildung von Schaumzellen, die im Verlauf apoptotisch werden und so zu einer Freisetzung von Lipidtröpfchen in der Intima führen (Yu et al., 2013; Christiakov et al., 2016). Darüber hinaus kommt es im Rahmen der geschädigten Endothelfunktion zu einer gestörten Produktion von Stickstoffmonoxid

Einleitung

(NO), somit zu einer Beeinträchtigung der Vasodilatation und konsekutiv zu einer peripheren Vasokonstriktion, was ebenfalls zur Entstehung der arteriellen Hypertonie beiträgt (Davignon und Ganz, 2004).

Pankow et al. zeigten, dass mehr als die Hälfte von 93 Patienten mit schlafbezogenen Atmungsstörungen eine arterielle Hypertonie hatten (Pankow et al., 1997). Bei Patienten mit einem leichtgradigen OSAS konnte in ca. 40 % der Fälle und bei Patienten mit einem höhergradigen OSAS in ca. 60 % der Fälle eine arterielle Hypertonie festgestellt werden. Darüber hinaus fehlte ein physiologischer nächtlicher Blutdruckabfall bei vielen Patienten, die entsprechend als ‚Non-Dipper‘ bezeichnet werden (Noda et al., 1993; Pankow et al., 1997; Ahmad et al., 2017). Dies ist deshalb von Relevanz, weil ‚Non-Dipping‘ als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt (Verdecchia et al., 1990; Banno und Kryger, 2007). Je schwerwiegender der Grad des OSAS ausfiel, desto höher war der Anteil der ‚Non-Dipper‘ (Pankow et al., 1997; Ahmad et al., 2017).

Gottlieb et al. konnten in der prospektiven Sleep Heart Health Study zeigen, dass männliche Probanden zw. 40 und 70 Jahren und einem AHI ≥ 30 ein 68 % höheres Risiko haben, eine koronare Herzkrankheit (KHK) zu entwickeln als gleichaltrige Probanden mit einem AHI < 5 (Gottlieb et al., 2010). Bei Frauen gleichen Alters oder Männern > 70 Jahre konnte dies allerdings nicht gezeigt werden. Männer mit einem AHI ≥ 30 haben zudem im Vergleich zu Männern mit einem AHI < 5 ein um 58 % erhöhtes Risiko, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln (Gottlieb et al., 2010).

Moore et al. konnten in einer prospektiven Kohortenstudie zeigen, dass das OSAS bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit einer erhöhten Mortalität, Myokardinfarkt und zerebrovaskulären Ereignissen vergesellschaftet ist (Moore et al., 2001). Nach anderen Autoren konnte weisen Patienten mit einem OSAS unabhängig von anderen Risikofaktoren (Alter, Raucherstatus, Alkoholkonsum, BMI, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Vorhofflimmern, arterielle Hypertonie) ein erhöhtes Risiko aufweisen, einen zerebrovaskulären Insult zu erleiden (Poza et al., 2000; Yaggi et al., 2005).

Schließlich konnte eine Assoziation zw. OSAS und Insulinresistenz, Glukoseintoleranz und dem Risiko, an Diabetes Typ 2 zu erkranken, dargestellt werden, unabhängig von anderen Einflussfaktoren wie Adipositas (Botros et al., 2009; Pamidi et al., 2010; Reutarakul und Mokhlesi, 2017). Umgekehrt ist die Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 2 un-

ter OSAS-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne schlafbezogene Atemstörungen signifikant erhöht (Pamidi und Tasali, 2012). Entsprechend konnte eine Korrelation zw. steigendem AHI und Insulinresistenz sowie abfallender Sauerstoffsättigung und gestörter Glucosetoleranz festgestellt werden (Punjabi et al., 2002; Reutrakul und Mokhlesi, 2017). Als zugrundeliegender Pathomechanismus wird die Aktivierung von Sympathikus, Hypothalamus-Hypophysenachse und inflammatorischen Signalkaskaden durch Schlaffragmentierung sowie intermittierende Hypoxie gesehen, die z.T. auch für Leberveränderungen verantwortlich sind (Jun und Polotsky, 2009).

1.6 Leberveränderungen bei OSAS

Mehrere Studien an Menschen und Tieren zeigen, dass durch CIH oder OSAS entzündliche Prozesse in der Leber ausgelöst werden (Savransky et al., 2007a; Reinke et al., 2011; da Rosa et al., 2012; da Rosa et al., 2015). In der Studie von Rosa et al. waren die Mäuse 5 Wochen lang einer intermittierenden Hypoxie ausgesetzt (60 x/h, 8 h pro Tag), bei Reinke et al. war die Dauer der Hypoxie etwas länger (60 x/h, jedoch 12 h pro Tag für 19–22 Wochen). In beiden Studien fand sich eine erhöhte hepatische Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , Il-1 β , Il-6 oder auch iNOS (Reinke et al., 2011; da Rosa et al., 2012; da Rosa et al., 2015). Als mögliche Ursache hierfür postulieren da Rosa et al. eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B (da Rosa et al., 2015), dessen Aktivierung mit chronischem Leberschaden, Fibrose und der Entstehung hepatozellulärer Karzinome (HCC) assoziiert ist (Robinson und Mann, 2010; Luedde und Schwabe, 2011).

Auch Aron-Wisnewsky et al. konnten zeigen, dass eine CIH unabhängig von anderen Risikofaktoren mit Leberschädigungen im Sinne von Inflammation, Steatose und letztlich mit Leberfibrose und -zirrhose einhergeht (Aron-Wisnewsky et al., 2012).

Die vermehrte Bildung der proinflammatorischen Zytokine Il-1 β , Il-6 und TNF- α kann zusätzlich eine Hochregulierung von Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 bewirken. Dies kann durch direkte Interaktion mit dem Insulinrezeptor potentiell zu einer Insulinresistenz führen und somit zur Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 beitragen (Emanuelli et al., 2000; Mooney et al., 2001; Senn et al., 2002). Die Insulinresistenz wiederum führt zu einer erhöhten Freisetzung von freien Fettsäuren aus Adipozyten, die vermehrt

Einleitung

in der Leber aufgenommen werden und potentiell in einer Lebersteatose münden können (Browning und Horton, 2004).

Tatsächlich konnte eine erhöhte Prävalenz von Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) bei Patienten mit einem schweren OSAS nachgewiesen werden (Türkay et al., 2012; Mir et al., 2013). Im Gegensatz dazu konnten Savransky et al. lediglich eine Schwellung der Hepatozyten und eine vermehrte Glykogenspeicherung nach intermittierender Hypoxieexposition feststellen, aber keine Verfettung nachweisen (Savransky et al., 2007a).

Ein weiterer beschriebener Mechanismus, der zur Fettleber-Entstehung beiträgt, ist die Hypoxie-induzierte HIF-1 α Stabilisation; diese führt über die Aktivierung von Sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) und Stearoyl coenzyme A desaturase 1 (SCD-1) zu einer hepatischen Akkumulation von ungesättigten Fettsäuren, VLDL- und Triglyceriden (Drager et al., 2010). Zusätzlich kommt es zu einem vermehrten Fettsäureangebot aufgrund peripherer Lipolyse, die infolge der Sympathikusaktivierung beim OSAS verstärkt ist (Drager et al., 2010). Möglicherweise spielen auch die ebenfalls HIF-1 α -abhängigen Scavenger-Rezeptoren CD36 und LOX-1 bei der Fettleber-Entstehung eine Rolle: CD36 ist für die Aufnahme ins intrazelluläre Kompartement von freien langkettigen Fettsäuren verantwortlich (Miquilena-Colina et al., 2011), LOX-1 vermittelt die Aufnahme von oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (ox-LDL) (Xu et al., 2013). Rey et al. zeigten eine erhöhte Expression von CD36 mRNA in Hepatozyten von Mäusen und Menschen nach Exposition von Hypoxie (1 % O₂) für 36 h, was zur Entwicklung einer NAFLD beitragen könnte (Rey et al., 2020). Bezüglich der Auswirkung von CIH bzw. Hypoxie auf LOX-1 in der Leber finden sich in der Literatur bisher keine konklusiven Daten. OxLDL und sein Rezeptor LOX-1 scheinen auch bei der Entwicklung einer Dysfunktion der Endothelzellen der Sinusoide beteiligt zu sein, die mit NAFLD assoziiert ist (Zhang et al., 2014). Ozturk et al. konnten zeigen, dass der Serum-LOX-1-Spiegel in Patienten mit NAFLD signifikant höher war als in gesunden Kontrollen (Ozturk et al., 2015).

Schließlich sind auch die in der Angiogenese involvierten Gene bei der Entwicklung der NAFLD beteiligt (Paschetta et al., 2015). Hierbei spielt ebenfalls die Hochregulation von HIF-1 α und HIF-2 α durch intermittierende Hypoxie eine Rolle, was u. a. eine Modulation der Fibrogenese und Angiogenese via hepatische Kupffer- und Sternzellen bewirkt und mit erhöhten Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF)-Spiegeln assoziiert ist (Paschetta et al., 2015). Die Isoform VEGF-A vermittelt die Proliferation und Migration von

Einleitung

Endothelzellen und ist somit u. a. für die Angiogenese verantwortlich (Hugo Gene Nomenclature Committee 2008), während die Isoform VEGF-B für das Überleben von Endothelzellen, Perizyten, glatten Muskelzellen sowie vaskulären Stamm- und Vorläuferzellen verantwortlich ist (Zhang et al., 2009).

VEGF-A erzielt seine Wirkung über die Bindung an den Tyrosinkinase-Rezeptor, die Kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase 1 (KDR/Flt-1, VEGFR2), während die Isoform VEGF-B u. a. über die Bindung an die fms-like tyrosin Kinase 1 (Flt-1/VEGFR1) wirkt (Mustonen und Alitalo, 1995; Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Neufeld et al., 1999, Zhang et al., 2009). Ankoma-Sey et al. zeigten, dass kontinuierliche Hypoxie im Lebergewebe von Ratten eine erhöhte Expression von VEGF sowie dessen Rezeptoren hervorruft (Ankoma-Sey et al., 2000). In einem Mausmodell reduzierte eine KDR-Blockade mit VEGFR2-Antikörpern die Verfettung und Entzündung der Leber (Coulon et al., 2013). Außerdem wird angenommen, dass VEGF und seine Rezeptoren in der Entwicklung von Leberzirrhose involviert sind, denn VEGF steigert die $\alpha 1(I)$ -Prokollagen-mRNA-Expression in aktivierten Sternzellen (Yoshiji et al., 2003; Dufour und Clavien, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem der Marker Ki-67 für die Hepatozytenproliferation untersucht (Gerlach et al., 1997). Bereits Corpechot et al. konnten mithilfe dieses Markers zeigen, dass eine chronisch konstante Hypoxie eine reduzierte Hepatozytenproliferation bewirkt, und postulierten die Hemmung des HGF (Hepatocyte Growth Factor) und seines Rezeptors c-Met als mögliche Ursache (Corpechot et al., 2002).

Zusätzlich wurde in der Dissertation die Glutaminsynthetase (GS) untersucht. Die GS ist kein exklusiv hepatisches Enzym, spielt in der Leber jedoch eine bedeutende Rolle u.a. für den Harnstoffzyklus und die Bindung überschüssigen Ammonium. Durch die Übertragung von Ammonium auf Glutamat entsteht Glutamin, die Transportform des Stickstoffs (Long et al., 2011). In der Leber desaminiert die Glutaminase das Glutamin und es entstehen Glutamat und Ammoniumionen, die über den Harnstoffzyklus in ungiftigen Harnstoff umgewandelt und anschließend über die Niere ausgeschieden werden (Karaca et al., 2018). Die GS ist in der Leber in 1 bis 3 Zelllagen um die Zentralvene (ZV) exprimiert, während sich die Glutaminase und die Enzyme des Harnstoffzyklus in den portalen Hepatozyten befinden (Gebhardt and Mecke, 1983; Häussinger, 1987).

In dieser Arbeit wurde der Vermutung nachgegangen, dass durch ein erniedrigtes Sauerstoffangebot die Kapazität der GS in der ohnehin schon sauerstoffarmen perivenösen

Zone mit einem erhöhten inflammatorischen Risiko eingeschränkt sein würde. Die bisherige Studienlage bezüglich des Einflusses von CIH auf die Expression der GS ist dürftig. Bekannt ist, dass die GS-Expression in der Leberzirrhose reduziert ist (Fleming und Wanless, 2013).

1.7 Therapie des OSAS

Bei den Behandlungsformen des OSAS gibt es unterschiedliche Ansätze, die entsprechend der Symptomatik und den Komorbiditäten des jeweiligen Patienten eingesetzt bzw. individuell angepasst werden können. Allein durch den Einsatz konservativer Maßnahmen können schon Effekte erzielt werden.

Beispiele hierfür sind die Reduktion des Gewichtes, das der Hauptrisikofaktor für das OSAS ist (Browman et al., 1984; Chirinos et al., 2014; Li und He, 2021), die Einhaltung einer angemessenen Schlafhygiene (z. B. Vermeidung von Alkohol und Nikotin) oder die Rückenlage-Verhinderung (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) e.V., 2017). Da durch abnehmenden Muskeltonus im Schlaf die Zunge in Rückenlage nach hinten fällt, kann durch eine Rückenlage-Verhinderungsweste der AHI signifikant reduziert werden. Allerdings ist diese Methode aufgrund der geringen Compliance als Langzeittherapie selten dauerhaft anwendbar (Wenzel et al., 2007). Darüber hinaus gibt es verschiedene medikamentöse Ansätze, jedoch berechtigen es die vorliegenden Daten bisher nicht, eine medikamentöse Therapie beim OSAS einzusetzen (Smith et al., 2006; Mason et al., 2013; Fleury et al., 2019). Als apparative Maßnahmen stehen orale Hilfsmittel zur Verfügung, z. B. die Unterkieferprotrusionschiene (UPS), die für die Behandlung der leichten und mittelschweren Form des OSAS infrage kommt (Lim et al., 2004; Kushida et al., 2006; Waters, 2019). Die kontinuierliche Überdruckbeatmung (continuous positive airway pressure, CPAP) stellt den Goldstandard in der Therapie des OSAS dar (AWMF, 2017; Waters, 2019) und ist eine nichtinvasive Methode, die kontinuierlich Raumluft unter Druck via Nasen- oder Gesichtsmaske in die oberen Atemwege und die Lunge pumpt (Prabhat et al., 2012). Häufig auftretende Nebeneffekte sind dabei eine Austrocknung der Schleimhäute in den oberen Atemwegen und Nase, Augen- und Gesichtshautirritationen sowie abdominale Blähungen; somit existieren viele potentielle Gründe für eine reduzierte Compliance (Pepin et al., 1995; NHMRCA, 2000). Die CPAP reduziert neben den schlafbezogenen Symptomen auch die

Einleitung

Ausschüttung von Katecholaminen und von freien O₂-Radikalen oder ROS (Schulz et al., 2000a), während die NO-Produktion gesteigert wird (Ip et al., 2004). Zusätzlich wird der vagale Tonus durch die CPAP erhöht (Maser et al., 2008). Somit kommt es zur Reduktion der endothelialen Dysfunktion und der arteriellen Hypertonie (Kohler et al., 2011; Fox et al., 2021; Shirahama et al., 2021). In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine CPAP-Therapie den Blutdruck hypertoner Patienten mit OSAS signifikant senkt (Becker et al., 2003; Shafazand und Patel, 2014; Javaheri et al., 2017; Shirahama et al., 2021). Darüber hinaus reduziert die CPAP-Therapie bei Patienten mit schwerem OSAS das Risiko, an einem kardiovaskulären Ereignis zu erkranken oder zu versterben (Marin et al., 2005; Javaheri et al., 2017). Ferner scheint eine CPAP-Therapie bei OSAS-Patienten das Schlaganfallrisiko zu reduzieren (Marin et al., 2005; Javaheri et al., 2017) bzw. reduziert eine frühzeitige CPAP-Therapie bei Schlaganfallpatienten die Wahrscheinlichkeit eines erneuten Schlaganfalls (Jehan et al., 2018). Die Datenlage bezüglich des Effektes der CPAP-Therapie auf Diabetes ist unklar. Durch eine kontinuierliche CPAP-Therapie konnten die HbA1c-Level in Patienten mit Diabetes und OSAS verbessert werden (Martínez-Cerón et al., 2016; Malik et al., 2017). Kaur und Mokhlesi zeigten, dass eine CPAP-Therapie von ≥ 8 h/Nacht über 2 Wochen die Glucose im Blut sowie den HbA1c-Wert senkt (Kaur und Mokhlesi, 2017). Im Gegensatz dazu zeigten Muraki et al. jedoch, dass CPAP über 6 Monate den Glucosemetabolismus und die Insulinresistenz nicht signifikant verbesserte (Muraki et al., 2018). In Bezug auf die Leber finden sich in der Literatur ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse: Einige Autoren beschreiben eine Verbesserung der Leberwerte und der Fibrose (Chen et al., 2018; Kim et al., 2018) und andere beschreiben keine signifikanten Unterschiede (Jullian-Desayes et al., 2016; Labarca et al., 2018).

Zusätzlich zeigten Steiropoulos et al. eine signifikante Reduktion von proinflammatorischen Zellen und Zytokinen im Blut nach einer sechsmonatigen CPAP-Therapie in Patienten mit OSAS (Steiropoulos et al., 2009).

Schließlich gibt es auch operative Behandlungsmethoden, die zwar Erfolge erzielen, deren Indikation allerdings vorsichtig gestellt werden sollte, da sie mit einem hohen Risiko an Langzeitfolgen, v. a. mit Dysphagie, einhergehen können (Sundaram et al., 2005; Franklin et al., 2009). Es wird zw. resektiven Verfahren, nichtresektiven Verfahren und

Osteotomien unterschieden. Die resektiven Verfahren, z. B. die Uvulopalatopharyngoplastik (UPPP) und die Laser-assistierte Uvulopalatoplastik (LAUP), stellen den unbehinderten Luftfluss wieder her, indem Obstruktionen in den oberen Atemwegen chirurgisch beseitigt werden (Becker et al., 2009). Die UPPP weist eine Erfolgsrate von 40–50 % bei leichtem und mittelschwerem OSAS auf, die allerdings langfristig abnehmen kann (Won et al., 2008; Sheen und Abdulateef, 2021). Wird eine UPPP mit einer Tonsillektomie (TE) kombiniert, konnten Erfolgsraten zw. 31,3 % und 96 % nachgewiesen werden (Stuck et al., 2018; Just und Dietz, 2019). Jedoch kann diese Operation mit schweren Komplikationen, wie Atemnot, Dysphagie oder persistierender Mundtrockenheit, vergesellschaftet sein (Fairbanks, 1990; Won et al., 2008). Bei der Durchführung einer LAUP ist mit Erfolgsraten von fast 50 % in Bezug auf das OSAS zu rechnen. Jedoch treten bei bis zu 60 % der Patienten postoperative Nebenwirkungen wie Schmerzen oder Ödeme in den oberen Luftwegen auf, weshalb diese Methode zunehmend verlassen wird (AWMF, 2017; Won et al., 2008). Zu den nichtresektiven Verfahren gehören u. a. die Weichgaumenimplantate. In der Literatur zeigt sich, dass Weichgaumenimplantate bei leichtem und mittelschwerem OSAS gegenüber dem Placebo überlegen sind (Friedman et al., 2008; Steward et al., 2008). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass resektive und nichtresektive Verfahren zwar mit einem Komplikationsrisiko einhergehen können, jedoch für ein selektioniertes Patientengut eine Alternative zur Beatmungstherapie darstellen können (Won et al., 2008; Franklin et al., 2009; Just und Dietz, 2019). Osteotomien von Ober- und Unterkiefer spielen eine Rolle bei besonderen anatomischen Gegebenheiten wie kraniofazialen Dysplasien (Boudewyns et al., 2007), hierzu zählen die Gesichtsskelettverlagernden Eingriffe. Das maxillo-mandibuläre Advancement kann zu einer Besserung des OSAS von 90–100 % führen (Conradt et al., 1997; Hochban et al., 1997; Prinsell, 1999) und die mandibuläre Osteotomie mit Genioglossus Advancement verzeichnet Erfolge in 35–62 % der Fälle (Kezirian und Goldberg, 2006; Won et al., 2008). Eine effiziente Methode mit hohen Erfolgsraten in der OSAS-Behandlung wäre die Tracheotomie. Allerdings wird diese selten als Primärtherapie eingesetzt, da mit einem solch schwerwiegenden chirurgischen Eingriff viele Komplikationen, wie Sprachschwierigkeiten, rezidivierende Bronchitiden und ästhetische Probleme, einhergehen können (Guilleminault et al., 1981; Mehra und Wolford, 2000; Just und Dietz, 2019).

1.8 CIH-Mausmodell des OSAS

Verschiedene Methoden wurden entwickelt, um das OSAS und seine Folgen in Tieren zu simulieren. Dazu zählen Tiere mit spontanem OSAS, ein mechanischer Verschluss der oberen Atemwege, eine Zufuhr von intermittierend-hypoxischen Atemgasen (CIH) und eine repetitive Unterbrechung des Schlafes (Jun und Polotsky, 2007). Ein natürliches Modell des OSAS in der Tierwelt ist die englische Bulldogge (Hendricks et al., 1987). Diese hat einen weichen Gaumen und einen engen Oropharynx und die meisten Tiere zeigen im Schlaf Episoden von SaO_2 -Abfall. Auch Kollagen-Injektionen in die oberen Luftwege von Affen können eine veränderte Atmung und einen unphysiologischen Schlaf wie bei Schlafapnoe-Patienten erzeugen (Philip et al., 2005).

Jedoch ist ein spontanes OSAS bei Tieren selten, was eine Untersuchung mit ausreichender Zahl an Fällen mit bekanntem Pheno- und Genotyp, die benötigt würden, um metabolische Veränderungen zu detektieren, nahezu unmöglich macht (Jun und Polotsky, 2007). Auch durch mechanischen Verschluss kann das OSAS simuliert werden. Horner et al. beispielsweise untersuchten tracheotomierte Hunde, bei denen über ein Ventil die Luftzufuhr unterbrochen werden konnte (Horner et al., 1998). Die Ähnlichkeit zum natürlichen OSAS ist dabei ein Vorteil, allerdings sind solche Modelle technisch aufwendig durchzuführen und somit ist die Untersuchung großer Gruppen schwieriger (Jun und Polotsky, 2007). Polotsky et al. überwachten Mäuse mittels Polysomnographie und weckten diese durch Luftstöße nach festgelegten Zeiten, um so Arousals zu simulieren (Polotsky et al., 2006). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass Arousals nach chronischer Exposition nicht mehr sicher reproduzierbar sind und die Schlafzeit über 24 h dann nicht mehr reduziert ist (Jun und Polotsky, 2007).

Das o. g. in dieser Arbeit verwendete CIH-basierte OSAS-Mausmodell der CIH ist das am besten entwickelte Modell, um die kardiovaskulären, metabolischen und neurokognitiven Effekte des OSAS zu untersuchen (Jun und Polotsky, 2007). Zur Erzeugung der CIH dient ein System, das den Fluss von Raumluft, Stickstoff und Sauerstoff in die Mäusekäfige kontrolliert (Polotsky et al., 2003). Das CIH-Modell wird v. a. mit Nagetieren, insbesondere Mäusen, realisiert. Es wird zwischen einem schlafabhängigen und einem schlafunabhängigen Modell unterschieden. Schlafabhängige Systeme benötigen die Implantation von EEG- und EMG-Elektroden und werden nur in der Schlafphase eingesetzt. Das schlafunabhängige Modell nimmt keine Rücksicht auf Schlaf-Wachphasen, ermöglicht

dadurch aber auch eine längere CIH-Exposition (Drager et al., 2010). Die verwendete Dauer und Frequenz der CIH variieren zw. 30 und 120 s sowie 9 und 60x/h bei einer Sauerstoffkonzentration von 3–10 % (Jun und Polotsky, 2007; Drager et al., 2010). Vorteile des Mausmodells sind sowohl der ökonomische Aspekt wie niedrige Kosten, hohe Reproduktionsraten und einfache Haltung als auch die Möglichkeit, Knockout (KO) oder Gen-überexprimierende Tiere gegenüber WT-Kontrollen zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil ist, dass störende experimentelle Instrumentierung (z. B. eine Trachealkanüle) nicht erforderlich ist.

Im vorliegenden Projekt kam eine CIH-Intervention (30 Zyklen/h, im Wechsel FiO_2 6–7 % und 21 %, 8 h/Tag, 5 Tage/Woche, über 6 Wochen) im Vergleich zu Normoxie (NOX) sowohl bei WT-Mäusen als auch bei iNOS-KO-Mäusen zum Einsatz. Die CIH-Exposition wurde schlaforientiert, d. h. tageszeitbezogen, durchgeführt.

1.9 NO-Synthasen und das OSAS

NO-Synthasen (NOS) synthetisieren NO aus L-Arginin. Dabei entsteht unter Oxidation und NADPH-Verbrauch L-Citrullin (Palmer et al., 1988; Groves und Wang, 2000). Durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bildet sich ein Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex und die NO-Synthasen werden aktiviert (Andrew und Mayer 1999; Alderton et al., 2001; Förstermann und Sessa, 2012). Es gibt drei Hauptisoformen der NO-Synthasen. Die konstitutiv exprimierte endotheliale NOS (eNOS, NOS3) befindet sich im Gefäßendothel, in Neuronen, Epithelzellen und Kardiomyozyten. Die neuronale NOS (nNOS, NOS1) wird konstitutiv in Neuronen, Skelettmuskeln und Epithelzellen exprimiert (Hill et al., 2010). Die induzierbare NOS (iNOS, NOS2) bildet Ca^{2+} -unabhängig NO und befindet sich in allen kernhaltigen Zellen des kardiovaskulären Systems sowie in inflammatorischen Zellen wie Leukozyten, Fibroblasten und Mastzellen. In der Leber produzieren aktivierte Kupfferzellen mittels iNOS NO (Iwakiri, 2015). Die Transkription von iNOS ist fakultativ und wird reguliert durch Zytokine ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IFN- γ) sowie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) (Papapetropoulos et al., 1999). Die iNOS produziert mikromolare, toxische Mengen von NO, solange ihre Expression durch die oben genannten inflammatorischen Faktoren induziert wird (Dias-Junior et al., 2008; Hill et al., 2010). Die beiden konstitutiv exprimierten NO-Synthasen, nNOS und eNOS, hingegen produzieren

Einleitung

eine nanomolare Menge NO (Runge und Patterson, 2005), wodurch der Gefäßtonus aufrechterhalten und die Zellproliferation, die Thrombozytenaggregation sowie die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel kontrolliert werden (Förstermann und Sessa, 2012). Als lösliches Gas passiert NO die Zellmembran und bindet in der Zielzelle an das Häm der löslichen Guanylatcyclase (sGC). Diese produziert zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), das dann wiederum die cGMP-Kinase aktiviert. Dieses Enzym bewirkt ein Absinken der Ca^{2+} -Konzentration, indem es K^{+} -Kanäle aktiviert und Ca^{2+} -Kanäle inaktiviert, was in einer Vasodilatation resultiert. Phosphodiesterasen kontrollieren diesen Vorgang, indem sie cGMP abbauen (Ghofrani et al., 2004).

Die Ergebnisse einiger Studien weisen darauf hin, dass das OSAS oxidativen Stress und endotheliale Dysfunktion verursacht und somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen spielt (Wang et al., 2004; Ciftci et al., 2011). Es wurden signifikant niedrigere Nitrat-Nitrit-Konzentrationen im Serum von OSAS-Patienten gemessen, die sich nach CPAP-Therapie wieder normalisierten (Ip et al., 2000; Schulz et al., 2000b; Noda et al., 2007; Ciftci et al., 2011). Auch der Plasmaspiegel von L-Arginin, dem Substrat, aus dem NO synthetisiert wird, steigt nach einmaliger CPAP-Therapie bei Patienten mit OSAS an (Lavie, 2003).

Mit Blick auf die verschiedenen NO-Synthetasen werden die Rollen von iNOS und eNOS in der Leber in der Literatur unterschiedlich beschrieben. So sehen einige Studien eNOS als das wichtigste Enzym an, das für die NO-Überproduktion im Endothel bei Leberzirrhose verantwortlich ist (Farzaneh-Far und Moore, 2001). Morales-Ruiz et al. hingegen beobachteten erhöhte Proteinkonzentrationen von iNOS- und eNOS-mRNA in der thorakalen Aorta von Ratten mit Leberzirrhose, was auf einen Beitrag beider Enzyme zur Leberzirrhose hinweist (Morales-Ruiz et al., 1996). Hinsichtlich der nNOS finden sich in der Literatur keine Daten im Bezug zur Leber. Die nNOS ist die wichtigste NOS-Isoform im menschlichen Skelettmuskel (Eghbalzadeh et al., 2014). Die Rolle der nNOS bei Diabetes mellitus wird in der Literatur kontrovers diskutiert, vorwiegend in Bezug auf die Skelettmuskulatur. Während einige Autoren auf der einen Seite eine erniedrigte nNOS Protein Expression im Vastus lateralis feststellten (Bradley et al., 2007; Krause et al., 2014), wurde auf der anderen Seite keine Veränderung der nNOS Protein Expression im Vastus lateralis von übergewichtigen insulinresistenten Probanden im Vergleich mit übergewichtigen, nicht insulinresistenten Probanden dokumentiert (Punkt et al., 2006).

Einleitung

Die Expression und Aktivität der iNOS unter CIH werden in der Literatur ebenfalls uneinheitlich diskutiert. So existieren Studien, die eine Hochregulation von iNOS in muskulären und elastischen Arterien der Lunge von Ratten (Shirai et al., 2003) und im subkutanen vaskulären Gewebe im Menschen feststellten (Patt et al., 2010), andere zeigten eine Herunterregulierung (Toporsian et al., 2000; Jelic et al., 2008) und wieder andere erkannten keinen signifikanten Unterschied zwischen (Murata et al., 2001). Jelic et al. dokumentierten auch eine erhöhte iNOS-Expression in endothelialen Zellen, die sie aus Armvenen von OSAS-Patienten gewannen, und konnten so eine OSAS-bedingte vaskuläre Entzündung belegen (Jelic et al., 2008).

In kardiovaskulärem und neuronalem Gewebe konnte eine erhöhte Expression der iNOS nach CIH-Exposition festgestellt werden. Dabei spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine Rolle (Bannow et al., 2022). Greenberg et al. beschrieben, dass durch CIH im Herzgewebe von Mäusen eine erhöhte Aktivität von NF- κ B zu verzeichnen war. Dies war begleitet von einem Anstieg von iNOS, einem NF- κ B abhängigen Genprodukt (Greenberg et al., 2006).

Die Rolle der hepatischen iNOS bei CIH ist bislang nicht untersucht und u. a. Gegenstand dieser Arbeit.

1.10 Leberveränderungen bei iNOS-gendefizienten (KO-)Mäusen

Im Jahr 1995 entwickelten Laubach et al. Mäuse, denen das iNOS-Gen fehlt, um die Rolle von iNOS in Entzündungsprozessen und septischem Schock darzustellen (Laubach et al., 1995). Hierzu wurden Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 verwendet, die in ihrem Phänotyp und in der Histologie nicht von WT-Mäusen zu unterscheiden sind. Im vorliegenden Projekt wurden ebenfalls iNOS-KO-Mäuse CIH ausgesetzt und die Lebern dieser Tiere untersucht.

Es wird angenommen, dass eine CIH über eine Stabilisation von HIF-1 α (hypoxic-inducible-factor-1-alpha) in der Leber zu einer Steigerung der Synthese und Akkumulation einfach ungesättigter Fettsäuren sowie der VLDL- und Triglycerid-Exkretion führt (Drager et al., 2010). Durch eine HIF-1 α -Stabilisation kommt es auch zu einer Aktivierung der iNOS-Expression, wodurch hohe Spiegel von NO produziert werden können. Während chronisch erhöhte NO-Level als schädlich für die Leber angesehen werden, wirken tran-

Einleitung

sient erhöhte NO-Level protektiv in Bezug auf den Lebermetabolismus und die Progression einer Leberschädigung (Tirosh, 2018). In älteren Studien wurde noch eine leberschädigende Wirkung der NO angenommen, über eine Blockierung der mitochondrialen Atmungskette, gefolgt von einer verminderten ATP-Synthese, einer erhöhten ROS-Produktion und in der Folge die Unfähigkeit der Anpassung an hypoxischen Stress (Mantena et al., 2007; Mateo et al., 2003).

