

**Vermehrte Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen
aus neutrophilen Granulozyten bei obstruktiver
Schlaf-Apnoe : Einfluß einer CPAP-Therapie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Siamak Mahmoudi

aus Shiraz (Iran)

Gießen 2009

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II
des Universitätsklinikums Gießen / Marburg, Standort Gießen

(Direktor : Prof. Dr. W. Seeger)

Gutachter :

Prof. Dr. Richard Schulz

PD Dr. Matthias Heckmann

Tag der Disputation : 09.12.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite
1.1. Obstruktive Schlaf-Apnoe	1-4
1.2. Sauerstoffradikale	4-5
1.3. Fragestellung	5-6
2. Patienten und Methode	
2.1. Patienten	7
2.2. Polysomnographie	7-12
2.3. CPAP-Therapie	12
2.4. Messung des oxidativen Burst von neutrophilen Granulozyten	13-15
2.5. Statistik	15
3. Ergebnisse	
3.1. Patientencharakteristika	16-17
3.2. Freisetzung von Sauerstoffradikalen vor CPAP-Therapie	17-18
3.3. Freisetzung von Sauerstoffradikalen nach CPAP-Therapie	19-20

	Seite
4. Diskussion	
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	21
4.2. Einflussfaktoren der Messergebnisse	21-22
4.3. Mögliche Quellen des oxidativen Stress bei OSA	23
4.4. Oxidativer Stress in der Pathogenese der OSA-assoziierten Herz-Kreislaufkrankungen	24-25
4.5. Klinische Bedeutung der Ergebnisse	25
5. Zusammenfassung	26
6. Englische Zusammenfassung	27
7. Literatur	28-34
8. Ehrenwörtliche Erklärung	35
9. Danksagung	36
10. Originalpublikation	37

1. Einleitung

1.1. Obstruktive Schlaf-Apnoe

Bei der obstruktiven Schlaf-Apnoe (OSA) handelt es sich um eine schlafbezogene Atmungsstörung mit häufiger als fünfmal pro Stunde auftretenden Atempausen von mehr als zehn Sekunden Dauer bei gleichzeitig fortdauernder Aktivierung der Inspirationsmuskulatur (Duchna, 2006). Bei der Apnoe ist der Atemfluß definitionsgemäß komplett unterbrochen, bei der Hypopnoe ist er um mindestens 50% im Vergleich zur Normalamplitude der Atmung reduziert. Zur Beurteilung der Schwere des Krankheitsbildes wird der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) angegeben, d.h. die Anzahl der Apnoen und Hypopnoen pro Stunde Schlaf. Ein AHI $< 5/h$ gilt als nicht pathologisch, während ein AHI von 5-15/h als leichtgradige OSA, ein AHI von 15-30/h als mittelgradige OSA und ein AHI $> 30/h$ als schwere OSA bezeichnet werden können.

Ursache der OSA ist der repetitive Kollaps der oberen Atemwege, meistens auf dem Niveau des Oropharynx. Der wesentliche prädisponierende Faktor ist die Adipositas, die über eine Einlagerung überschüssigen Fettgewebes eine Einengung des Pharynx bewirkt. Andere anatomische Faktoren können ebenfalls eine Rolle spielen (Retrognathie, Makroglossie z.B. bei Akromegalie und Hypothyreose, vergrößerte Tonsillen bei Kindern und Jugendlichen). Weitere ätiologische Faktoren sind männliches Geschlecht, zunehmendes Alter, bei Frauen die Postmenopause sowie Alkoholgenuß und Gebrauch von Sedativa (White, 2005).

Apnoen und Hypopnoen führen zu einer verminderten alveolären Ventilation mit konsekutivem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes und Anstieg des Kohlendioxidpartialdruckes. Dies bewirkt eine Sympathikusaktivierung mit Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck im großen und kleinen Kreislauf. Weiterhin finden sich durch die vermehrten Atemanstrengungen Negativierungen des intrathorakalen Druckes.

In der Summe lösen die genannten Veränderungen dann eine zentralnervöse Aktivierung (sogen. Arousal) aus, die meistens von den Patienten nicht bewußt wahrgenommen wird. Das Arousal bewirkt eine Tonuszunahme der oropharyngealen Muskulatur und dadurch eine Beseitigung der Obstruktion. Bei Wiedereröffnung des zuvor kollabierten Pharynx tritt Schnarchen auf und es folgt eine Hyperventilation von etwa drei bis sechs Atemzügen. Durch die Weckreaktionen resultiert eine Schlaffragmentierung mit Suppression der Tiefschlafphasen NREM 3 und 4 sowie Verringerung des REM-Schlafes.

Die Häufigkeit der OSA in der erwachsenen, im erwerbsfähigen Alter stehenden Bevölkerung wird mit 2% der Frauen und 4% der Männer angegeben. Männer sind also insgesamt häufiger als Frauen von der Erkrankung betroffen, nach der Menopause gleichen sich die Prävalenzen bei beiden Geschlechtern aber weitgehend an. Der Erkrankungsgipfel liegt in der 5. bis 6. Lebensdekade (Young, 2002).

Die Leitsymptome des OSAS sind lautes und unregelmäßiges Schnarchen, nächtliche Atemstillstände und gesteigerte Tagesmüdigkeit. Weitere mögliche Symptome sind Nykturie, morgendliche Kopfschmerzen, neurokognitive Dysfunktion und depressive Verstimmung. Die exzessive Tagesmüdigkeit kann eine erhöhte Unfallgefahr bewirken. Schließlich leiden OSA-Patienten überdurchschnittlich häufig an kardio- und zerebrovaskulären Folgeerkrankungen, die wesentlich für die erhöhte Mortalität von unbehandelten Patienten mit höhergradiger OSA ($AHI > 30/h$) verantwortlich sind (Schulz, 2006). Da in der vorliegenden Arbeit hierauf der Fokus liegt, sollen diese Komplikationen der OSA im folgenden detaillierter besprochen werden.

Im Schlaf kommt es wie bereits erwähnt bei der OSA zur Entwicklung von Apnoe-synchronen Blutdruckspitzen, sodaß im 24-h-Langzeit-EKG ein Ausbleiben der physiologischen Blutdruckabsenkung beobachtet werden kann (sogen. non-dipping). Am Tage persistieren bei 40 bis 60% der betroffenen Patienten erhöhte Blutdruck-Werte.

Epidemiologische Studien ergaben, daß die Odds Ratios für die Entwicklung einer systemarteriellen Hypertonie mit zunehmendem AHI ansteigen (Peppard, 2000). Aufgrund der vorliegenden Daten ist die OSA mittlerweile als eine der häufigsten Ursachen der sekundären arteriellen Hypertonie in Leitlinien zur Hypertonie anerkannt (Chobanian, 2003).

Auch im kleinen Kreislauf kommt es bei der OSA im Schlaf zu repetitiven Druckerhöhungen. Bei circa einem Viertel der OSA-Patienten ist auch am Tage eine pulmonalarterielle Hypertonie nachzuweisen. Hervorgehoben werden muß, daß die pulmonale Hypertonie bei der OSA in der Regel aber nur gering ausgeprägt ist und folglich nur wenige dieser Patienten an einem klinisch manifesten Cor pulmonale leiden (Schulz, 2005).

OSA-Patienten weisen eine akzelerierte Atherosklerose auf, wie Messungen der Intima-Media-Dicke an der A. carotis communis gezeigt haben. Dieser sonographisch bestimmbare Surrogat-Marker der Atherosklerose ist bei OSA-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten ohne OSA erhöht (Schulz, 2005). Die Folgekrankheiten der Atherosklerose - koronare Herzerkrankung (KHK) inklusive Myokardinfarkt und zerebrovaskuläre Erkrankungen einschließlich Hirninfarkt - sind bei der OSA folglich häufig anzutreffen. Die Prävalenzrate der KHK bei der OSA beträgt 20-30%, einen zurück-liegenden Schlaganfall findet man bei 5-10% der OSA-Patienten. Epidemiologische Studien sprechen - wie bei der arteriellen Hypertonie - für einen kausalen Zusammenhang zwischen OSA und KHK beziehungsweise Schlaganfall (Shahar, 2001; Arzt 2005). Myokardiale Ischämien können bei der OSA nicht nur durch die Begünstigung atherosklerotischer Gefäßveränderungen entstehen, sondern auch durch die nächtliche Hypoxie infolge Verminderung des myokardialen Sauerstoffangebots. Auch die Entstehung von Schlaganfällen im Rahmen der OSA muß multifaktoriell verstanden werden. So können Schlaganfälle auch durch die OSA-assoziierte arterielle Hypertonie oder Herzrhythmusstörungen wie Vorhofflimmern ausgelöst werden.

OSA-Patienten leiden in 5-10% der Fälle an einer Linksherzinsuffizienz. Mögliche Bindeglieder zwischen OSA und Linksherzinsuffizienz sind die arterielle Hypertonie und die KHK. Zu berücksichtigen sind in diesem Zusammenhang auch die negativ inotropen Effekte der zum Teil erheblichen intrathorakalen Druckschwankungen im Rahmen der nächtlichen Apnoen.

Die Diagnose der OSA wird im Schlaflabor mit einer polysomnographischen Untersuchung gesichert. Goldstandard der Therapie ist die sogen. CPAP-Therapie (continuous positive airway pressure), eine nicht-invasive Maskenbeatmung mit konstantem positiven Druck. Einzelheiten zur Polysomnographie und zur CPAP-Therapie können dem Methodik-Teil dieser Arbeit entnommen werden.

1.2. Sauerstoffradikale

Freie Radikale sind Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen und infolgedessen eine ausgeprägte chemische Reaktivität besitzen (Dröge, 2002). In Abhängigkeit ihres zentralen Atoms erfahren freie Radikale (RONS) per definitionem eine Zuordnung in reaktive Sauerstoff - (reactive oxygen species, ROS) oder Stickstoffverbindungen (reactive nitrogen species, RNS). O₂-Radikale können über verschiedene Enzyme generiert werden. Hierzu zählen im wesentlichen Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, die Xanthinoxidase und NADPH-Oxidasen. NADPH-Oxidasen sind die wichtigste Quelle der ROS-Bildung im vaskulären System. Sie finden sich in zirkulierenden Zellen (neutrophile Granulozyten) und in residenten Zellen der Gefäßwand (Endothelzellen, glatte Muskelzellen). NADPH-Oxidasen katalysieren die folgende chemische Reaktion, die die Bildung des Superoxidanionradikals bewirkt :



Im Organismus herrscht unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Radikalenbildung und -abbau. Findet jedoch eine vermehrte Freisetzung von Sauerstoffradikalen statt und / oder weisen die körpereigenen Schutzsysteme wie antioxidative Vitamine (Vitamin A, C und E) und Enzyme (Superoxiddismutase, Glutathion-Peroxidase, Hämoxygenase etc.) Defizite auf, treten durch die Radikalen Schädigungen auf (= oxidativer Streß), was u.a. auch ursächlich für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen gesehen wird (Halliwell, 1993).

Freie O₂-Radikale oxidieren LDL-Cholesterin, wodurch der Atherosklerose-Prozess begünstigt wird (Rice-Evans, 1993). Weiterhin reagieren sie mit dem vom Endothel produzierten Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) unter der Bildung von Peroxynitrit (Darley-Usmar, 1995). Dadurch wird die Bioverfügbarkeit von NO reduziert und es resultiert eine Einschränkung der endothel-abhängigen Vasodilatation (sogen. endotheliale Dysfunktion). Auch hierüber kann die Atherosklerose begünstigt werden, es können aber auch eine arterielle Hypertonie und / oder eine Herzinsuffizienz entstehen. Weitere bedeutsame vaskuläre Effekte freier O₂-Radikale sind die gesteigerte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (Fraticeili, 1996), eine Förderung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation (Iuliano, 1997) und die Bildung der vasokonstriktiv wirkenden Isoprostane (Patrono, 1997). Schließlich werden pro-inflammatorisch wirkende und Hypoxie-abhängige Transkriptionsfaktoren unter dem Einfluß freier O₂-Radikale aktiviert (NFkB, HIF1-alpha).

1.3. Fragestellung

Wie bereits erwähnt leiden OSA-Patienten häufig an kardiovaskulären Erkrankungen. Die hierfür verantwortlichen pathophysiologischen Mechanismen sind jedoch noch unzureichend aufgeklärt. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, daß unbehandelte OSA-Patienten unter einem erhöhten oxidativen Stress leiden, der - wie im vorangehenden Abschnitt dargestellt - wesentlich an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt ist.