Die Studienlage bezüglich der Rolle des NO in der Progression der NAFLD und der Leberfibrose ist dürftig, insbesondere finden sich hinsichtlich der Auswirkung der CIH auf die Inflammation im iNOS-KO-Modell keine konklusiven Ergebnisse in der Literatur.

Bisherige iNOS-KO-Mausmodelle haben gezeigt, dass NO eine wichtige Rolle in der Leberregeneration spielt. So beobachteten Rai et al., dass es zur Apoptose und Nekrose nach partieller Hepatektomie in iNOS-KO-Mäusen kam, was impliziert, dass NO essentiell für den Schutz der Hepatozyten nach Resektion ist (Rai et al., 1998).

Ergebnisse von Anavi et al. zeigten andererseits, dass die iNOS an der Entwicklung einer Leberfibrose beteiligt ist (Anavi et al., 2015): WT-Mäuse und iNOS-KO-Mäuse wurden für 6 Wochen mit einer ‚high-cholesterol diet‘ gefüttert. Die WT-Mäuse entwickelten verglichen mit den iNOS-KO-Mäusen in der Folge eine stärkere Leberfibrose. Dies konnte zum einen in der Sirius-Black-Färbung, einer Methode, um Kollagen und Amyloid anzufärben, dargestellt werden, zum anderen konnten höhere Level der profibrotischen Genexpression nachgewiesen werden (Anavi et al., 2015). Auch Qiao et al. zeigten anhand von iNOS-Deletion eine fördernde Rolle von NO hinsichtlich der Entwicklung einer nichtalkoholischen Fettleberhepatitis (NASH) (Qiao et al., 2019). WT-Mäuse und iNOS-KO-Mäuse wurden für 16 Wochen mit einer ‚high-fat diet‘ gefüttert. Anschließend wurde u. a. eine Oil-Red-Färbung, die die Fetteinlagerung in den Hepatozyten darstellt, durchgeführt und es wurden Triglyceride sowie die Alanin-Aminotransferase im Plasma bestimmt. Die Autoren stellten fest, dass WT-Mäuse eine stärker ausgeprägte hepatische Steatose bzw. Leberschädigung entwickelten als die iNOS-KO-Mäuse (Qiao et al., 2019).

Cassini-Vieira et al. untersuchten Gewebe von iNOS-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen hinsichtlich Inflammation, Angiogenese und Fibrose. Den Mäusen wurde hierfür ein Polyether-Polyurethane-Schwamm in die Subkutis implantiert, der nach 14 Ta-

Einleitung

gen analysiert wurde. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Gefäße und VEGF-Level als Ausdruck eines proinflammatorischen/prozirrhotischen Effektes in iNOS-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen reduziert war. Darüber hinaus wurde bei iNOS-KO-Mäusen eine erhöhte Anzahl von Neutrophilen und Makrophagen im implantierten Polyether-Polyurethane-Schwamm nachgewiesen (Cassini-Vieira et al., 2015).

Zusammenfassend ist demnach die derzeitige Studienlage bezüglich einer pro- oder antiinflammatorischen Wirkung von iNOS-KO auf die Leber unter CIH nicht eindeutig.

1.11 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob CIH in der Leber eine Hochregulation der Entzündungsmarker, insbesondere von iNOS, bewirkt und ob iNOS dabei eine ursächlich fördernde Rolle bzgl. Zytokinexpression, Steatosis und Angiogenese der Leber innehat. Die in der Literatur überwiegende, aber nicht eindeutige Datenlage ist, dass eine iNOS-Deletion eher leberprotektiv wirkt, indem sie die Inflammation reduziert, allerdings sind auch protektive Effekte der iNOS beschrieben. Deshalb wurde der Effekt eines iNOS-KO im Vergleich zum WT auf die CIH-verursachte Inflammation und Steatose der Leber untersucht, wobei angenommen wurde, dass iNOS-KO zu einer Reduktion des inflammatorischen Effektes führt.

Als primäres Ziel wurde der Vergleich von Expression und zonaler Verteilung proinflammatorischer Marker (COX-1, COX-2, CD68, Il-1 β , Il-6 und TNF- α) zw. CIH und NOX im WT und iNOS-KO definiert. Dies wurde mittels zweier Methoden untersucht, auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR (COX-1, CD68, Il-1 β , Il-6 und TNF- α) sowie immunhistochemischer Färbung (COX-2 und CD68).

Sekundäres Ziel war im selben Kontext die Untersuchung der RNA-Expression von mehreren angiogenetischen Markern und deren Rezeptoren (VEGF-A, VEGF-B, KDR), die an der Entwicklung der Leberfibrose beteiligt sind, von Scavenger-Rezeptoren (CD36 und LOX-1), die im Zusammenhang mit der Entwicklung einer NAFLD bei OSAS stehen, sowie von SOCS-3, das mit einer Insulinresistenz vergesellschaftet ist.

Zusätzlich wurde der Einfluss von CIH auf die Hepatozytenproliferation (Ki-67), die GS und die hepatische Glykogenspeicherung untersucht. Für Ki-67 und dessen zonale Verteilung sowie die GS wurde eine Immunhistochemie durchgeführt, die zonale Glykogenverteilung wurde mittels PAS-Färbung dargestellt und jeweils in CIH und NOX verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav Heratherm Oven OMS 100	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Axio Imager M2 Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axiocam HRc	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner FIREBOY plus	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Chip Priming Station	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Heizplatte IKA MAG RCT	Janke und Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Kryostat Jung Frigocut 2800E (Reichert und Jung)	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Orthoplan	Leitz, Wetzlar, Deutschland
MJ-Research PTC-200 Thermocycler	Global Medical Instrumentation Inc., Ramsey, USA
MS3 Vortexer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PHMT-PSC-15 Thermoshaker	Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK
Thermocycler Mx3005P QPCR Systems	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
TKA Gen Pure mit xCAD Dispenser	Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert, Deutschland
Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortexer VF2	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Material und Methoden

Waage K7	Mettler, Zürich, Schweiz
Wärmeschrank Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Perfect Spin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge Pico 17	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

2.1.2 Gebrauchsartikel

96-Loch-Platte	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Combitips plus, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Cups Safe Seal Micro Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Einmalkanüle Sterican®	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalskalpell	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Filterspitze SafeSeal Tips Permium Cell Saver, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filterspitze, steril	STARLAB GmbH, Hamburg
Manuelle Pipetten	Eppendorf Research, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mini MR1 basic Magnetrührer	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim, Deutschland
Safe Seal Micro Tube	SARSTEDT AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Tube	SARSTEDT AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Verschlussstreifen für 96-Loch-Platte	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA

Tabelle 4: Liste der verwendeten Gebrauchsartikel

Material und Methoden

2.1.3 Chemikalien

Affinity Script Buffer	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Buffer DNase1 + MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DAB-Verdünnungspuffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DePex Eindeckmittel Gurr®	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Desoxyribonuklease I (DNase)	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Destilliertes Wasser, DNase-/RNase-frei	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Diaminobenzidin (DAB) Substrate Peroxide Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
dNTP Mix	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ Mg ²⁺ (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Eosin G (Certistain®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 96 %	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Ethanol absolute, ≥ 99,8 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Flüssigstickstoff	Linde AG, München, Deutschland
Gelantine gepulvert	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun-Lösung nach Mayer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Arcos Organics, New Jersey, USA
Isopropanol ≥ 99,7 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchrom(III)-sulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol anhydrous, 99,8 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Normales Schweineserum (NSS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Material und Methoden

Nukleotriphosphate (dNTP)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Oligo (dt) 18 Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland
Periodic Acid Solution	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Pferdeserum (HS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Reverse Transkriptase	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Ribolock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
RNase Away®	Molecular Bio Products, San Diego, USA
RNasin® Ribonuklease Inhibitor	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Schiff's Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tissue-TEK O.C.T™ COMPOUND	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Xylol > 98 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

Name	Katalognummer	Firma
monoklonaler Ratte anti-Maus CD68	MCA1957	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
polyklonaler Kaninchen anti-Maus COX-2	ab15191	Abcam plc, Cambridge, UK
polyklonaler Kaninchen anti-Maus Glutaminsynthetase	ab73593	Abcam plc, Cambridge, UK
polyklonaler Kaninchen anti-Maus Ki-67	ab15580	Abcam plc, Cambridge, UK

Tabelle 6: Liste der verwendeten Primärantikörper

Sekundärantikörper

Name	Katalognummer	Firma
Polyklonaler HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen	ZRH1158	LINARIS-Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland
Polyklonaler HRP-konjugierter Ziege anti-Ratte	STAR72	AbDSerotec, Düsseldorf, Deutschland

Tabelle 7: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

2.1.5 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Quiagen GmbH aus Hilden, Deutschland bezogen.

Zielgene:

Abkürzung	Katalognummer	Amplicon (bp)	Offizieller Name
CD36	QT01058253	149	CD36 antigen
CD68	QT00254051	67	CD68 antigen
Il-1 β	QT01048355	150	Interleukin-1-beta
Il-6	QT00098875	128	Interleukin-6
KDR	QT02519972	95	Kinase insert domain protein receptor
Nos2 (iNOS)	QT00100275	118	Nitric oxide synthase 2, inducible
Olr1 (LOX-1)	QT01552124	114	Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
Ptgs1	QT00155330	142	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (COX-1)
SLC1a4	QT00114394	118	Solute carrier family 1 (glutamate amino acid transporter), member 4
SOCS3	QT02488990	90	Suppressor of cytokine signaling 3
TNF- α	QT00104006	111	Tumor necrosis factor
VEGF-A	QT00160769	117	Vascular endothelial growth factor A
VEGF-B	QT01059863	125	Vascular endothelial growth factor B

Tabelle 8: Liste der verwendeten Zielgene

Housekeeping-Gene

Abkürzung	Katalognummer	Amplicon (bp)	Offizieller Name
Gapdh	QT01658692	144	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hprt	QT00166768	168	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
Rplp0	QT00249375	125	Ribosomal protein, large, P0
Tbp	QT00198443	114	TATA-Box Binding Protein

Tabelle 9: Liste der verwendeten Housekeeping-Gene

2.1.6 Gebrauchsfertige Systeme

Kit	Inhalt	Hersteller
Affinity Script Multiple Temperature Reverse Transcriptase	- Affinity Script Multiple Temperature reverse Transcriptase - 10x Affinity Script RT Puffer - 100mM DTT	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit	- Agilent RNA 6000 Nano-chips - Elektrodenreiniger-Chips - Agilent RNA 6000 Ladder - RNA Nano Dye Konzentrat - Agilent RNA 6000 Nano Marker - Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Brilliant III Ultra-Fast SYBER® Green QPCR Master Mix	- 2x Brilliant III Ultra-Fast SYBER® Green QPCR Master Mix - Reference dye (1mM)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Diaminobenzidin (AB, HRP-Substrat)	- DAB/ metal concentrate (x10) - Peroxid-Puffer	Roche Diagnostics, Deutschland GmbH, Mannheim

Tabelle 10: Liste der verwendeten gebrauchsfertigen Systeme

2.1.7 Software

Axio Vision Release 4.8.2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Image J 1.45s	U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Excel 2011, Version 14.0.0	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2011, Version 14.0.0	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NormFinder.xla	Molecular Diagnostics Laboratories, Connington, USA
MxProQPCR Software	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA

Tabelle 11: Liste der verwendeten Software

2.2 Methoden

2.2.1 Das Mausmodell der CIH

Es wurde ein etabliertes Mausmodell untersucht, bei dem WT-Mäuse (C57BL/6J-Mäuse) der Firma Charles-River Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland) durch CIH (30 Zyklen/h, im Wechsel FiO_2 6–7 % und 21 %, 8 h/Tag, 5 Tage/Woche, über 6 Wochen) ein AHI von 30 simuliert wurde, was einem moderat-schweren OSAS entspricht. Dabei wurde durch eine Stickstoffzufuhr die Sauerstoffkonzentration zyklisch von 21 % auf 6–7 % reduziert.

Neben der CIH-Interventionsgruppe (WT CIH, $n = 8$) standen jeweils Kontrolltiere desselben Genotyps unter Normoxie (NOX) zur Verfügung (WT NOX, $n = 8$). Die Kontrollgruppe wurde unter Raumlufte, d. h. FiO_2 21 %, entsprechend den CIH-Expositionszeiten gehalten.

Neben den WT-Mäusen wurden außerdem iNOS-KO-Mäuse (Stamm B6.129P2-Nos2^{tm1Lau/J}) jeweils in NOX (iNOS NOX, $n = 8$) und unter CIH (iNOS CIH, $n = 8$) untersucht und wurden mit WT NOX oder WT CIH verglichen.

Das Mausmodell stand im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit Prof. Dr. N. Weissmann (Justus-Liebig-Universität Gießen; ECCPS Professur Molecular Mechanisms of Emphysema, Hypoxia and Lung Aging), Prof. Dr. R. Kinscherf und Prof. Dr. W. Hildebrandt zur Verfügung (Förderung durch von Behring-Röntgen-Stiftung 2011, Nr. 580071). Für diese Untersuchungen lag eine Genehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen vor (Aktenzeichen: GI 20/10 Nr. 84/2011) (Kraut, 2014).

Material und Methoden

Das Modell simuliert CIH als OSAS-Komponente in einer homogenen Mäusegruppe, ohne die typischen, klinisch unvermeidbaren Confounder wie OSAS-Schweregrad, Übergewicht, Rauchen, Inaktivität u. a. m. zuzulassen. Pathophysiologisch typische Faktoren des OSAS wie die obstruktionsbedingten intrathorakalen Druckschwankungen oder Änderungen des $p\text{CO}_2$ bleiben in diesem Modell unberücksichtigt.

Die 8–12 Wochen alten Mäuse wurden im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität gehalten und mit Wasser und Futter ad libitum versorgt (Kraut, 2014).

2.2.2 Gewebeprobeentnahme

Nach 6 Wochen NOX-/CIH-Exposition wurden die Tiere geopfert und Lebergewebe wurde für die im Anatomischen Institut in Marburg durchgeführten Laboranalysen kryosasserviert. Die Tiere wurden mit Ketaminhydrochlorid und Xylazin narkotisiert, nachdem sie heparinisiert wurden, um anschließend die Organe zu entnehmen. Nach vorsichtiger Resektion der Leberproben wurde ein Teil der Organe in Tissue-TEK eingebettet und in N_2 gekühltem Isopentan Schraubdeckeltubes schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert, während das Gewebe für die histologische Untersuchung einer Formaldehyd-Fixierung mit nachfolgender Behandlung in Kochsalz- Alkohollösung unterzogen wurden (Kraut, 2014).

Parallel dazu wurden auch Myokard- und Skelettmuskelproben, Lunge und Gefäße (A. carotis, A. pulmonalis, A. femoralis, A. renalis) entnommen, die im Rahmen separater Arbeiten untersucht wurden.

2.2.3 Herstellung von Kryoschnitten

Aus den Tissue-TEK-Blöcken wurden mit einem Kryomikrotom bei -20°C ca. $7\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte beider Leberlappen gefertigt und auf Objektträgern aufgenommen. Diese Objektträger wurden zuvor mit Chromalaun-Gelatine beschichtet, um eine bessere Anhaftung der Kryoschnitte zu erzielen.

Chromalaun-Gelatine: 1,0 g Gelatine, 0,1 g Kaliumchrom-III-Sulfat,
 200 ml Aqua dest. bei 50°C

Material und Methoden

Durchführung der Chromalaun-Gelatine-Beschichtung:

1,0 g Gelatine in 100 ml Aqua dest. bei 50 °C	10 min
0,1 g Kaliumchrom-III-Sulfat in 100 ml Aqua dest. bei 50 °C	10 min
Gelatine und Kaliumchrom in Magnetprüher	10 min
Auftragen der Chromalaun-Gelatine auf Objektträger	
Trocknen	

2.2.4 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung histologischer Schnitte

Die HE-Färbung ermöglicht einen Überblick über den Gewebeschnitt und die Zellmorphologie. Es wurde von jeder Gewebeprobe ein Kontrollschnitt mittels HE-Färbung eingefärbt, um die Qualität, insbesondere vor immunhistochemischen Färbungen hinsichtlich pathologischer Veränderungen, zu überprüfen.

Die HE-Färbung ist eine weit verbreitete Färbung in der Histologie. Der Farbstoff Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie die Zellkerne und das raue endoplasmatische Retikulum blau an, während eosinophile Strukturen wie das Zytoplasma und die Interzellularsubstanz durch Eosin rot angefärbt werden (Fanghänel, 2018). Danach werden die Schnitte zur Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt.

Hämalaun:	0,1 g Hämatoxylin, 0,02 g Natriumjodat, 5,0 g Kalialaun 100 ml Aqua dest.
Eosin:	100 ml Eosin Y (1 %), 10 ml Phloxin B (1 %), 780 ml Ethanol (96 %), 4 ml Eisessig

Durchführung der HE-Färbung:

Färbung:

1. Inkubation in Hämalaun nach Mayer 30 s
2. Bläuen unter Leitungswasser 10 min
3. Inkubation in Eosin 3 min
4. Waschen in Aqua dest. 1 min

Entwässerung:

1. Ethanol 96 % 5 min

Material und Methoden

2. Isopropanol	2 x 5 min
3. Xylol I	5 min
4. Xylol II	5 min
5. Xylol III	5 min

Anschließend wurden die Schnitte mit DePex-Eindeckmittel und einem Deckglas eingedeckt.

2.2.5 Periodic-acid-Schiff-reaction(PAS)-Färbung histologischer Schnitte

Diese Färbung kam zum Einsatz, um Glykogen in Leberzellen anzufärben. Durch die Periodsäure werden freie Hydroxygruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert, an die wiederum das Schiff'sche Reagenz bindet und dadurch in einen purpurroten Farbstoff übergeht.

Periodic Acid Solution: 1 g Periodic Acid, 100 ml Aqua. dest.

Durchführung der PAS-Färbung:

Fixierung in Formalin 4 %	10 min
Waschen unter Leitungswasser	1 min
Inkubation in Periodic Acid Solution 1 %	5 min
Waschen in Aqua dest.	3 x 5 min
Inkubation in Schiffs Reagenz	15 min
Waschen unter Leitungswasser	5 min
Kernfärbung: Hämatoxylin	30 s
Bläuen unter Leitungswasser	10 min
Entwässerung entsprechend der HE-Färbung	

Eindeckung mit DePex und einem Deckglas

2.2.6 Immunhistochemische Färbung histologischer Schnitte

Die Methode der Immunhistochemie dient dazu, bestimmte Antigene in einem Gewebe sichtbar zu machen (Immunlokalisation). Das Grundprinzip der indirekten Methode beruht darauf, dass ein bestimmter Primärantikörper spezifisch eine antigene Domäne eines Proteins des Gewebes bindet. Anschließend wird der Schnitt mit einem Sekundärantikörper (ein polyklonaler HRP-konjugierter Ziegen Anti-Kaninchen oder Anti-Ratte Antikörper) inkubiert, der wiederum spezifisch an den Primärantikörper bindet. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird dann über die Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) visualisiert.

Durchführung der Immunhistochemie:

Tag 1:

1. Fixierung der Kryoschnitte in 4 % PFA/PBS 10 min
2. Waschen in PBS 3x 5 min
3. Blocken in 1 % NSS/PBS oder NPS/PBS bei 37 °C 30 min
4. Absaugen des 1 % NSS/PBS oder NPS/PBS
5. Auftragen des jeweiligen ersten Antikörpers (bzw. PBS auf die Schnitte der Negativkontrolle) und Inkubation über Nacht bei 4–6 °C

Tag 2:

1. Absaugen
2. Waschen in PBS 3 x 5 min
3. Inkubation des jeweiligen zweiten Antikörpers bei RT 50 min
4. Absaugen
5. Waschen in PBS 3 x 5 min
6. Auftragen von DAB 5 min/nach Sicht
7. Waschen in PBS 2 x 5 min
8. Hämalanbad nach Mayer 30 s
9. Bläuen unter Leitungswasser 10 min
10. Entwässerung entsprechend der HE-Färbung
11. Eindeckung mit DePex und einem Deckglas

Primärantikörper	Verdünnung Primärantikörper	Sekundärantikörper	Verdünnung Sekundärantikörper	Blockierung
CD68 Antikörper	1:100	Polyklonaler Horseradish Peroxidase(HRP)-konjugierter Ziege anti-Ratte	1:100	NSS
COX-2 Antikörper	1:200	Polyklonaler HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen	1:200	NSS +NPS
Glutaminsynthetase Antikörper	1:500	Polyklonaler HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen	1:100	NSS
Ki-67 Antikörper	1:500	Polyklonaler HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen	1:200	NSS

Tabelle 12: Primärantikörper und Sekundärantikörper, Verdünnung und Blockierung

Als Negativkontrolle wird anstelle des Primärantikörpers die gleiche Menge PBS-Puffer auf das Gewebe aufgetragen, während sich das restliche Vorgehen nicht von dem mit einem Antikörper bei den übrigen Proben unterscheidet.

2.2.7 Auswertung der Immunhistochemie

Zur Untersuchung des Gewebes bzgl. der Expression der Entzündungsmarker (CD68, COX-2), der GS sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 wurden Antikörper gegen diese Proteine verwendet (vgl. Tabelle 12).

Die Fotodokumentation der Schnitte erfolgte mit dem Mikroskop Axiomager M2 bzw. mit dem Bildverarbeitungsprogramm AxioVision Rel.4.8 bei einer 10-fachen Bildvergrößerung. Von 8 Mäusen je Gruppe (WT NOX, WT CIH) wurden Kryoschnitte des rechten und linken Leberlappens mit guter Qualität in der HE-Färbung ausgewählt. Je Leberlappen wurden zwei Zentralvenen (ZV) und zwei Glissontrias (GT) ausgewertet.

Die Addition des maximalen Gefäßlumendurchmessers und der dazu senkrechten Lumenweite definierte den Radius eines Kreises um ZV oder GT, in dem COX-2-positive und Ki-67-positive Zellen bzw. COX-2-negative und Ki-67-negative Zellen in % positive Zellen bestimmt wurden. Bei CD68 wurde dagegen die Zahl positiver Zellen pro Fläche

Material und Methoden

ermittelt (vgl. Abb. 3). Auch bei der GS wurde die Fläche der positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche des Leberschnittes bestimmt, die Auswertung erfolgte automatisiert. Zunächst wurden hierfür Segmentierungen unter Berücksichtigung (Ausschluss) von Gewebedefekten/-lücken, Gefäßen, insbesondere, wenn schräg angeschnitten, festgelegt, die standardisiert und automatisch für alle Präparate angewendet werden konnten (vgl. Abb. 4).

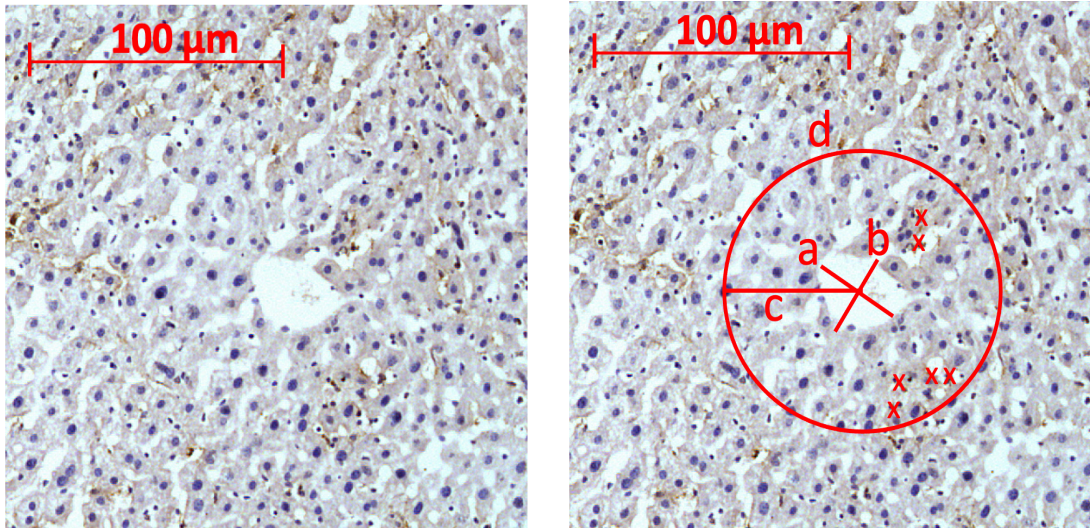


Abbildung 3: Darstellung der Vorgehensweise bei der Auswertung der (immun-)histologischen Bilder am Beispiel von CD68; Vergrößerung 10-fach

ZV unbearbeitet (links), ZV-Lumen vermessen und positive Zellen markiert (rechts).

a: maximaler Durchmesser, b: senkrechte Lumenweite zum maximalen Durchmesser,

c (Radius) = a + b, d: Kreis, x: positive Zellen

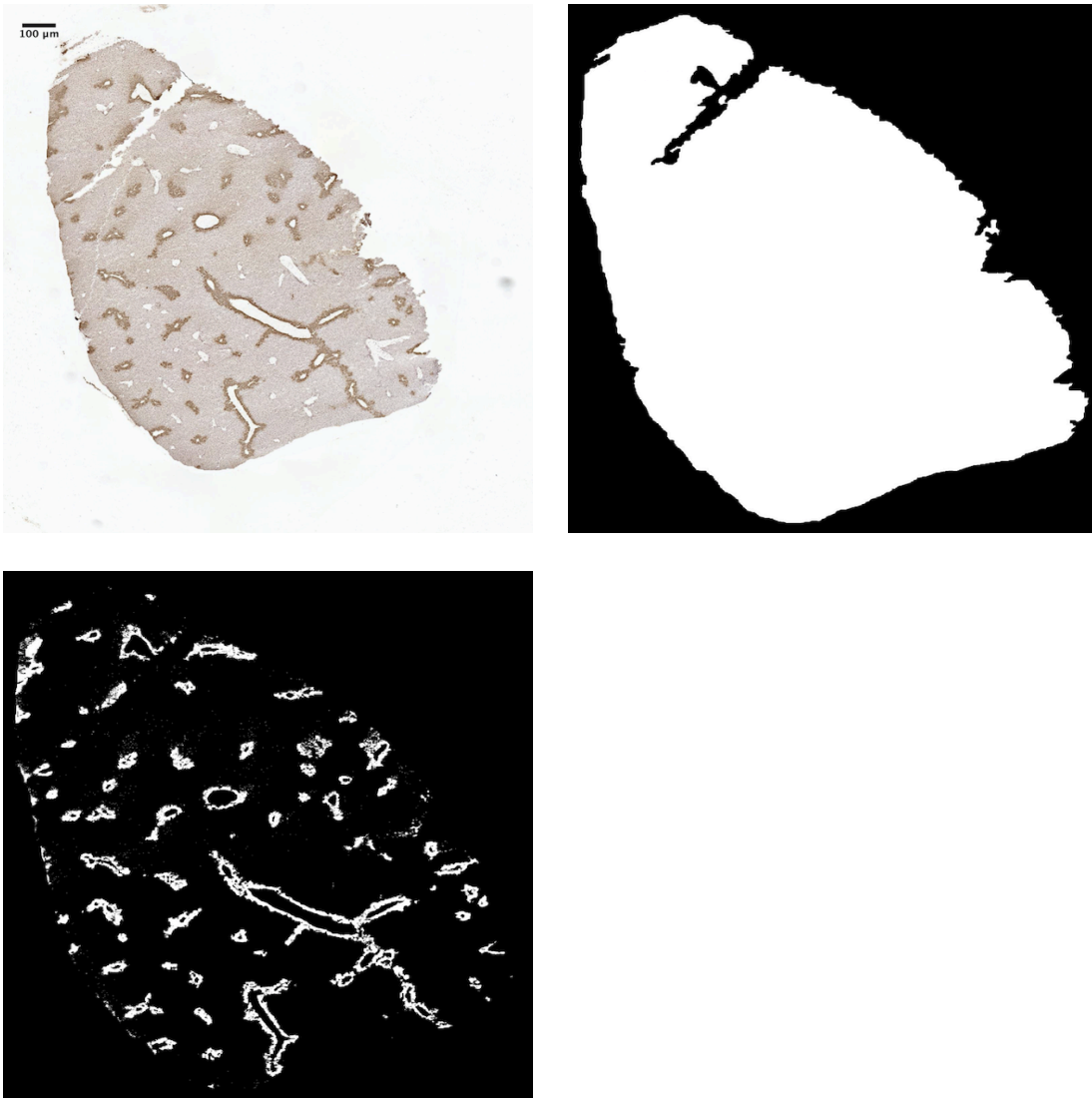


Abbildung 4: GS, Immunhistochemie im WT

Immunhistochemie GS original (oben links), Gesamtfläche des Gewebe-Kryo-Schnitts (oben rechts), positiv gefärbte Zellen (unten links).

2.2.8 Auswertung der PAS-Färbung

Analog zur immunhistochemischen Färbung wurden auch für PAS-positive Zellen pro Leberlappen 2 ZV bzw. 2 GT von 8 Mäusen ausgewertet. Wie auch bei der Immunhistochemie bestimmte die Addition des maximalen Gefäßlumendurchmessers und der dazu senkrechten Lumenweite den Radius des Kreises, in dem PAS-positive bzw. PAS-negative Zellen gezählt wurden.

2.2.9 Molekularbiologische Analyse der Leberbiopsien mittels qRT-PCR

2.2.9.1 RNA-Extraktion

Nach gründlicher Desinfektion aller Arbeitsflächen mit 70 % Ethanol wurde das Gewebe unter eingeschaltetem Abzug verarbeitet. Um eine Erwärmung der Gewebeproben zu verhindern, wurde auf Trockeneis gearbeitet und die verwendeten Utensilien wurden mittels flüssigen Stickstoffs gekühlt. Die Gewebeproben der Leber wurden mit sterilem Mörser und Stößeln bis zur pulverförmigen Konsistenz zerkleinert. Für die qRT-PCR erfolgte ein Poolen des Lebergewebes jeweils eines Lappens von je 8 Tieren pro Gruppe. Nach Zerkleinerung wurde 1 ml TRIzol auf die Probe gegeben und mithilfe einer Saugkanüle vermengt. Nach Inkubation der Proben von 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform addiert und für weitere 5 min inkubiert. Hierbei war darauf zu achten, dass die Caps regelmäßig geschüttelt wurden. Nun wurde jede Probe für 10 min zentrifugiert (13 000 rpm, 4 °C) und so eine Bildung von drei Phasen herbeigeführt. Die oberste, RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in einen neuen Cup überführt. Nach Zugabe von Isopropanol zur Präzipitation der RNA und gutem Mischen der Probe erfolgte eine Inkubation bei -70 °C über Nacht. Anschließend wurden die Proben 40 min abzentrifugiert (13 000 rpm, 4 °C) und der Isopropanolüberstand wurde abgenommen. Außerdem wurden 400 µl 70%iger Ethanol hinzugefügt, um das Pellet zu waschen. Die Proben wurden daraufhin wieder für 10 min zentrifugiert (13 000 rpm, 4 °C), der Überstand wurde verworfen und das Pellet für ca. 30 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurden zur besseren Lösung der RNA RNase Inhibitor sowie DNase- und RNase-freies H₂O in einem Verhältnis von 1:40 gemischt, auf die Proben gegeben und für 10 min bei 60 °C im Thermoshaker PHMT-PCS-15 inkubiert.

2.2.9.2 Quantitative Nukleinsäureanalyse

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben erfolgte mit dem NanoDrop® 2000c Spectrophotometer. Für eine Messung wurde 1 µl auf die Messoberfläche pipetiert und die Konzentration durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} wurde verwendet, um den Reinheitsgrad der RNA zu beurteilen. Ein Verhältnis von etwa 1,9 bis 2,1 wird als ‚rein‘ für RNA

gesehen. Atypische Absorptionsspektren und -quotienten $< 1,8$ kamen in den verwendeten RNA-Proben nicht vor. Die Messungen wurden als Zweifachbestimmung durchgeführt und daraus wurde das arithmetische Mittel gebildet.

2.2.9.3 Qualitative RNA-Analytik

Die qualitative RNA-Analytik erfolgte als Nanochip-Analyse, für die sämtliche RNA-Proben zunächst mit RNase-freiem H₂O auf eine Konzentration von unter 0,5 µg/µl verdünnt werden mussten. Die Integrität der isolierten Gesamt-RNA wurde mit dem RNA 6000 Nano Kit am Agilent-2001-Bioanalyzer ermittelt. Diese Technik ermöglicht durch das Prinzip der Elektrophorese eine Auftrennung nach Molekülgröße und eine Konzentrationsbestimmung von 12 Proben gleichzeitig.

Die Proben und ein mitgeführter Standard wurden in die Chip-Wells pipettiert. Durch zugefügte Farbmoleküle (RNA 6000 Nano Marker), die sich der RNA anlagerten, wurden die RNA-Fragmente und deren Laufzeiten registriert. Ein RNA ‚ladder standard‘, der 6 RNA-Fragmente mit einer Größe von 0,2 bis 6 kb beinhaltet, wurde als Referenz genutzt. Die Software verglich automatisch die Konzentration der unbekanntenen Proben mit dem ‚ladder standard‘. Über einen Fluoreszenzdetektor wurden die RNA-Fragmente und deren Laufzeiten registriert. Der Bioanalyzer generierte aus den Daten sowohl ein Elektropherogramm als auch gelähnliche Bilder. Als Maß für die Integrität wurde die RIN (RNA Integrity Number) verwendet. RIN-Werte variieren von 10 bei völlig intakter RNA bis 1 bei völlig geschädigter RNA (Schroeder, et al., 2006). Die RIN-Werte lagen in der vorliegenden Arbeit bei 7,68 (WT NOX), 7,26 (WT CIH), 8,02 (INOS-KO NOX) und 6,96 (INOS-KO CIH).

2.2.9.4 DNase-Verdau

Um eine Verunreinigung der RNA durch DNA zu vermeiden, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Nach langsamem Auftauen auf Eis wurde dazu die RNA-Probe (1 µg RNA) zunächst mit destilliertem RNase- und DNase-freien Wasser auf 7,5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Es erfolgten die Zugabe von 1 µl Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCL, 25 mM MgCl₂, pH 7,5) pro Probe sowie von 1,5 µl DNase I und die anschließende Inkubation im MJ Research PTC-200 Thermocycler bei 37 °C für 30 min. Nach Abschluss des Schrittes

wurde 1 μl 50 mM EDTA hinzugefügt und erneut für 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Abkühlung der Probe erfolgte auf Eis, die weitere Lagerung bei -80 °C.

2.2.9.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Da die PCR-Reaktion mit stabiler DNA durchgeführt wird, musste die RNA zunächst in DNA umgeschrieben werden. Diese DNA wird als komplementäre DNA (cDNA) bezeichnet. So wurden im nächsten Reaktionsschritt 0,5 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ Oligonucleotidprimer (Oligodt 18), die spezifisch für bestimmte DNA-Basenfolgen sind, zu den Proben hinzugegeben und die Probe wurde anschließend mit RNase- und DNase-freiem destilliertem Wasser auf 13,7 μl aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 65 °C für 5 min inkubiert und die Temperatur wurde für 10 min auf Raumtemperatur reduziert, um es den Primern zu ermöglichen, sich an die RNA zu heften. Im nächsten Schritt wurden 2 μl AffinityScript RT-Puffer (500 mM Tris-HCL, pH 8,3, 750 mM KCL, 30 mM MgCl_2), 2 μl DTT (100 mM), 0,8 μl dNTP-Mix (100 mM), 1 μl reverse Transkriptase sowie 0,5 μl Ribolock Inhibitor (40 U/ μl) zu den Proben hinzugefügt. Es entstand eine Lösung mit einem Endvolumen von 20 μl . Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen und können RNA- sowie DNA-Sequenzen als Matrize verwenden. Zunächst band die Polymerase an den RNA-Einzelstrang und ein komplementärer DNA-Strang wurde gebildet. Die Oligonukleotide dienten dabei als Startpunkt. Danach wurde durch die Exoribonukleaseaktivität der reversen Transkriptase der Hybridstrang aus RNA und DNA gespalten, um anschließend die cDNA mithilfe der dNTPs zu einem kompletten DNA-Doppelstrang zu vervollständigen. Dafür wurden die Proben für 1 h bei 42 °C inkubiert und danach für 15 min bei 70 °C inaktiviert. Für den DNase-Verdau und die cDNA-Synthese wurde das AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase verwendet.

2.2.9.6 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die die Quantifizierung von gewonnener DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mithilfe von Fluoreszenzmessungen ermöglicht. Dazu wurde in dieser Arbeit der unspezifisch in dsDNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBER Green I für die Detektion des Fluoreszenzsignals verwendet. Dieses nimmt mit der Menge der Dann-Produkte zu. Als Erstes wurde die cDNA-Lösung der jeweiligen Gruppen (WT NOX, WT CIH, iNOS-KO NOX, iNOS-KO CIH)

Material und Methoden

zu 4 Pools zusammengefasst und mit RNase- und DNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. Parallel wurden Standardproben, für die in Abhängigkeit vom jeweiligen Primer cDNA einer Mäuse-Referenz-RNA oder ein cDNA-Mix dient, in sequenzieller Verdünnung (1:10, 1:20, 1:40, 1:160, 1:320) mitgeführt. Die Standardansätze dienen der Erstellung einer Standardkurve. In Vorbereitung für die PCR wurde weiterhin 6 µl des 1:100 ROX Reference dye zum 2x Brilliant III Ultra-Fast SYBER®Green QPCR Master Mix hinzugegeben sowie die SYBER®Green-QPCR-Lösung angesetzt. Letzteres erfolgte durch Zugabe von 7,5 µl des angesetzten 2x Brilliant III Ultra-Fast die SYBER®Green QPCR Master Mix (enthält Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, Mg²⁺, einen Puffer und einen doppelsträngige DNA bindenden, fluoreszierenden Farbstoff SYBER Green I) zu 1 µl destilliertem RNase- und DNase-freiem Wasser und 1,5 µl Primer. Von dieser Lösung wurden 10 µl pro Well benötigt. Die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion erfolgte an der UV Sterilizing PCR Workstation. Es wurden zunächst 5 µl cDNA und Standard als Doppelbestimmung auf eine 96-Loch-Platte pipettiert. Als Negativkontrolle diente RNase- und DNase-freies Wasser, das anstelle von cDNA in ein freies Well pipettiert wurde. Anschließend erfolgte das Pipettieren von jeweils 10 µl SYBER®Green-QPCR-Lösung in jedes verwendete Well. Danach wurde die Platte mit Verschlussstreifen verschlossen, mit dem Vortexer gemischt und kurz zentrifugiert. Dann wurde die Platte in den PCR Block Mx3005P QPCR Systems gestellt und die Amplifizierung gestartet. Dies geschah mithilfe des Programms MxPro QPCR Software. Die PCR-Konditionen für die Reaktion waren: 95 °C für 3 min (initiale Denaturierung), gefolgt von 40 Zyklen mit 95 °C für 10 s (Denaturierung) und 60 °C für 20 s (Elongation), 95 °C für 1 min, 55 °C für 30 s und schließlich jeweils plus 1 °C, bis 95 °C erreicht waren, für 30 s (Schmelzkurvenanalyse). Mithilfe der Standardkurvenmethode erfolgte nun die relative Quantifizierung der Daten. Dabei diente für jedes zu untersuchende Genprodukt ein cDNA-Mix einer Mäuserferenz oder der zu untersuchenden Proben zur Erstellung der Standardkurve, die mittels linearer Regression Rückschlüsse auf die jeweiligen cDNA-Konzentrationen der zu untersuchenden Proben erlaubte. Um eine Normalisierung der cDNA zu ermöglichen, wurden die eingesetzten Gewebeproben auf ein ausgewähltes Haushaltsgen bezogen. Diese ‚Housekeeping-Gene‘ sind als Strukturproteine definiert, die eine konstante Expression, insbesondere unter den experimentell variierenden Bedingungen, aufweisen und entsprechend für alle Proben gleich exprimiert sein sollten. Diese Auswahl erfolgte unter Zuhilfenahme

des Programms Normfinder.xla aus verschiedenen zuvor getesteten Genen (Gapdh, Hprt, Rplp0, Tbp) und fiel in diesem Fall auf das Housekeeping-Gen Rplp0.

2.2.10 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen und Darstellungen der vorliegenden Arbeit wurden mit Microsoft Excel durchgeführt (Microsoft Excel 2011, Version 14.0.0, Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die Angabe der n-Zahl für die jeweiligen Gruppen entspricht immer der Anzahl der Tiere.

Für die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen verglichen. Für den Vergleich CIH vs. NOX wurde der *t*-Test für ungepaarte Stichproben bzw. im Falle einer nichtnormalen Verteilung der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für den Vergleich ZV vs. GT wurde der *t*-Test für gepaarte Stichproben bzw. im Falle einer nichtnormalen Verteilung der Wilcoxon-Test angewendet. Ein p-Wert < 0,05 wurde hierbei als statistisch signifikant angesehen. Die Daten wurden jeweils als Mittelwerte (MW) +/- Standardabweichung (SD) angegeben.

Im Rahmen der PCR-Messungen wurde Gewebe von jeweils 8 Proben der Tiere einer Versuchsgruppe gepoolt. Die x-fache Expression eines Gens erfolgte immer relativ zu WT NOX (= 1). Eine Veränderung größer Faktor 1,5 bzw. kleiner Faktor 0,5 wurde hierbei als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Effekt von CIH auf die hepatische Expression proinflammatorischer Marker im WT

Der prozentuale Anteil der COX-2-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der Auswertfläche im Lebergewebe unter CIH betrug 18,46 %, während der von NOX bei 16,00 % lag. Im *t*-Test war diese Differenz mit einem *p*-Wert von 0,12 nicht signifikant (vgl. Abb. 5, 6).

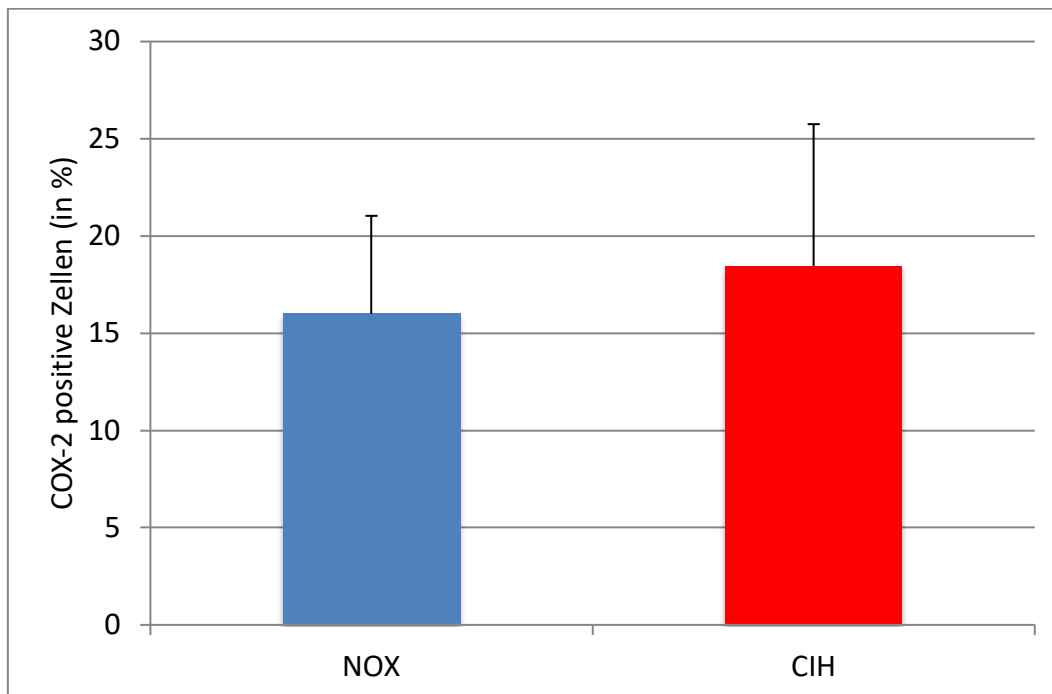


Abbildung 5: Effekt von CIH auf COX-2 im WT

Anteil (in %) der COX-2-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche im Lebergewebe unter NOX ($n = 8$) und unter CIH ($n = 8$). Gezeigt sind MW \pm SD; NOX vs. CIH $p = 0,12$.

Ergebnisse

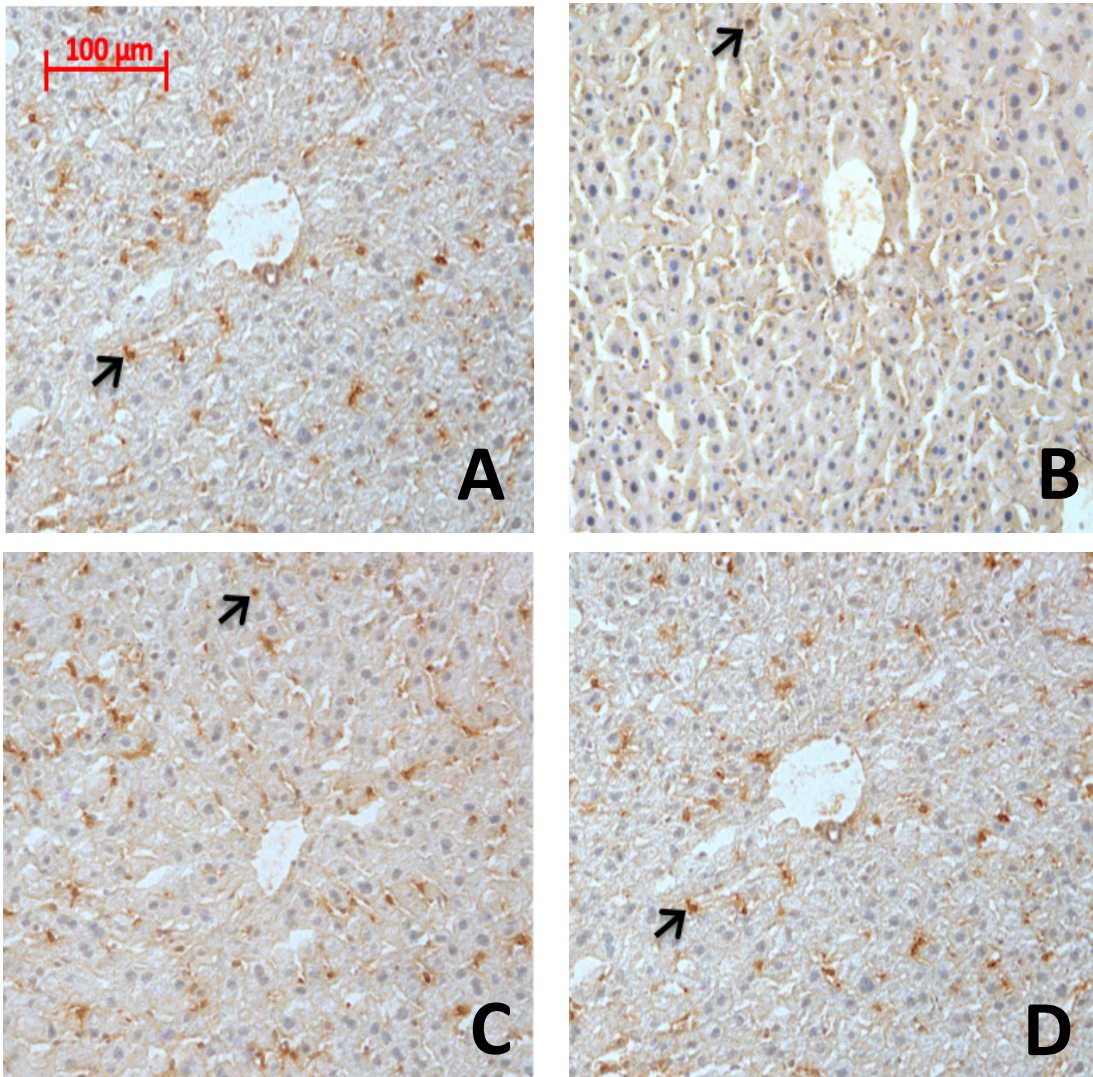


Abbildung 6: Effekt von CIH auf COX-2 im WT

Immunlokalisation von COX-2-positiven Zellen in Beispielen für A) ZV, NOX; B) GT, NOX; C) ZV, CIH und D) GT, CIH

Vergrößerung 10-fach. Positiv gefärbte Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet.

Ergebnisse

Der prozentuale Anteil der CD68-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtfläche der Auswertfläche im Lebergewebe von CIH betrug 0,092 Zellzahl/mm², während der von NOX bei 0,094 Zellzahl/mm² lag.

Im *t*-Test ergab sich zw. den Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,92$) (vgl. Abb. 7, 8).

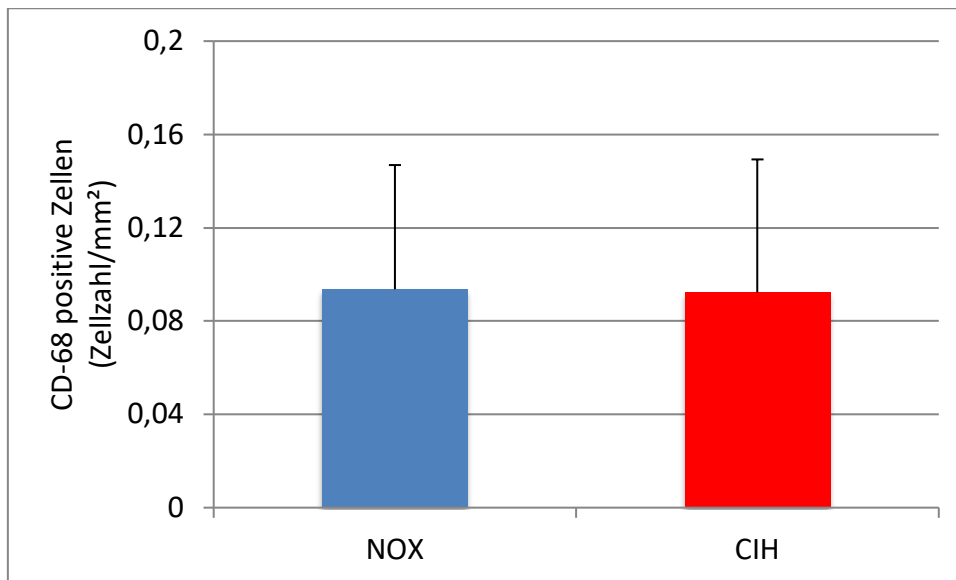


Abbildung 7: Effekt von CIH auf CD68 im WT

Anteil (Zellzahl/mm²) der CD68-positiven Zellen pro Fläche im Lebergewebe unter NOX ($n = 8$) und unter CIH ($n = 8$). Gezeigt sind MW +/- SD; NOX vs. CIH $p = 0,92$.

Ergebnisse

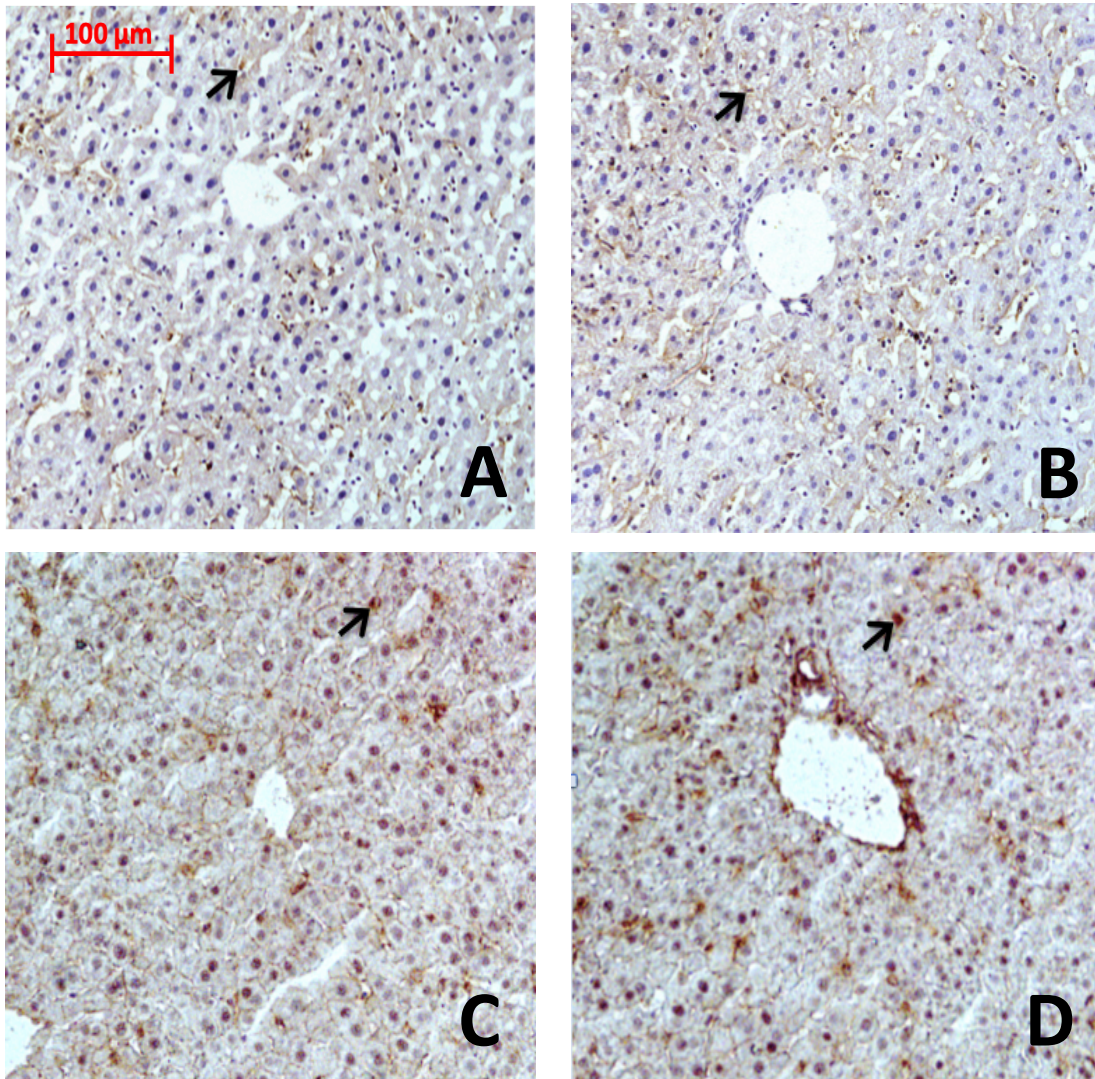


Abbildung 8: Effekt von CIH auf CD68 im WT

Immunlokalisation von CD68-positiven Zellen in Beispielen für A) ZV, NOX; B) GT, NOX; C) ZV, CIH und D) GT, CIH

Vergrößerung 10-fach. Positiv gefärbte Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet.

Immunhistologisch zeigten CD68- und COX-2-positive Zellen ein unterschiedliches zonales Verteilungsmuster in der CIH- sowie NOX-Gruppe. Für die beiden Entzündungsmarker wurde jeweils die Anzahl der positiven Zellen um ZV und GT verglichen.

In NOX und CIH konnten COX-2-positive Zellen vorwiegend um die ZV nachgewiesen werden. Der Unterschied zw. GT und ZV war sowohl unter NOX als auch unter CIH signifikant (NOX und CIH: $p < 0,05$) (vgl. Abb. 9).

Ergebnisse

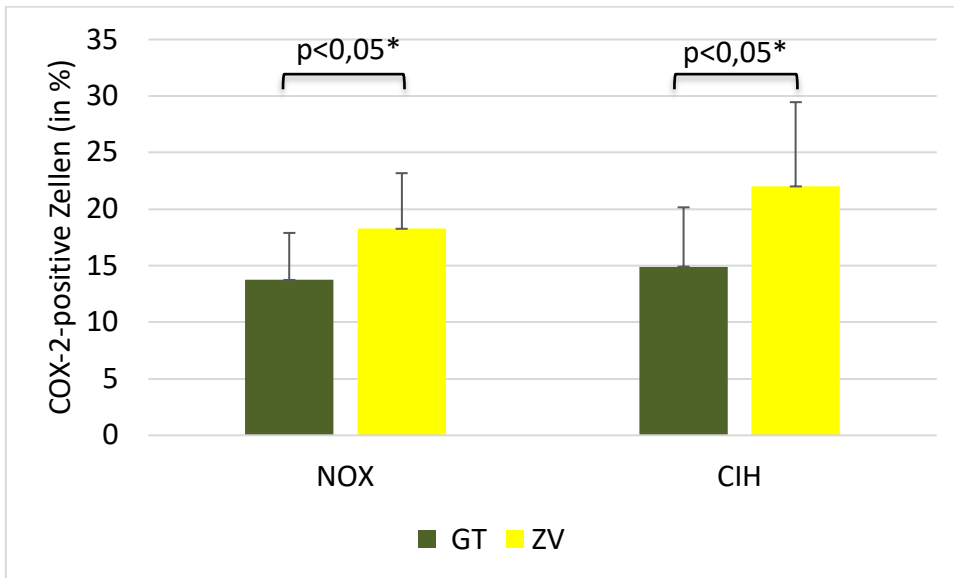


Abbildung 9: Effekt von CIH auf die zonale Verteilung von COX-2 im WT

Anteil (in %) der COX-2-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche um ZV (n = 8) und GT (n = 8) im Lebergewebe unter NOX und unter CIH. Gezeigt sind MW +/- SD.

Ergebnisse

CD68-positive Zellen befanden sich in NOX und CIH hauptsächlich im Bereich der GT. Der Unterschied zw. GT und ZV war in NOX signifikant (NOX: $p < 0,05$), nicht jedoch in CIH (CIH: $p = 0,33$) (vgl. Abb. 10).

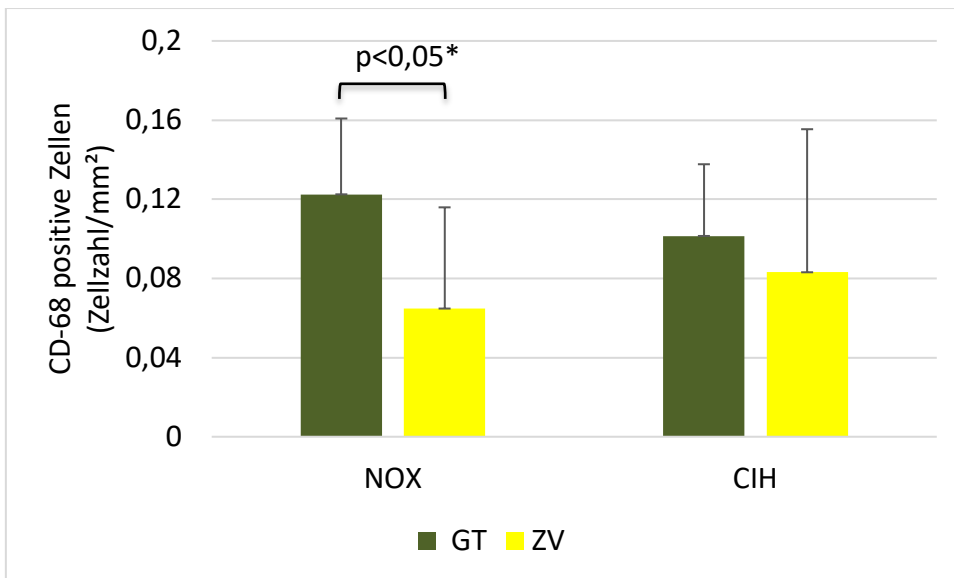


Abbildung 10: Effekt von CIH auf die zonale Verteilung von CD68 im WT

Anteil (Zellzahl/mm²) der CD68-positiven Zellen pro Fläche um ZV (n = 8) und GT (n = 8) im Lebergewebe unter NOX und unter CIH. Gezeigt sind MW +/- SD.

Darüber hinaus wurden die ZV/GT-Ratios zw. CIH und NOX für beide Marker verglichen, hierbei zeigte sich jeweils kein signifikanter Unterschied (COX-2: $p = 0,40$; CD68: $p = 0,11$).

3.2 Effekt von CIH auf den hepatischen Glykogenspeicher im WT

Die Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) zeigte keinen signifikanten Unterschied im prozentualen Anteil der PAS-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der Auswertfläche in der Leber von CIH (55,79 %) im Vergleich zu NOX (56,68 %) (vgl. Abb. 11, 12).

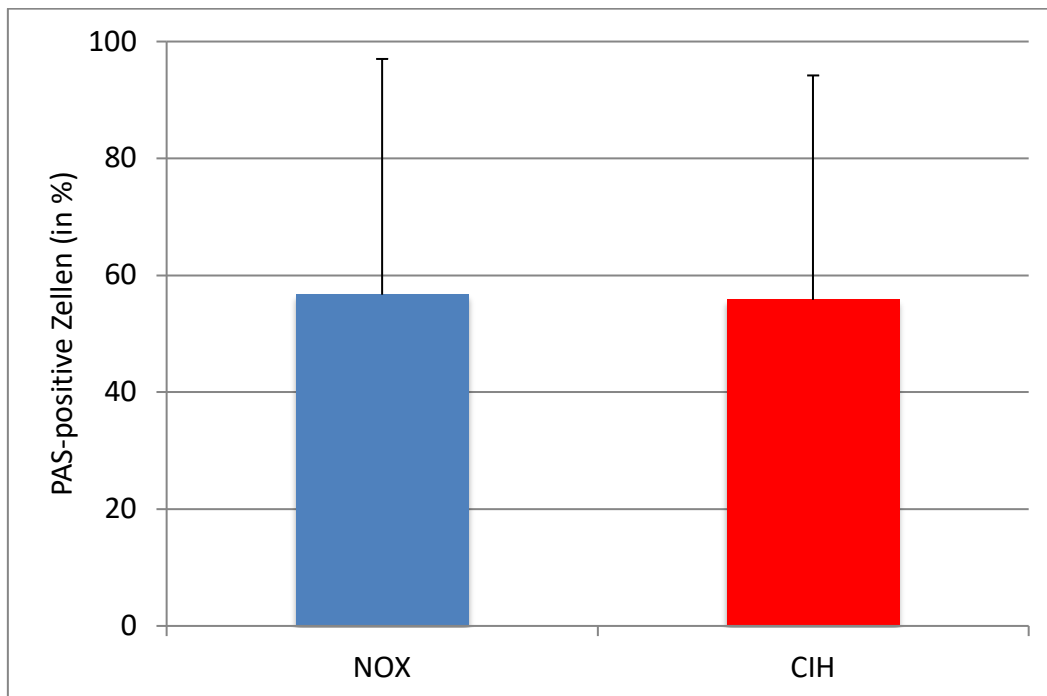


Abbildung 11: Effekt von CIH auf Glykogen im WT

Anteil (in %) der PAS-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche im Lebergewebe unter NOX (n = 8) und unter CIH (n = 8). Gezeigt sind MW \pm SD; NOX vs. CIH p = 0,93.