So ist es vorstellbar, daß die mit der OSA assoziierte zyklische nächtliche Hypoxie verschiedene Zellen des vaskulären Systems dieser Patienten zur Produktion von Sauerstoffradikalen stimuliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden als eine mögliche Population von Zielzellen neutrophile Granulozyten untersucht. Neutrophile Granulozyten können durch eine Aktivierung ihrer NADPH-Oxidase freie Sauerstoffradikale freisetzen (sogen. oxidative Burst). Dieser Vorgang spielt z.B. eine Rolle bei der Abwehr bakterieller Erreger, aber auch beim myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden, der in gewisser Weise in Analogie zur nächtlichen Hypoxie / Reoxygenation im Rahmen der OSA gesehen werden kann (Korthuis, 1993; Valen, 1993). Die Fragestellung dieser Arbeit war somit, ob der oxidative Burst neutrophiler Granulozyten bei unbehandelten OSA-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne schlafbezogene Atmungsstörung gesteigert ist. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die postulierten Veränderungen unter einer adäquaten CPAP-Therapie im kurz- und langfristigen Verlauf reversibel sind.

2. Patienten und Methodik

2.1. Patienten

Eingeschlossen wurden 18 Patienten mit polysomnographisch gesicherter Diagnose einer OSA. Das Spektrum an Begleiterkrankungen, die Medikation sowie ein evtl. bestehender Nikotinkonsum wurden anamnestisch erfaßt. Während des Aufenthalts im Schlaflabor wurde der Blutdruck in Ruhe um 6.00 h, 12.00 h, 16.00 h und 20.00 h in liegender Position gemessen. Eine arterielle Hypertonie wurde diagnostiziert, falls dabei der Blutdruck mindestens zweimal Werte von 140/80 mm Hg überstieg oder falls bereits ein medikamentös behandelter Hypertonus bestand. Bei jedem Patienten wurden darüber hinaus die Nüchtern-Serumkonzentrationen für Kreatinin, Cholesterin und Glukose bestimmt. Weiterhin wurden zwei Kontrollgruppen ohne schlafbezogene Atmungsstörung untersucht. Die erste Kontrollgruppe setzte sich aus 10 Patienten mit einem Bronchialkarzinom zusammen, die bezüglich ihrer Komorbiditäten mit den OSA-Patienten gematcht waren. Die zweite Kontrollgruppe bestand aus 10 jungen, gesunden nichtrauchenden Normalpersonen.

2.2. Polysomnographie

Über insgesamt drei Nächte erfolgte im Schlaflabor der Medizinischen Klinik II eine Polysomnographie. Unter Polysomnographie versteht man die kontinuierliche Ableitung von Biosignalen im Schlaf, in der Regel unter Überwachungsbedingungen. Als Meßeinheit diente das Computersystem SIDAS GS der Firma IfM GmbH, Wettenberg. Ableitung und Auswertung der polysomnographischen Parameter erfolgten standardisiert nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Schlafforschung und Schlafmedizin (DGSM). Während der ersten Nacht wurde eine diagnostische Polysomnographie durchgeführt, in den darauffolgenden beiden Nächten wurde eine CPAP-Therapie eingeleitet (siehe weiter unten).

Zur Verringerung des Hautwiderstandes an den Stellen, an denen die EOG-, EMG- und EEG-Sensoren angelegt werden, bedarf es einer Vorbehandlung der Haut. Zunächst wird die Haut mit Alkohol gereinigt. Um die Dicke der Hornschicht zu reduzieren, wird mit einem Wattetupfer eine EEG-Paste aufgetragen und verrieben, die anschließend mit Alkohol wieder entfernt wird. Es ist dabei zu beachten, daß die tiefen, kapillarisierten Hautschichten nicht verletzt werden. Die von uns verwendete EEG-Paste enthält Tylose C30 1,5 g, Propylenglykol 5,0 g, Sorbinsäure 0,1 g, Kaliumsorbat 0,1 g, Kaliumhydrogentartrat 1,0 g, Natriumchlorid 12,0 g, Bimsstein 25,0 g und Aqua purificata ad 100,0 g. Auf die so präparierte Haut können die Einmalelektroden aufgeklebt werden. Bei allen Elektroden muß auf einen möglichst geringen Haut-Elektroden-Übergangswiderstand ($< 10 \text{ k}\Omega$) geachtet werden. Sollte nach Anlegen bei einzelnen Elektroden eine Impedanz $> 10 \text{ k}\Omega$ gemessen werden, müssen diese Elektroden neu geklebt werden. Bei der Impedanzprüfung ist immer die Indifferenzelektrode (Neutral) gegen die abzuleitende Elektrode zu messen.

Bei der Langzeitregistrierung des Schlafes werden verschiedene Kanäle abgeleitet, die im folgenden näher besprochen werden sollen. Zur Ableitung des Elektrookulogramms (EOG) wird jeweils eine Elektrode seitlich neben dem linken und rechten Auge befestigt (ein Zentimeter oberhalb des linken lateralen Augenrandes sowie ein Zentimeter unterhalb des rechten lateralen Augenrandes). Auf dem ersten Kanal wird das Potential der Elektrode EOG1 und auf dem zweiten Kanal wird dasjenige der Elektrode EOG2 registriert. Als Referenz dient eine neutrale Elektrode am Mastoid. Registriert werden Spannungen, die durch Bewegungen des Auges als elektrischem Dipol in diesen Elektroden induziert werden. Dadurch werden die typischen schnellen Augenbewegungen des REM-Schlafes sowie das langsame Augenrollen des Stadiums NREM1 erkannt. Das Elektromyogramm (EMG) dient der Erfassung der Veränderung des Muskeltonus. Dies hat z.B. bei der Erkennung der Muskelatonie des REM-Schlafes und von periodischen Beinbewegungen eine Bedeutung. Eine bipolare Ableitung der Region über dem M. submentalis wird standardisiert verwendet (EMG1). Die beiden EMG2-Elektroden werden auf dem M. tibialis anterior links und rechts plaziert.

Durch das Elektroencephalogramm (EEG) wird der Grad der zentralnervösen Aktiviertheit erfaßt. Die EEG-Elektroden werden nach dem internationalen 10-20 System an den Positionen C3/A2 und C4/A1 positioniert. Die Elektrode C3 wird nach 20% der Strecke zwischen Cz und linkem Mastoid befestigt und auf die Elektrode M2 (auf dem linken Mastoid) bezogen. Die Elektrode C4 wird entsprechend nach 20% der Strecke zwischen Cz und rechtem Mastoid positioniert und auf die Elektrode M1 (auf dem rechten Mastoid) bezogen. Das EEG wird zusammen mit dem EOG und EMG für die Bewertung der Schlafstadien benötigt.

Der kardiovaskuläre Aspekt des Schlafes wird routinemäßig ausschließlich mit Hilfe des Elektrokardiogramms (EKG) erfaßt. Wegen der höheren Potentialdifferenzierung im mV-Bereich ist vor dem Aufkleben der EKG-Elektroden keine Hautvorbereitung notwendig. Die negative Elektrode wird im zweiten rechten Interkostalraum parasternal, die positive Elektrode an der Herzspitze positioniert. Diese Elektrodenanordnung ist an die Brustwandableitung Nehb A angelehnt und kann mit der Extremitätenableitung II nach Einthoven verglichen werden.

Die thorakoabdominellen Atembewegungen werden induktionsplethysmographisch gemessen. Hierzu werden zwei Gürtel, einer in Höhe der Mamillen, der andere in Höhe des Bauchnabels so befestigt, daß sie nur leicht vorgedehnt sind. Der Atemfluß kann mit thermosensitiven Sensoren an Mund und Nase gemessen werden. Diese Sensoren messen die Temperaturunterschiede zwischen dem kälteren inspiratorischen und dem wärmeren expiratorischen Luftstrom. Eine noch sensitivere Methode zur Atemflussmessung ist die Staudruckmessung mittels einer Nasenkanüle. Diese wurde zum Zeitpunkt der Studie in unserem Schlaflabor jedoch noch nicht eingesetzt. Mit Hilfe der Pulsoximetrie werden die arterielle Sauerstoffsättigung (SaO₂) und die Pulsfrequenz gemessen. Der Sensor wird am Finger appliziert, wobei die Leuchtdiode auf dem Nagelbett, die Photodiode gegenüber auf der Fingerbeere mit Klebestreifen befestigt werden. Die Aufzeichnung von Schnarchgeräuschen erfolgt qualitativ mit Hilfe eines in der Fossa jugularis befestigten Mikrophons.

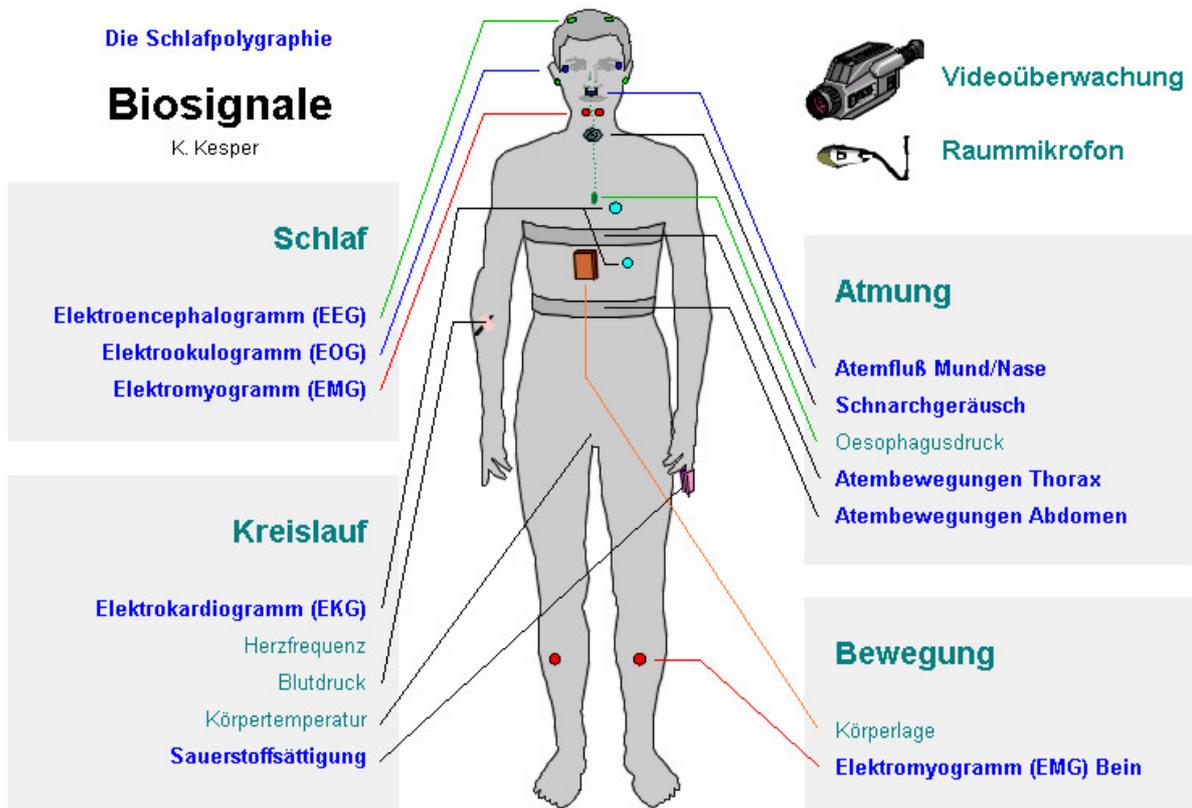


Abbildung 1

Schema der im Rahmen der Polysomnographie abgeleiteten Parameter.

Die Kabel aller oben genannten Elektroden und Meßgeräte werden in den dafür vorgesehenen Anschlüssen einer Box verankert, die der Patient um den Hals trägt. In dieser Box befindet sich auch ein Lagesensor zur Registrierung der Körperposition. Weiterhin dient die Patientenanschlußbox der Vorverstärkung und Weiterleitung der gemessenen Biosignale.

Zur Überwachung der Patienten im Dunkeln wird eine Infrarotkamera eingesetzt. Weiterhin sind die Räume mit einer Gegensprechanlage ausgestattet, durch die sich sowohl der Patient als auch das überwachende Personal verständlich machen können. Eine speziell geschulte Nachtwache muß während der gesamten Zeit der Polysomnographie anwesend sein, um auf Alarme reagieren zu können, um dekonnectierte Sensoren in ihrem Sitz zu korrigieren und um den Patienten bei der Einleitung einer nicht-invasiven Beatmung zu betreuen.