Ergebnisse

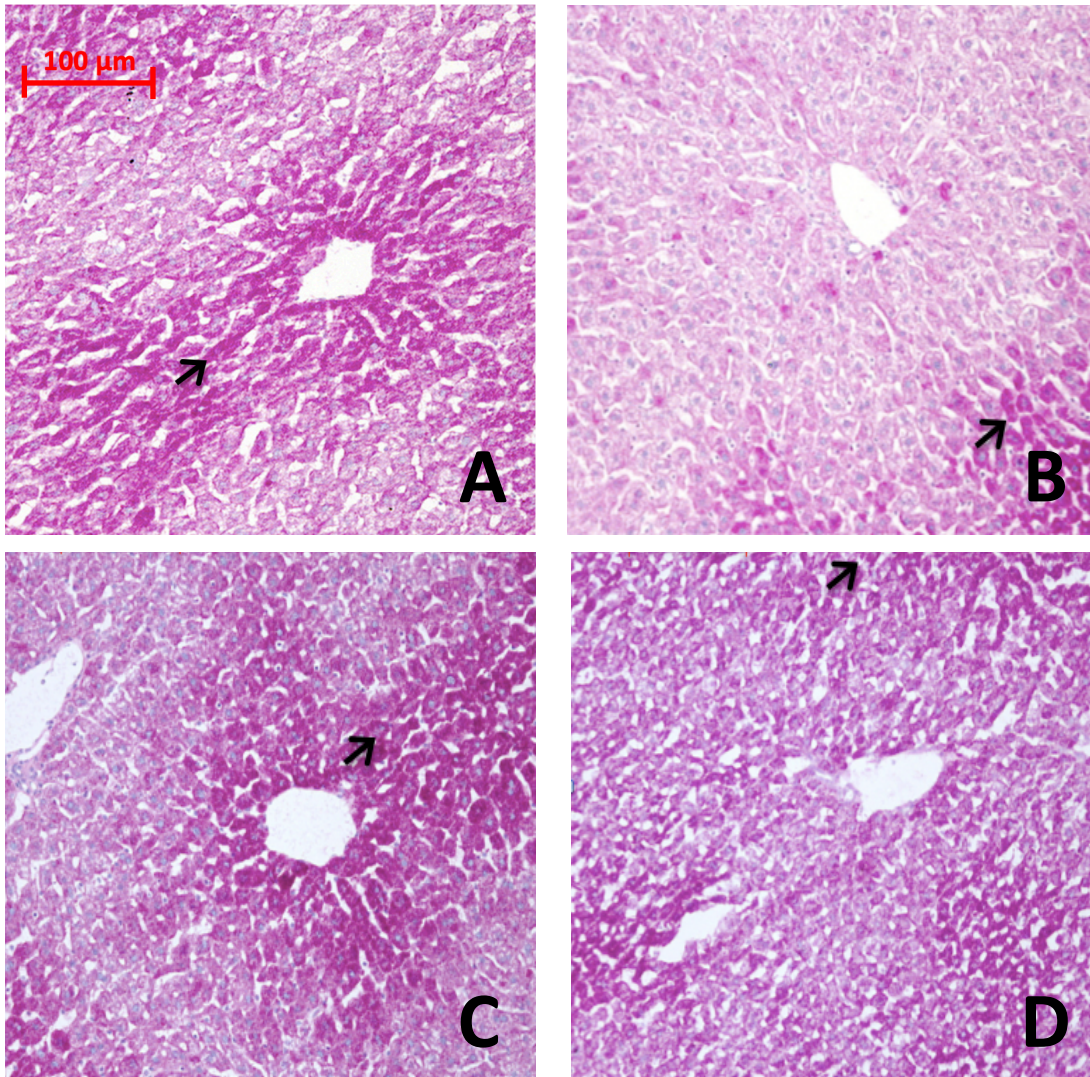


Abbildung 12: Effekt von CIH auf Glykogen im WT

Darstellung PAS-positiver Zellen in Beispielen für A) ZV, NOX; B) GT, NOX; C) ZV, CIH und D) GT, CIH

Vergrößerung 10-fach. Positiv gefärbte Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet.

Wie bei COX-2 und CD68 wurde auch für Glykogen die zonale Verteilung beurteilt. Es wurde die Anzahl der positiven Zellen um ZV und GT sowohl unter NOX als auch unter CIH verglichen. Sowohl unter NOX als auch unter CIH konnten signifikant mehr PAS-positive Zellen um die ZV als um die GT nachgewiesen werden ($p < 0,05$) (vgl. Abb. 13). Darüber hinaus wurden die ZV/GT-Ratios zw. CIH und NOX verglichen, hierbei zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p = 0,43$).

Ergebnisse

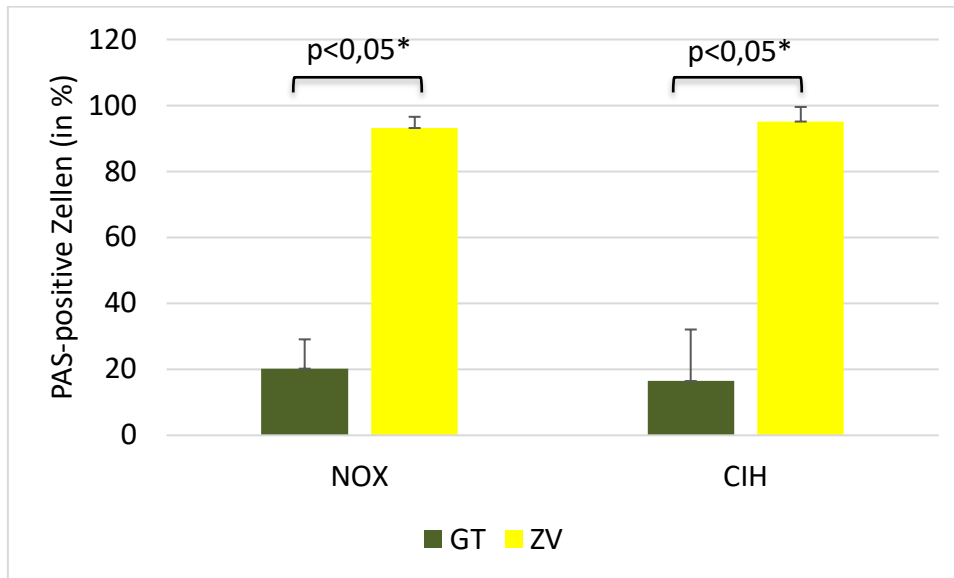


Abbildung 13: Effekt von CIH auf die zonale Verteilung von Glykogen im WT

Anteil (in %) der PAS-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche um ZV (n = 8) und GT (n = 8) im Lebergewebe unter NOX und unter CIH. Gezeigt sind MW +/- SD.

3.3 Effekt von CIH auf die hepatische Expression von Ki-67 auf Proteinebene im WT

Der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der Auswertfläche in der Leber betrug unter CIH 8,92 % und unter NOX 8,71 %, dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,85$) (vgl. Abb. 14, 15).

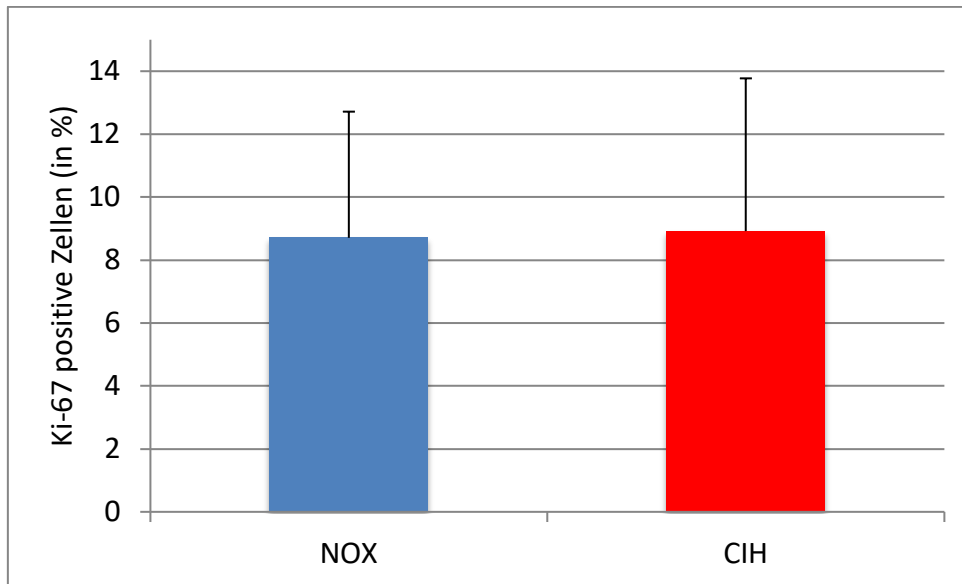


Abbildung 14: Effekt von CIH auf Ki-67 im WT

Anteil (in %) der Ki-67-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche im Lebergewebe unter NOX ($n = 8$) und unter CIH ($n = 8$). Gezeigt sind MW \pm SD; NOX vs. CIH: $p = 0,85$.

Ergebnisse

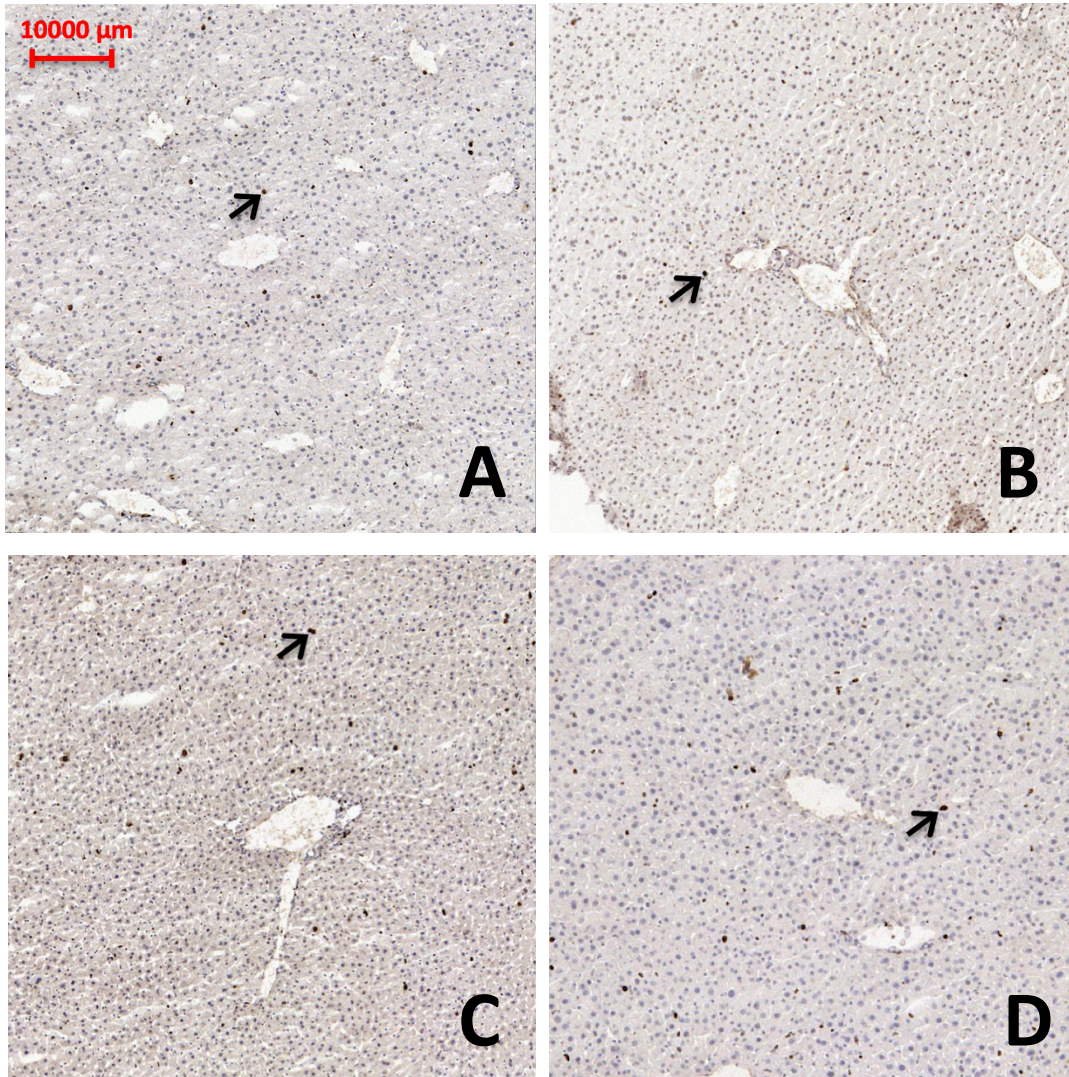


Abbildung 15: Effekt von CIH auf Ki-67 im WT

Immunlokalisation von Ki-67-positiven Zellen in Beispielen für A) ZV, NOX; B) GT, NOX; C) ZV, CIH und D) GT, CIH

Vergrößerung 10-fach. Positiv gefärbte Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet.

Ergebnisse

Es zeigte sich weder unter CIH noch unter NOX ein signifikanter Unterschied in der Fraktion Ki-67-positiver Zellen zwischen GT und ZV (NOX: $p = 0,39$; CIH: $p = 0,96$) (vgl. Abb. 16).

Für die ZV/GT-Ratios ergab sich zw. CIH und NOX ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p = 0,68$).

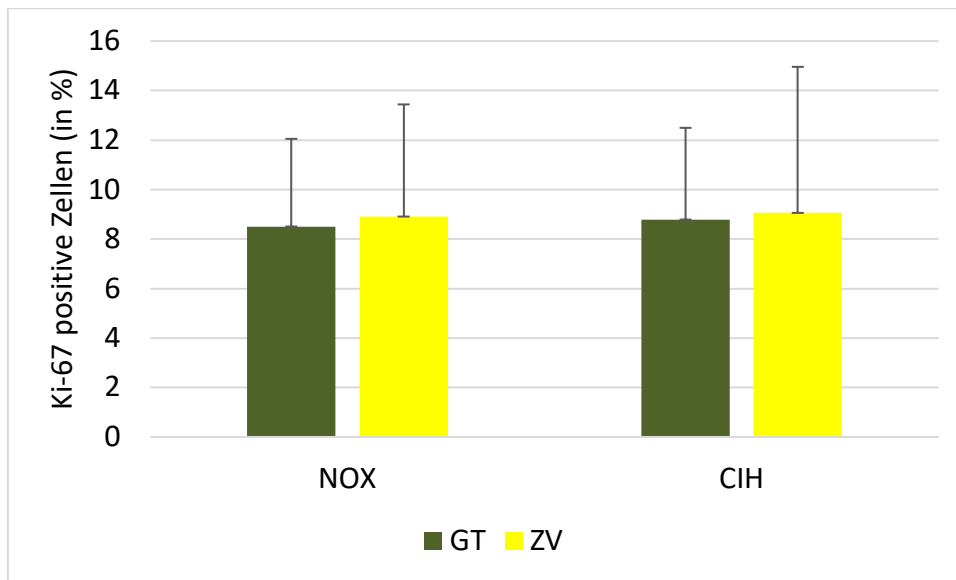


Abbildung 16: Effekt von CIH auf die zonale Verteilung von Ki-67 IM WT

Anteil (in %) der Ki-67-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl der Auswertfläche um GT ($n = 8$) und ZV ($n = 8$) im Lebergewebe unter NOX und unter CIH. Gezeigt sind MW \pm SD.

3.4 Effekt von CIH auf die hepatische Expression der Glutaminsynthetase (GS) auf Proteinebene im WT

Der prozentuale Anteil der GS-positiven Fläche bezogen auf die Gesamtfläche in der Leber betrug unter CIH 8,68 % und unter NOX 7,98 %. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,70$) (vgl. Abb. 17).

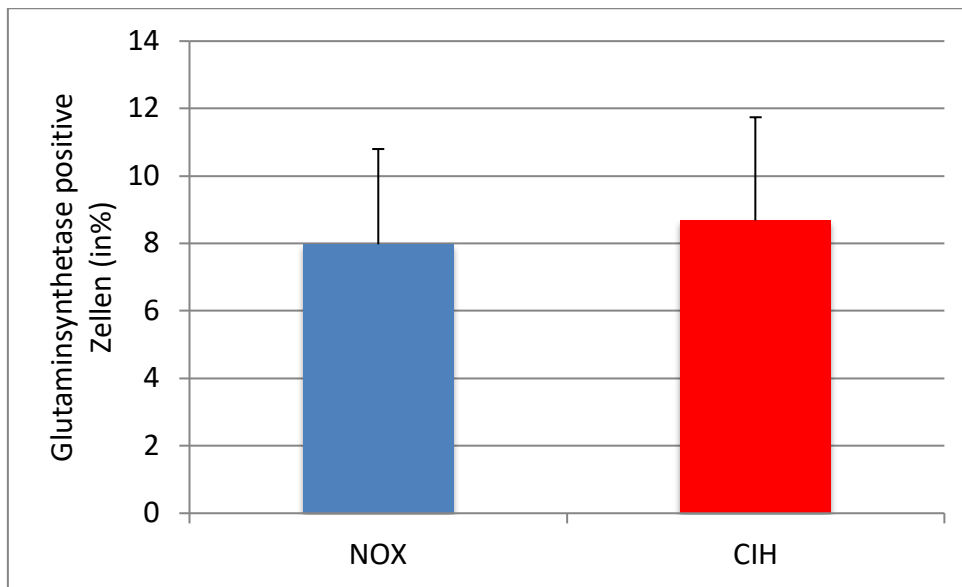


Abbildung 17: Effekt von CIH auf die GS im WT

Anteil (in %) der immunhistochemisch GS-positiven Fläche bezogen auf die Gesamtfläche im Lebergewebe unter NOX- ($n = 8$) und unter CIH- ($n = 8$) Mäusen. Gezeigt sind MW \pm SD; NOX vs. CIH $p = 0,70$.

Eine weitergehende Analyse bezüglich der zonalen Verteilung GS-positiver Zellen entfiel wegen der streng perivenösen Expression der GS.

3.5 Effekt von CIH auf die hepatische Expression von iNOS-RNA

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der PCR-Analysen Gewebe von jeweils 8 Proben der Tiere einer Versuchsgruppe gepoolt. Die Gewebeproben wurden auf ein ausgewähltes Housekeeping-Gen (Rplp0) bezogen.

Die graphische Darstellung erfolgte relativ zu NOX (= 1).

Die Genexpression von iNOS zeigte eine Reduktion auf das 0,12-Fache im Lebergewebe von CIH im Vergleich zu NOX (vgl. Abb. 18), die als signifikant ($< 0,5$) zu bewerten ist (vgl. Kapitel 2.2.10).

Bei iNOS-KO-Mäusen konnte, wie zu erwarten, keine iNOS-Genexpression in der Leber nachgewiesen werden.

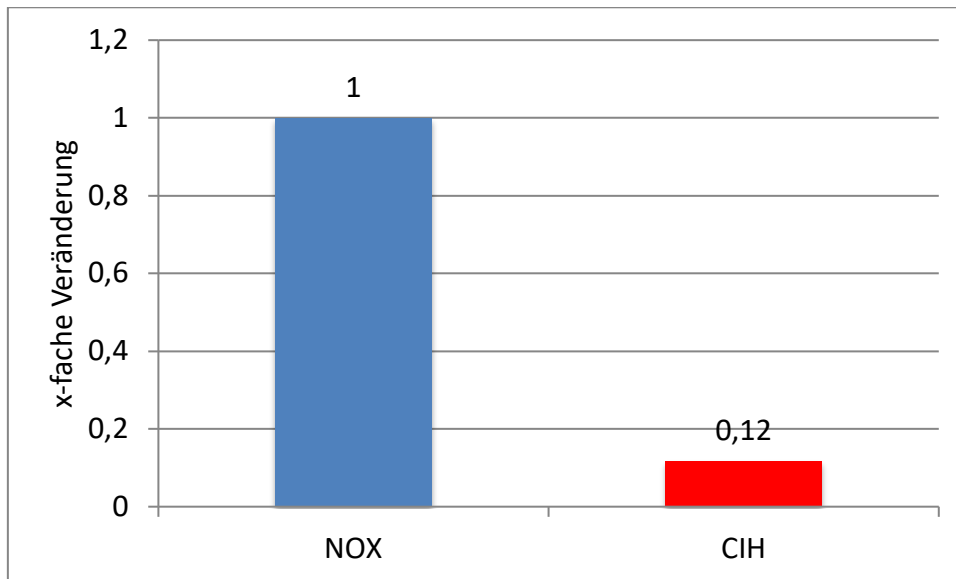


Abbildung 18: Effekt von CIH auf die Expression von iNOS im WT

iNOS-Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im Lebergewebe unter CIH relativ zu NOX (Referenzgruppe).

3.6 Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die hepatische Expression von proinflammatorischen Transkripten (COX-1, CD68, Il-1 β , Il-6 und TNF- α)

Im Vergleich von CIH zu NOX zeigte sich im Lebergewebe eine erhöhte Expression von COX-1 (1,89-fach), CD68 (1,37-fach), Il-1 β (2,42-fach), Il-6 (4,09-fach) und TNF- α (12,17-

Ergebnisse

fach). Dabei waren nur die Erhöhungen von COX-1, Il-1 β , Il-6 und TNF- α als signifikant ($> 1,5$; vgl. Kapitel 2.2.10) anzusehen.

Im Vergleich von iNOS-KO NOX zu WT NOX (= 1) zeigte sich im Lebergewebe, dass die relative Genexpression von COX-1 (1,16-fach) und CD68 (1,11-fach) nahezu gleichbleibend war, während für die übrigen proinflammatorischen Marker Reduktionen erkennbar waren: Il-1 β (0,62-fach), Il-6 (0,50-fach) und TNF- α (0,36-fach). Die Reduktion von TNF- α war dabei signifikant ($< 0,5$).

Im Vergleich von iNOS-KO CIH zu WT NOX (= 1) zeigten die Genexpressionen im Lebergewebe von COX-1, CD68, Il-1 β , Il-6 und TNF- α keine statistisch signifikanten Veränderungen: COX-1 (1,09-fach) und CD68 (1,04-fach), Il-1 β (0,92-fach), Il-6 (0,68-fach) und TNF- α (0,57-fach) (vgl. Abb. 19).

Im Vergleich von iNOS-KO CIH zu WT CIH zeigten die Genexpressionen im Lebergewebe von Il-1 β (0,39-fach), Il-6 (0,17-fach) und TNF- α (0,05-fach) eine statistisch signifikante Reduktion (vgl. Abb. 19).

Ergebnisse

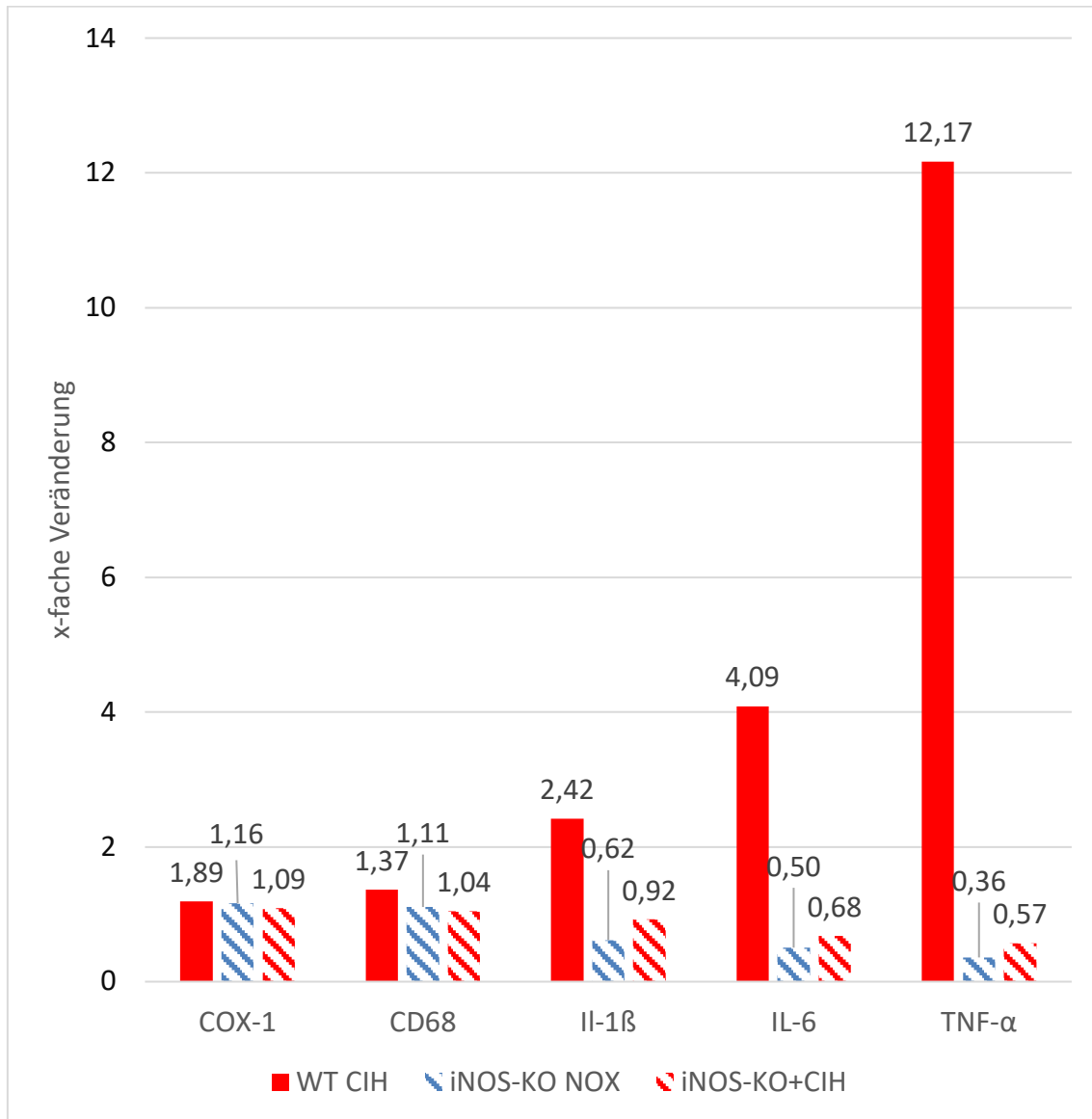


Abbildung 19: Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die RNA-Expression von COX-1, CD68, IL-1 β , IL-6 und TNF- α

Relative Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) der proinflammatorischen Marker (COX-1, CD68, IL-1 β , IL-6 und TNF- α) im Lebergewebe von WT CIH, iNOS-KO NOX und iNOS-KO CIH bezogen auf WT NOX (Referenzgruppe).

3.7 Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die hepatische Expression von SOCS-3-RNA

Im Vergleich von CIH zu NOX im WT zeigte sich im Lebergewebe eine signifikant (> 1,5) erhöhte Expression von SOCS-3 (1,60-fach).

Ergebnisse

Im Vergleich von iNOS-KO NOX zu WT NOX konnte im Lebergewebe mittels qRT-PCR-Untersuchung beobachtet werden, dass die Genexpression von SOCS-3 (1,39-fach) relativ zu WT NOX (= 1) erhöht war. Dies war statistisch nicht signifikant.

Im Vergleich von iNOS-KO CIH zu WT NOX zeigte sich im Lebergewebe eine 1,95-fache erhöhte Genexpression von SOCS-3. Dies war statistisch signifikant ($> 1,5$; vgl. Abb. 20).

Im Vergleich von iNOS-KO CIH zu WT CIH zeigte die Genexpression im Lebergewebe von SOCS-3 eine Erhöhung der Expression (1,22-fach), welche nicht statistisch signifikant war (vgl. Abb. 20).

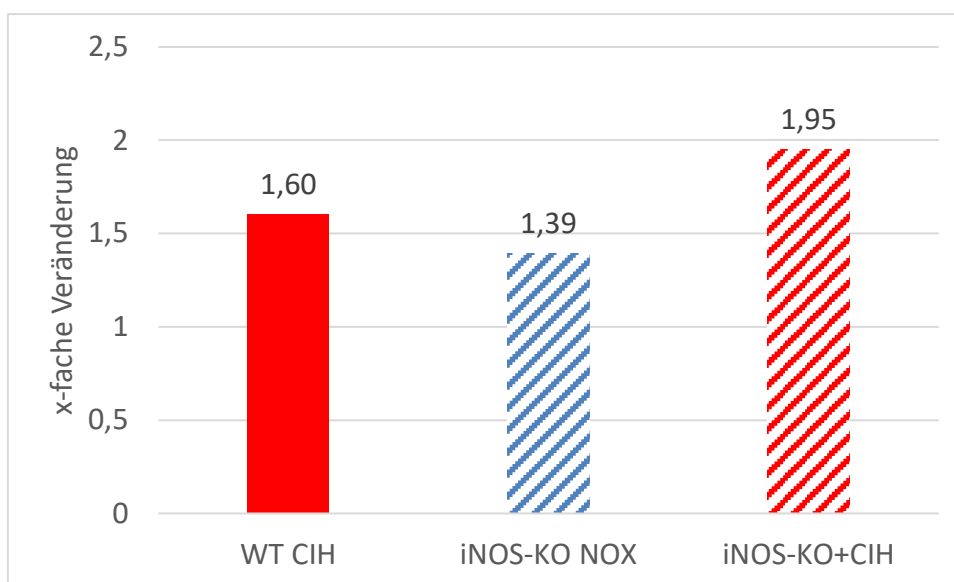


Abbildung 20: Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die RNA-Expression von SOCS-3

Relative SOCS-3-Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) im Lebergewebe von WT CIH, iNOS-KO NOX und iNOS-KO CIH bezogen auf WT NOX (Referenzgruppe).

3.8 Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die hepatische Expression von angiogenen Transkripten (KDR, VEGF-A und VEGF-B)

Im Vergleich von CIH zu NOX im WT zeigte sich im Lebergewebe eine erhöhte Expression von KDR (2,40-fach), während die Expression von VEGF-A (0,99-fach) und VEGF-B (1,07-fach) nahezu unverändert blieb. Dabei war nur die Erhöhung von KDR als signifikant ($> 1,5$) anzusehen.

Im Vergleich von iNOS-KO NOX zu WT NOX konnte im Lebergewebe mittels qRT-PCR-Untersuchung festgestellt werden, dass die Genexpression von KDR (2,26-fach) relativ

Ergebnisse

zu WT NOX (= 1) signifikant ($> 1,5$) erhöht war, während VEGF-A (0,98-fach) und VEGF-B (1,10-fach) erneut eine nahezu gleichbleibende, jedoch nicht statistisch signifikante Genexpression zeigten.

Im Vergleich von iNOS-KO CIH zu WT NOX zeigte sich im Lebergewebe eine erhöhte Genexpression von KDR (6,34-fach), VEGF-A (1,09-fach) und VEGF-B (1,26-fach). Dabei war nur die Erhöhung von KDR als signifikant ($> 1,5$) anzusehen (vgl. Abb. 21).

Im Vergleich von iNOS-KO CIH zu WT CIH zeigten die Genexpressionen im Lebergewebe von KDR (2,64-fach) eine statistisch signifikante Erhöhung (vgl. Abb. 21).

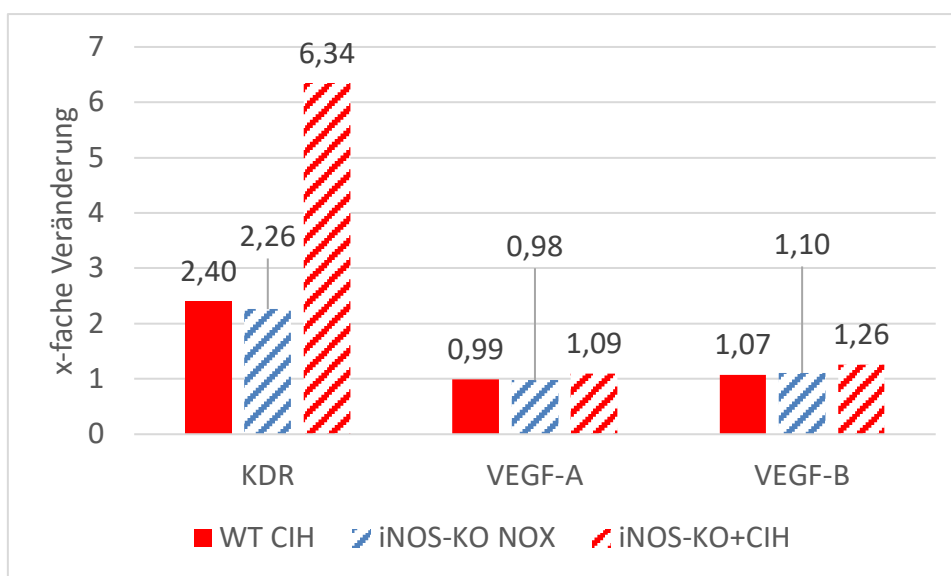


Abbildung 21: Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die RNA-Expression von KDR, VEGF-A und VEGF-B

Relative Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) der angiogenen Transkripte (KDR, VEGF-A und VEGF-B) im Lebergewebe von WT CIH, iNOS-KO NOX und iNOS-KO CIH bezogen auf WT NOX (Referenzgruppe).

3.9 Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die hepatische Expression von Transkripten der Scavenger-Rezeptoren (CD36 und LOX-1)

Im Vergleich von CIH zu NOX im WT zeigte sich im Lebergewebe eine nahezu gleichbleibende Expression von CD36 (0,96) und LOX-1 (1,10). Dies war statistisch nicht signifikant.

Ergebnisse

Im Vergleich von iNOS-KO NOX zu WT NOX konnte im Lebergewebe mittels qt-RT-PCR-Untersuchung festgestellt werden, dass die Genexpression von CD36 (1,04-fach) und von LOX-1 (1,21-fach) relativ zu WT NOX (= 1) erhöht war. Dies war ebenfalls statistisch nicht signifikant.

Im Vergleich von iNOS-KO CIH zu WT NOX zeigte sich im Lebergewebe eine 1,26-fach erhöhte Genexpression von CD36 und eine 1,89-fach erhöhte Genexpression von LOX-1, die als signifikant anzusehen ist ($> 1,5$) (vgl. Abb. 22).

Im Vergleich von iNOS-KO CIH zu WT CIH zeigten die Genexpressionen im Lebergewebe von CD36 (1,31-fach) eine nicht signifikante und von LOX-1 (1,72-fach) eine signifikante Erhöhung (vgl. Abb. 22).

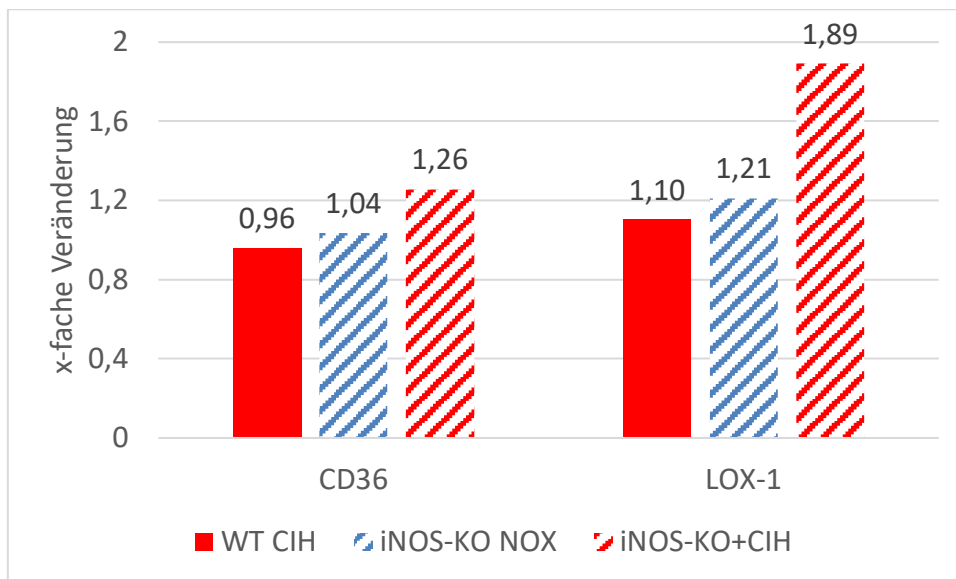


Abbildung 22: Effekt von CIH und/oder iNOS-KO auf die RNA-Expression von CD36 und LOX-1

Relative Expression (x-fache Veränderung; qRT-PCR) der Scavenger-Rezeptoren (CD36 und LOX-1) im Lebergewebe von WT CIH, iNOS-KO NOX und iNOS-KO CIH bezogen auf WT NOX (Referenzgruppe).

4 Diskussion

4.1 Das Mausmodell der CIH

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von CIH (30 Hypoxie Zyklen/h bis minimal 6 % O₂ über 8 h pro Tag, 5 Tage pro Woche, über 6 Wochen) im Vergleich zu NOX (FiO₂ 21 % über 6 Wochen) auf histomorphologische und molekularbiologische Veränderungen in der Leber von WT-Mäusen untersucht. Zusätzlich standen für die molekularbiologischen Untersuchungen iNOS-KO-Mäuse sowohl unter NOX als auch unter CIH zum Vergleich zur Verfügung, um die Rolle des iNOS hinsichtlich der Zytokinexpression, Lebersteatose und Angiogenese zu ermitteln.

Die Mäuse waren der CIH tagsüber ausgesetzt, während sie nachts unter normoxischen Bedingungen lebten. Dazu ist anzumerken, dass Mäuse nachtaktive Tiere sind, sodass die Exposition gegenüber CIH in der Schlafphase erfolgte. Allerdings wurde keine Rücksicht auf Schlaf- und Wachphase genommen (schlafunabhängig oder CIH). Arousals und Schlaf-fragmentation, die charakterisierende Eigenschaften des OSAS sind, fehlen in diesem Modell (Lee et al., 2009). Darüber hinaus wurde in diesem Mausmodell die CIH an nur 5 Tagen in der Woche angewendet, wodurch es an den zwei normoxischen Tagen möglicherweise zu einer Erholung und/oder protektiven Effekten hinsichtlich Leberveränderungen gekommen sein könnte.

Als weitere Limitation dieses Modells ist zu nennen, dass keine OSAS-typische Obstruktion in den oberen Atemwegen simuliert werden konnte. Somit ist CIH in diesem Modell nicht mit intrathorakalen Druckschwankungen oder Hyperkapnie verbunden. Diese beiden Faktoren stellen evtl. auch ein Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse dar, konnten jedoch in diesem CIH-Modell nicht näher untersucht werden (Schneider et al., 1997; Schneider et al., 2000). Außerdem können Mäuse im vorliegenden CIH-Modell auf die Hypoxiephasen mit einer gesteigerten Ventilation und entsprechender Hypokapnie reagieren, was den klinischen OSAS-Bedingungen nicht entspricht (Kraut, 2014) bzw. klinisch variabel nur im sog. ventilatorischen Overshoot nach Ende der Obstruktion vorkommt.

Schließlich bleibt zu erwähnen, dass verschiedene Arbeitsgruppen CIH mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen oder Expositionsdauern anwendeten, was die Vergleichbarkeit von Studien erschwert (Lee et al., 2009). Wie in Kapitel 1.8 beschrieben, variieren die Dauer und die Frequenz der CIH zw. 30 und 120 s sowie 9 und 60 h bei einer

Diskussion

Sauerstoffkonzentration von 3–10 % (Jun und Polotsky, 2007; Drager et al., 2010). Für die vorliegende Arbeit wurde ein Zyklus von 60 s Normoxie und 60 s Hypoxie, mit einem FiO_2 von 6–7 % und über 8 h pro Tag genutzt. Die verwendeten Werte liegen somit im mittleren Bereich. Es fanden 30 Hypoxie-Episoden pro Stunde statt und demnach wurde ein moderat-schweres OSAS, entsprechend einem AHI von 30 (vgl. Tabelle 2), nachgestellt. Aus dieser Einstellung der Parameter resultierte eine Sauerstoffsättigung der Mäuse von minimal 53–57 % (Kraut, 2014). Patienten mit OSAS weisen laut Mediano et al. z. B. eine minimale Sauerstoffsättigung von 69 ± 12 % (Mediano et al., 2007), laut Bradley et al. von 66 % auf (Bradley et al., 1985). Die Dauer der CIH über 8 h im vorliegenden Modell entspricht der durchschnittlichen Schlafdauer eines erwachsenen Menschen (Watson et al., 2014), jedoch nur grob tageszeitlich und nicht schlafphasenbezogen der Maus.

Trotz der aufgezählten Einschränkungen ist das Mausmodell der CIH zur Erforschung des OSAS und seiner kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der zugrundeliegenden Pathophysiologien, etabliert (Eisele et al., 2006).

Von Vorteil ist, dass eine große Anzahl von Mäusen der CIH ausgesetzt werden kann (Drager et al., 2010), dass das Mausmodell nicht invasiv (Jun and Polotsky, 2007) und technisch einfach durchführbar ist (Lee et al., 2009). Dies gilt auch für die Kontrollen (NOX), die ebenfalls ohne invasive Interventionen (wie eine Sham-Operation für künstliche Obstruktion) auskommen.

Viele Studien zu Mäusen haben gezeigt, dass die CIH im Mausmodell dieselben pathophysiologischen Folgen hervorrufen kann, die auch in OSAS-Patienten beobachtet werden. Dazu zählen eine erhöhte Sympathikusaktivität, eine beeinträchtigte vaskuläre Funktion (Phillips et al., 2004), ein erhöhter arterieller Blutdruck sowie kardio- und zerebrovaskuläre Ereignisse (Bao et al., 1997; Baratta et al., 2018) sowie – für diese Arbeit besonders von Belang – Leberveränderungen (Savransky et al., 2007b), Insulinresistenz (Iiyori et al., 2007) und Hyperlipidämie (Li et al., 2005).

Zunächst wurden für dieses CIH-Modell häufig Ratten verwendet (Lee et al., 2009), allerdings bieten Mäuse den Vorteil des vollständig sequenzierten Genoms, wodurch verschiedene transgene oder KO-Mäuse genutzt werden können, um die Pathophysiologie und Spätfolgen des OSAS auf molekularer Ebene zu erforschen (Tagaito et al., 2001).

4.2 Effekt von CIH auf die hepatische Expression von iNOS im WT

In der qRT-PCR zeigte sich unter CIH im Vergleich zu NOX eine Herunterregulation der iNOS-Expression im Lebergewebe von WT-Mäusen auf das 0,12-Fache, während in den iNOS-KO-Mäusen wie zu erwarten keine iNOS-Genexpression nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 18).

Hinsichtlich CIH und hepatischer iNOS-Expression ist die Studienlage dürftig und die Untersuchung am iNOS-KO-Modell daher von besonderer Relevanz.

In Studien zur chronischen Hypoxie-Exposition (Lau et al., 2013) und einmaligen Ischämie-Reperfusion (Hur et al., 1999; Rus et al., 2010; Rus et al., 2011) konnte dagegen eine iNOS-Hochregulation in Leber (ohne Fettleber), Herz und Lunge gezeigt werden: Lau et al. untersuchten Ratten, die 4 Wochen lang einer konstanten Sauerstoffkonzentration von 10 % ausgesetzt waren. Dabei stieg die iNOS-Expression in der Leber v. a. zw. Tag 7 und 28 an (Lau et al., 2013). Hur et al. unterbanden die arterielle Blutversorgung vom mittleren und linken lateralen Leberlappen von Ratten für 45 min. Die Expression von iNOS begann 1 h nach Reperfusion anzusteigen und sank nach 5 h wieder (Hur et al., 1999).

Im Unterschied zu den genannten Studien kam in der vorliegenden Arbeit jedoch CIH und nicht die kontinuierliche Hypoxie bzw. einmalige Hypoxie mit längeren Reoxygenierungsphasen zur Anwendung. Die Reize der akuten Hypoxie und der kontinuierlichen Hypoxie haben möglicherweise einen anderen Effekt auf die Regulation der iNOS als die CIH, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Allerdings sind die normoxischen Phasen von 16 h/Tag und 2 Tagen/Woche im Modell dieser Dissertation zu beobachten.

Die Verwendung des iNOS-KO-Modell in der vorliegenden Arbeit ermöglicht es, zu untersuchen, ob die (herunterregulierte) iNOS eine protektive oder fördernde Rolle hinsichtlich der Zytokinexpression, Lebersteatose und Angiogenese innehat.

Bekannt ist, dass iNOS eine Rolle bei der Entwicklung der Fettleber und der Leberfibrose spielt, beide sind mögliche Komplikationen des OSAS (Anavi et al., 2015).

Aktivierte Kupfferzellen produzieren mittels iNOS eine große Menge von NO (Iwakiri, 2015). Während die großen Makrophagen in den Periportalfeldern hauptsächlich eine phagozytotische Funktion erfüllen, spielen die kleineren Kupfferzellen um die ZV eine wichtige Rolle in der immunologischen Antwort, sind aktiver in der Zytokinproduktion

und weisen eine größere zytotoxische Kapazität auf (Itoh et al., 1992; Kmiec, 2001). Aussagen zur Lokalisation der iNOS-Expression können in der vorliegenden Arbeit nicht getroffen werden, da die Zonalität in der PCR nicht untersucht wurde.

Mehrere Studien untersuchten den Einfluss von kürzeren Hypoxiephasen auf die iNOS- und eNOS-Expression in anderen Organen: Rus et al. exponierten Ratten für 30 min einer Hypoxie (pO_2 48 mmHg), um dann nach verschiedenen Reoxygenierungszeiten (0, 2, 12, 24, 72 h und 5 Tagen) u. a. die eNOS- und iNOS-mRNA im Lungen- und Herzgewebe zu bestimmen. Im Lungengewebe zeigte sich eine Hochregulation der iNOS-mRNA nach 2 h, 12 h und 24 h. Bei längeren Reoxygenierungszeiten (48 h, 72 h und 5 Tagen) sank die iNOS-Expression wieder auf die ursprünglichen Werte (Rus et al., 2010).

Im Herzgewebe stieg die iNOS-Expression auf RNA-Ebene um ein 2,5-Faches unmittelbar nach Beendigung der Hypoxie (30 min, 48 mmHg), während Protein und Enzymaktivität von iNOS v. a. während der Reoxygenierungsepisode erhöht waren (Rus et al., 2011).

Auch gewebsspezifische Unterschiede sind anzunehmen, denn in der Arbeit von Kraut et al. konnte für das hier angewandte CIH-Expositionsmodell weder im linken Ventrikel noch in der Lunge eine Änderung der iNOS-Genexpression nachgewiesen werden (Kraut, 2014).

4.3 Effekt von CIH und iNOS-KO auf Inflammationsmarker (COX-1, COX-2, CD68, IL-1 β , IL-6, TNF- α)

Die vorliegenden molekularbiologischen Ergebnisse zeigen, dass die hepatische Expression von COX-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α unter CIH in WT-Mäusen anstieg, wobei die TNF- α -Heraufregulation (12,17-fach) am höchsten ausfiel (vgl. Abb. 19). Immunhistologisch ließ sich für COX-2 auf Proteinebene ein nicht signifikanter Trend in Richtung Erhöhung feststellen (vgl. Abb. 5). Die immunhistologischen Ergebnisse von CD68 zeigten in Übereinstimmung mit den molekularbiologischen Ergebnissen (vgl. Abb. 19) keinen signifikanten Unterschied zw. den beiden Gruppen CIH und NOX (vgl. Abb. 7).

Die Entwicklung einer Inflammation durch CIH in der Leber konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden (Reinke et al., 2001; da Rosa et al., 2012; da Rosa et al., 2015): Bei da Rosa et al. waren die Mäuse einer CIH 60 x/h, 8 h pro Tag für 5 Wochen ausgesetzt, bei Reinke et al. ebenfalls 60 x/h, jedoch 12 h pro Tag für 19–22 Wochen.

Diskussion

Die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , Il-1 β , Il-6 war entsprechend den vorliegenden Ergebnissen erhöht (Reinke et al., 2011; da Rosa et al., 2012; da Rosa et al., 2015).

Als mögliche Ursache hierfür postulieren da Rosa et al. eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B (da Rosa et al., 2015), der als Mediator in der Immunantwort die Expression vieler inflammatorischer Zytokine, Chemokine, Immunrezeptoren und Zellohäsionsmoleküle reguliert (Pahl, 1999; Liu et al., 2017).

Insbesondere TNF- α im Serum korreliert auf Proteinebene nach Untersuchung am Menschen mit der Schwere des OSAS (Ryan et al., 2006; Paschetta et al., 2015). In der prospektiven Studie von Ryan et al. wurde TNF- α im Serum von Gesunden und Probanden mit mildem bis schwerem OSAS bestimmt. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte TNF- α Konzentration in der schweren OSAS-Gruppe im Vergleich mit der milden bis moderaten OSAS-Gruppe (Ryan et al., 2006).

Bezüglich der iNOS-KO-Mäuse konnte keine statistisch signifikante Veränderung der Inflammationsmarker unter CIH im Vergleich zu WT NOX beobachtet werden. Zugleich zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion von Il-1 β , Il-6 und TNF- α in iNOS-KO-Mäusen unter CIH im Vergleich zum WT CIH (vgl. Abb. 19).

Dies impliziert, dass iNOS – trotz seiner unter CIH verminderten Expression im WT – an der CIH-bedingten Inflammation in der Leber kausal beteiligt ist und iNOS-KO einen protektiven Effekt hinsichtlich der hepatischen Inflammation unter CIH hat.

Die Rolle von iNOS bei der CIH-bedingten Inflammation der Leber wurde bisher nicht untersucht. iNOS-KO-Mäuse dienten bislang lediglich zur Untersuchung einer ‚high-fat-diet‘ (Anavi et al., 2015; Nozaki et al., 2015), einer ‚high-cholesterol-diet‘ (Qiao et al., 2019), einer Acetaminophen-Intoxikation (Salhanick et al., 2006) bzw. des Einflusses von CIH im Gehirn (Zhan et al., 2005) in iNOS-KO-Mäusen.

Wie bereits erwähnt, ist die iNOS an der Entwicklung der Fettleber (anderer Genese als OSAS) und der Leberfibrose beteiligt (Anavi et al., 2015; Nozaki et al., 2015; Qiao, 2019). Dabei sind die Daten in der Literatur widersprüchlich bzgl. einer protektiven oder aktivierenden Rolle von iNOS-KO hinsichtlich der Inflammation, der Entwicklung einer NASH und der Leberfibrose, auch wenn erstere prinzipiell die Komplikationen/Komorbiditäten des OSAS darstellen können.

Diskussion

Anavi et al. und Qiao et al. postulieren eine protektive Wirkung einer iNOS-Deletion hinsichtlich der Entwicklung einer NASH. Anavi et al. zeigten, dass es nach einer ‚high-cholesterol diet‘ und Qiao et al. nach einer ‚high-fat diet‘ in WT-Mäusen zu einer stärkeren Leberfibrose im Vergleich zu iNOS-KO-Mäusen kam (Anavi et al., 2015; Qiao et al., 2019). Auch Salhanick et al. gehen von einer protektiven Rolle der iNOS-Deletion hinsichtlich einer Acetaminophen-Intoxikation aus. WT-Mäusen und iNOS-KO-Mäusen wurde Acetaminophen in hepatotoxischer Dosierung (300 mg/kg) verabreicht. Zum einen war der Plasmaspiegel von Alanin-Aminotransferase signifikant tiefer in iNOS-KO-Mäusen im Vergleich zum WT, zum anderen zeigte sich eine reduzierte HIF- α -Expression im Lebergewebe von iNOS-KO-Mäusen (Salhanick et al., 2006). Demgegenüber zeigten Nozaki et al. in ihrer Arbeit eine verstärkte Fibrose und Inflammation der Leber in iNOS-KO-Mäusen nach 48 Wochen ‚high-fat diet‘. Die Inflammation wurde histologisch anhand des ‚NAFLD Activity Score‘ gemessen. Dieser umfasst den Anteil des betroffenen Gewebes in Prozent, die Ballonierung der Hepatozyten, die Anzahl der Inflammations-Foci und den Grad der Fibrose. Es zeigte sich ein signifikant erhöhter Score in der iNOS-KO-Gruppe. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit war auch die mRNA-Expression von IL-1 und TNF- α in iNOS-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant erhöht. Anders als im vorliegenden Dissertationsprojekt zu CIH scheint iNOS also in diesem Modell der Leberfibrose eine antiinflammatorische Rolle einzunehmen (Nozaki et al., 2015). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Arbeit die iNOS-Expression unter CIH im WT zwar abnahm, aber nicht gänzlich unterbunden wurde. Ob diese Verringerung der iNOS-Expression pro- oder antiinflammatorisch wirkt, ist daher nicht abschließend beurteilbar. Bei völligem Fehlen eines iNOS-Signals (iNOS-KO) entfällt aber offenbar die CIH-bedingte Inflammationsreaktion.

Entsprechend zeigten Zahn et al. ebenfalls, dass CIH (10 h pro Tag für 6 Wochen) im iNOS-KO-Mausmodell im Vergleich zu WT zu einem reduzierten Anstieg der Transkripte der Inflammationsparameter im Gehirn führte. Unter anderem wurde die Genexpression von TNF- α in vier verschiedenen Regionen des Gehirns bestimmt. Während im WT TNF- α in allen vier Hirnregionen anstieg, konnte in iNOS-KO-Mäusen jeweils in nur zwei verschiedenen Hirnregionen ein Anstieg der Entzündungsparameter gemessen werden (Zhan et al., 2005).

Diskussion

Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass überwiegend die iNOS für die Inflammation unter CIH, ‚high-fat diet‘ und ‚high-cholesterol diet‘ mitverantwortlich ist, da die Inflammation unter iNOS-KO ausbleibt oder zumindest verringert ist.

In der vorliegenden Dissertation scheint die Hochregulation der Zytokine durch CIH in der Leber mit einer Herunterregulation von iNOS assoziiert zu sein. Da ein völliges Fehlen von iNOS unter NOX oder CIH offenbar antiinflammatorisch wirkt, scheint eine (zumindest geringe) iNOS-Expression, bzw. eine NO-Produktion, für eine inflammatorische Reaktion notwendig.

4.3.1 Effekt von CIH auf die zonale Verteilung der Inflammation im WT

Die Expression von COX-2 und CD68 waren unbeeinflusst von der CIH Intervention; mittels immunhistochemischer Färbungen von COX-2 und CD68 allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit Aussagen zu deren zonaler Verteilung bei CIH und NOX getroffen werden.

Die Dichte der COX-2 positiven Zellen war um die ZV höher als um die GT, sowohl unter NOX als auch unter CIH. Der Unterschied zw. den beiden Zonen war mit $p < 0,05$ statistisch signifikant (vgl. Abb. 9).

Beim Vergleich der ZV/GT-Ratios zw. CIH und NOX ergab sich, dass CIH keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der COX-2 positiven Zellen hat, jedoch zeigte sich ein Trend zu einer Zunahme der COX-2-positiven Zellen um die ZV unter CIH.

Unter beiden Bedingungen, CIH und NOX, war dagegen die Dichte der CD68-positiven Zellen um die GT höher als um die ZV. Der Unterschied war für NOX statistisch signifikant (vgl. Abb. 10).

Auch für CD68 wurde die ZV/GT-Ratio zw. CIH und NOX gebildet und verglichen, hier zeigte sich, dass CIH keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung von CD68 in der Leber hat, jedoch war ebenfalls ein Trend zur Zunahme der CD68-positiven Zellen um die ZV unter CIH ersichtlich.

Ursächlich hierfür könnten die Besonderheiten der Anatomie und Perfusion der Leber sein. Die Versorgung der Leber mit sauerstoffreichem Blut erfolgt über die A. hepatica. Sauerstoffarmes, nährstoffreiches Blut fließt über die V. porta aus den unpaaren Bauchorganen zur Leber. Beide Gefäße vereinigen sich in den Sinusoiden und ihr Mischblut

Diskussion

fließt vom Periportalfeld zur ZV, wo es dann via V. cava inferior wieder dem Systemkreislauf zugeführt wird. Durch diesen Blutfluss entsteht ein deutlich geringeres Sauerstoff- und Nährstoffangebot im Bereich der ZV verglichen mit dem Periportalfeld (Lemasters et al., 1981; Ross und Wojciech, 2006). Die COX-2- und CD68-Differenzierung zw. ZV und Periportalfeld ist CIH unabhängig.

COX ist ein membranständiges Enzym und ist beteiligt an der Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure. COX tritt in zwei Isoformen auf: COX-1, einem Enzym, das in nahezu allen Geweben konstitutiv exprimiert wird und unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich eine moderate Menge an Prostaglandinen synthetisiert. Im Gegensatz dazu ist COX-2 durch Hormone, proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren induzierbar und wird v. a. unter pathophysiologischen Bedingungen in geschädigtem Gewebe gebildet (Kulkarni et al., 2000; Martín-Sanz et al., 2010). Neben der Synthese von Prostaglandinen führt dies auch zur Bildung von Thromboxan, die beide zum Prozess der Inflammation beitragen (Williams et al., 1999). Kommt es in der Leber zur Entzündung, wird COX-2 hauptsächlich in residenten Kupfferzellen und infiltrierten Makrophagen exprimiert (Callejas et al., 2000; Martín-Sanz et al., 2010). Kupfferzellen befinden sich hauptsächlich in den Sinusoiden und sind für die Phagozytose zuständig. Sie kommen häufiger in der periportalen als in der perivenösen Zone vor (Kuntz und Kuntz, 2008), sodass die frühzeitige Filtration des Blutes gewährleistet wird, sobald es in die Leber gelangt (Sleyster and Knook, 1982).

CD68 ist ein intrazelluläres Protein, das in gewebeständigen Monozyten und Makrophagen, entsprechend den Kupfferzellen in der Leber, vorkommt (AbD Serotec, A Bio-Rd Company, 2015; Christiakov et al., 2016).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sich periportale Kupfferzellen morphologisch und funktional von den perivenösen Kupfferzellen unterscheiden (Sleyster and Knook, 1982; Armbrust and Ramadori, 1996). So sind die periportalen Kupfferzellen größer, aktiver in der Phagozytose und besitzen eine größere lysosomale enzymatische Aktivität im Vergleich zu den perivenösen Kupfferzellen. Allerdings zeigen sie eine geringe Expression des MHC-II-Komplexes auf ihrer Zelloberfläche als die kleineren Kupfferzellen um die ZV (Hoedemakers et al., 1995; Laskin et al., 2001; Bykov et al., 2004; Sanyal et al., 2012).

Diskussion

Aktivierete Kupfferzellen produzieren mittels iNOS eine große Menge von NO (Iwakiri, 2015). Dabei setzen die kleinen Kupfferzellen um die ZV vermehrt NO und Superoxid-Anionen frei und zeigen darüber hinaus eine größere zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen im Vergleich zu den periportal en Kupfferzellen (Hoedemakers et al., 1995; Laskin et al., 2001; Bykov et al., 2004; Sanyal et al., 2012). NO reagiert mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu hochreaktiven Stickstoffspezies (RNS), z. B. dem toxischen Peroxynitrit (ONOO⁻). ROS, RNS und ONOO⁻ wiederum aktivieren die hepatischen Sternzellen. Aktivierete hepatische Sternzellen produzieren extrazelluläres Kollagen und führen so schließlich zur Leberfibrose (Iwakiri, 2015).

Die kleinen Kupfferzellen um die ZV reagieren außerdem sensibler auf Aktivierung und sind während Entzündungsprozessen aktiver (Laskin et al., 2001).

Zusammengefasst gewährleisten die großen Makrophagen in den Periportalfeldern eine phagozytotische Funktion, während die kleineren Kupfferzellen um die ZV eine wichtige Rolle in der immunologischen Antwort einnehmen und aktiver in der Zytokinproduktion sind sowie eine größere zytotoxische Kapazität aufweisen (Itoh et al., 1992; Kmieć, 2001). So lässt sich anhand des Trends in der COX-2-Färbung die Vermutung anstellen, dass unter CIH v. a. die kleineren perivenösen Kupfferzellen aktiviert werden und die Zytokinexpression COX-1, IL-1 β , IL-6 sowie TNF- α steigern. Neben einer erhöhten Zytokinproduktion kommt es besonders in den kleineren Kupfferzellen um die ZV möglicherweise außerdem zu einer erhöhten iNOS-Expression, einem NF- κ B-abhängigen Genprodukt, wie es bereits in Tiermodellen unter CIH gezeigt werden konnte (da Rosa et al., 2015; Greenberg et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit zeigt zumindest ein Trend der COX-2-Färbung eine CIH-bedingte proinflammatorische Aktivierung der Kupfferzellen um die ZV. Die aktivierende Rolle von iNOS bzw. die hemmende Rolle von iNOS-KO ist in diesem Zusammenhang demnach möglicherweise besonders um die ZV bedeutsam, was sich anhand der PCR erwartungsgemäß zonal nicht darstellen ließ. Allerdings muss hier an eine CIH-bedingte Verringerung der iNOS-Transkripts (zonenübergreifend) erinnert werden.

Die iNOS wurde immunhistologisch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, somit konnten diese Hypothesen nicht konklusiv bestätigt oder widerlegt werden.

4.4 Effekt von CIH und iNOS-KO auf SOCS-3

CIH und iNOS-KO zeigten beide einen im Trend fördernden Einfluss auf die Genexpression von SOCS-3 im Vergleich zu WT NOX (vgl. Abb. 20). Die Kombination von iNOS-KO und CIH zeigten im Vergleich zu WT NOX eine 1,96-fache Genexpression von SOCS-3 und damit den stärksten Anstieg, möglicherweise infolge einer Interaktion zw. CIH und iNOS-KO (vgl. Abb. 20). Aufgrund der gepoolten Proben waren auch hier keine ANOVA und somit keine genauere Analyse möglich.

Die ‚supressors of cytokine signaling‘ sind eine Familie von Proteinen, die intrazellulär Zytokin-Signaltransduktionen inhibieren. Da sie selbst durch Zytokine stimuliert werden, liegt eine negative Rückkopplungsschleife als Regulationsmechanismus vor (Zhang et al., 1999; Croker et al., 2004).

Wie bereits in Kapitel 1.6 beschrieben, kann es darüber hinaus als Folge der SOCS-3-Erhöhung zu einer verstärkten Insulinresistenz in Leber- und Muskelgewebe kommen, indem SOCS-3 die Phosphorylierung des Insulinrezeptors verhindert (Ueki et al., 2004). In der Literatur finden sich bisher keine Daten bezüglich des Einflusses von Hypoxie auf die Expression von SOCS-3 in der Leber, jedoch auf andere Organe:

Bai et al. stellten fest, dass SOCS-3 durch Hypoxie auch in glatten Muskelzellen und in der Lunge induzierbar war, dies allerdings in Zellkulturen, die nicht 6 Wochen unter CIH, sondern in einem Inkubator einem Gemisch von 3 % O₂ und 5 % CO₂ für die Dauer von 0 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h ausgesetzt waren (Bai et al., 2006).

White et al. zeigten, dass es in denjenigen Lokalisationen zu einem Anstieg von SOCS-3 kommt, die eine akute oder chronische Entzündung aufweisen (White et al., 2011): In entzündlich verändertem Gewebe war im Vergleich zu gesundem Gewebe ein höherer Prozentsatz CD68-positiver Zellen mit SOCS-3-Expression festzustellen (White et al., 2011). Hierfür wurden granulomatöse Entzündungen verschiedener Gewebe, z. B. unter Sarkoidose oder akuter Appendizitis entzündlich veränderter Lymphknoten, immunhistochemisch auf CD68 und SOCS-3 untersucht.

Möglicherweise erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der SOCS-3 auch infolge erhöhter Entzündungsparameter bei CIH im WT, die besonders am Beispiel von COX-1, Il-1 β , Il-6 und TNF- α erkennbar werden. Wie bereits erwähnt, führt eine vermehrte Bildung von Il-1 β , Il-6 und TNF- α u. a. zu einer SOCS-3-Hochregulierung, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt (Emanuelli et al., 2000;

Mooney et al., 2001; Senn et al., 2002). Warum SOCS-3 auch bei iNOS-KO-Mäusen ohne Hochregulation dieser Zytokine tendenziell vermehrt exprimiert wird, bleibt unklar. Möglicherweise ist die CIH-bedingte Abnahme von iNOS im WT bzw. iNOS-KO gleichermaßen verantwortlich für die Hochregulierung von SOCS-3. Bezüglich der Beziehung zw. iNOS und SOCS-3 finden sich in der Literatur bisher allerdings keine weiterführenden Daten.