Um Artefakte zu erkennen und eine einwandfreie Aufzeichnung zu gewährleisten, ist ein sogen. Biosignaltest zu Beginn der Registrierung im Wachzustand erforderlich. Die EEG-Kanäle werden mit folgendem Kommando getestet : entspannt liegen, die Augen schließen (1-2 Minuten) : Nachweis von Alphawellen. Augen öffnen : Verschwinden der Alphawellen. Dies ist hilfreich zur Definition von Wachzeiten während der Nacht sowie zur Erkennung von Arousals. Beim EOG-Test werden schnelle horizontale und vertikale Augenbewegungen ausgeführt. Er dient der Bewertung der schnellen Augenbewegungen im REM-Schlaf. Der EMG-1-Kanal wird durch mehrmaliges auf die Zähne Beißen überprüft, der EMG2-Kanal durch Anziehen der Füße in Richtung Kopf. Die respiratorischen Kanäle werden ebenfalls durch verschiedene Kommandos getestet (normal Atmen, Hyperventilieren, Luftanhalten ohne Atmungsaktivität und mit Atmungsaktivität). Zum Schluß sollte der Patient laute und leise Schnarchgeräusche simulieren. Es werden dabei verschiedene Ausprägungen obstruktiven Schnarchens dargestellt.

Die Auswertung der Polysomnographie wurde visuell nach international festgelegten Kriterien vorgenommen. Nächtliche Atmungsstörungen wurden aufgrund den Vorschlägen einer Task Force der American Sleep Disorders Association klassifiziert (ASDA, 1999). An respiratorischen Parametern wurden der AHI sowie die mittlere SaO₂ in %, die minimale SaO₂ in % und die SaO₂ unter 90% in % der gesamten Schlafzeit bestimmt. Die Schlafstadien-Beurteilung erfolgte in 30 sec. Epochen nach den von Rechtschaffen & Kales vorgeschlagenen Kriterien (Rechtschaffen & Kales, 1968). Die Arousal-Definition richtete sich nach den ASDA-Kriterien, d.h. es wurde eine EEG-Aktivierung aus dem Schlaf heraus von mindestens 3 sec. Dauer gefordert (ASDA, 1992). Die einzelnen Schlafstadien wurden in ihrer prozentualen Verteilung erfaßt (normal : 50-60% NREM 1+2, jeweils 20-25% NREM 3+4 sowie REM) und es wurde ein Arousalindex erstellt (Anzahl der Arousals pro Stunde Schlaf, normal : 10-15/h).

2.3. CPAP-Therapie

Die continuous positive airway pressure (CPAP)-Beatmung ist die Standardtherapie der OSA (Sullivan, 1981). Hierbei wird unter Spontanatmung über ein Schlauchsystem und eine Nasen - oder Nasen/Mundmaske ein kontinuierlicher positiver Druck eingestellt, der zu einer pneumatischen Schienung der oberen Atemwege führt. Die Höhe des therapeutisch erforderlichen Drucks muß individuell unter polysomnographischen Bedingungen ermittelt werden. In unserem Schlaflabor erfolgte über eine Fernbedienung eine stufenweise, manuelle Hoch-Titration bis zum Erreichen des sogen. minimal-effektiven CPAP-Druckes. Bei diesem Druck wird eine möglichst komplette Elimination aller Atempausen und des Schnarchens in allen Körperlagen und Schlafstadien erreicht (auch in Rückenlage und im REM-Schlaf). Mit der CPAP-Therapie wird eine Normalisierung der Atmung und des Schlafes erzielt. Dies führt zu einer Besserung der Tagesmüdigkeit und der neurokognitiven Funktion der betroffenen Patienten. Schließlich wirkt die CPAP-Therapie bei konsequenter Langzeitanwendung kardioprotektiv und senkt somit die kardio-und zerebrovaskuläre Morbidität und Mortalität bei der OSA (Marin, 2005).

2.4. Messung des oxidativen Burst von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten verfügen über membranständige Rezeptoren, die nach Bindung von Liganden unterschiedliche Funktionen wie Chemotaxis, Adhärenz und Phagozytose vermitteln. Die Besetzung der Rezeptoren für das bakterielle Tripeptid N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin (fMLP) und die Calcium-Ionophore A23 führen über verschiedene Zwischenschritte zu einer Aktivierung der hauptsächlich in der äußeren Zellmembran lokalisierten NADPH-Oxidase mit nachfolgender Freisetzung von freien O₂-Radikalen. Dieser Vorgang wird als oxidativer burst bezeichnet.

Zur Messung des oxidativen burst wurde EDTA-antikoaguliertes, peripher-venöses Blut von Kontroll - und OSA-Patienten verwendet. Die erste Blutprobe wurde morgens um 7 Uhr direkt nach Beendigung der diagnostischen Polysomnographie abgenommen. Weitere Blutentnahmen erfolgten in der OSA-Gruppe nach Einleitung der CPAP-Therapie ebenfalls um 7 Uhr (nach zwei Nächten CPAP-Therapie und nach einigen Monaten häuslicher CPAP-Nutzung).

Die Labormethodik war bereits aus vorangehenden Studien etabliert (Grimminger, 1996). Zunächst wurden die neutrophilen Granulozyten aus den Blutproben nach der Methode von Boyum durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten gewonnen. Hierzu wurde das Blut zunächst 1:2 mit PBS -/- verdünnt. 35 ml dieses Gemisches wurden nun vorsichtig mit einer sterilen 50 ml Polypropylene-Pipette (Falcom) auf 15 ml Ficoll-Lösung, die zuvor in ein 50 ml-fassendes steriles Propylene-Röhrchen (Falcon) vorgelegt worden war, aufgeschichtet. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 35 min. bei 400 x g. Die Zellisolation wurde standardmäßig unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur (20-25°C) durchgeführt; die Isolationsdauer betrug durchschnittlich ca. zwei Stunden. Durch diese Zentrifugation über den Ficoll-Gradienten bewirkt man eine Auftrennung von thrombozytenreichen Plasma, mononucleären Zellen (Mono- und Lymphocyten) und Granulo - und Erythrozyten.

Die beiden letzten Zellpopulationen befinden sich in einer gemeinsamen Bande am Boden des Röhrchens. Nach Absaugen des Plasmas und der mononucleären Zellen erfolgte nun die Abtrennung der Erythrozyten von den PMN. Zunächst wurde die Bande mit 10%-igem Polyvinylalkohol in NaCl gemischt (Verhältnis 1:3) und 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Sedimentation der Erythrozyten stengelassen, danach überpipettiert und bei 150 x g 10 min. zentrifugiert. Die Entfernung verbleibender Erythrozyten erfolgte durch hypotone Lyse. Dazu wurden die Zellen in 18 ml aqua dest. resuspendiert. Nach einer Einwirkzeit von 20 sec. wurde die Lyse durch Zusatz von 2 ml 10-fachem PBS-Konzentrat beendet. Zur vollständigen Reinigung der PMN von Ficoll-Rückständen schlossen sich zwei Waschschrirte in PBS-/- (150 x g; 10 min.) an.

Zwischen den beiden Waschschrirten erfolgte die Quantifizierung der Zellen durch lichtmikroskopische Zählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bei 400-facher Vergrößerung. Durchschnittlich ließen sich aus 50 ml Blut ca. 10×10^7 PMN isolieren. Die Reinheit der isolierten Graulozyten wurde in regelmäßigen Abständen über Differentialblutbilder kontrolliert; dabei ergab sich ein PMN-Anteil von 97%. Mono - und Lymphozyten waren mit jeweils 1% vertreten; die restlichen Zellen wurden als eosinophile und basophile Granulozyten identifiziert. Die Zellvitalität wurde mit Hilfe der Trypan-Blau-Ausschluß-Methode und der LDH-Freisetzung überprüft, wobei 98% der PMN am Ende der Isolation vital waren. Die spontane LDH-Freisetzung der PMN wurde auf die durch das Bienengift Mellitin hervorgerufene, absolute Enzymfreisetzung bezogen und lag immer unter 3%.

Nach dem letzten Waschschrirte wurden die PMN in PBS +/- aufgenommen, wobei die Konzentration der Zellen auf 5×10^6 PMN/ml eingestellt wurde und das Probenvolumen pro Ansatz jeweils 1 ml betrug. Für die Quantifizierung des Plättchenaktivierenden Faktors wurde dem Versuchspuffer 0,25% BSA zur extrazellulären Stabilisierung des Mediators zugesetzt. Die Stimulation erfolgte im Wasserbad bei 37°C unter regelmäßigem Schütteln, um einer Aggregation der Zellen vorzubeugen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion je nach dem anschließenden Analytikverfahren durch Kühlung auf 4°C und durch Zentrifugation bei 1200 x g abgestoppt.

Die auf diese Weise isolierten neutrophilen Granulozyten wurden in vitro durch Zugabe von fMLP und A23 zur Freisetzung von Superoxidanionen stimuliert. Die $O_2^{\cdot-}$ Produktion wurde schließlich über die durch Superoxiddismutase (SOD) hemmbare Reduktion von Cytochrom C gemessen. Hierzu wurden die Proben paarweise angesetzt und 75 μ M Cytochrom C zugegeben. Nur einem der Ansätze wurde 10 μ g/ml SOD zugesetzt. Die Stimulation erfolgte bei 37°C im Wasserbad und wurde durch Kühlung auf Eis und anschließende Zentrifugation bei 4°C (1200 x g, 4 min) beendet. Die Zellüberstände wurden photometrisch bei 546 nm (Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom C) analysiert, wobei jeweils die Extinktion gegen den SOD-enthaltenden Parallelsatz gemessen wurde. Die granulozytäre $O_2^{\cdot-}$ Produktion konnte unter Einbeziehung eines Extinktionskoeffizienten von 21 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 1:1 Stöchiometrie errechnet werden. Sie wurde schließlich in $\text{nmol } O_2^{\cdot-} / 5 \times 10^6$ Zellen angegeben.

2.5. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert +/- SEM angegeben. Zum Vergleich der Superoxid-Produktion der neutrophilen Granulozyten zwischen den drei Patientengruppen (OSA-Gruppe, Kontrollgruppen 1 und 2) wurde der Kruskal Wallis-Test eingesetzt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden dann mit dem Dunn-Test evaluiert, einschließlich einer Alpha-Korrektur nach Holm. Die intraindividuellen Unterschiede der Superoxidabgabe bei den OSA-Patienten vor und nach CPAP-Therapie wurden mit Hilfe des Friedman-Tests beurteilt. Schließlich wurde überprüft, ob der oxidative Burst mit dem Ausmaß der nächtlichen Hypoxie (ausgedrückt als $\text{SaO}_2 < 90\%$ in % der TST) und dem AHI linear korrelierten. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Patienten-Charakteristika

Die Charakteristika der OSA-Patienten und der zweiten Kontrollgruppe sind in Tabelle 1 miteinander verglichen. Alle untersuchten Patienten waren männlichen Geschlechts. Die OSA-Patienten waren im Durchschnitt 12 Jahre jünger und hatten ein deutlich höheres Körpergewicht. Da die Patienten der zweiten Kontrollgruppe alle an einem Bronchialkarzinom litten, war hier der Anteil der Raucher höher. Das Spektrum kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen war hingegen in beiden Gruppen gleich verteilt. Wie bereits erwähnt bestand die erste Kontrollgruppe aus jungen, gesunden, nicht rauchenden Probanden (alles Männer, Alter : 30 +/- 3 Jahre, BMI : 22,9 +/- 2,6 kg/m²) .

	OSA Group	Control Group 2
n	18	10
Sex, male/female	18/0	10/0
Age, yr*	51.8 ± 2.8	63.8 ± 3.2
BMI, kg/m ² *	33.2 ± 1.9	25.8 ± 2.0
Peripheral WBC count, × 10 ³ /μl*	7.4 ± 0.3	7.7 ± 0.6
Diabetes mellitus	2 (11%)	—
Hypercholesterolemia	13 (72%)	9 (90%)
Smoking	8 (44%)	8 (80%)
Chronic bronchitis	3 (17%)	3 (30%)
Arterial hypertension	7 (39%)	4 (40%)
Coronary artery disease	1 (6%)	1 (10%)
Cerebrovascular disease	1 (6%)	1 (10%)
AHI, n/h*	53 ± 6	—
Sa _{O₂} < 90% (percentage of TST)*	31.4 ± 5.9	1.5 ± 0.5
Sa _{O₂} mean, %*	89.6 ± 1.1	94.2 ± 2.3
Lowest Sa _{O₂} , %*	65.6 ± 3.7	87.0 ± 3.8

Definition of abbreviations: AHI = apnea-hypopnea index; BMI = body mass index; Sa_{O₂} = nocturnal oxygen saturation; TST = total sleep time; WBC = white blood cell.