4.5 Effekt von CIH und iNOS-KO auf die Angiogenese in der Leber

Kraut zeigte, wie auch McGuire et al., dass es unter CIH zu einem Anstieg des Hämatokrits im Sinne einer gesteigerten Erythropoese kommt (McGuire und Bradford, 1999; Kraut, 2014). Darüber hinaus tragen eine gesteigerte Diurese und ein in der Folge vermindertes Plasmavolumen zu einer Erhöhung des Hämatokrits bei. In beiden Fällen handelt es sich um Adaptationsmechanismen zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung unter Hypoxie-Bedingungen (Woods et al., 2011). Im Rahmen des Dissertationsprojekts von Franziska Büttner wurde an dem hier analysierten Mausmodell z. B. die Auswirkung von CIH auf die Angiogenese in Kardiomyozyten untersucht. Es zeigte sich eine Hochregulation von Angiogenesemarkern, wobei KDR mit einem 4,3-fachen Anstieg die größte Veränderung zeigte (Büttner, 2017). Wie bereits in Kapitel 1.10 erläutert, kommt es unter chronischer Hypoxie und CIH zu einer Aktivierung von HIF-1 α , der als Transkriptionsfaktor die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff reguliert und als Folge zu einer Aktivierung der Angiogenese führt. Dies gilt auch für die Leber, denn da Rosa et al. stellten in Mäuselebern u. a. einen Anstieg der Expression von VEGF um 71 % nach CIH-Exposition (60 x/h, 8 h/Tag, für 5 Wochen) fest (da Rosa et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Leber zwar ein Anstieg des Rezeptors KDR unter CIH im WT und bei iNOS-KO (NOX/CIH) im Vergleich zur WT-NOX-Gruppe, jedoch war keine erhöhte Expression der Liganden VEGF-A und VEGF-B festzustellen (vgl. Abb.21). Der größte Anstieg von KDR zeigte sich in den iNOS-KO-Mäusen unter CIH im Vergleich zu WT NOX, möglicherweise im Rahmen eines synergistischen Effekts von CIH und iNOS-KO (vgl. Abb. 21). Da die Proben gepoolt waren, ließ sich diesbezüglich jedoch keine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit genauerer Aussage zur Interaktion durchführen.

Diskussion

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit stellten Cassini-Vieira et al. die in iNOS-KO-Mäusen reduzierten VEGF-Level im implantierten Polyether-Polyurethane-Schwamm von iNOS-KO-Mäusen fest, wobei der Rezeptor KDR in der Studie nicht näher untersucht wurde (Cassini-Vieira et al., 2015).

Über Faktoren, die eine selektive erhöhte KDR-Expression bei fehlender Erhöhung der VEGF-A- und VEGF-B-Expression herbeiführen, kann nur spekuliert werden: Möglicherweise wäre es nach einer längeren CIH-Exposition als den gegenwärtigen 6 Wochen auch zu einem Anstieg von VEGF-A und VEGF-B gekommen oder diese angiogenen Marker könnten zu Beginn des Experiments transient erhöht gewesen sein. Takagi et al. konnten in einer älteren Arbeit belegen, dass die Expositionsdauer der Hypoxie einen Einfluss auf die Expression von KDR sowie VEGF-A und VEGF-B hat: Es wurden Endothelzellen der Rinderretina verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und anschließend die Expression von KDR mittels Northern Blot sowie die Konzentration von VEGF-A und VEGF-B mittels Bindungsanalyse untersucht. Es zeigte sich, dass die Konzentrationen von VEGF-A und VEGF-B nach Exposition von 1 % O₂ über 24 h abfielen, während es nach 72 h zu einem Anstieg der angiogenetischen Marker kam. Die KDR-Expression reduzierte sich, je länger die Hypoxiedauer anhielt und je geringer die Sauerstoffkonzentration war (Tagaki et al., 1996).

Denkbar ist auch, dass bereits genügend Protein der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren gebildet wurde, sodass die Transkription wieder herunterreguliert wurde. Zusammenfassend zeigt sich jeweils durch CIH und iNOS-KO ein steigender Effekt auf die Expression von KDR. Aufgrund des größten Anstiegs von KDR in iNOS-KO-Mäusen unter CIH lässt sich möglicherweise ein Synergieeffekt von iNOS-KO und CIH postulieren.

4.6 Effekt von CIH und iNOS-KO auf Scavenger-Rezeptoren in der Leber

Weder unter CIH oder iNOS-KO allein noch in Kombination von CIH und iNOS-KO kam es im Vergleich zu WT NOX zu einer signifikanten Veränderung der Genexpression von CD36 (vgl. Abb. 22). Auch LOX-1 zeigte im WT unter CIH und iNOS-KO unter NOX im Vergleich zu WT NOX keinen signifikanten Anstieg (vgl. Abb. 22). Den größten Anstieg zeigte LOX-1 mit einem 1,89-fachen Anstieg in iNOS-KO-Mäusen unter CIH im Vergleich zu WT-NOX-Mäusen (vgl. Abb. 22).

Diskussion

Die Studienlage bzgl. des Einflusses der Hypoxie auf Scavenger-Rezeptoren in der Leber ist dürftig. Wie die im Folgenden aufgeführten Studien belegen, ist bekannt, dass CD36 eine Rolle bei der Entwicklung einer Fettleber spielt. Die Fettleber ist zwar eine bekannte Komplikation des OSAS, aber nicht zwingend (allein) von Hypoxie-Triggern abhängig (Aron-Wisnewsky et al., 2012).

Rey et al. zeigten, dass es in Hepatozyten von Mäusen und Menschen nach Exposition von Hypoxie (1 % O₂ für 36 h) zu einer erhöhten Expression von CD36 mRNA kam und dies somit zur Entwicklung einer NAFLD beitragen kann (Rey et al., 2020). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit exponierten Rey et al. allerdings zum einen Hepatozyten und nicht Mäuse den hypoxischen Bedingungen und zum anderen kam eine kontinuierliche Hypoxie und keine CIH zum Einsatz.

Auch Crucet et al. untersuchten die CD36-Expression unter hypoxischen Bedingungen (0,2 % O₂ für 24 h), allerdings in Makrophagen, die aus atherosklerotischen Plaques und Hepatozyten der Maus entnommen wurden. Hier zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen von Rey et al. eine reduzierte CD36-Expression (Crucet et al., 2013). Die Studie von Crucet et al. unterscheidet sich von der vorliegenden Arbeit darin, dass auch hier eine kontinuierliche Hypoxie und keine CIH zum Einsatz kam. Darüber hinaus wurden im Speziellen Makrophagen untersucht.

Miquilena-Colina et al. stellten fest, dass die hepatische Expression von CD36 signifikant höher war bei Patienten mit einer NAFL (nichtalkoholischen Fettleber), einer NASH sowie Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion mit und ohne Fettleber im Vergleich zu lebergesunden Patienten. Zusätzlich zeigten sie eine Korrelation zw. der CD36-Expression und dem Insulinspiegel, weshalb sie einen Zusammenhang zw. der Hochregulierung von CD36 und einer Insulinresistenz postulierten (Miquilena-Colina et al., 2011).

CD36, eine Fettsäuretranslokase (fatty acid translocase/FAT), reguliert die Aufnahme und den intrazellulären Transport freier, langkettiger Fettsäuren (Miquilena-Colina et al., 2011). Eine hohe Expression von CD36 findet sich auf Makrophagen, Adipozyten, Kardiomyozyten und Myozyten (Wilson et al., 2016). Unter gewissen Umständen, wie bestimmten Infektionskrankheiten, ist CD36 auch in Hepatozyten aufzufinden (Terpstra et al., 2000). Eine hohe Expression auf Myozyten führt zu einer erhöhten Aufnahme freier, langkettiger Fettsäuren im Muskel (Ibrahimi et al., 1999). Demgegenüber führt

eine CD36-Deletion zu einer reduzierten Akkumulation freier, langkettiger Fettsäuren im Muskel, Herzen und Fettgewebe (Nozaki et al., 1999; Son et al., 2018).

LOX-1 vermittelt die Aufnahme von oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (ox-LDL) und befindet sich auf der Oberfläche von Endothelzellen und Makrophagen (Xu et al., 2013; Hong et al., 2015).

Neben der Beteiligung in der Atherosklerose (Hong et al., 2015) scheinen oxLDL und sein Rezeptor LOX-1 an der Entwicklung einer Dysfunktion der endothelialen Sinusoidzellen in der Leber beteiligt zu sein, womit auch die NAFLD assoziiert ist. OxLDL gebunden an LOX-1 aktiviert den NF- κ B-Signalweg, erhöht Endothelin sowie freie Sauerstoffradikale und reduziert die intrazelluläre NO-Konzentration, was zur endothelialen Dysfunktion führen kann (Zhang et al., 2014).

Crucet et al. untersuchten in ihrer bereits weiter oben erwähnten Arbeit auch die Expression von LOX-1, die sich nach 24 h unter hypoxischen Bedingungen (0,2 % für 24 h) in Makrophagen aus atherosklerotischen Plaques sowie aus Hepatozyten erhöht zeigte (Crucet et al., 2013). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit kam hier die kontinuierliche Hypoxie zum Einsatz, die möglicherweise einen anderen Einfluss auf die Expression von LOX-1 und CD36 hat als die CIH.

Der signifikante Anstieg von LOX-1 und der leichte, nicht signifikante Anstieg von CD36 in iNOS-KO-Mäusen lässt vermuten, dass iNOS hinsichtlich der Entwicklung einer NAS/NASH eine protektive Rolle einnimmt. In der Literatur finden sich diesbezüglich keine vergleichbaren Daten.

4.7 Effekt von CIH auf die Speicherung und zonale Verteilung von Glykogen im WT

In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied im Anteil der PAS-positiven Zellen weder im Bereich der ZV noch dem der GT zw. CIH und NOX festgestellt werden (vgl. Abb. 11). Zudem wurde die ZV/GT-Ratio gebildet und zw. CIH und NOX verglichen. Hierbei zeigte sich jedoch, dass CIH keinen Einfluss auf die Verteilung von Glykogen in der Leber hat (vgl. Abb. 13).

Wie bereits in Kapitel 1.6 erwähnt, zeigten Savransky et al. interessanterweise, dass CIH im Mausmodell eine Ansammlung von Glykogen in den Hepatozyten bewirkt (Savransky et al., 2007a). Im Gegensatz zu den 6 Wochen CIH in der vorliegenden Studie waren die

Diskussion

Mäuse in der Arbeit von Savransky et al. jedoch mit 12 Wochen doppelt so lang der CIH ausgesetzt (Savransky et al., 2007a), was möglicherweise einen entscheidenden Effekt auf die Glykogenansammlung in der Leber hatte.

Diabetes ist mit einem veränderten Glykogengehalt in verschiedenen Geweben assoziiert. Während bei Patienten mit Diabetes Typ 2 die Speicherung von Glykogen in der Leber und im Muskel beeinträchtigt ist, wurde ein gesteigerter Glykogengehalt im Herzen sowie in β -Zellen des Pankreas festgestellt (Ros et al., 2011; Sullivan und Forbes, 2019). Wie bereits erwähnt, konnte in früheren Arbeiten eine Assoziation zw. OSAS und Insulinresistenz, Glukoseintoleranz und dem Risiko, an Diabetes Typ 2 zu erkranken, dargestellt werden, unabhängig von anderen Einflussfaktoren wie Adipositas (Botros et al., 2009; Pamidi et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden Insulin- und Glukosespiegel nicht gemessen, sodass dieser Zusammenhang hier nicht abschließend zu beurteilen war.

Garbacz et al. zeigten, dass eine Überexpression von CD36 in Mäusen zu einer erhöhten Glykogenspeicherung in der Leber führte (Garbacz et al., 2016). Möglicherweise war im vorliegenden Projekt die fehlende CD36-Erhöhung mitverantwortlich dafür, dass sich der Glykogengehalt unter CIH nicht erhöht zeigte.

Hinsichtlich der zonalen Verteilung zeigte sich in dieser Arbeit zwar mehr Glykogen um die ZV als um die GT, dieses Muster blieb jedoch von CIH unbeeinflusst (vgl. Abb. 13).

Glykogen ist ein verzweigtes Polysaccharid, das in Glukosemoleküle gespalten werden kann, wenn Energie benötigt wird. Im Muskel und in der Leber werden die Hauptanteile des Glykogens gespeichert. Während die Leber durch Glykogenaufbau und -abbau die Glukosekonzentration im Blut stabil hält, versorgt der Muskel sich mit seinen Glykogenvorräten selbst, wenn er Energie benötigt (Berg et al., 2002). Die Glykogensynthese katalysiert die Reaktion von UDP-Glukose an eine vorhandene Glykogenkette. Dabei hemmen Glucagon und Adrenalin die Glykogensynthese und fördern den Glykogenabbau, während Insulin die Glykogensynthese fördert und den Abbau hemmt (López et al., 1991; von Wilamowitz-Moellendorff et al., 2013).

Der Glykogenaufbau und -abbau erfolgen in unterschiedlicher Aktivität bzgl. der Leberzonen und der metabolischen Stoffwechsellage (Riemann et al., 2008). Während der Hungerphase überwiegt der Glykogenabbau mittels Glykogenphosphorylase von peri-

portal nach perivenös, während die Befüllung der Glykogenspeicher mittels Glykogensynthese umgekehrt von perivenös nach periportal stattfindet (Riemann et al., 2008). Auch Kudryavtseva et al. zeigten in Ratten unter 48 h Nahrungskarenz, dass die Hepatozyten perivenös weiterhin eine kleine Menge Glykogen speichern (Kudryavtseva et al., 1992).

4.8 Effekt von CIH auf Ki-67 und die zonale Verteilung von Ki-67 im WT

In der vorliegenden Arbeit konnte für Ki-67 kein signifikanter Unterschied zw. CIH und NOX sowie zw. ZV und GT in der immunhistologischen Färbung festgestellt werden (vgl. Abb. 14, 16). Darüber hinaus zeigte sich auch für die ZV/GT-Ratios zw. CIH und NOX kein signifikanter Unterschied, d. h. kein Einfluss von CIH auf die Verteilung von Ki-67 in der Leber.

Die immunhistologische Färbung von Ki-67 wird zur Markierung von sich teilenden Zellen genutzt. Sie zeigt das Ausmaß der Proliferation an (Sun und Kaufman, 2018). Dabei ist die Funktion von Ki-67 noch weitgehend unklar (Scholzen und Gerdes, 2000). Die Fraktion der Ki-67-positiven Tumorzellen eignet sich beispielsweise als Prognose des klinischen Verlaufs (Scholzen und Gerdes, 2000).

Corpechot et al. zeigten, dass chronische, konstante Hypoxie bei Hepatozyten in vitro eine reduzierte Proliferation bewirkt, was u. a. durch die Hemmung des Hepatocyte Growth Factor (HGF) und seines Rezeptors c-Met erklärt wird. Dabei wurden u. a. Zellkulturen von Hepatozyten und hepatische Sternzellen unter Sauerstoffkonzentration von < 1 % untersucht (Corpechot et al., 2002). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit exponierten Corpechot et al. die Hepatozyten der Ratten erst nach der Entnahme in vitro einer Sauerstoffkonzentration von < 1 % für 24 h (Corpechot et al., 2002). Möglicherweise haben eine kontinuierliche Hypoxie-Exposition und eine dabei extrem geringe Sauerstofffraktion (< 1 %) einen Einfluss auf die Expression des Proliferationsmarkers.

In Myozyten konnte ebenfalls eine Reduktion von Ki-67 nach Exposition von Hypoxie festgestellt werden. Tong et al. untersuchten fetale Rattenherzen und ventrikuläre, embryonale Myozyten nach Behandlung mit 20%igem Sauerstoff und 1%igem Sauerstoff für 24 oder 48 h. Dabei wurde festgestellt, dass Hypoxie eine signifikante Reduktion von Ki-67 und eine Hochregulation der ‚tissue inhibitors of metalloproteinases‘ 3 und 4

(TIMP-3 und TIMP-4) zur Folge hatte, was die Autoren als Ursache der hemmenden Wirkung von Hypoxie auf die Proliferation in Myozyten sehen (Tong et al., 2013). Möglicherweise hat neben der kontinuierlichen Hypoxie auch die Art des Gewebes einen Einfluss auf die Expression von Ki-67, denn anders als im vorliegenden Dissertationsprojekt untersuchten Tong et al. Myozyten und nicht Hepatozyten.

4.9 Effekt von CIH auf die Glutaminsynthetase (GS)

Die GS ist ein Enzym, das Ammonium auf Glutamat überträgt und eine wichtige Rolle in der Ammonium-Entgiftung sowie der Regulierung von Stickstoff und dem pH-Wert in der Leber spielt (Long et al., 2011). Die GS ist in der Leber in 1 bis 3 Zelllagen um die ZV exprimiert (Gebhardt und Mecke, 1983). Der intrahepatische Glutaminzyklus besteht darin, dass in periportalen Hepatozyten Glutamat entsteht und perivenös wieder neu zu Glutamin synthetisiert wird (Häussinger und Gerok, 1984).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied zw. CIH und NOX (vgl. Abb. 17). Die Studienlage bzgl. des Einflusses von CIH auf die Expression der GS ist dürftig:

Vats et al. simulierten den Einfluss der Höhe (7620 m), indem sie Albinoratten in einem Käfig hypobaren Bedingungen (6 h pro Tag für 1, 7, 14 und 21 Tage) aussetzten. Unter anderem wurde die Glutaminsynthetaseaktivität in der Leber gemessen, die sich bei den Tieren erhöht zeigte, die 7 und 14 Tage den hypobaren Bedingungen exponiert waren. An Tag 21 normalisierte sich die Glutaminsynthetaseaktivität jedoch wieder (Vats et al., 1999). Ein Hauptunterschied zur vorliegenden Arbeit besteht darin, dass zum einen konstant hypoxische und zum anderen hypobare Bedingungen zum Einsatz kamen. Dies hat möglicherweise einen anderen Effekt als die CIH auf die GS. Des Weiteren zeigten Vats et al. eine normalisierte Glutaminsynthetaseaktivität nach 3 Wochen. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch lediglich die GS immunhistochemisch gefärbt, sodass eine Aussage über die Aktivität nicht möglich ist. Im vorliegenden Dissertationsprojekt wurde zudem die GS in der Leber außerdem nach 6 Wochen immunhistochemisch untersucht, zu einem Zeitpunkt, an dem sich die GS, so überhaupt verändert, möglicherweise also wieder normalisiert hatte.

Diskussion

Grundsätzlich ist die Glutaminsynthetaseaktivität zwar stabil, Veränderungen der Aktivität wurden jedoch nach ‚low-protein diet‘, Hypophysektomie, partieller Hepatektomie und portokavalen Shunts festgestellt (Warford, 2000; Wang und Watford, 2006). Auch Insulin hat einen Einfluss auf die GS, der aber nicht vollständig geklärt ist (Wang und Watford, 2006).

Eine erhöhte Aktivität im Muskel und im Fettgewebe konnte bei insulinabhängigem Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden (Wang und Watford, 2006). Nicht auszuschließen ist, dass möglicherweise ein erhöhter Insulinspiegel die GS transient (somit nach 6 Wochen nicht erfassbar) erhöht und CIH keinen direkten Einfluss auf diese hat, denn wie in den vorigen Abschnitten bereits beschrieben, konnte eine Assoziation zw. OSAS und Insulinresistenz, Glukoseintoleranz und dem Risiko, an Diabetes Typ 2 zu erkranken, unabhängig von anderen Einflussfaktoren wie Adipositas, dargestellt werden (Botros et al., 2009; Pamidi et al., 2010). Die Prävalenz von Hyperglykämie, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 ist in Patienten mit OSAS im Vergleich zu gesunden Patienten erhöht (Li et al., 2018). Darüber hinaus konnte eine Korrelation zw. nächtlicher Sauerstoffsättigung und Nüchternblutglukose bzw. Glukosekonzentration im zwei-stündigen oralen Blutglukosetest nachgewiesen werden, was eine Korrelation zw. der Schwere des OSAS und dem Auftreten einer Insulinresistenz nahelegt (Li et al., 2018).

5 Zusammenfassung

Das Syndrom der obstruktiven Schlafapnoe (OSAS) ist die häufigste schlafbezogene Atmungsstörung. Es ist durch einen wiederholten Tonusverlust der oberen Atemwegsmuskulatur im Schlaf gekennzeichnet, der zu einem Kollaps der Pharynxmuskulatur und zu einer Okklusion der Luftwege oberhalb der Glottis führt. Die damit verbundene Apnoe/Hypopnoe resultiert in einem Abfall der Sauerstoffsättigung und einer Sympathikusaktivierung mit einer Weckreaktion (Arousal). Leitsymptom des OSAS ist neben lautem Schnarchen v. a. die Tagesmüdigkeit. Langfristige Folgen betreffen verschiedene Organsysteme. So ist das OSAS als unabhängiger Risikofaktor für weit verbreitete systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), das metabolische Syndrom und kardiovaskuläre Erkrankungen zu betrachten. Aufgrund der steigenden Prävalenz des Hauptrisikofaktors, der Adipositas, gewinnen auch das OSAS und dessen zugrundeliegende Pathomechanismen zunehmend an Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den Effekt einer chronisch-intermittierenden Hypoxie (CIH), als pathophysiologisch wichtigem Faktor des OSAS, auf die Leber immunhistologisch und molekularbiologisch zu untersuchen. Hierfür stand ein etabliertes Mausmodell (männliche C57Bl/6J-Mäuse) zur Verfügung, bei dem durch CIH (30 Zyklen/h Hypoxie bis minimal 6 % O₂ über 8 h pro Tag, 5 Tage pro Woche, über 6 Wochen) ein AHI von 30 simuliert wurde, was einem moderat-schweren OSAS entspricht. Neben der CIH-Interventionsgruppe (WT CIH, n = 8) standen Kontrolltiere dieses Genotyps unter Normoxie (WT NOX, n = 8) zur Verfügung.

Als primäres Ziel wurde der Effekt von CIH im Vergleich zu NOX auf die hepatische Expression proinflammatorischer Marker (COX-1 und COX-2, CD68, Il-1 β , Il-6 und TNF- α) erforscht.

Sekundär wurden weitere Faktoren untersucht, die potentiell an OSAS-bedingten Leberveränderungen beteiligt sind: angiogene Transkripte (VEGF-A, VEGF-B und KDR), an der Entwicklung der NAFLD beteiligte Transkripte (CD36 und LOX-1), (immun-)histochemisch die GS und die Hepatozytenproliferation (Ki-67) sowie die hepatische Glykogenspeicherung. Da unter CIH eine massive Herunterregulation der iNOS beobachtet wurde, war es ein zusätzliches Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle von iNOS bei Veränderungen der genannten Faktoren (Transkripte) zu untersuchen. Hierfür standen iNOS-KO-

Zusammenfassung

Mäuse sowohl für eine NOX-Exposition (iNOS-KO NOX, n = 8) als auch eine CIH-Intervention (iNOS-KO CIH, n = 8) zur Verfügung und wurden mit WT NOX oder WT-CIH verglichen.

Unter den Entzündungsparametern zeigten sich auf RNA-Ebene im WT unter CIH gegenüber NOX statistisch signifikant erhöht: Il-1 β 2,42-fach, Il-6 4,09-fach und TNF- α 12,17-fach. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien, die zeigen konnten, dass CIH zu einer Inflammation in der Leber führt. Ein Einfluss von CIH auf die Dichte von CD68-positiven und COX-2-positiven Zellen und deren Verteilung in der Leber konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden.

Darüber hinaus zeigten sich KDR (2,40-fach) und SOCS-3 (1,60-fach) unter CIH im WT statistisch signifikant erhöht. Die erhöhte KDR-Expression kann als Ausdruck der unzureichenden Sauerstoffzufuhr des Gewebes gesehen werden und die erhöhte SOCS-3-Expression steht in Verbindung mit hochregulierten Zytokinen und kann zu einer Insulinresistenz beitragen.

INOS-KO NOX im Vergleich zu WT NOX führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der TNF- α -Expression (0,36-fach). INOS-KO CIH im Vergleich zu WT CIH zeigte eine statistisch signifikante Reduktion von Il-1 β (0,38-fach), Il-6 (0,17-fach) und TNF- α (0,05-fach). Demgegenüber resultierte die Kombination von iNOS-KO und CIH in einer statistisch signifikant gesteigerten Expression von SOCS-3 (1,95-fach) und KDR (6,34-fach) gegenüber WT NOX. Im Vergleich von iNOS-KO CIH zu WT CIH zeigte die Genexpression von KDR (2,64-fach) ebenfalls eine statistisch signifikante Erhöhung. Somit wurde der o. g. CIH-Effekt durch iNOS-KO gesteigert. Dies könnte auf eine fördernde Rolle der iNOS in Inflammationsprozessen auf der einen Seite und eine protektive Rolle bezüglich der mit SOCS-3 verbundenen Insulinresistenz und angiogenetischen Prozesse auf der anderen Seite hinweisen.

Insgesamt scheint eine Hochregulation der Zytokine durch CIH in der Leber mit einer Herunterregulation von iNOS assoziiert zu sein. Da ein völliges Fehlen von iNOS jedoch keine proinflammatorische Wirkung unter NOX oder CIH aufweist und eher antiinflammatorisch wirkt, ist eine (zumindest geringe) iNOS-Expression bzw. eine NO-Produktion offenbar für eine inflammatorische Reaktion notwendig. Im Gegensatz dazu verhindert iNOS eine übermäßige SOCS-3-Expression und eventuell auch eine enthemmte Angiogenese.

6 Summary

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is the most common sleep-related breathing disorder. It is characterized by a repetitive loss of tone in the upper airway muscles during sleep, leading to a collapse of the pharyngeal muscles and occlusion of the airway above the glottis. The associated apnea or hypopnea leads to a drop in oxygen saturation and sympathetic activation, resulting in arousal. Leading symptoms are loud snoring and, above all, daytime sleepiness. Long-term consequences affect various organ systems. OSAS is an independent risk factor for common systemic diseases such as diabetes mellitus, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), metabolic syndrome, and cardiovascular diseases. Due to the increasing prevalence of the leading risk factor, obesity, OSAS and its underlying pathomechanisms are also gaining interest.

This dissertation investigated the effect of chronic intermittent hypoxia (CIH), as a pathophysiologically significant factor of OSAS, on the liver immunohistologically and molecularly. For this purpose, an established mouse model (male C57Bl/6J mice) was applied in which CIH (30 cycles/h hypoxia to minimal 6% O₂ for 8 h per day, five days per week, for six weeks) simulated an AHI of 30, corresponding to moderate-severe OSAS. In addition to the intervention group (WT CIH, n = 8), control animals of this genotype under normoxia (WT NOX, n = 8) were used.

The primary objective was to investigate the effect of CIH compared to NOX on the hepatic expression of proinflammatory markers (COX-1 and COX-2, CD68, IL-1 β , IL-6, and TNF- α).

Secondarily, other factors potentially involved in OSAS-related liver changes were investigated: angiogenic transcripts (VEGF-A, VEGF-B, and KDR), transcripts involved in NAFLD (CD36 and LOX-1) development, immunohistochemical GS and hepatocyte proliferation (Ki-67), and hepatic glycogen storage.

Since significant iNOS downregulation was observed under CIH, an additional research aim was to investigate the role of iNOS in changes in the abovementioned factors (transcripts). For this purpose, a group of iNOS-KO mice was exposed to NOX (iNOS-KO NOX, n = 8) and CIH intervention (iNOS-KO CIH, n = 8) for comparison with WT NOX or WT CIH.

Summary

Inflammatory parameters exhibited statistically significant increases, at the RNA level, in WT under CIH compared with NOX: IL-1 β 2.42-fold, IL-6 4.09-fold, and TNF- α 12.17-fold. This finding confirms the results of previous studies demonstrating that CIH leads to inflammation in the liver. This research could not detect the effect of CIH on the density of CD68-positive and COX-2-positive cells and their distribution in the liver.

Moreover, KDR (2.40-fold) and SOCS-3 (1.60-fold) exhibited statistically significant increases under CIH in WT. Increased KDR expression could reflect insufficient tissue oxygenation, and increased SOCS-3 expression is linked to upregulated cytokines, potentially contributing to insulin resistance.

Compared with WT NOX, INOS-KO NOX revealed a statistically significant reduction in TNF- α expression (0.36-fold). Compared with WT CIH, INOS-KO CIH exhibited statistically significant reductions in IL-1 β (0.38-fold), IL-6 (0.17-fold), and TNF- α (0.05-fold).

In contrast, the combination of iNOS-KO under CIH significantly increased SOCS-3 (1.95-fold) and KDR (6.34-fold) expression compared with WT NOX. Comparing iNOS-KO CIH with WT CIH revealed a statistically significant increase (2.64-fold) in KDR gene expression. Thus, iNOS-KO increased the abovementioned CIH effect.

This finding suggests that iNOS has a promoting role in inflammatory processes, on the one hand, and a protective role regarding SOCS-3-related insulin resistance and angiogenic processes, on the other hand.

Overall, cytokine upregulation by CIH in the liver appears to be associated with iNOS downregulation. However, because a complete absence of iNOS has no proinflammatory effect under NOX or CIH and is relatively anti-inflammatory, iNOS expression (at least at low levels) and NO production appear necessary for an inflammatory response. In contrast, iNOS prevents excessive SOCS-3 expression and possibly disinhibited angiogenesis.

7 Literaturverzeichnis

AASM (The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force). (1999). "Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force." *Sleep*, 22(5), S. 667-689.

Abbasi, A., Gupta, S. S., Sabharwal, N., Meghrajani, V., Sharma, S., Kamholz, S., Kupfer, Y. (2021). "A comprehensive review of obstructive sleep apnea." *Sleep Sci (Sao Paulo, Brazil)*, 14(2), S. 142–154.

AbD Serotec, A Bio-Rd Company. (2015). „CD68 antibody.“ Online: <https://www.bio-rad-antibodies.com/cd68-antibody-macrophage-marker.html> (Stand: 17.08.2022).

Ahmad, M., Makati, D., Akbar, S. (2017). „Review of and Updates on Hypertension in Obstructive Sleep Apnea.“ *Int J Hypertens*, 2017, Artikel Identifikationsnummer 1848375.

Anavi S., Eisenberg-Bord M., Hahn-Obercyger M., Genin O., Pines M., Tirosh O. (2015). „The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis.“ *Lab Invest*, 95(8), S. 914-924.

Antonaglia, C. und Passuti, G. (2021). „Obstructive sleep apnea syndrome in non-obese patients.“ *Sleep Breath*, 26(2), S. 513-518.

Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. " *Biochem J*, 357(Pt 3), S. 593-615.

Andrew, P. J. und Mayer, B. (1999). "Enzymatic function of nitric oxide synthases." *Cardiovasc Res*, 43(3), S. 521-531.

Ankoma-Sey, V., Wang, Y., Dai, Z. (2000). "Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells." *Hepatology*, 31(1), S. 141-148.

Araz, O., Karaman, A., Esdur, V., Ucar, E. Y., Subasi, I. D., Alper, F., Akgun, M. (2020). The association of OSAS and uvula: the role of MRI in this egg-chicken problem in OSAS." *Sleep Breath*, 24(2), S. 465–470.

Armbrust, T. und Ramadori, G. (1996). "Functional characterization of two different Kupffer cell populations of normal rat liver." *J Hepatol*, 25(4), S. 518-528.

Aron-Wisnewsky, J., Minville, C., Tordjman, J., Lévy, P., Bouillot, J. L., Basdevant, A., Bedossa, P., Clément, K., Pépin, J.L. (2012). "Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese." *J Hepatol*, 56(1), S. 225-233.

AWMF. (2017). S3 Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörung Kapitel "Schlafbezogene Atmungsstörungen bei Erwachsenen", Online: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/063-001l_S3_SBAS_2017-08_2_verlaengert_und_Hinweis_Teil-Aktualisierung_2020-07.pdf (Stand: 05.05.2022).

Bai, L., Yu, Z., Qian, G., Qian, P., Jiang, J., Wang, G., Bai, C. (2006). "SOCS3 was induced by hypoxia and suppressed STAT3 phosphorylation in pulmonary arterial smooth muscle cells." *Respir Physiol Neurobiol*, 152(1), S. 83-91.

Banno, K. und Kryger, M. H. (2007). "Sleep apnea: clinical investigations in humans." *Sleep Med.*, 8(4), S. 400-426.

Bannow, L. I., Bonaterra, G. A., Bertoune, M., Maus, S., Schulz, R., Weissmann, N., Kraut, S., Kinscherf, R., Hildebrandt, W. (2022). "Effect of chronic intermittent hypoxia (CIH) on neuromuscular junctions and mitochondria in slow- and fast-twitch skeletal muscles of mice-the role of iNOS." *Skelet Muscle*, 12(1), S. 6.

Bao, G., Metreveli, N., Li, R., Taylor, A., Fletcher, E.C. (1997). "Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: role of the sympathetic nervous system." *J Appl Physiol*, 83(1), S. 95-101.

Baratta, F., Pastori, D., Fabiani, M., Fabiani, V., Ceci, F., Lillo, R., Lolli, V., Brunori, M., Pannitteri, G., Cravotto, E., De Vito, C., Angelico, F., Del Ben, M. (2018). „Severity of OSAS, CPAP and cardiovascular events: A follow-up study.“ *Eur J Clin Invest*, 48(5), e12908.

Becker H.F., Jerrentrup A., Ploch T., Grote L., Penzel T., Sullivan C.E., Peter J.H. (2003). "Effect of nasal continuous positive airway pressure treatment on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea." *Circulation*, 107(1), S. 68-73.

Becker H.F., Ficker J., Fietze I., Geisler P., Happe S., Hornyak M., Kotterba S., Orth M., Podszus T., Raschke F., Randerath W., Rühle K.-H., Stiasny-Kolster K., Walther B., Wiater A. (2009). "S3-Leitlinie-Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen." *Somnologie*, 13, S. 4-160.

Benjafield, A., Ayas, N., Eastwood, P., Heinzer, R., Ip, M., Morrell, M., Nunez, C., Patel, S., Penzel, T., Pépin, J.-L., Peppard, P., Sinha, S., Tufik, S., Valentine, K., Malhotra, A. (2019). „Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis.“ *Lancet Respir Med*, 7(8), S. 687-698.

Berg, J.T., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002). "Chapter 21, Glykogen Metabolism." *Biochemistry*. (5. Aufl.), New York: W H Freeman. Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21190>. (Stand: 14.12.2020).

Boneberg, R., Pardun, A., Hannemann, L., Hildebrandt, O., Koehler, U., Kinscherf, R., Hildebrandt, W. (2021). "High Plasma Cystine Levels Are Associated with Blood Pressure and Reversed by CPAP in Patients with Obstructive Sleep Apnea." *Journal of clinical medicine*, 10(7): 1387.

Botros, N., Concato, J., Mohsenin, V., Selim, B., Doctor, K., Yaggi, H. (2009). "Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes." *Am J Med*, 122(12), S. 1122-1127.

Boudewyns A., Marklund, M., Hochban, W. (2007). "Alternatives for OSAHS treatment: selection of patients for upper airway surgery and oral appliances." *European respiratory review*, 16(106), S. 132-145.

Bradley, S. J., Kingwell, B. A., Canny, B. J., McConell, G. K. (2007). "Skeletal muscle neuronal nitric oxide synthase micro protein is reduced in people with impaired glucose homeostasis and is not normalized by exercise training." *Metabolism*, 56(10), S. 1405–1411.

Bradley, T. D., Martinez, D., Rutherford, R., Lue, F., Grossman, R.F., Moldofsky, H., Zamel, N., Phillipson, E.A. (1985). "Physiological determinants of nocturnal arterial oxygenation in patients with obstructive sleep apnea." *J Appl Physiol*, 59(5), S. 1364-1368.

Browman, C.P., Sampson, M.G., Yolles, S.F., Gujavarty, K.S., Weiler, S.J., Walsleben, J. A., Hanhn, J.A., Mitler, M.M. (1984). "Obstructive sleep apnea and body weight." *Chest*, 85(3), S. 435-438.

Browning, J.D. und Horton, J.D. (2004). "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury." *J Clin Invest*, 114(2), S. 147-152.

Büttner, F. (2017). Der Effekt von chronisch-intermittierender Hypoxie auf myokardiale Vaskularisation, Entzündung und mitochondriale Integrität im Mausmodell. Online: <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2017/0443/pdf/dfb.pdf> (Stand 14.12.2020).

Bykov, I., Ylipaasto, P., Eerola, L., Lindros, K.O. (2004). "Functional Differences between Periportal and Perivenous Kupffer Cells Isolated by Digitonin-Collagenase Perfusion." *Comp Hepatol*, 3 (Suppl 1), S. 34.

Callejas N.A., Boscá L., Williams C.S., DuBOIS R.N., Martín-Sanz P. (2000). "Regulation of cyclooxygenase 2 expression in hepatocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins." *Gastroenterology*, 119(2), S. 493-501.

Cassini-Vieira, P., Araújo, F.A., da Costa Dias, F.L., Russo, R.C., Andrade, S.P., Teixeira, M.M., Barcelos, L.S. (2015). "iNOS Activity Modulates Inflammation, Angiogenesis, and Tissue Fibrosis in Polyether Synthetic Implants." *Mediators of Inflamm*, 2015, Artikel Identifikationsnummer 138461.

Chen, L.-D., Lin, L., Zhang, L.-J., Zeng, H.-X., Wu, Q.Y., Hu, M.-F., Xie, J.-J., Liu, J.-N. (2018). "Effect of continuous positive airway pressure on liver enzymes in obstructive sleep apnea: A meta-analysis." *Clin Resp J*, 12(2), S. 373-381.

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., Pack A.I. (2014). "CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea." *N Engl J Med*, 370(24), S. 2265-2275.

Chistiakov D.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. (2016). "Macrophage -mediated cholesterol handling in atherosclerosis." *J Cell Mol Med*, 20(1), S. 17-28.

Chung, F., Liao, P., Elsaid, H., Islam, S., Shapiro, C. M., Sun, Y. (2012). "Oxygen desaturation index from nocturnal oximetry: a sensitive and specific tool to detect sleep-disordered breathing in surgical patients." *Anesth Analg*, 114(5), S. 993-1000.

Ciftci, T. U., Kokturk, O., Demirtas, S., Gulbahar, O., Bukan, N. (2011). "Consequences of hypoxia-reoxygenation phenomena in patients with obstructive sleep apnea syndrome." *Ann Saudi Me*, 31(1), S. 14-18.

Conradt, R., Hochban, W., Brandenburg, U., Heitmann, J., Peter, J.H. (1997). "Long-term follow-up after surgical treatment of obstructive sleep apnoea by maxillomandibular advancement." *Eur Respir J*, 10(1), S. 123-128.

Corpechot, C., Barbu, V., Wendum, D., Chignard, N., Housset, C., Poupon, R., Rosmorduc, O. (2002). "Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis." *Am J Pathol*, 160(2), S. 613-620.

Coughlin, S.R., Mawdsley, L., Mugarza, J.A., Calverley, P.M., Wilding, J.P. (2004). "Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome." *Eur Heart J*, 25(9), S. 735-741.

Coulon, S., Legry, V., Heindryckx, F., Van Steenkiste, C., Casteleyn, C., Olievier, K., Libbrecht L., Carmeliet P., Jonckx B., Stassen J.M., Van Vlierberghe H., Leclercq I., Colle I., Geerts A. (2013). "Role of vascular endothelial growth factor in the pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis in two rodent models." *Hepatology*, 57(5), S. 1793-1805.

Crocker, B.A., Metcalf, D., Robb, L., Wei, W., Mifsud, S., DiRago, L., Cluse L.A., Sutherland K.D., Hartley L., Williams E., Zhang J.G., Hilton D.J., Nicola N.A., Alexander W.S., Roberts A.W. (2004). "SOCS3 is a critical physiological negative regulator of G-CSF signaling and emergency granulopoiesis." *Immunity*, 20(2), S. 153-165.

Crucet, M, Wüst, S., Spielmann, P., Lüscher, T., Wenger, R., Matter, C. (2013). „Hypoxia enhances lipid uptake in macrophages: role of the scavenger receptors LOX1, SRA, and CD36.“ *Atherosclerosis* 229(1), S. 110-117.

da Rosa, D.P., Forgiarini, L.F., Baronio, D., Feijó, C.A., Martinez, D., Marroni, N.P. (2012). "Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver." *Mediators Inflamm*, 2012, Artikel Identifikationsnummer 879419.

da Rosa, D. P., Forgiarini, L. F., e Silva, M. B., Fiori, C. Z., Andrade, C. F., Martinez, D., Marroni, N.P. (2015). "Antioxidants inhibit the inflammatory and apoptotic processes in an intermittent hypoxia model of sleep apnea." *Inflamm Res*, 64(1), S. 21-29.

Literaturverzeichnis

- Davies, R.J. und Stradling, J.R.** (1990). "The relationship between neck circumference, radiographic pharyngeal anatomy, and the obstructive sleep apnoea syndrome." *Eur Respir J*, 3(5), S. 509-514.
- Davignon, J. und Ganz, P.** (2004). „Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis.“ *Circulation* 109(23 Suppl 1), S. III-27-III-32.
- de Winther M.P., van Dijk K.W., Havekes L.M., Hofker M.H.** (2000). "Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc*, 20(2), S. 290-297.
- Dias-Junior, C.A., Cau, S.B., Tanus-Santos, J.E.** (2008). "Role of nitric oxide in the control of the pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications." *J Bras Pneumol*, 34(6), S. 412-419.
- Drager, L.F., Jun, J.C., Polotsky, V.Y.** (2010). "Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 24(5), S. 843-851.
- Duchna, H-W.** (2006). „Schlafbezogene Atmungsstörungen - Neuauflage der Internationalen Klassifikation von Schlafstörungen (ICSD-2) der American Academy of Sleep Medicine (AASM).“ *Pneumologie*, 60(9), S. 568-575.
- Dufour, J.-F. und Clavien, P.-A.** (2010). "Signaling Pathways in Liver Diseases", 2. Auflage, Heidelberg, Springer, S. 426-429.
- Duran J., Esnaola S., Rubio R., Iztueta A.** (2001). „Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr.“ *Am J Respir Crit Care Med*, 163(3 PT 1), S. 685-689.
- Eghbalzadeh, K., Brixius, K., Bloch, W., Brinkmann, C.** (2014). "Skeletal muscle nitric oxide (NO) synthases and NO-signaling in "diabesity"- what about the relevance of exercise training interventions?." *Nitric oxide*, 37, S. 28–40.
- Eisele, H., Weissmann, N., Seeger, W., Schulz, R.** (2006). „Ein Mausmodell der obstructiven Schlaf-Apnoe.“ *Pneumologie*, 60(5), S. 60-A4.
- Faber J.F., Faber C., Faber A.P.** (2019). "Obstructive sleep apnea in adults." *Dental Press J Orthod.*, 24(3), 99-109. Fanghänel. Pschyrembel Online. Online: <https://www.pschyrembel.de/Hämatoxylin-Eosin-Färbung/K098V> (Stand: 14.12.2020).
- Farzaneh-Far, R. und Moore, K.** (2001). "Nitric oxide and the liver." *Liver*, 21(3), S. 161–174.
- Emanuelli B., Peraldi P., Filloux C., Sawka-Verhelle D., Hilton D., Van Obberghen E.** (2000). "SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling." *J Biol Chem*, 275(21), S. 15985-15991.

Literaturverzeichnis

Fairbanks, D.N. (1990). "Uvulopalatopharyngoplasty complications and avoidance strategies." *Otolaryngol Head Neck Surg*, 102(3), S. 239-245.

Fanghänel, J. (2018). "Hämatoxylin-Eosin-Färbung." *Pschyrembel online*. Online: <https://www.pschyrembel.de/Hämatoxylin-Eosin-Färbung/K098V> (Stand: 18.12.20).

Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., Silverstein, R.L. (2000). "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice." *J Clin Invest*, 105(8), S. 1049-1056.

Ferrara, N. und Davies-Smyth, T. (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." *Endocrine reviews*, 18(1), S. 4-25.

Fleming, K.E. und Wanless I.R. (2013). "Glutamine synthetase expression in activated hepatocyte progenitor cells and loss of hepatocellular expression in congestion and cirrhosis." *Liver Int.*, 33(4), S. 525-534.

Fleury Curado, T., Berger, S., Polotsky, V. Y. (2019). "Pharmacotherapy of Obstructive Sleep Apnea: Is Salvation Just Around a Corner?" *Am J Respir Crit Care Med*. 199(10), S. 1186–1187.

Franklin, K.A., Anttila, H., Axelsson, S., Gislason, T., Maasilta, P., Myhre, K.I., Rehnqvist, N. (2009). "Effects and side-effects of surgery for snoring and obstructive sleep apnea--a systematic review." *Sleep*, 32(1), S. 27-36.

Friedman, M., Schalch, P., Lin, H.C., Kakodkar, K.A., Joseph, N.J., Mazloom, N. (2008). "Palatal implants for the treatment of snoring and obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome." *Otolaryngol Head Neck Surg*, 138(2), S. 209-216.

Förstermann, U. und Sessa, W.C. (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." *Eur Heart J*, 33(7), S. 829-837.

Fox, H., Arzt, M., Bergmann, M. W., Bitter, T., Linz, D., Oldenburg, O., Penzel, T., Rillig, A., Schöbel, C., Sinha, A. M., Sommer, P., Spießhöfer, J., Stadler, S., Skobel, C. E. (2021). "Positionspapier „Schlafmedizin in der Kardiologie“, Update 2021". *Kardiologie*, 15(5), S. 429–461.

Garbacz, W.G., Lu, P., Miller, T.M., Poloyac, S.M., Eyre, N.S., Mayerhofer, G., Xu, M., Ren, S., Xie, W. (2016). „Hepatic Overexpression of CD36 Improves Glykogen Homeostasis and Attenuates High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance.“ *Mol Cell Biol*, 36(21), S. 2715-2727.

Gebhardt, R. und Mecke, D. (1983). "Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture." *EMBO J*, 2(4), S. 567-570.

Gemeinsamer Bundesausschuss. (2006). Zusammenfassender Bericht des Unterausschusses "Ärztliche Behandlung" des Gemeinsame Bundesausschusses über die Beratungen von 1998-2004 zur Bewertung der Polygraphie und Polysomnographie im Rahmen der Differentialdiagnostik und Therapie der schlafbezogenen Atmungsstörungen gemäß §135 Abs.1 SGB V: 22. Online: <https://www.g-ba.de/downloads/40-268-234/2006-01-27-Abschluss-Polygraphie.pdf>. (Stand: 18.08.2022).

Gerlach C., Sakkab D.Y., Scholzen T., Dassler R., Alison M.R., Gerdes J. (1997). "Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy." *Hepatology*, 26(3), S. 573-578.

Ghofrani, H.A., Pepke-Zaba, J., Barbera, J.A., Channick, R., Keogh, A.M., Gomez-Sanchez, M.A., Kneussl, M., Grimminger, F. (2004). "Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension." *J Am Coll Cardiol*, 43(12 Suppl S), S. 68S-72S.

Gottlieb, D.J., Yenokyan, G., Newman, A.B., O'Conner, G.T., Punjabi, N.M., Quan, S.F., Redline, S., Resnick, H.E., Tong, E.K., Diener-West, M., Shahar, E. (2010). "Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study." *Circulation*, 122(4), S. 352-360.

Greenberg, H., Ye, X., Wilson, D., Htoo, A. K., Hendersen, T., Liu, S. F. (2006). "Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo." *Biochem Biophys Res Commun*, 343(2), S. 591-596.

Groves, J.T. und Wang, C.C. (2000). "Nitric oxide synthase: models and mechanisms." *Curr Opin Chem Biol*, 4(6), S. 687-695.

Grunstein, R., Wilcox, I., Yang, T.S., Gould, Y., Hedner, J. (1993). "Snoring and sleep apnoea in men: association with central obesity and hypertension." *Int J Obes Relat Metab Disord*, 17(9), S. 533-540.

Guilleminault, C., Eldrige, F.L., Simmons, F.B., Dement, W.C. (1976). "Sleep apnea in eight children". *Pediatrics*, 58(1), S. 23-30.

Guilleminault, C., Simmons, F. B., Motta, J., Cumiskey, J., Rosekind, M., Schroeder, J. S., Dement, W.C. (1981). "Obstructive sleep apnea syndrome and tracheostomy. Long-term follow-up experience." *Arch Intern Med*, 141(8), S. 985-988.

Häussinger, D. (1987). „Hepatic glutamine metabolism.“ *Beitr Infusionsther Klin Ernähr*, 17, S. 144-57.

Häussinger, D. und Gerok, W. (1984). "Functional liver cell heterogeneity." *Beitr Infusionsther Klin Ernähr*, 11(5), S. 245-253.

Hendricks, J. C., Kline, L. R., Kovalski, R. J., O'Brien, J. A., Morrison, A. R., Pack, A. I. (1987). "The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing." *J Appl Physiol*, (Bethesda, Md.:1985), 63(4), S. 1344-1350.

Hill, B.G., Dranka, B.P., Bailey, S.M., Lancaster, J.R., Darley-Usmar, V.M. (2010). "What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology." *J Biol Chem*, 285(26), S. 19699-19704.

Hnin, K., Mukherjee, S., Antic, N. A., Catcheside, P., Chai-Coetzer, C. L., McEvoy, D., Vakulin, A. (2018). "The impact of ethnicity on the prevalence and severity of obstructive sleep apnea." *Sleep Med Rev*, 41, S. 78–86.

Hochban, W., Conradt, R., Brandenburg, U., Heitmann, J., Peter, J. H. (1997). "Surgical maxillofacial treatment of obstructive sleep apnea." *Plast Reconstr Surg*, 99(3), S. 619-626.

Hoedemakers, R.M., Morselt, H.W., Scherphof, G. L., Daemen, T. (1995). "Heterogeneity in secretory responses of rat liver macrophages of different size." *Liver*, 15(6), S. 313-319.

Holberg, C.J., Natrajan, S., Cline, M.G., Quan, S.F. (2000). "Familial Aggregation and Segregation Analysis of Snoring and Symptoms of Obstructive Sleep Apnea." *Sleep Breath*, 4(1), S. 21-30.

Hong, D., Li, L.F., Gao, H.C., Wang, X., Li, C.C., Luo, Y., Bai, Y.P., Zhang, G.G. (2015). „High-Density Lipoprotein Prevents Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Downregulation of Liver LOX-1 Expression.“ *PloS One*, 10(4), Artikel Identifikationsnummer: e0124285.

Horner, R.L., Brooks, D., Kozar, L.F., Leung, E., Hamrahi, H., Render-Teixeira, C.L., Makino, H., Kimhoff, R.J., Phillipson, E.A. (1998). "Sleep architecture in a canine model of obstructive sleep apnea." *Sleep*, 21(8), S. 847-858.

HUGO Gene Nomenclature Committee (2020): VEGFA vascular endothelial growth factor A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422> (Stand: 04.03.2022).

Hur, G.M., Ryu, Y.S., Yun, H.Y., Jeon, B.H., Kim, Y.M., Seok, J.H., Lee, J.H. (1999). "Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB." *Biochem Biophys Res Commun*, 261(3), S. 917-922.

Ibrahimi, A., Bonen, A., Blinn, W., Hajri, T., Li, X., Cameron, R., Abumrad, N.A. (1999). "Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin." *J Biol Chem*, 274(38), S. 26761-6.

Iiyori, N., Alonso, L.C., Li, J., Sanders, M.H., Garcia-Ocana, A., O'Doherty, R.M., Polotsky, V.Y., O'Donnell, C.P. (2007). "Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity." *Am J Respir Crit Care Med*, 175(8), S. 851-857.

Ip, M.S., Lam, B., Chan, L.Y., Zheng, L., Tsang, K.W., Fung, P.C., Lam, W.K. (2000). "Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure." *Am J Respir Crit Care Med*, 162(6), S. 2166-2171.

Ip, M., Tse, H., Lam, B., Tsang, K. L. (2004). "Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment." *Am J Respir Crit Care Med.*, 169(3), S. 348-53.

Itoh, Y., Okanoue, T., Morimoto, M., Nagao, Y., Mori, T., Hori, N., Kagawa, K., Kashima, K. (1992). "Functional heterogeneity of rat liver macrophages: interleukin-1 secretion and Ia antigen expression in contrast with phagocytic activity." *Liver*, 12(1), S. 26-33.

Iwakiri, Y. (2015). „Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase.“ *Clin Mol Hepatol*, 21(4), S. 319-325.

Janssens, J. P., Pautex, S., Hilleret, H., Michel, J. P. (2000). "Sleep disordered breathing in the elderly." *Aging (Milan, Italy)*, 12(6), S. 417-429.

Javaheri, S., Barbe, F., Campos-Rodriguez, F., Dempsey, J.A., Khayat, R., Javaheri, S., Malhotra, A., Martinez-Garcia, M.A., Mehra, R., Pack, A.I., Polotsky, V. Y., Redline, S., Somers, V.K. (2017). "Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences." *Journal of the American College of Cardiology*, 69(7), S. 841–858.

Jehan S., Farag M., Zizi F., Pandi-Perumal S.R., Chung A., Truong A., Jean-Louis G., Tello D., McFarlane S.I. (2018). "Obstructive sleep apnea and stroke." *Sleep Med Disord*, 2(5), S. 120-125.

Jelic, S., Padeletti, M., Kawut, S. M., Higgins, C., Canfield, S. M., Onat, D., Colombo P.C., Basner R.C., Factor P., LeJemtel T.H. (2008). "Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea." *Circulation*, 117(17), S. 2270-2278.

Jullian-Desayes I., Tamisier R., Zarski J.P., Aron-Wisnewsky J., Launois-Rollinat S., Trocme C., Levy P., Joyeux-Faure M., Pepin J. (2016). „Impact of effective versus sham continuous positive airway pressure on liver injury in obstructive sleep apnoea: Data from randomized trials.“ *Respirology* 21(2), S. 378-385.

Jun, J. und Polotsky, V. Y. (2007). "SLEEP DISORDERED BREATHING AND METABOLIC EFFECTS: EVIDENCE FROM ANIMAL MODELS." *Sleep Med Clin*, 2(2), S. 263-277.

Jun, J. und Polotsky, V.Y. (2009). „Metabolic consequences of sleep-disordered breathing.“ *ILAR journal* 50(3), S. 289-306.

Just, M. und Dietz, A. (2019). "Chirurgische Therapieoptionen bei obstruktiven schlafbezogenen Atmungsstörungen und Schnarchen." *Laryngo-Rhino-Otol*, 98(09), S. 638-650.

Karaca, M., Martin-Levilain, Grimaldi, M., Li, L., Dizin, E., Emre, Y., Maechler, P.. (2018). „Liver Glutamate Dehydrogenase Controls Whole-Body Energy Partitioning Through

Literaturverzeichnis

Amino Acid-Derived Gluconeogenesis and Ammonia Homeostasis. " Diabetes, 67(10), S. 1949-1961.

Kaur A. und Mokhlesi B. (2017). "The Effect of OSA Therapy on Glucose Metabolism: It`s All about CPAP Adherence!" J Clin Sleep Med, 13(3), S. 365-367.

Kezirian, E.J. und Goldberg, A.N. (2006). "Hypopharyngeal surgery in obstructive sleep apnea: an evidence-based medicine review." Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 132(2), S. 206-213.

Kim D., Ahmed A., Kushida C. (2018). „Continuous Positive Airway Pressure Therapy on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Obstructive Sleep Apnea.“ J Clin Sleep Med, 14(8), S. 1315-1322.

Kmieć, Zbigniew (2001). "Cooperation of Liver Cells in Health and Disease." Adv Anat Embryol Cell Biol. 161, S. 1-151.

Kohler, M., Stoewhas, A., Ayers, L., Senn, O. B., Russi, E., Stradling, J. (2011). "Effects of continuous positive airway pressure therapy withdrawal in patients with obstructive sleep apnea: a randomized trial." Am J Respir Crit Care Med, 184(10), S. 1192-1199.

Kudryavtseva, M., Sakuta, G., Stein, G., Kudryavtsev, N. (1992). "The metabolic zonation of glycogen synthesis in rat liver after fasting and refeeding." Tissue and Cell, 24(1), S. 31-35.

Kulkarni S.K., Jain N.K., Singh A. (2000). "Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors." Methods Find Exp Clin Pharmacol, 22(2), S. 291-298.

Kuntz, E. und Kuntz H.-D. (2008). "Hepatology: Textbook and Atlas; History, Morphology, Biochemistry, Diagnostics, Clinic, Therapy." 3. Auflage, Heidelberg, Springer, S. 24.

Krause, M., Rodrigues-Krause, J., O'Hagan, C., De Vito, G., Boreham, C., Susta, D., Newsholme, P., Murphy, C. (2012). "Differential nitric oxide levels in the blood and skeletal muscle of type 2 diabetic subjects may be consequence of adiposity: a preliminary study." Metabolism, 61(11), S. 1528–1537.

Kraut, S. (2014). "Pathomechanismen der Schlafapnoe im Mausmodell Rolle der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase." Gießen: med. vet. Diss. Justus-Liebig-Universität Gießen, S. 34-67.

Krollner, B. (2020). "ICD-10-GM Version 2020 Systemisches Verzeichnis. Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision-German Modification-." Online: <http://www.icdcode.de/suche/icd/code/G47.-.html?sp=Sobstruktive%20schlafapnoe> (Stand: 14.12.2020).

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., Pancer

Literaturverzeichnis

- J.P.; American Academy of Sleep.** (2006). "Practice parameters for the treatment of snoring and Obstructive Sleep Apnea with oral appliances: an update for 2005." *Sleep*, 29(2), S. 240-243.
- Laskin, D.L., Weinberger, B., Laskin, J.D.** (2001). "Functional heterogeneity in liver and lung macrophages." *J Leukoc Biol*, 70(2), S. 163-170.
- Labarca G., Cruz R., Jorquera J.** (2018). „Continuous positive airway pressure in patients with obstructive sleep apnea and non-alcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis.“ *J Clin Sleep Med*, 14(1), S. 133-139.
- Lal, C., Strange, C., Bachmann, D.** (2012). „Neurocognitive impairment in obstructive sleep apnea.“ *Chest* 141(6), S. 1601-1610.
- Lau, T.Y., Xiao, J., Liang, E.C., Liao, L., Leung, T.M., Nanji, A.A., Fung, M.L., Tipoe, G.L.** (2013). "Hepatic response to chronic hypoxia in experimental rat model through HIF-1 alpha, activator protein-1 and NF-kappa B." *Histol Histopathol*, 28(4), S. 463-471.
- Laubach, V.E., Shesely, E.G., Smithies, O., Sherman, P.A.** (1995). "Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death." *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(23), S. 10688-10692.
- Lavie, L.** (2003). "Obstructive sleep apnoea syndrome - an oxidative stress disorder." *Sleep Med Rev*, 7(1), S. 35-51.
- Lee, J. J. und Sundar, K. M. (2021).** "Evaluation and Management of Adults with Obstructive Sleep Apnea Syndrome." *Lung*, 199(2), S. 87–101.
- Lee, E.J., Woodske, M.E., Zou, B., O'Donnell, C.P.** (2009). "Dynamic arterial blood gas analysis in conscious, unrestrained C57BL/6J mice during exposure to intermittent hypoxia." *J Appl Physiol* (1985), 107(1), S. 290-294.
- Lemasters, J.J., Ji, S., Thurman, R.G.** (1981). "Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver." *Science*, 213(4508), S. 661-663.
- Li, J., Thorne, L.N., Punjabi, N.M., Sun, C.K., Schwartz, A.R., Smith, P.L., Marino R.L., Rodriguez A., Hubbard W.C., O'Donnell C.P., Polotsky V.Y.** (2005). "Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice." *Circ Res*, 97(7), S. 698-706.
- Li, M., Li, X., Lu, Y.** (2018). „Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Metabolic Diseases.“ *Endocrinology* 159 (7), S. 2670-2675.
- Li, X. und He, J. (2021).** "The Association Between Serum/Plasma Leptin Levels and Obstructive Sleep Apnea Syndrome: A Meta-Analysis and Meta-Regression." *Front Endocrinol*, 12, Artikel Identifikationsnummer 696418.

Literaturverzeichnis

Lim, J., Lasserson, T. J., Fleetham, J., Wright, J. (2004). "Oral appliances for obstructive sleep apnoea." *Cochrane Database Syst Rev*(1), 2004(4), Artikel Identifikationsnummer CD004435.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C. (2017). „NF- κ B signaling in inflammation.“ *Sig. Transduct. Target Ther.* 2, Artikel Identifikationsnummer e17023.

Long, J., Wang, H., Lang, Z., Wang, T., Long, M., Wang, B. (2011). "Expression level of glutamine synthetase is increased in hepatocellular carcinoma and liver tissue with cirrhosis and chronic hepatitis B." *Hepatol Int*, 5(2), S. 698-706.

López, M.P., Gómez-Lechón, M.J., Castell, J.V. (1991). "Role of Glucose, Insulin, and Glucagon in Glycogen Mobilization in Human Hepatocytes." *Diabetes*, 40(2), S. 263-268.

Luedde, T. und Schwabe, R. F. (2011). "NF- κ B in the liver - linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8(2), S. 108-118.

Ma, B., Li, Y., Wang, X., Du, L., Wang, S., Ma, H., Zhou, D., Usman, T., Lu, L., & Qu, S. (2022). "Association Between Abdominal Adipose Tissue Distribution and Obstructive Sleep Apnea in Chinese Obese Patients." *Front Endocrinol*, 13, Artikel Identifikationsnummer 847324.

Malik, J.A., Masoodi, S.R., Shoib, S. (2017). "Obstructive sleep apnea in Type 2 diabetes and impact of continuous positive airway pressure therapy on glycemic control." *Indian J Endocrinol Metab*, 21(1), S. 106-112.

Mantena, S., King, A., Andringa, K., Eccleston, H., Bailey, S. (2008). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases." *Free Radic Biol Med.*, 44(7), S. 1259–1272.

Marin, J.M., Carrizo, S.J., Vicente, E., Agustí, 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), S. 1046-1053.

Martínez-Cerón, E., Barquiel, B., Bezos, A. M., Casitas, R., Galera, R., García-Benito, C., Hernanz, A., Alonso-Fernández, A., García-Río, F. (2016). „Effect of Continuous Positive Airway Pressure on Glycemic Control in Patients with Obstructive Sleep Apnea and Type 2 Diabetes. A Randomized Clinical Trial.“ *Am J Respir Crit Care Med*, 194(4), S. 476-85.

Martín-Sanz P., Mayoral R., Casado M., Boscá L. (2010). "COX-2 in liver, from regeneration to hepatocarcinogenesis: what we have learned from animal models?" *World J Gastroenterol*, 16(12), S. 1430-1435.

Maser, R.E., Lenhard, M.J., Rizzo, A.A., Vasile, A.A. (2008). "Continuous positive airway pressure therapy improves cardiovascular autonomic function for persons with sleep-disordered breathing." *Chest*, 133(1), S. 86-91.

Mason, M., Welsh, E. J., Smith, I. (2013). "Drug therapy for obstructive sleep apnoea in adults." *Cochrane Database Syst Rev*, (5), Artikel Identifikationsnummer, CD003002.

Mateo, J., García-Lecea, M., Cadenas, S., Hernández, C., Moncada, S. (2003). "Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways." *Biochem J*. 376 (Pt 2), S. 537–544.

Mathur, R. und Douglas, N. J. (1995). "Family studies in patients with the sleep apnea-hypopnea syndrome." *Ann Intern Med*, 122(3), S. 174-178.

Maurer, J.T. und Hörmann, K. (1998). "Diagnosis and therapy of sleep-related breathing disorders. 1: Terminology." *HNO*, 46(12), S. 958-968.