* Values are means ± SEM.

Tabelle 1

Die OSA-Patienten hatten im Mittel eine deutlich ausgeprägte nächtliche Atmungsstörung mit schwerer Hypoxie und Störung der Schlafarchitektur. Alle Patienten wurden effizient mit CPAP behandelt, wobei der mittlere Druck bei 10.0 +/- 0.6 cm H₂O lag. Nach einer mittleren follow-up Zeit von 4,8 +/- 0,6 Monaten wurden 10 der 18 OSA-Patienten nachuntersucht. Bei diesen Patienten waren im Verlauf keine signifikanten Änderungen des BMI, des Blutdrucks oder anderer Charakteristika aufgetreten. Alle hatten regelmäßig ihr CPAP-Gerät verwendet (Nutzungsdauer 5,5 +/- 0,5 h pro Nacht). Sie berichteten über eine Verbesserung der Tagesschläfrigkeit und litten nicht unter relevanten Nebenwirkungen der Behandlung.

3.2. Freisetzung von Sauerstoffradikalen vor CPAP-Therapie

Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen nach in vitro Stimulation mit fMLP und A23 war am niedrigsten in der gesunden Kontrollgruppe (3.7 +/- 1.5 nmol O₂^{-•} / 5 x 10⁶ Zellen). Die andere Kontrollgruppe hatte etwas höhere Werte (4.1 +/- 0.6 und 12.0 +/- 1.4 nmol O₂^{-•} / 5 x 10⁶ Zellen), diese Unterschiede waren aber statistisch nicht signifikant. Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen nach Stimulation mit fMLP war bei den unbehandelten OSA-Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen um den Faktor 3-4 erhöht (14.1 +/- 1.5 nmol O₂^{-•} / 5 x 10⁶ Zellen, p jeweils < 0.01). Die O₂^{-•} Produktion nach Stimulation mit A23 war bei OSA ebenfalls signifikant höher, aber nicht so ausgeprägt wie nach fMLP (16.0 +/- 1.1 nmol O₂^{-•} / 5 x 10⁶ Zellen, p < 0.01 im Vergleich zu Kontrollgruppe 1 und p < 0.05 im Vergleich zu Kontrollgruppe 2, siehe Abbildung 2). Die Konzentrationen der freien Sauerstoffradikale waren nicht unterschiedlich zwischen OSA-Patienten mit oder ohne kardiovaskuläre Erkrankungen (fMLP : 13.6 +/- 2.6 vs. 14.1 +/- 2.1, A23 : 16.4 +/- 1.4 vs. 15.9 +/- 1.7 nmol O₂^{-•} / 5 x 10⁶ Zellen). Bei Betrachtung der individuellen Daten bestand für die Werte nach fMLP-Stimulation fast keine Überschneidung zwischen der OSA-Gruppe und den beiden Kontrollgruppen, was für die Werte nach A23-Stimulation hingegen nicht zutraf. Signifikante Korrelationen zwischen dem OSA-Schweregrad (AHI, Ausmaß der nächtlichen Desaturationen) und der Höhe des oxidativen burst bestanden nicht.

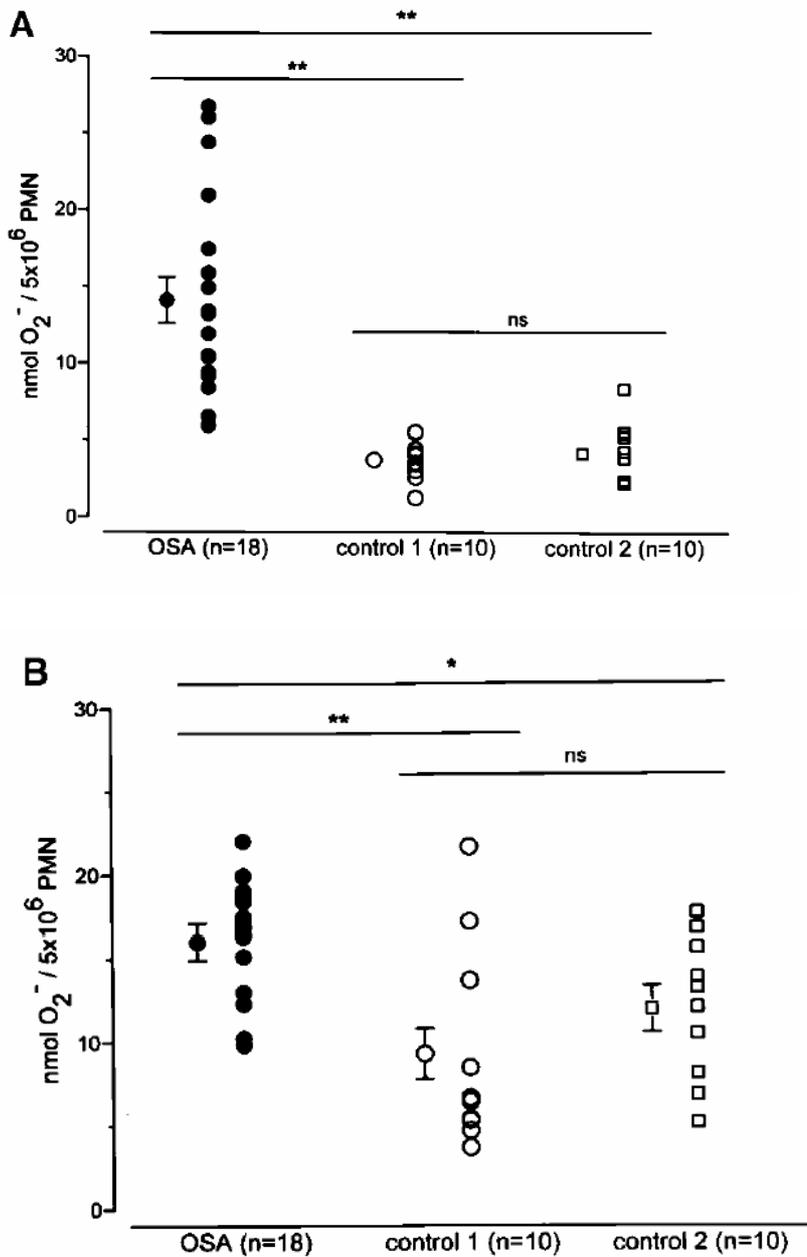


Abbildung 2

Oxidativer Burst neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit fMLP (A) und A23 (B) bei OSA-Patienten (gefüllte Kreise) und Kontroll-Patienten ohne OSA (Kontrolle 1 : gesunde Probanden, leere Kreise, Kontrolle 2 : Bronchialkarzinom-Patienten, leere Rechtecke). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM und individuelle Werte angegeben.
 * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ns : nicht signifikant.

3.3. Freisetzung von Sauerstoffradikalen nach CPAP-Therapie

Bereits nach 2 Nächten CPAP-Therapie nahm die Freisetzung von Sauerstoffradikalen bei allen Patienten mit OSA signifikant ab. Verglichen mit den Werten vor Einleitung der CPAP-Therapie wurde die Radikalen-Produktion nach Stimulation mit fMLP im Mittel um 43% reduziert ($8.1 \pm 1.5 \text{ nmol O}_2^{\cdot-} / 5 \times 10^6 \text{ Zellen}$, $p < 0.01$), nach Stimulation mit A23 um 16% ($13.7 \pm 1.1 \text{ nmol O}_2^{\cdot-} / 5 \times 10^6 \text{ Zellen}$, $p = 0.09$). Zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung war die mittlere $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Freisetzung in der OSA-Gruppe dann mit derjenigen beider Kontrollgruppen vergleichbar (fMLP : 5.5 ± 0.6 , A23 $11.0 \pm 2.3 \text{ nmol O}_2^{\cdot-} / 5 \times 10^6 \text{ Zellen}$). Die Reduktion der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Konzentration unter Bezugnahme auf die Werte vor CPAP war jetzt für die Stimulation mit fMLP 61% ($p < 0.01$) und für diejenige mit A23 33% ($p = 0.07$, siehe Abbildung 3).

Zur Kontrolle wurde der oxidative burst der neutrophilen Granulozyten bei 2 der 10 gesunden Kontrollpersonen zusätzlich nach einer Nacht mit CPAP-Beatmung gemessen. Hierbei zeigte sich keine Veränderung der Messwerte.

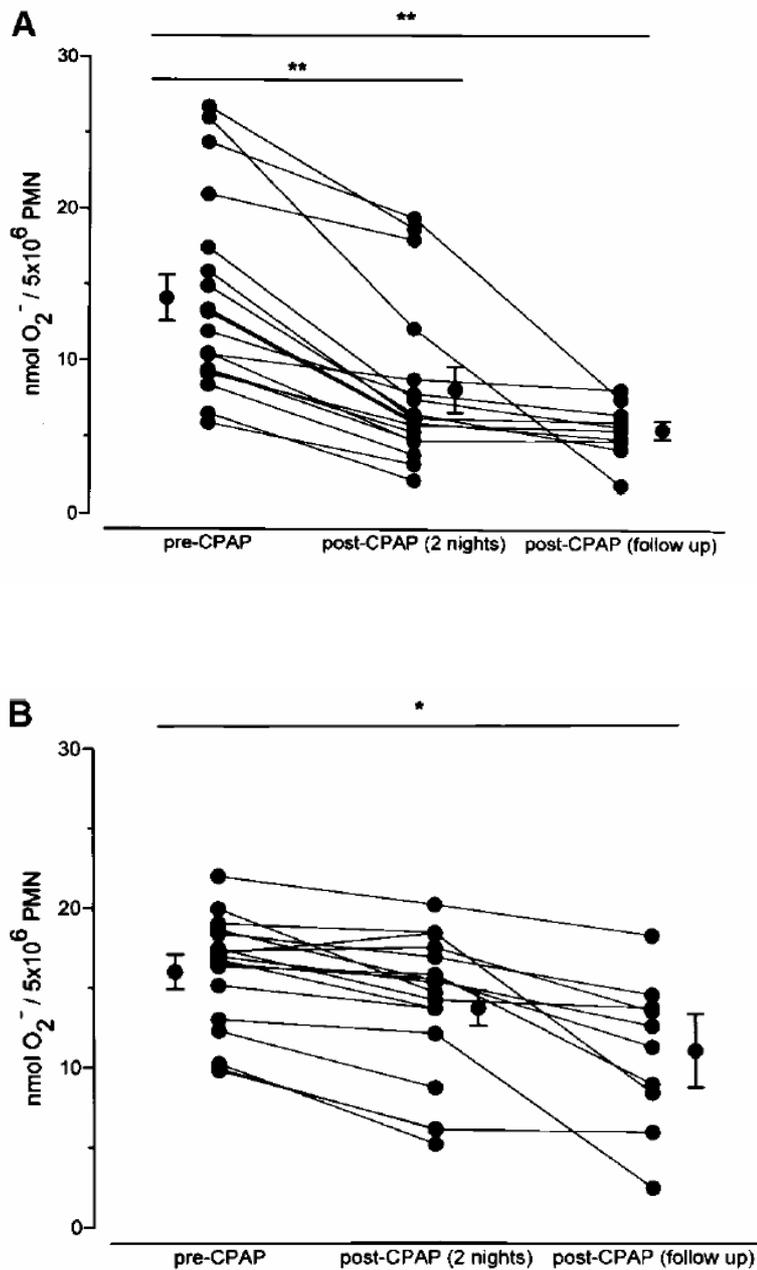


Abbildung 3

Oxidativer Burst neutrophiler Granulozyten nach in vitro Stimulation mit fMLP und A23 bei 18 OSA-Patienten vor und nach 2 Nächten CPAP-Therapie sowie bei 10 Patienten nach 4,8 Monaten Follow-up (n = 10). Die Daten sind als Mittelwert +/- SEM und als individuelle Werte angegeben. * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals festgestellt werden, daß die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus neutrophilen Granulozyten bei unbehandelten Patienten mit OSA im Vergleich zu Kontrollen ohne nächtliche Atmungsstörung deutlich erhöht war. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Radikalenproduktion bereits nach 2 Nächten CPAP-Therapie signifikant abnahm und im Verlauf noch weiter bis auf Werte reduziert wurde, die jetzt mit denjenigen der Kontrollen vergleichbar waren.

In den folgenden Abschnitten sollen zunächst mögliche Fehlerquellen unserer Untersuchungsergebnisse diskutiert werden, bevor auf die Bedeutung der gemachten Beobachtungen für die OSA und die hiermit assoziierte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität eingegangen wird. Dies geschieht im Kontext mit nachfolgenden Studien, die zusammen mit den hier vorgestellten Daten dazu geführt haben, daß der oxidative Stress bei der OSA mittlerweile als wesentlicher pathogenetischer Faktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei diesen Patienten angesehen wird.

4.2. Einflussfaktoren der Messergebnisse

Viele Faktoren können die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus neutrophilen Granulozyten beeinflussen und müssen bei der Wertung der dargestellten Ergebnisse berücksichtigt werden. Zunehmendes Alter ist mit erhöhten oxidativen Streß verbunden (Chaves, 1998). Rauchen führt ebenfalls zu einer vermehrten Radikalenproduktion (Jay, 1986). Die chronisch-obstruktive Bronchitis und das Bronchialkarzinom sind schließlich auch mit oxidativem Streß in Verbindung gebracht worden (Repine, 1997; Jaruga, 1994).

Die Patienten der zweiten Kontrollgruppe litten alle unter einem Bronchialkarzinom, die Mehrheit von ihnen rauchte und sie waren durchschnittlich älter als die OSA-Patienten. Trotzdem war der oxidative Burst dieser Patienten geringer als bei den OSA-Patienten. Insofern sind die gefundenen Unterschiede in der Radikalfreisetzung zwischen dieser Kontrollgruppe und den OSA-Patienten möglicherweise als noch signifikanter zu bewerten.

Weiterhin könnte spekuliert werden, daß die relativ hohe kardiovaskuläre Komorbidität der OSA-Patienten per se einen vermehrten oxidativen Stress verursacht haben könnte. Jedoch waren kardiovaskuläre Erkrankungen gleich häufig bei der OSA-Gruppe und der zweiten Kontrollgruppe anzutreffen. Weiterhin lag innerhalb der OSA-Gruppe kein Unterschied in der Radikalenproduktion zwischen Patienten mit und ohne kardiovaskuläre Erkrankungen vor. Schließlich spricht die Tatsache, daß es unter CPAP-Therapie bei den OSA-Patienten (nicht aber bei 2 Normalprobanden) zu einer deutlichen Abnahme der $O_2^{\cdot-}$ - Freisetzung aus den neutrophilen Granulozyten kam dafür, daß unsere Beobachtungen durch die OSA selbst verursacht wurden.

Eine mögliche Limitation unserer Studie ist, daß die gesunden Kontrollen jünger waren als die OSA-Patienten, wodurch zumindest teilweise die niedrigeren Werte des oxidativen Burst bei diesen Probanden erklärt werden könnten. Es wäre wohl wünschenswert gewesen, diese Gruppe mit der OSA-Gruppe bezüglich Alter und Gewicht zu matchen. Weiterhin fehlt in unserem Studiendesign ein longitudinaler Kontrollarm, der die Radikalfreisetzung aus Leukozyten bei Gesunden im weiteren zeitlichen Verlauf noch einmal untersucht hätte.

Schließlich ist eine gewisse Verzerrung der Ergebnisse durch Einflüsse der individuellen Diät möglich. In der Nahrung enthaltene Antioxidantien wie die Vitamine A, C und E können den oxidativen Streß durch Abfangen von freien Sauerstoffradikalen vermindern (Cao, 1998). Die Patienten unsere Studie nahmen aber keine definierte Diät zu sich.

4.3. Mögliche Quellen des oxidativen Stress bei OSA

In dieser Studie wurden erstmals neutrophile Granulozyten als potentielle Quellen des oxidativen Stresses bei OSA beschrieben. Diese Zellen sorgen als unspezifische Abwehr bei angemessener Stimulation für eine adäquate Produktion von Superoxidanionen zur Abtötung pathogener Keime. Eine vermehrte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten aus Granulozyten findet sich bei Erkrankungen, die aufgrund einer entzündlichen Genese - unabhängig davon, ob akut oder chronisch verlaufend oder ob infektiös oder autoimmun bedingt - zu einer Akkumulation und Aktivierung dieser Zellen führen. Solche Erkrankungen lagen bei den untersuchten Patienten aber nicht vor, so daß wir postulieren, daß die nächtliche zyklische Hypoxie den oxidativen Burst der Granulozyten aktivierte. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, daß eine israelische Arbeitsgruppe zwei Jahre nach unserer Originalpublikation ähnliche Ergebnisse publizierte. In dieser Studie wurden die neutrophilen Granulozyten mit PMA stimuliert (Dyugovskaya, 2002).

Außer zirkulierenden neutrophilen Granulozyten könnten auch noch andere, in dieser Studie nicht untersuchte Zellen zu einem erhöhten oxidativen Streß bei OSA beitragen. Dazu zählen in erster Linie Endothelzellen. Das Endothel könnte unter den Einflüssen von apnoe-assoziiert Hypoxie / Reoxygenation und Scherkräften vermehrt O_2^- Radikale produzieren. Glatte Muskelzellen der Gefäßwand könnten mittels ihrer eigenen NADPH-Oxidase ebenfalls Sauerstoffradikale abgeben.

Nicht-zelluläre Quellen könnten auch zu einem erhöhten oxidativen Streß bei OSA führen. Es ist bekannt, daß die OSA mit erhöhtem Plasmaspiegel von Adrenalin und Noradrenalin einhergeht (Carlson, 1993). Diese Katecholamine können über eine Autooxidation eine Bildung von Sauerstoffradikalen bewirken (Miller, 1996). Schließlich wurde berichtet, daß die für die OSA charakteristische REM-Schlaf-Deprivation tierexperimentell den oxidativen Streß steigert.

4.4. Oxidativer Stress in der Pathogenese der OSA-assozierten Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Da freie Sauerstoffradikale wie eingangs beschrieben eine wichtige Rolle bei Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen einschließlich der Arteriosklerose spielen, könnte die beobachtete vermehrte Freisetzung von O_2^- Radikalen das häufige Vorkommen dieser Erkrankungen bei OSA erklären. Dabei wird von uns der folgende pathophysiologische Zusammenhang vorgeschlagen : unter Hypoxie / Reoxygenation wird die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten am Endothel gesteigert und die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen getriggert. Diese Radikale schädigen direkt das Endothel und stimulieren die Proliferation glatter Muskelzellen. Die Aggregation von Plättchen und Erythrozyten wird gefördert. Schließlich wird der Metabolismus vasoaktiver Substanzen durch freie Sauerstoffradikale beeinflusst. Stickstoffmonoxid, der am stärksten vasodilatativ wirkende Mediator des Endothels, wird zu Peroxynitrit abgebaut. Die Synthese des gleichfalls gefäßerweiternd wirkenden Prostacyclins wird gehemmt. Auf der anderen Seite werden Isoprostane, die Vasokonstriktoren darstellen, nicht-enzymatisch aus Arachidonsäure gebildet. Schließlich wird die Lipidperoxidation gesteigert, was zur Bildung von sogen. Schaumzellen führt. Insgesamt wird des vaskuläre Milieu unter dem Einfluß von Sauerstoffradikalen von prokoagulatorischen und vasokonstriktiven Kräften dominiert, was schließlich durch anatomische Veränderungen der Gefäßwand selbst fixiert werden kann.

Viele der angeführten Veränderungen sind bei der OSA bereits beschrieben worden und unterstützen somit unsere oben genannte Hypothese. Die Thrombozyten-Aggregation ist bei OSA erhöht (Bokinsky, 1995). Die Prostacyclin/Thromboxan-Ratio im Urin ist erniedrigt (Krieger, 1991). Isoprostane sind im Blut und im Exhalat von OSA-Patienten erhöht gefunden worden (Carpagnano, 2003). Unsere eigene und eine Arbeitsgruppe aus Hongkong konnten unabhängig voneinander zeigen, daß die Plasmaspiegel der Stickstoffmonoxid-Derivate Nitrit und Nitrat bei OSA im Vergleich zu Gesunden vermindert sind (Schulz, 2000; Ip, 2000).

Der NO-Mangel bei unbehandelter OSA korreliert zudem mit dem Ausmaß der endothelialen Dysfunktion dieser Patienten (Ohike, 2005). Weiterhin wurde gezeigt, daß OSA-Patienten eine erhöhte Lipid-und DNS-Oxidation aufweisen (Barcelo, 2000; Lavie, 2004; Yamauchi, 2005). Um dieses Bild zu komplettieren existieren Daten, die für ein Defizit von Antioxidantien bei OSA sprechen (Christou, 2003; Barcelo, 2006). Wichtig ist, daß auch diese Studien eine Reversibilität der Biomarker-Veränderungen nach CPAP-Therapie fanden.

4.5. Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben das Verständnis zum pathophysiologischen Zusammenhang zwischen OSA und kardiovaskulären Erkrankungen wesentlich erweitert, möglicherweise haben sie aber auch eine klinische Bedeutung. So könnte ausgehend von der Beobachtung eines erhöhten oxidativen Stresses vermutet werden, daß antioxidative Substanzen oder Medikamente die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei der OSA senken können. Dies könnte vor allem für solche Patienten eine Rolle spielen, die eine CPAP-Therapie nicht tolerieren und non-compliant sind. Eine erste in diese Richtung deutende Studie wurde später von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Es wurde beschrieben, daß das antioxidativ wirksame Vitamin C eine Besserung der Endothelfunktion von unbehandelten OSA-Patienten bewirkt (Grebe, 2006). Untersucht werden muß allerdings noch, ob dieser protektive Effekt von Vitamin C sich auch für kardiovaskuläre Endpunkte bei diesen Patienten darstellen läßt.

5. Zusammenfassung

Die obstruktive Schlaf-Apnoe (OSA) ist mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert. Freie Sauerstoffradikale spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. Hypothetisch könnte die mit der OSA verbundene Hypoxie-Reoxygenation über eine Produktion von Sauerstoffradikalen zu einem erhöhten oxidativen Streß führen.

Bei 18 OSA-Patienten (Alter : 52 +/- 2.8 Jahre, BMI 33.2 +/- 1.9 kg/m², AHI 53 +/- 5.7/h) wurde die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen aus isolierten neutrophilen Granulozyten nach in vitro-Stimulation mit fMLP und A23 bestimmt. Die Radikalenproduktion wurde über die durch Superoxid-Dismutase hemmbare Reduktion von Cytochrom c gemessen. Blutproben wurden vor und nach 2 Nächten CPAP-Therapie sowie nach einer Nachbeobachtungszeit von fast 5 Monaten abgenommen. 10 junge, gesunde Probanden sowie 10 Bronchialkarzinom-Patienten ohne OSA aber mit einem vergleichbaren Spektrum kardiovaskulärer Erkrankungen dienten als Kontrollgruppen.

Vor CPAP war die Freisetzung von Sauerstoffradikalen bei OSA im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen signifikant erhöht. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen OSA-Patienten mit und ohne kardiovaskuläre Erkrankungen. Eine effektive CPAP-Therapie bewirkte eine sofortige und anhaltende Reduktion der Radikalen-Konzentration bei allen Patienten mit OSA.

In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, daß die OSA mit vermehrtem oxidativen Streß verbunden ist. Die gesteigerte Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen könnte zur Entstehung kardiovaskulärer Folgeerkrankungen bei OSA wesentlich beitragen. Die CPAP-Therapie könnte durch Reduktion dieses oxidativen Streß die Entwicklung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen bei OSA verhindern.

6. Englische Zusammenfassung

Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea - impact of Continuous Positive Airway Pressure Therapy

Obstructive sleep apnea (OSA) is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality. Free oxygen radicals have been implicated in the pathogenesis of cardiovascular disorders. Therefore, we aimed to test the hypothesis that increased oxidative stress constitutes one underlying mechanism for the connection between OSA and cardiovascular disease.