McGuire, M. und Bradford, A. (1999). "Chronic intermittent hypoxia increases haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat." *Respir Physiol* , 117 (1), S. 53-8.

McNicholas, W. T. (2007). "Cardiovascular outcomes of CPAP therapy in obstructive sleep apnea syndrome." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293(4), S. R1666-1670.

McNicholas, W.T. (2018). "Diagnostic criteria for obstructive sleep apnea: time for reappraisal." *J Thorac Dis*, 10(1), S. 531-533.

Mediano, O., Barceló, A., de la Peña, M., Gozal, D., Agustí, A., Barbé, F. (2007). "Day-time sleepiness and polysomnographic variables in sleep apnoea patients." *Eur Respir J*, 30(1), S. 110-113.

Mehra, P. und Wolford, L.M. (2000). "Surgical management of obstructive sleep apnea." *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 13(4), S. 338-342.

Miquilena-Colina, M. E., Lima-Cabello, E., Sánchez-Campos, S., García-Mediavilla, M. V., Fernández-Bermejo, M., Lozano-Rodríguez, T., Vargas-Castrillón J, Buqué X, Ochoa B, Aspichueta P, González-Gallego J, García-Monzón C. (2011). "Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C." *Gut*, 60(10), S. 1394-1402.

Mir, H.M., Stepanova, M., Afendy, H., Cable, R., Younossi, Z.M. (2013). „Association of Sleep Disorders with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Population-based Study.“ *J Clin Exp Hepatol*, 3(3), S. 181-185.

Mitra, A.K., Bhuiyan, A.R., Jones, E.A. (2021). "Association and Risk Factors for Obstructive Sleep Apnea and Cardiovascular Diseases: A systematic review. " *Diseases*, 9(4), S. 88.

Mooe, T., Franklin, K. A., Holmström, K., Rabben, T., Wiklund, U. (2001). „Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis.“ *Am J Crit Care Med*, 164(10), S. 1910-1913.

Mooney, R. A., Senn, J., Cameron, S., Inamdar, N., Boivin, L. M., Shang, Y., Furianetto, R.W. (2001). "Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance." *J Biol Chem*, 276(28), S. 25889-25893.

Morales-Ruiz, M., Jiménez, W., Pérez-Sala, D., Ros, J., Leivas, A., Lamas, S., Rivera, F., & Arroyo, V. (1996). "Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites." *Hepatology*, 24(6), S: 1481–1486.

Morgan, D., Rebelato, E., Abdulkader, F., Graciano, M.F., Oliveira-Emilio, H.R., Hirata, A., Rocha, M.S., Bordin, S., Curi, R., Carpinelli, A.R. (2009). "Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta cells." *Endocrinology*, 150(5), S. 2197-2201.

Muraki I., Wada H., Tangawa T. (2018). „Sleep apnea and type 2 diabetes.“ *J Diabetes Investig*, 9(5), S. 991-997.

Murata, T., Yamawaki, H., Hori, M., Sato, K., Ozaki, H., Karaki, H. (2001). "Hypoxia impairs endothelium-dependent relaxation in organ cultured pulmonary artery." *Eur J Pharmacol*, 421(1), S. 45-53.

Mustonen, T. und Alitalo, K. (1995). "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis." *J Cell Biol*, 129(4), S. 895-898.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." *FASEB J*, 13(1), S. 9-22.

NHMRC. (2000). "Effectiveness of nasal continuous positive airway pressure (nCPAP) in obstructive sleep apnoea in adults." The National Health and Medical Research Council Australia: 3. Online: https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/hpr21_0_ncpap_obstructive_sleep_apnoea_adults_131223.pdf (Stand: 08.05.2015).

Nieto, F.Y., Lind, B., Shahar, E., Samet, J., Redline, S., D'Agostino, Newman, A.B., Lebowitz, M.D., 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), S. 1829-1836.

Noda, A., Okada, T., Hayashi, H., Yasuma, F., Yokota, M. (1993). "24-hour ambulatory blood pressure variability in obstructive sleep apnea syndrome". *Chest*, 103(5), S. 1343-7.

Noda, A., Nakata, S., Koike, Y., Miyata, S., Kitaichi, K., Nishizawa, T., Nagata K, Yasuma F, Murohara T, Yokota M. (2007). "Continuous positive airway pressure improves daytime baroreflex sensitivity and nitric oxide production in patients with moderate to severe obstructive sleep apnea syndrome." *Hypertens Res*, 30(8), S. 669-676.

Nozaki, S., Tanaka, T., Yamashita, S., Sohmiya, K., Yoshizumi, T., Okamoto, F., Kitaura, Y., Kotake, C., Nishida, H., Nakata, A., Nakagawa, T., Matsumoto, K., Kameda-Takemura, K., Tadekoro, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y., Kawamura, K., Matsuzawa, Y. (1999). "CD36 mediates long-chain fatty acid transport in human myocardium: Complete myocardial accumulation defect of radiolabeled long-chain fatty acid analog in subjects with CD36 deficiency." *Mol Cell Biochem* 192, S. 129-135.

Nozaki Y., Fujita K., Wada K., Yoneda, M., Kessoku, T., Shinohara, Y., Kento, I., Ogawa, Y., Nakamuta, M., Saito, S., Masaki, N., Nagashima, Y., Terauchi, Y., Nakajima, A. (2015). „Deficiency of iNOS-derived NO accelerates lipid accumulation-independent liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis mouse model.“ *BMC Gastroenterol* 15, S. 42.

Ong K. uns Clerk A. (1998). "Comparison of the severity of sleep-disordered breathing in Asian and Caucasian patients seen at a sleep disorders center." *Respir Med.* 92(6), S. 843-848.

Ozturk, O., Colak, Y., Senates, E., Yilmaz, Y., Ulasoglu, C., Doganay, L., Ozkanli, S., Olutulu, Y.M., Coskunpinar, E., Tuncer, I. (2015). „Increased serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease.“ *World J Gastroenterol.* 21(26), S. 8096-8102.

Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene*, 18(49), S. 6853-6866.

Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." *Nature*, 333(6174), S. 664-666.

Pamidi S., Aronsohn R.S., Tasali E. (2010). „Obstructive sleep apnea: role in the risk and severity of diabetes.“ *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 24(5), S. 703-715.

Pamidi S. und Tasali E. (2012). „Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: is there a link?“ *Front Neurol*, 3, S. 126.

Pankow, W., Nabe, B., Lies, A., Becker, H., Köhler, U., Kohl, F.V, Lohmann, F.W. (1997). "Influence of sleep apnea on 24-hour blood pressure." *Chest* , 112(5), S. 1253-1258.

Papapetropoulos, A., Rudic, R.D., Sessa, W.C. (1999). "Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system." *Cardiovasc Res*, 43(3), S. 509-520.

Paschetta, E., Belci, P., Alisi, A., Liccardo, D., Cutrera, R., Musso, G., Nobili V. (2015). "OSAS-Related Inflammatory Mechanisms of Liver Injury in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Mediators Inflamm*, 2015, Artikel Identifikationsnummer: 815721.

Patil, S.P., Schneider, H., Schwartz, A.R., Smith, P.L. (2007). „Adult Obstructive Sleep Apnea: Pathophysiology and Diagnosis.“ *Chest*, 132(1), S. 325.

Patil, S. P., Ayappa, I.A., Caples, S.M., Kimhoff, R. J., Patel, S. R., Harrod, C. G. (2019). „Treatment of Adult Abstructive Sleep Apnea With Positive Airway Pressure: An American Academy of Sleep Medicine Systematic Review, Meta-Analysis, and GRADE

Literaturverzeichnis

Assessment." *J Clin Sleep Med*, 15(2), S. 301-334.

Patt, B.T., Jarjoura, D., Haddad, D.N., Sen, C.K., Roy, S., Flavahan, N.A., Khayat R.N. (2010). "Endothelial dysfunction in the microcirculation of patients with obstructive sleep apnea." *Am J Respir Crit Care Med*, 182(12), S. 1540-1545.

Pepin J.L., Leger P., Veale D., Langevin B., Robert D., Lèvy P. (1995). "Side effects of nasal continuous positive airway pressure in sleep apnea syndrome. Study of 193 patients in two French sleep centres." *Chest*, 107, S. 375-81.

Peppard, P.,E., Young, T., Palta, M., Skatrud, J. (2000). "Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension." *N Engl J Med*, 342 (19), S. 1378-1384.

Philip, P., Gross, C. E., Taillard, J., Bioulac, B., Guilleminault, C. (2005). "An animal model of a spontaneously reversible obstructive sleep apnea syndrome in the monkey." *Neurobiol Dis*, 20(2), S. 428-431.

Phillips, S.A., Olson, E.B., Morgan, B.J., Lombard, J.H. (2004). "Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(1), S. H388-H393.

Polotsky, V. Y., Li, J., Punjabi, N.M., Rubin, A.E., Smith, P.L., Schwartz, A.R., O'Donnell CP. (2003). "Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice." *J Physiol*, 552(Pt 1), S. 253-264.

Polotsky, V.Y., Rubin, A.E., Balbir, A., Dean, T., Smith, P.L., Schwartz, A.R., O'Donnell, C.P. (2006). "Intermittent hypoxia causes REM sleep deficits and decreases EEG delta power in NREM sleep in the C57BL/6J mouse." *Sleep Med*, 7(1), S. 7-16.

Poza, J., Martinez, A.E., Marti Masso, J.F. (2000). "Sleep apnea syndrome and cerebral infarction." *Neurologia*, 15(1), S. 3-7.

Prabhat, K.C., Goyal, L., Bey, A., Maheshwari, S. (2012). "Recent advances in the management of obstructive sleep apnea: The dental perspective." *J Nat Sci Biol Med*, 3(2), S. 113-117.

Prinsell, J.R. (1999). "Maxillomandibular advancement surgery in a site-specific treatment approach for obstructive sleep apnea in 50 consecutive patients." *Chest*, 116(6), S. 1519-1529.

Punjabi N.M., Sorkin J.D., Katzel L.I., Goldberg, A.P., Schwartz A.R., Smith P.L. (2002). „Sleep-disordered Breathing and Insulin Resistance in Middle-aged and Overweight Men.“ *Am J Crit Care Med*, 165(5), S. 677-682.

Punjabi, N.M. (2008). "The epidemiology of adult obstructive sleep apnea." *Proc Am Thorac Soc*, 5(2), S. 136-143.

Literaturverzeichnis

Punkt, K., Fritzsche, M., Stockmar, C., Hepp, P., Josten, C., Wellner, M., Schering, S., Buchwalow, I. B. (2006). "Nitric oxide synthase in human skeletal muscles related to defined fibre types." *Histochem Cell Biol.*, 125(5), S. 567–573.

Qiao, Y., Li, X., Zhang, X., Xiao F., Zhu Y., Fang Z., Sun J. (2019). „Hepatocellular iNOS protects liver from NASH through Nrf2-dependent activation of HO-1.“ *Biophys Res Commun*, 514(2), S. 372-378.

Rai, R.M., Lee, F.Y., Rosen A., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Koteish, A., Liew, F.Y., Zaragoza, C., Lowenstein, C., Diehl, A.M. (1998). „Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthasedeficient mice.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(23), S. 13829-13834.

Reinke, C., Bevans-Fonti, S., Drager, L.F., Shin, M.K., Polotsky, V.Y. (2011). "Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes." *J Appl Physiol* (1985), 111(3), S. 881-890.

Reutrakul, S. und Mokhlesi, B. (2017). "Obstructive Sleep Apnea and Diabetes: A State of the Art Review." *Chest*, 152(5), S. 1070–1086.

Rey E., Meléndez-Rodríguez F., Marañón P., Gil-Valle M., Carrasco A.G., Torres-Capelli M., Chávez S., Del Pozo-Maroto E., Rodríguez de Cía J., Aragonés J., García-Monzón C., González-Rodríguez Á. (2020). „Hypoxia-inducible factor 2alpha drives hepatosteatosis through the fatty acid translocase.“ *Liver Int*, 40(10), S. 2553-2567.

Riemann, J.F., Fischbach, W., Galle P.R., Mössner, J. (2008). "Gastroenterologie: das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Band 2: Leber, Galle, Pankreas." 1. Auflage, Stuttgart, Thieme, S. 1189.

Robinson, S.M. und Mann, D.A. (2010). "Role of nuclear factor kappaB in liver health and disease." *Clin Sci (Lond)*, 118(12), S. 691-705.

Ros, S., Garcia-Rocha, M., Calbo, J., Guinovart, J.J. (2011). „Restoration of hepatic deposition reduces hyperglycaemia, hyperphygia and gluconeogenic enzymes in a streptozotocin-induced model of diabetes in rats.“ *Diabetologia*, 54(10), S. 2639-2648.

Ross, M.P. und Wojciech, P. (2006). "Histology, A Text and Atlas With correlated cell and molecular biology." 5. Auflage, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, S. 582-583.

Runge, M.P. und Patterson, C. (2005). "Principles of Molecular Cardiology." New Jersey, Humana Press, S. 388.

Rus, A., Peinado, A., Castro, L., Del Moral, L. (2010). "Lung eNOS and iNOS are Reoxygenation Time-Dependent Upregulated After Acute Hypoxia." *The Anatomical Record*, 293(6), S. 1089-1098.

Literaturverzeichnis

Rus, A., Del Moral, M.L. Peinado, F., Molina, M.A. (2011). „Upregulation of cardiac No/NOS system during short-term hypoxia and the subsequent reoxygenation period.“ *Eur J Histochem*, 55(2), S. e17

Ryan, S., Taylor, C., McNicholas, W. (2006). „Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome.“ *Am J Respir Crit Care Med*, 174(7), S. 824-830.

Salhanick, S.D., Orlow, D., Holt, D.E., Pavlides, S., Reenstra, W., Buras, J.A. (2006). „Endothelially derived nitric oxide affects the severity of early acetaminophen-induced hepatic injury in mice.“ *Acad Emerg Med*, 13(5), S. 479-85.

Salman, L.A., Shulman, R., Cohen, J.B. (2020). "Obstructive Sleep Apnea, Hypertension, and Cardiovascular Risk: Epidemiology, Pathophysiology, and Management." *Current cardiology reports*, 22(2), S. 6.

Sankri-Tarbichi, A. G. (2012). "Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: Etiology and diagnosis." *Avicenna J Med*, 2(1), S. 3-8.

Sanyal, A., Boyer, T., Terrault, N, Lindor, K. (2012). "Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease." 6. Auflage, Philadelphia: Elsevier Saunders, S. 131.

Savransky, V., Bevans, S., Nanayakkara, A., Li, J., Smith, P. L., Torbenson, M. S., Polotsky VY. (2007a). "Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293(4), S. G871-G877.

Savransky, V., Nanayakkara, A., Vivero, A., Li, J., Bevans, S., Smith, P. L., Polotsky VY. (2007b). "Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury." *Hepatology*, 45(4), S. 1007-1013.

Schäfer, H., Hasper, E., Ewig, S., Lüderitz, B. (1996). "Schlafbezogene Atmungsstörungen: Etabliertes und Neues in Diagnostik und Therapie." *Dtsch Ärztebl*, 93(38), S. 43.

Schneider, H., Schaub, C. D., Andreoni, K. A., Schwartz, A. R., Smith, P. L., Robotham, J.L., O'Donnell C.P. (1997). "Systemic and pulmonary hemodynamic responses to normal and obstructed breathing during sleep." *J Appl Physiol* (1985), 83(5), S. 1671-1680.

Schneider, H., Schaub, C. D., Chen, C. A., Andreoni, K. A., Schwartz, A. R., Smith, P. L., Robotham J.L., O'Donnell C.P. (2000). "Neural and local effects of hypoxia on cardiovascular responses to obstructive apnea." *J Appl Physiol* (1985), 88(3), S. 1093-1102.

Scholzen, T. und Gerdes, J. (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol*, 182(3), S. 311-322.

Schroeder, A., Müller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T. (2006). „The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.“ *BMC Mol Biol*, 7, S. 3.

Schulz, R., Mahmoudi, S., Hattar, K., Sibelius, U., Olschewski, H., Mayer, K., Seeger, W., Grimminger, F. (2000a). „Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy.“ 162(2 Pt 1), S. 566-570.

Schulz, R., Schmidt, D., Blum, A., Lopes-Ribeiro, X., Lücke, C., Mayer, K., Olschewski H., Seeger W., Grimminger F. (2000b). "Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy." *Thorax*, 55(12), S. 1046-1051.

Senn, J.J., Klover, P.J., Nowak, I.A., Mooney, R.A. (2002). "Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes." *Diabetes*, 51(12), S. 3391-3399.

Shafazand S. und Patel S.R. (2014). "Effect of CPAP on Blood Pressure in Patients with Obstructive Sleep Apnea and resistant Hypertension." *J Clin Sleep Med*, 10(3), S. 341-343.

Sheen, D., und Abdulateef, S. (2021). "Uvulopalatopharyngoplasty". *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 33(2), S. 295–303.

Shirahama, R., Tanigawa, T., Ida, Y., Fukuhisa, K., Tanaka, R., Tomooka, K., Lan, F. Y., Ikeda, A., Wada, H., Kales, S. N. (2021). "Long-term effect of continuous positive airway pressure therapy on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea." *Sci Rep* 11(1), S. 19101.

Shirai, M., Pearson, J.T., Shimouchi, A., Nagaya, N., Tsuchimochi, H., Ninomiya, I., Mori, H. (2003). "Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries." *Br J Pharmacol*, 139(5), S: 899-910.

Sivitz W.I. und Yorek M.A. (2010). "Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal*, 12(4), S. 537-577.

Sleyster, E.C. und Knook, D.L. (1982). "Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells." *Lab Invest*, 47(5), S. 484-490.

Smith, I., Lasserson, T. J., Wright, J. (2006). "Drug therapy for obstructive sleep apnoea in adults." *Cochrane Database Syst Rev* (5), Artikel Identifikationsnummer: CD003002.

Somers V.K., White D.P., Amin R., Abraham W.T., Costa F., Culebras A., Daniels S., Floras J.S., Hunt C.E., Olson L.J., Pickering T.G., Russell R., Woo M., Young T., American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology; American Heart Association Stroke Council; American Heart Association Council on Cardiovascular Nursing; American College of Cardiology Foundation. (2008). "Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/american College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On

Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health)." *Circulation*, 118(10), S. 1080-1111.

Son, N.-H., Basu, D., Samovski, D., Peitka, T.A., Peche, V.S., Willecke, F., Fang, X., Yu, S.-Q., Scerbo, D., Chang, H.R., Sun, F., Bagdasarov, S., Drosatos, K., Yeh, S.T., Mullick, A.E., Shoghi, K.I., Gumaste, N., Kim, K., Huggins, L.-A., Lhaxhang, T., Abdumrad, N.A., Goldberg, I.J. (2018) „Endothelial cell CD36 optimizes tissue fatty acid uptake.“ *The Journal of clinical investigation*, 128(10), S. 4329-4342.

Steward, D.L., Huntley, T.C., Woodson, B.T., Surdulescu, V. (2008). "Palate implants for obstructive sleep apnea: multi-institution, randomized, placebo-controlled study." *Otolaryngol Head Neck Surg*, 139(4), S. 506-510.

Steiropoulos, P., Kostianidis I., Nena E., Tsara, V., Gounari, E., Hatzizisi O., Kyriazis, G., Christaki, P., Froudarakis, M., 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), S. 537-543.

Strohl, K.P. und Redline, S. (1996). "Recognition of obstructive sleep apnea." *Am J Respir Crit Care Med*, 154(2 Pt 1), S. 279-289.

Stuck, B.A., Ravesloot, M.J., Eschenhagen T., Sommer J.U. (2018) "Tonsillektomie mit Uvulopalatopharyngoplastik zur Behandlung der obstruktiven Schlafapnoe des Erwachsenen " *Somnologie*, 22, S. 85-97.

Sullivan, M.A. und Forbes, J.M. (2019). „Glucose and glykogen in the diabetic kidney. Heroes or villains?“ *EBioMedicine*, 47, S. 590-597.

Sun, X. und Kaufman, P.D. (2018). „Ki-67: more than a proliferation marker.“ *Chromosoma*, 127(2), S. 175-186.

Sundaram, S., Bridgman, S. A., Lim, J., Lasserson, T. J. (2005). "Surgery for obstructive sleep apnoea." *Cochrane Database Syst Rev*, (4), Artikel Identifikationsnummer: CD001004.

Tagaito, Y., Polotsky, V.Y., Campen, M.J., Wilson, J.A., Balbir, A., Smith, P.L., Schwartz A.R., O'Donnell, C.P. (2001). "A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse." *J Appl Physiol* (1985), 91(6), S. 2758-2766.

Takagi, H., King, G. L., Ferrara, N., Aiello, L. P. (1996). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk gene expression through adenosine A2 receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(7), S. 1311–1321.

Takahashi K., Takeya M., Sakashita N. (2002). "Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals." *Med Electron Microsc*, 35(4), S. 179-203.

Terpstra, V., van Amersfoort, E.S., van Velzen, A.G., Kuiper, J., van Berkel, T.J. (2000). "Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(8), S. 1860-1872.

Tietjens, J.R., Claman, D., Kezirian, E.J., De Marco, T., Mirzayan, A., Sadroonri, B., Goldberg, A.N., Long, C., Gerstenfeld, E.P., 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), Artikel Identifikationsnummer: e010440.

Tirosh, O. (2018). „Hypoxic Signaling and Cholesterol Lipotoxicity in Fatty Liver Disease Progression.“ *Oxid Med Cell Longev*, 2018, Artikel Identifikationsnummer 2548154.

Tong, W., Xiong, F., Li, Y., Zhang, L. (2013). "Hypoxia inhibits cardiomyocyte proliferation in fetal rat hearts via upregulating TIMP-4." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 304(8), S. R613-620.

Toporsian, M., Govindaraju, K., Nagi, M., Eidelman, D., Thibault, G., Ward, M. E. (2000). "Downregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after prolonged hypoxia in vivo." *Circ Res*, 86(6), S. 671-675.

Toraldo D.M., Passali D., Sanna A., De Nuccio F., Conte L., De Benedetto M. (2017). "Cost-effectiveness strategies in OSAS management: a short review." 37(6), S. 447-453.

Türkay, C., Ozol, D., Kasapoğlu, B., Kirbas, I., Yıldırım, Z., Yiğitoğlu, R. (2012). "Influence of obstructive sleep apnea on fatty liver disease: role of chronic intermittent hypoxia." *Respir Care*, 57(2), S. 244-249.

Ueki, K., Kondo, T., Kahn, C.R. (2004). "Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms." *Mol Cell Biol*, 24(12), S. 5434-5446.

Vats, P., Mukherjee, A.K., Kumria, M.M.L., Singh, S.N., Patil, S.K.B., Rangnathan, S., Sridharan, K. (1999). „Changes in the activity levels of glutamine synthetase, glutaminase and glycogen synthetase in rats subjected to hypoxic stress.“ *Int J Biometeorol*, 42, S. 205-209.

Verdecchia, P., Schillaci, G., Guerrieri, M., Gatteschi, C., Benemio, G., Boldrini, F., Porcellati, C. (1990). "Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension." *Circulation*, 81(2), S. 528-36.

von Wilamowitz-Moellendorff, A., Hunter, R. W., García-Rocha, M., Kang, L., López-Soldado, I., Lantier, L., Patel, K., Pegg, M. W., Martínez-Pons, C., Voss, M., Calbó, J., Cohen, P. T., Wasserman, D. H., Guinovart, J. J., Sakamoto, K. (2013). „Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis.“ *Diabetes* 62(12), S. 4070-4082.

- Wang, Y. Q., Luk, J. M., Ikeda, K., Man, K., Chu, A. C., Kaneda, K., Fan, ST.** (2004). "Regulatory role of vHL/HIF-1alpha in hypoxia-induced VEGF production in hepatic stellate cells." *Biochem Biophys Res Commun*, 317(2), S. 358-362.
- Wang, Y. und Watford, M.** (2006). „Glutamine, insulin and glucocorticoids regulate glutamine synthetase expression in C2C12 myotubes, Hep G2 hepatoma cells and 3T3 L1 adipocytes.“ *Biochimica et biophysica acta*, 1770(4), S. 594-600.
- Warford, M.** (2000). „Glutamine and Glutamate Metabolism across Liver Sinusoid.“ *The Journal of Nutrition*, 130(4), S. 983S-987S.
- Watson, N. F., Harden, K. P., Buchwald, D., Vitiello, M. V., Pack, A. I., Strachan, E., Goldberg, J.** (2014). "Sleep duration and depressive symptoms: a gene-environment interaction." *Sleep*, 37(2), S. 351-358.
- Waters T. (2019).** "Alternative interventions for obstructive sleep apnea." *Cleve Clin J Med*, 86(9 Suppl 1), S. 34–41.
- Wenzel, S., Smith, E., Leiacker, R., Fischer, Y.** (2007). "Efficacy and longterm compliance of the vest preventing the supine position in patients with obstructive sleep apnea." *Laryngorhinootologie*, 86(8), S. 579-583.
- West, S. D., Nicoll, D. J., Stradling, J. R.** (2006). "Prevalence of obstructive sleep apnoea in men with type 2 diabetes." *Thorax*, 61(11), S. 945-950.
- Wetter, D. W., Young, T. B., Bidwell, T. R., Badr, M. S., Palta, M.** (1994). "Smoking as a risk factor for sleep-disordered breathing." *Arch Intern Med*, 154(19), S. 2219-2224.
- White, G.E., Cotterill, A., Addley, M.R., Soilleux, E.J., Greaves, D.R.** (2011). "Suppressor of cytokine signalling protein SOCS3 expression is increased at sites of acute and chronic inflammation." *J Mol Histol*, 42(2), S. 137-151.
- Williams, C.S., Mann, M., DuBois, R.N.** (1999). "The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development." *Oncogene*, 18(55), S. 7908-7916.
- Wilson, C., Tran, J., Erion, D., Vera, N., Febbraio, M., Weiss, E.** (2016). "Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice." *Endocrinology*, 157(2), S. 570-585.
- Won, C. H., Li, K. K., Guilleminault, C.** (2008). "Surgical treatment of obstructive sleep apnea: upper airway and maxillomandibular surgery." *Proc Am Thorac Soc*, 5(2), S. 193-199.
- Woods, D.R., Stacey, M., Hill, N., de Alwis, N.** (2011). „Endocrine aspects of high altitude acclimatization and acute mountain sickness.“ *J R Army Med Corps*, 157(1), S. 33-7.
- Woodson, B.T.** (1998). "Surgical approaches to obstructive sleep apnea." *Curr Opin Pulm Med*, 4(6), S. 344-350.

Xu, S., Ogura, S., Chen, J., Little, P. J., Moss, J., Liu, P. (2013). "LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers." *Cell Mol Life Sci*, 70(16), S. 2859-2872.

Yacoub, M., Youssef, I., Salifu M.O., Mcfarlane, S.I. (2017). „Cardiovascular Disease Risk in Pbstructive Sleep apnea: An Update.“ *J Sleep Disord Ther*, 7(1), S. 283.

Yaggi, H.K., Concato J., Kernan, W.N., Lichtman, J.H., Brass L.M., Mohsenin V. (2005). „Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death.“ *N Engl J Med*, 353(19), S. 2034-2041.

Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Hicklin, D.J., Wu Y., Yanase K., Namisaki T., Yamazaki M., Tsujinoue H., Imazu H., Masaki T., Fukui H. (2003). "Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis." *Gut*, 52(9), S. 1347-1354.

Yu X.H., Fu Y.C., Zhang D.W., Yin K., Tang C.K. (2013). "Foam cells in atherosclerosis." *Clin Chim Acta*, 424, S. 245-252.

Zamarron, C., Valdes Cuadrado, L., Alvarez-Sala, R. (2013). „Pathophysiologic mechanisms of cardiovascular disease in obstructive sleep apnea syndrome.“ *Pulm Med*, 2013, Artikel Identifikationsnummer 521087.

Zhan, G., Fenik, P., Pratico, D., Veasey, S.C. (2005). "Inducible nitric oxide synthase in long-term intermittent hypoxia: hypersomnolence and brain injury." *Am J Respir Crit Care Med*, 171(12), S. 1414-1420.

Zhang, J.G., Farley, A., Nicholson, S.E., Willson, T.A., Zugaro, L.M., Simpson, R.J., Moritz R.L., Cary D., Richardson R., Hausmann G., Kile B.J., Kent S.B., Alexander W.S., Metcalf D., Hilton D.J., Nicola N.A., Baca M. (1999). "The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation." *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(5), S. 2071-2076.

Zhang F., Tang Z., Hou X., Lennartsson J., Li Y., Koch A.W., Scotney P., Lee C., Arjunan P., Dong L., Kumar A., Rissanen T.T., Wang B., Nagai N., Fons P., Fariss R., Zhang Y., Wawrousek E., Tansey G., Raber J., Fong G.H., Ding H., Greenberg D.A., Becker K.G., Herbert J.M., Nash A., Yla-Herttuala S., Cao Y., Watts R.J., Li X. (2009) "VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(15), S. 6152-6157.

Zhang, Q., Liu, J., Liu, J., Huang, W., Tian, L., Quan, J., Wang, Y., Niu, R. (2014). "oxLDL induces injury and defenestration of human liver sinusoidal endothelial cells via LOX1." *J Mol Endocrinol*, 53(2), S. 281-293.

Zhang, W. und Si, L.Y. (2012). "Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) and hypertension: pathogenic mechanisms and possible therapeutic approaches." *Ups J Med Sci*. 117(4), S. 370-382

8 Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Effekt chronisch-intermittierender Hypoxie auf inflammatorische Parameter der Leber im Wildtyp und iNOS-KO Mausmodell“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf Kinscherf und Unterstützung von Prof. Dr. Wulf Hildebrand ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.“

Ort, Datum, Unterschrift Doktorandin

„Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.“

Ort, Datum, Unterschrift Referent

9 Tabellarischer Lebenslauf

Inhalt wurde entfernt.

Tabellarischer Lebenslauf

Inhalt wurde entfernt.

10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren in Marburg und Gießen.

Vorklinischer Studienabschnitt:

Aumüller, Braun, Brehm, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Feuser, Kinscherf, Koolman, Lill, Mueller, Oliver, Preissig-Müller, Rausch, Röhm, Schwarz, Steininger, Thieme, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Apitzsch, Bartsch, Baum, Becker, Bien, Czubayko, Dettmeyer, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabilic, Fuchs-Winkelmann, Geeks, Görg, Gress, Hertl, Heverhagen, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kann, Kill, Kircher, Klose, Köhler, König, Kolb-Niemann, Kuhlmann, Lohoff, Luster, Mahnken, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Ruchholtz, Schneider, Seifart, Sekundo, Schäfer, Schieffer, Schmidt, Schulze, Sevinc, Sommer, Steinkamp, Stief, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Waldmann, Werner, Wulf, Zovko,

11 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Wulf Hildebrandt, der stets Zeit für Rückfragen und anregende Unterstützung fand.

Ich bedanke mich bei dem Institutsleiter, Prof. Dr. Eberhard Weihe, sowie seinem Stellvertreter und Arbeitsgruppenleiter, Prof. Dr. Ralf Kinscherf, für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit im Institut der Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg.

Dann möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Anatomie und Zellbiologie, bedanken, die auf unterschiedliche Art und Weise bei dem Gelingen meiner Dissertation beteiligt waren. Besonders danke ich Michael Dreher, Andrea Cordes, Claudia Keppler und Elke Völck-Badouin für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei methodischen Fragen. Ich bedanke mich bei Hans Schwarzbach für seine Unterstützung bei technischen Schwierigkeiten und seiner Hilfe bei der Auswertung der Bilder.

Dr. Gabriel Bonaterra, der stets Ansprechpartner war und mit mir viele durchgeführte Experimente besprochen und bei jeglichen Problemen zusammen mit mir nach Lösungen gesucht hat.

Der größte Dank geht jedoch an meine Familie, besonders an meinen Mann, Alan Peters, der mich zu jeder Zeit bedingungslos unterstützt, mich motiviert und mir vorbehaltlos vertraut. Ihm ist die Arbeit gewidmet.