In 18 patients with OSA, the release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils was determined after stimulation with the bacterial tripeptide formylmethionyl-leucylphenylalanine (fMLP) and the calcium ionophore A23. Superoxide production was measured as superoxide dismutase-inhibitable reduction of cytochrome c. Blood samples were obtained before and after two nights of CPAP therapy and after 4.8 ± 0.6 mo of follow-up. Ten healthy young volunteers and 10 lung cancer patients without OSA but a similar spectrum of comorbidity served as controls.

Before CPAP, neutrophil superoxide generation was markedly enhanced in OSA when compared with both control groups. Effective CPAP therapy led to a rapid and long-lasting decrease of superoxide release in OSA.

In conclusion, OSA is linked with a “priming” of neutrophils for enhanced respiratory burst. The increased superoxide generation, which might have major impact on the development of cardiovascular disorders, is virtually fully reversed by effective CPAP therapy.

7. Literatur

American Sleep Disorders Association (ASDA) Report. EEG-arousals: scoring rules and examples. A preliminary report from the sleep Disorders Atlas Task of the American Sleep Disorders Association. *Sleep* 1992; 15 : 174-84.

American Sleep Disorders Association (ASDA) Report. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendation for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep* 1999; 22 : 667-89.

Arzt M, Young T, Finn L, Skatrud JB, Bradley TD. Association of sleep-disordered breathing and the occurrence of stroke. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172 :1447-51.

Barcelo A, Miralles C, Barbe F, Vila M, Pons S, Agusti AGN. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur Respir J* 2000; 16 : 644-7.

Barcelo A, Barbe F, de la Peña M, Vila M, Pérez G, Pierola J, Duran J, Agusti AG. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J* 2006; 27 : 756-60.

Bokinsky G, Miller M, Ault K, Husband P, Mitchell J. Spontaneous platelet activation and aggregation during obstructive sleep apnea and its response to therapy with nasal continuous positive airway pressure. *Chest* 1995; 108 : 625-630.

Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* 1998; 68 : 1081-7.

Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest* 2003;124 : 1386-92.

Carlson JT, Hedner J, Elam M, Ejsnell H, Sellgren J, Wallin BG. Augmented resting sympathetic activity in patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 1993; 103 : 1763-8.

Chaves MM, Rocha-Vieira E, de Lima e Silva R, Pereira dos Reis A, Nogueira Machado JA. Host defenses in the aged: evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes. *Mech Ageing Dev* 1998; 104 :103-9.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 report, *JAMA* 2003; 289 : 2560-72.

Christou K, Moulas AN, Pastaka C, Gourgoulianis KI. Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Med.* 2003; 4 : 225-8.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 1995; 369 : 131-135 .

Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002; 82 : 47-95.

Duchna HW. [Sleep-related breathing disorders - a second edition of the International Classification of Sleep Disorders (ICSD-2) of the American Academy of Sleep Medicine (AASM)]. *Pneumologie* 2006; 60 : 568-75.

Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 : 934-939.

Fratlicelli A, Serrano Jr. CV, Bochner BS, Capogrossi MC, Zweier JL. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1310 : 251-259.

Grebe M, Eisele HJ, Weissmann N, Schaefer C, Tillmanns H, Seeger W, Schulz R. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173 : 897-901.

Grimminger F, Hattar K, Papavassilis C, Temmesfeld B, Csernok E, Gross WL, Seeger W, Sibelius U. Neutrophil activation by anti-proteinase 3 antibodies in Wegener's granulomatosis: role of exogenous arachidonic acid and leukotriene B4 generation. *J Exp Med* 1996; 184 : 1567-1572.

Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993; 23 : 118-126 .

Ip MS, Lam B, Chan LY, Zheng L, Tsang KW, Fung PC, Lam WK. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162 : 2166-71.

Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Pratico D, Violi F. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 999-1006.

Jaruga P, Zastawny TH, Skokowski J, Dizdaroglu M, Olinski R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* 1994; 341 : 59-64.

Jay M, Kojima S, Gillespie MN. Nicotine potentiates superoxide anion generation by human neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 86 : 484-487.

Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* 1993; 16 : 19-26.

Krieger J, Benzoni D, Sforza E, Sassard J. Urinary excretion of prostanoids during sleep in obstructive sleep apnea patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991; 18 : 551-5.

Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2004; 27 : 123-8.

Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Longterm cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnea-hypopnoea with and without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 2005; 365 : 1046-53.

Miller JW, Selhub J, Joseph JA. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autooxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radic Biol Med* 1996; 21 : 241-9.

Ohike Y, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ohga E, Santa T, Imai K, Hashimoto M, Yoshizumi M, Ouchi Y. Amelioration of vascular endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea syndrome by nasal continuous positive airway pressure - possible involvement of nitric oxide and asymmetric NG, NG-dimethylarginine. *Circ J* 2005; 69 : 221-6.

Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes : potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17 : 2309-15.

Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000; 342 : 1378-84.

Rechtschaffen A, Kales A (Hrsg.): A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. National Institute of Health Publications 204, US Government Printing Office, Washington DC, 1968

Repine JE, Bast A, Lankhorst I, and the Oxidative Stress Study Group. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156 : 341-357.

Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 1993; 32 : 71-110 .

Schulz R, Schmidt D, Blum A, Lopes-Ribeiro X, Lücke C, Mayer K, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax*. 2000; 55 : 1046-51.

Schulz R, Eisele HJ, Weissmann N, Seeger W. Pulmonale Hypertonie und schlafbezogene Atmungsstörungen. *Pneumologie* 2005; 59 : 270-4.

Schulz R, Seeger W, Fegbeutel C, Hüsken H, Bödeker RH, Tillmanns H, Grebe M. Changes in extracranial arteries in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2005; 25 : 69-74.

Schulz R, Eisele HJ, Weissmann N, Seeger W. Obstruktive Schlaf-Apnoe : ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor. *Deutsches Ärzteblatt* 2006; 103 : 775-81.

Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Javier Nieto F, O'Connor GT, Boland LL, Schwartz JE, Samet JM. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163 : 19-25.

Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M, Eves L. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet* 1981; 18 : 862-5.

Valen G, Vaage J. Toxic oxygen metabolites and leukocytes in reperfusion injury. A review. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 41 : 19-29.

White DP. Pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172 : 1363-70.

Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, Okamoto Y, Ohnishi Y, Suzuki T, Kimura H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest* 2005; 127 : 1674-9.

Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 : 1217-39.

8. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre :

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Siamak Mahmoudi _____

9. Danksagung

Ich möchte allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben danken.

Meinen besonderen Dank an:

Herrn Prof. Dr. med. Richard Schulz mit dem mich mehr verbindet als nur die Doktorarbeit, der zu meinem Freund wurde und immer ein offenes Ohr für meine Belange hatte. Er stand mir mit Rat und Tat zur Seite und ist mir sowohl als Mensch als auch als Arzt zum Vorbild geworden.

Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger, daß ich in seinem Labor meine Forschungen und meine Arbeit durchführen durfte.

Frau Dr. med. Katja Hattar für ihre unermüdliche und kompetente Hilfe, weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Labors von Herrn Prof. Seeger, ohne die ein optimales und reibungsloses Arbeiten nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Freundin Katrin für viele Diskussionen und Anregungen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und Geschwistern danken für ihre Ermunterungen und die erbrachte Unterstützung, die es mir erst ermöglichte, mein Studium in Deutschland aufzunehmen und zu vollenden.

10. Originalpublikation

Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K, Seeger W, Grimminger F. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162 : 566-70.

Impact factor : 9,074

Zitierungen bei Google Scholar (bis 2/2009) : 254

Enhanced Release of Superoxide from Polymorphonuclear Neutrophils in Obstructive Sleep Apnea

Impact of Continuous Positive Airway Pressure Therapy

RICHARD SCHULZ, SIAMAK MAHMOUDI, KATJA HATTAR, ULF SIBELIUS, HORST OLSCHESKI, KONSTANTIN MAYER, WERNER SEEGER, and FRIEDRICH GRIMMINGER

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Justus-Liebig-University, Gießen, Germany

Obstructive sleep apnea (OSA) is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality. Free oxygen radicals have been implicated in the pathogenesis of cardiovascular disorders. Therefore, we aimed to test the hypothesis that increased oxidative stress constitutes one underlying mechanism for the connection between OSA and cardiovascular disease. In 18 patients with OSA the release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils was determined after stimulation with the bacterial tripeptide formylmethionyleucylphenylalanine (fMLP) and the calcium ionophore A23. Superoxide production was measured as superoxide dismutase-inhibitable reduction of cytochrome *c*. Blood samples were obtained before and after two nights of CPAP therapy and after 4.8 ± 0.6 mo of follow-up. Ten healthy young volunteers and 10 lung cancer patients without OSA but a similar spectrum of comorbidity served as controls. Before CPAP, neutrophil superoxide generation was markedly enhanced in OSA when compared with both control groups. Effective CPAP therapy led to a rapid and long-lasting decrease of superoxide release in OSA. In conclusion, OSA is linked with a "priming" of neutrophils for enhanced respiratory burst. The increased superoxide generation, which might have major impact on the development of cardiovascular disorders, is virtually fully reversed by effective CPAP therapy.

Obstructive sleep apnea (OSA) is associated with cardiovascular morbidity such as arterial hypertension, coronary artery disease, and cerebrovascular disease (1). It is thought that these disorders account for the increased mortality observed in OSA (2); however, the causal relationship between OSA and cardiovascular disease remains to be clearly established (3).

Free oxygen radicals are highly reactive molecules playing pivotal roles in the pathophysiology of such different diseases as neurodegenerative disorders, chronic inflammatory disease, and cancer (4). Free oxygen radicals are also supposed to make important contributions to the development of cardiovascular disease (5, 6). This has, for example, been shown for the process of ischemia/reperfusion injury in coronary artery disease. Under these conditions, polymorphonuclear neutrophils are activated, with decreasing tensions of oxygen being considered as one of the triggers, to adhere to the endothelium and to release free oxygen radicals. The enhanced free radical generation contributes to postischemic cellular injury and extension of infarct size (7–9).

In OSA repeated collapse of the upper airways occurs during sleep. Consequently, cyclical alterations of arterial oxygen saturation are observed, with oxygen desaturation developing in response to apneas followed by resumption of oxygen saturation during hyperventilation. This phenomenon has been referred to as *hypoxia/reoxygenation* and may to some extent be compared with the sequelae in ischemia/reperfusion, although overall changes being by far not so drastic. However, even minor abnormalities related to the hypoxia/reoxygenation events may be of interest against the background that these events may occur frequently and over long time periods in untreated patients with OSA.

On the basis of these considerations, it was hypothesized that OSA may be linked with increased oxidative stress (10). This issue has already been addressed in a previous study by Müns and coworkers, who investigated oxidative burst of neutrophils recovered from nasal lavage and blood of 24 patients with OSA (11). These authors measured the conversion rate of radiolabeled dihydrorhodamine elicited by incorporation of *Escherichia coli* bacteria by neutrophils. It was found that in OSA neither the number of blood neutrophils nor their oxidative burst activity was altered when compared with healthy controls. However, the test employed in this study delineates only the bactericidal activity of neutrophils, being unable to measure oxidative burst in response to other, i.e., nonbacterial stimuli. Furthermore, this method cannot directly quantify the concentrations of free oxygen radicals released from neutrophils.

To overcome these methodologic limitations, we aimed to determine the release of superoxide from circulating neutrophils of patients with OSA undergoing *ex vivo* challenge by the bacterial tripeptide formylmethionyleucylphenylalanine (fMLP) and the calcium ionophore A23. These substances represent well-established and powerful stimuli of superoxide production from neutrophils irrespective of the eventual trigger. Even more important, through measurement of superoxide dismutase-inhibitable reduction of cytochrome *c*, exact quantification of neutrophil superoxide generation is made possible (12).

METHODS

Patients

Eighteen consecutive patients with a polysomnographically verified diagnosis of OSA were investigated. Before participation, all patients had given informed written consent and the study protocol had been approved by the local ethics committee.

In all patients serum creatinine (normal, < 1.2 mg/dl), total cholesterol (normal, < 200 mg/dl), and fasting blood glucose levels (normal, < 110 mg/dl) were measured. Furthermore, peripheral white blood cell counts were determined (normal, $4\text{--}10 \times 10^3/\mu\text{l}$). The patients were asked about their regular medications and smoking habits. The medical history of each patient was evaluated with special reference

(Received in original form August 20, 1999 and in revised form January 31, 2000)

This work contains parts of the doctoral thesis of S. Mahmoudi.

Supported by a grant from Weinmann, Inc. (Hamburg, Germany).

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Richard Schulz, M.D., Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Justus-Liebig-University, Klinikstr. 36, 35392 Giessen, Germany.

Am J Respir Crit Care Med Vol 162, pp 566–570, 2000
Internet address: www.atsjournals.org

to the presence of cardiovascular disease (i.e., arterial hypertension, coronary artery disease, and cerebrovascular disease). Blood pressure at rest was measured at fixed time intervals during the stay of the patients in the sleep laboratory (at 6:00 A.M., noon, 4:00 P.M., and 8:00 P.M.). Arterial hypertension was diagnosed if blood pressure values exceeded 140/90 mm Hg during at least two different measurements or if there was known and medically treated hypertension. Patients with ongoing systemic infection were excluded from the study.

Ten healthy nonsmoking volunteers were taken as the first control group (all males, mean age 30 ± 3 yr, body mass index [BMI] 22.9 ± 2.6 kg/m²). Ten patients without OSA and who were hospitalized because of lung cancer served as the second control group.

Among the control subjects, OSA was excluded by a negative history of sleep-related symptoms (i.e., snoring, witnessed apneas, excessive daytime sleepiness) and by overnight pulse oximetry recordings. The characteristics of the OSA group and the second control group are summarized in Table 1.

Polysomnography

Polysomnography was performed on three consecutive nights. The electroencephalogram (electrodes at positions C3–A2 and C4–A1 of the international 10–20 system), electrooculogram, and electromyogram of the submandibular and pretibial muscles were simultaneously recorded. Ventilatory airflow at the nose and mouth was registered with thermistors. The breathing movements of the chest and abdomen were monitored by inductive plethysmography. The arterial oxygen saturation (SaO₂) was measured transcutaneously with pulse oximetry at the finger tip of the patient. Finally, an electrocardiogram was obtained. All data were registered on a computerised polysomnograph with capability for analog registration (Sidas GS; IfM GmbH, Wettenberg, Germany). Analysis of sleep stages was performed manually at 30-s intervals according to the criteria of Rechtschaffen and Kales.

An obstructive apnea was diagnosed if complete cessation of oronasal flow occurred in the presence of thoracoabdominal breathing movements. If neither oronasal flow nor breathing efforts of the chest and abdomen could be detected this was scored as a central apnea. Hypopnea was defined as a reduction of the respiratory amplitude by greater than 50% with regard to the preceding effort signals.

All apneas and hypopneas were required to have a duration of at least 10 s. The apnea-hypopnea index (AHI) was obtained by dividing the total number of apneas and hypopneas through the total sleep time. An AHI of more than 10 per hour of sleep was considered as diagnostic of OSA.

During the first night a diagnostic study was performed. After the confirmation of the diagnosis of OSA, continuous positive airway pressure (CPAP) therapy was applied to all patients during the second night (Somnotron 4; Weinmann, Hamburg, Germany). Over the third

night all patients slept with the final titrated pressure to assure adequate elimination of all apneas, hypopneas, and snoring.

After various times of CPAP use at home (range, 43–239 d), 10 of the 18 patients with OSA were reexamined in our sleep laboratory. Compliance with CPAP therapy was evaluated by the readings of the built-in time counter of the CPAP machine. Good compliance was defined as CPAP use for at least 5 h per night during 5 d of the week. During the control night, the adequacy of the initially chosen CPAP was checked. It was increased if snoring or apneas persisted; otherwise it was kept constant or decreased if possible.

Measurement of Superoxide Release from Neutrophils

Peripheral venous blood samples were obtained at 7:00 A.M. from the patients with OSA and the control subjects. In the patients with OSA this was done before and after the initiation of CPAP treatment (i.e., after the first two nights of CPAP therapy and at follow-up). Blood samples were withdrawn in EDTA-prepared tubes and immediately forwarded for neutrophil isolation.

Before isolation of polymorphonuclear neutrophils (PMNs), the EDTA-anticoagulated blood was centrifuged in a Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) gradient, erythrocytes were sedimented with polyvinyl alcohol (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany), and residual erythrocytes were removed by hypotonic lysis. Cells were washed twice ($150 \times g$, 10 min, 4° C) and resuspended in phosphate-buffered saline (298 mM) with Ca²⁺ and Mg²⁺ (PBS) at a final concentration of 5×10^6 /ml. Cell purity was > 98% (Pappenheim staining) and cell viability was > 96% (trypan blue exclusion) throughout.

Isolated PMNs were stimulated to produce superoxide anions (O₂⁻) by adding the bacterial tripeptide fMLP and the calcium ionophore A23 to the probes. O₂⁻ generation was measured as superoxide dismutase-inhibitable reduction of cytochrome *c* as described (12). Duplicate reaction mixtures containing PMNs (5×10^6 /ml) and 75 μM ferricytochrome *c* were incubated at 37° C in the presence or absence of superoxide dismutase (10 μg/ml). PMN O₂⁻ production was finally expressed as nanomoles of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs.

Statistical Analysis

All data are given as means \pm SEM. For comparison of superoxide release between the three different patient groups (OSA group, and control groups 1 and 2), the Kruskal-Wallis test was employed. The intergroup differences were then evaluated by the Dunn test, including an α correction according to Holm.

Within the OSA group, the intraindividual differences between superoxide release before CPAP therapy, after two nights of CPAP therapy, and at follow-up were evaluated by the Friedman test. Subsequently, to control the familywise error rate, the Holm procedure as modified by Schafer was used.

Finally, it was tested if the superoxide concentrations were linearly correlated with the degree of nocturnal oxygen desaturation (as expressed as SaO₂ < 90%, as a percentage of total sleep time) as well as the AHI. A *p* value of < 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Patient Characteristics

As shown in Table 1, the patients with OSA were on average 12 yr younger than the patients of the second control group. Furthermore, they were markedly obese, whereas the controls were not overweight. The peripheral white blood cell count was within the normal range for all patients. A high percentage of the patients with OSA and of the patients in control group 2 had hypercholesterolemia. All patients had normal serum creatinine concentrations and only two patients with OSA had mild diabetes mellitus. As the patients of the second control group all suffered from lung cancer, the percentage of smokers was higher than in the OSA group. The spectrum of cardiovascular morbidity was similar in both groups. As already mentioned, the first control group was composed of healthy nonsmoking young volunteers.

TABLE 1

PATIENT CHARACTERISTICS OF THE OSA GROUP AND THE SECOND CONTROL GROUP

	OSA Group	Control Group 2
n	18	10
Sex, male/female	18/0	10/0
Age, yr*	51.8 \pm 2.8	63.8 \pm 3.2
BMI, kg/m ² *	33.2 \pm 1.9	25.8 \pm 2.0
Peripheral WBC count, $\times 10^3/\mu\text{l}$ *	7.4 \pm 0.3	7.7 \pm 0.6
Diabetes mellitus	2 (11%)	—
Hypercholesterolemia	13 (72%)	9 (90%)
Smoking	8 (44%)	8 (80%)
Chronic bronchitis	3 (17%)	3 (30%)
Arterial hypertension	7 (39%)	4 (40%)
Coronary artery disease	1 (6%)	1 (10%)
Cerebrovascular disease	1 (6%)	1 (10%)
AHI, n/h*	53 \pm 6	—
SaO ₂ < 90% (percentage of TST)*	31.4 \pm 5.9	1.5 \pm 0.5
SaO ₂ mean, %*	89.6 \pm 1.1	94.2 \pm 2.3
Lowest SaO ₂ , %*	65.6 \pm 3.7	87.0 \pm 3.8

Definition of abbreviations: AHI = apnea-hypopnea index; BMI = body mass index; SaO₂ = nocturnal oxygen saturation; TST = total sleep time; WBC = white blood cell.

* Values are means \pm SEM.

Polysomnographic Data

The patients with OSA had moderate to severe sleep-disordered breathing, with marked nocturnal oxygen desaturation and disturbed sleep architecture (Table 1). All patients were efficiently treated by nasal CPAP, with the mean pressure set at 10.0 ± 0.6 cm H₂O. The mean duration of the follow-up period was 4.8 ± 0.6 mo. Of the 10 patients who were reevaluated after that time, there was no significant change in BMI, blood pressure, or blood parameters except for one patient, who had lost weight.

All patients had regularly used their CPAP device (average usage time, 5.4 ± 0.5 h per night). They reported improvement of daytime sleepiness and did not suffer from serious side effects of CPAP therapy. In the patient who had lost weight the CPAP pressure was reduced by 2 cm H₂O, whereas in the remaining patients it was kept constant.

Superoxide Release before CPAP

The superoxide release in response to fMLP and A23 stimulation was lowest in the young healthy control group (3.7 ± 0.5 and 9.3 ± 1.5 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs, respectively). The other control group showed modestly higher superoxide levels (4.1 ± 0.6 and 12.0 ± 1.4 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs); however, these differences did not reach significance. In contrast, fMLP-stimulated superoxide release was markedly increased in the patients with untreated OSA when compared with both control groups (14.1 ± 1.5 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs, $p < 0.01$ for each comparison; multiplicative factor, 3.4–3.8; Figure 1A). O₂⁻ production after stimulation with A23 was also significantly elevated in OSA, but to a somewhat lesser extent (16.0 ± 1.1 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs, $p = 0.01$ when compared with control group 1 and $p = 0.05$ when compared with control group 2; multiplicative factor, 1.4–2.1; Figure 1B). The superoxide levels were not different between OSA patients with and without cardiovascular disease (fMLP, 13.6 ± 2.6 versus 14.1 ± 2.1 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs; A23, 16.4 ± 1.4 versus 15.9 ± 1.7 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs; data not shown).

The same was true for patients with and without hypercholesterolemia (fMLP, 13.8 ± 1.7 versus 15.0 ± 3.9 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs; A23, 16.4 ± 1.2 versus 16.0 ± 2.5 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs; data not shown). When looking at individual data, there was virtually no overlap between the OSA group and the control groups with regard to fMLP-elicited superoxide release (only two patients with OSA had O₂⁻ concentrations comparable to the highest levels measured in the control subjects). In contrast, superoxide release in response to A23 showed a significant overlap of single values between OSA and non-OSA patients. Superoxide levels in OSA were weakly correlated with the degree of nocturnal oxygen desaturation ($r = 0.42$) and the AHI ($r = 0.38$); however, this was not significant.

Superoxide Release after CPAP

After only two nights of CPAP therapy, superoxide release was reduced in almost all patients with OSA. When compared with the data obtained before CPAP initiation, superoxide generation in response to fMLP challenge was reduced by 43% (to 8.1 ± 1.5 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs, $p < 0.01$; Figure 2A) and to A23 challenge by 16% (to 13.7 ± 1.1 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs, $p = \text{NS}$; Figure 2B). At follow-up, the superoxide concentrations were further reduced to levels now comparable to those of both control groups (fMLP, 5.5 ± 0.6 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs; A23, 11.0 ± 2.3 nmol of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs). The average reduction in superoxide

concentrations with regard to the pre-CPAP values was 61% after fMLP ($p < 0.01$) and 33% after A23 ($p = 0.05$).

In two healthy volunteers, superoxide release was also measured after a night with CPAP set a pressure of 8 cm H₂O. In these subjects, no significant change in superoxide production was observed after CPAP application.

DISCUSSION

Among subjects with untreated OSA the release of superoxide from circulating neutrophils was markedly enhanced when compared with the control subjects. After only two nights of CPAP therapy superoxide release was significantly reduced in almost all patients with OSA. Continuous CPAP therapy even resulted in near-normal levels of superoxide release in the OSA patients with long-term follow-up.

Before discussing these observations, one might wonder why there was virtually no difference between superoxide levels in the control groups. First, this might be due to compartmentalized neutrophil activation in control group 2. Smoking, chronic bronchitis, and lung cancer will primarily lead to neutrophil activation within the airways and the lungs, which will not be evident when measuring superoxide release from circulating neutrophils (13–15). Second, when considering the impact of cardiovascular disease on superoxide generation from neutrophils, the activity of the disease process is of major im-

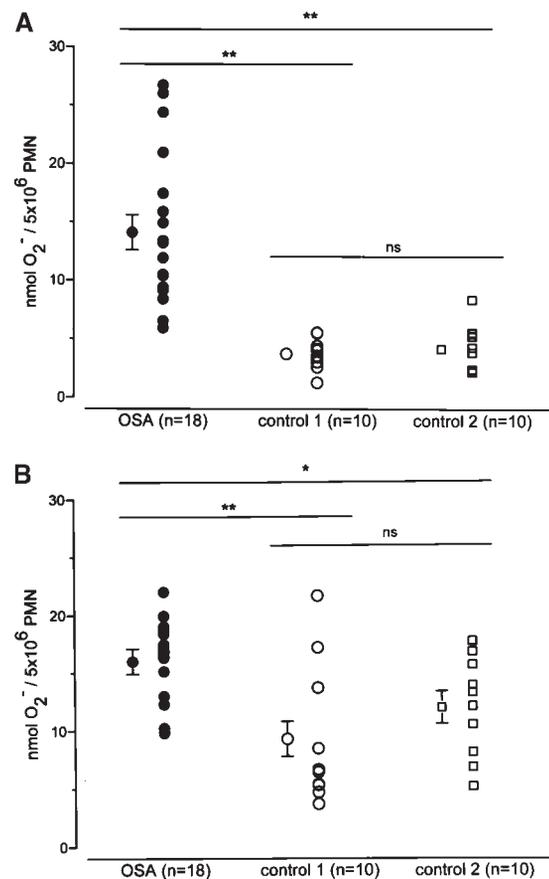


Figure 1. Superoxide release from polymorphonuclear neutrophils (expressed as nanomoles of O₂⁻ per 5×10^6 PMNs) after stimulation with fMLP (A) and A23 (B) in patients with untreated OSA (closed circles) and the control groups (control group 1: healthy volunteers, open circles; control group 2: patients without OSA, rectangles). All data are given as means \pm SEM and as individual values. The SEM is not depicted if it is so small that it would be obscured by the symbol representing the mean value. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ns, nonsignificant.

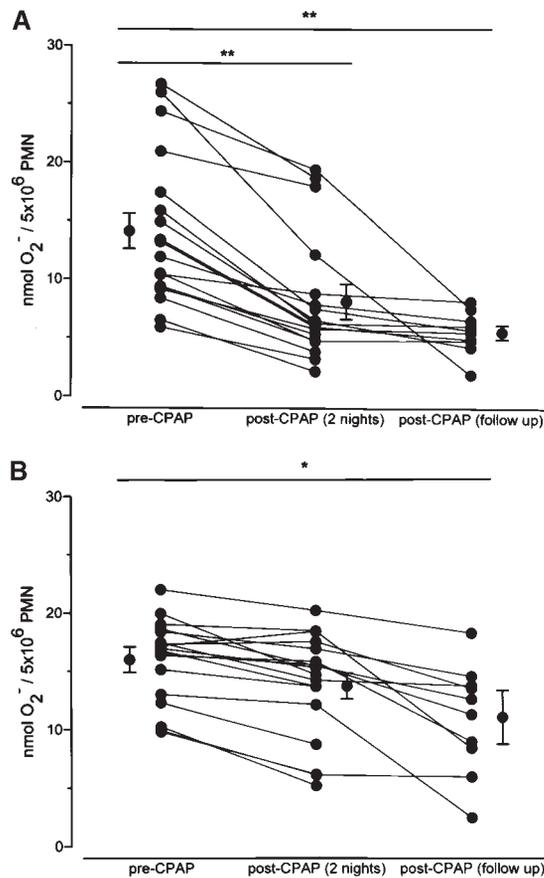


Figure 2. Superoxide release from polymorphonuclear neutrophils (expressed as nanomoles of O₂⁻ per 5 × 10⁶ PMNs) after stimulation with fMLP (A) and A23 (B) in 18 patients with OSA before and after two nights of CPAP therapy and in 10 patients at follow-up. All data are given as means ± SEM and as individual values. *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01.

portance. Only in unstable angina, myocardial infarction, and uncontrolled hypertension has the oxidative burst of blood neutrophils been found to be significantly enhanced (8, 9, 16, 17). If there is no persistent myocardial ischemia and if blood pressure is adequately regulated by antihypertensive drugs, as was the case for the patients of control group 2, intravascular oxidative stress can be expected to be low.

In comparison with both control groups, the patients with OSA were characterized by markedly enhanced neutrophil superoxide generation. This and the rapid decline in neutrophil superoxide release on onset of CPAP therapy clearly deny the view that differences in underlying morbidity might be responsible for the widely divergent superoxide production in non-OSA and OSA patients. A final argument for the validity of our results is the fact that, in contrast to the patients with OSA, CPAP therapy had no significant impact on superoxide release in two healthy volunteers undergoing a night of CPAP ventilation.

In contrast to our own findings, in the earlier study by Müns and coworkers the neutrophil oxidative burst was not increased in OSA (11). Apart from the already mentioned methodologic limitations of this study, it might be possible that a bias resulted from the time of blood sampling. Müns and colleagues did not state at which time they obtained the blood specimens. However, if blood was not withdrawn in the morning shortly after awakening, the oxidative burst might erroneously have been determined to lie in the normal range. In

our study measurements of superoxide release from neutrophils were carried out at 7:00 A.M. throughout, i.e., at a time when the cells had just been exposed to apnea-related hypoxemia.

In our opinion it is unlikely that the enhanced release of superoxide from circulating neutrophils is due to local activation of these cells in the upper airway mucosa of patients with OSA. First of all, there is no real mucosal inflammation in OSA but merely mechanical irritation, which presumably will not lead to activation of leukocytes. Furthermore, if neutrophil bursting occurs in the pharyngeal tissue this phenomenon will remain localized and not be evident when measuring release of radicals from cells derived from the systemic circulation.

The present study did not address the signaling events underlying the enhanced readiness of neutrophils from patients with OSA to respond with superoxide generation. It is interesting that the phenomenon was observed for both fMLP- and calcium ionophore challenge; however, the differences were more prominent for the ligand-mediated stimulation. This finding may suggest changes in the upstream signaling cascade in the neutrophils rather than changes in the leukocyte NADPH oxidase itself as underlying mechanism(s).

“Priming” of neutrophils is known to occur on *in vivo* and *in vitro* incubation with lipopolysaccharides or proinflammatory cytokines, resulting in enhanced responsiveness including respiratory burst to a second inflammatory challenge (18). We are not aware of any study addressing whether such priming might also be provoked by periodic changes in oxygen or carbon dioxide tensions, as occurs under conditions of OSA. The fact that superoxide concentrations were not significantly related to the degree of nocturnal oxygen desaturation argues against blood gas alterations as the primary triggers of superoxide generation in OSA. Alternatively, mediators secondarily arising in the patients with OSA might be involved in neutrophil priming. Two of these substances are tumor necrosis factor and interleukin 6, which are potent triggers of radical release from PMNs and that have been reported to be elevated in OSA (19, 20). Regardless of the mechanism(s) involved, the alteration of the leukocyte responsiveness does, however, clearly occur *in vivo* and is not “transported” by the plasma fraction in the blood sample, as the neutrophils were isolated from the other blood constituents before undergoing ionophore or fMLP challenge.

The presently observed neutrophil priming for an enhanced respiratory burst might well be related to pathophysiological sequelae occurring in patients with OSA. The increased superoxide release might induce the expression of vascular adhesion molecules, the proliferation of vascular smooth muscle cells, and the aggregation and activation of platelets (21–23). In addition, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol is oxidized under the influence of superoxide and incorporated into macrophages, thus forming foam cells (24). Finally, nitric oxide, the main vasodilator released from the endothelium, is broken down to peroxynitrite (25). All these events have been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis, known to take place with enhanced rapidity in OSA, and at least some of them have already been described in these patients (26–28).

CPAP therapy has been shown to have beneficial effects on long-term survival of patients with OSA (2). The rapid and long-lasting reduction in superoxide release from neutrophils after the institution of CPAP might constitute one mechanism through which this form of therapy prevents the development and progression of cardiovascular morbidity and mortality in OSA.

In conclusion, markedly enhanced readiness of neutrophils to respond with superoxide generation to different stimuli was noted in patients with OSA, rapidly reversible on onset of CPAP therapy. The exact mechanisms underlying such "priming" of neutrophils for enhanced respiratory burst under conditions of OSA remain to be further elucidated. However, this finding may be relevant to the increased cardiovascular morbidity observed in patients with OSA. Furthermore, CPAP therapy, by reducing this oxidative stress both in the short and long term, might prevent the emergence and progression of cardiovascular disease in OSA.

References

- Shepard, J. W. 1992. Hypertension, cardiac arrhythmias, myocardial infarction and stroke in relation to obstructive sleep apnea. *Clin. Chest Med.* 13:437-458.
- He, J., M. H. Kryger, F. J. Zorick, W. Conway, and T. Roth. 1988. Mortality and apnea index in obstructive sleep apnea (experience in 385 male patients). *Chest* 94:9-14.
- Wright, J., R. Johns, I. Watt, A. Melville, and T. Sheldon. 1997. The health effects of obstructive sleep apnoea and the effectiveness of treatment with continuous positive airways pressure: a systematic review of the research evidence. *Br. Med. J.* 314:851-860.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 344:721-724.
- Halliwell, B. 1993. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 23:118-126.
- Mügge, A. 1998. The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Z. Kardiol.* 87:851-864.
- Belch, J. J. 1994. The relationship between white blood cells and arterial disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 5:440-446.
- Korthuis, R. J., and D. N. Granger. 1993. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin. Cardiol.* 16:19-26.
- Valen, G., and J. Vaage. 1993. Toxic oxygen metabolites and leukocytes in reperfusion injury: a review. *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 41: 19-29.
- Dean, R. T., and I. Wilcox. 1993. Possible atherogenic effects of hypoxia during obstructive sleep apnea. *Sleep* 16:S15-S22.
- Müns, G., I. Rubinstein, and P. Singer. 1995. Phagocytosis and oxidative burst of granulocytes in the upper respiratory tract in chronic and acute inflammation. *J. Otolaryngol.* 24:105-110.
- Grimminger, F., K. Hattar, C. Papavassilis, B. Temmesfeld, E. Csernok, W. L. Gross, W. Seeger, and U. Sibelius. 1996. Neutrophil activation by anti-proteinase 3 antibodies in Wegener's granulomatosis: role of exogenous arachidonic acid and leukotriene B4 generation. *J. Exp. Med.* 184:1567-1572.
- Jay, M., S. Kojima, and M. N. Gillespie. 1986. Nicotine potentiates superoxide anion generation by human neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86:484-487.
- Repine, J. E., A. Bast, I. Lankhorst, and the Oxidative Stress Study Group. 1997. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:341-357.
- Jaruga, P., T. H. Zastawny, J. Skokowski, M. Dizdaroğlu, and R. Olinski. 1994. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett.* 341:59-64.
- Kumar, K. V., and U. N. Das. 1993. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic. Res. Commun.* 19:59-66.
- Sagar, S., I. J. Kallo, N. Kaul, N. K. Ganguly, and B. K. Sharma. 1992. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* 111:103-108.
- Jupin, C., M. Parant, and L. Chedid. 1989. Effect of muramyl peptides and tumor necrosis factor on oxidative responses of human blood phagocytes. *Immunol. Lett.* 22:187-192.
- Entzian, P., K. Linnemann, M. Schlaak, and P. Zabel. 1996. Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153:1080-1086.
- Vgontzas, A. N., D. A. Papanicolaou, E. O. Bixler, A. Kales, K. Tyson, and G. P. Chrousos. 1997. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:1313-1316.
- Fratlicelli, A., C. V. Serrano, Jr., B. S. Bochner, M. C. Capogrossi, and J. L. Zweier. 1996. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* 1310:251-259.
- Rao, G. N., and B. C. Berk. 1992. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ. Res.* 70:593-599.
- Iuliano, L., A. R. Colavita, R. Leo, D. Pratico, and F. Violi. 1997. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 999-1006.
- Rice-Evans, C., and R. Burdon. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.* 32:71-110.
- Darley-Usmar, V., H. Wiseman, and B. Halliwell. 1995. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 369:131-135.
- Ohga, E., T. Nagase, T. Tomita, S. Teramoto, T. Matsuse, H. Katayama, and Y. Ouchi. 1999. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *J. Appl. Physiol.* 87:10-14.
- Bokinsky, G., M. Miller, K. Ault, P. Husband, and J. Mitchell. 1995. Spontaneous platelet activation and aggregation during obstructive sleep apnea and its response to therapy with nasal continuous positive airway pressure. *Chest* 108:625-630.
- Schulz, R., D. Schmidt, K. Mayer, A. Blum, H. Olschewski, F. Grimminger, and W. Seeger. 1998. Plasma levels of NOx in obstructive sleep apnea before and after CPAP therapy (abstract). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:A777.