

A légúti és szisztémás gyulladás vizsgálata obstruktív alvási apnoében

Doktori értekezés

Dr. Kis Adrián

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Bikov András, Ph.D., klinikai szakorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Faludi Béla, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Torzsa Péter, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Cserháti Endre, MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Purebl György, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Vizi Éva, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2021

1 Bevezetés

Az obstruktív alvási apnoe (OSA) egy gyakori betegség, melyet alvás közben a felső légutak részleges, vagy teljes kollapszusa, ennek következtében létrejövő átmeneti légzéskimaradások (apnoe) jellemeznek. Az apnoe-k intermittáló hipoxiához és szén-dioxid retencióhoz vezetnek, valamint ébredést (arousal) provokálnak. OSA-ban az apnoe és ébredés váltakozása miatt a szervezetben végbemenő biológiai folyamatokban is megfigyelhető cirkadián ritmus felborul, ami hosszabb távon fennmaradva fokozza a szív- és érrendszeri, a metabolikus és a kognitív betegségek kialakulásának és progressziójának kockázatát. Ennek hátterében feltehetően részben a hipoxiás és reoxigenizációs epizódok által a sejtekben kiváltott oxidatív stressz, részben a közvetlenül, valamint közvetett hatások által beindított gyulladáshoz vezető kaszkád és citokin termelés állhat. Ezek a reakciók lokálisan és szisztémásan egyaránt megfigyelhetőek. Ebből kifolyólag a légúti és szisztémás gyulladás pontos megértése OSA-ban kritikus jelentőséggel bír, hiszen ezek a tényezők hozzájárulnak a társbetegségek kialakulásához. Mindezek miatt a PhD munkám során a légúti (kilégzett szén-monoxid) és a szisztémás (keringő survivin és mikrovezikulák) gyulladás szerepét vizsgáltam.

2 Célkitűzések

1. A kilégzett szén-monoxid (eCO) vizsgálata esti és reggeli időpontokban a nem dohányos OSA-s betegek és krónikus légúti betegségben nem szenvedő kontroll populáció körében.
2. A plazma mikrovezikulák (MV) szintjének napi változásának elemzése OSA-ban szenvedő betegeknél és kontroll alanyoknál.
3. A plazma survivin szintjének vizsgálata OSA-s betegek körében, kiegészítve annak éjszakai változásaival és a kapott eredmények összehasonlítása a betegség súlyosságával.

3 Módszerek

3.1 A vizsgálati protokollok

A kilégzett szén-monoxid szintjének mérését célzó vizsgálatunkba 159 önkéntest vontunk be, akik OSA alapos gyanújával érkeztek a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikájára, és korábban semmilyen terápiában nem részesültek, krónikus légúti betegségük korábról ismert volt. Felvettük a résztvevők anamnéziséjét és dohányzási szokásait, kitöltötték az Epworth álomossági skálát és a felügyelt alvásvizsgálat előtt este és után másnap reggel megmértük a kilégzett szén-monoxid szintjüket.

A mikrovezikulák szintjében bekövetkező változások vizsgálatához 18 OSA-s és 9 egészséges egyént vontunk be a vizsgálatba. Az alvási apnoe diagnózisát teljes éjszakás, felügyelt polyszomnografiával (PSG)

állapítottuk meg, a résztvevők egyike sem használt pozitív légúti nyomást biztosító terápiás készüléket. Minden résztvevőtől esetén 5 előre meghatározott időpontban vénás vért vettünk, valamint elvégeztük náluk a felügyelt alvásvizsgálatot.

A survivin szintet 45 OSA-s és 31 kontroll betegben mértük. A résztvevőknél anamnézis felvételt, vérnyomás mérést, valamint a felügyelt alvásvizsgálat előtt este és után reggel vénás vérvételt végeztünk a plazma survivin szintjének meghatározásához. A diagnózis frissen került megállapításra, az apnoe-hipopnoe index (AHI) alapján enyhe, közepes és súlyos OSA csoportokat hoztunk létre, és a betegeket a testtömeg index alapján elhízott és nem elhízott csoportra osztottuk.

3.2 Alvásvizsgálatok

A vizsgálatainkban résztvevők este 9 és reggel 6 óra között felügyelt alvásvizsgálaton estek át az alvás alatti légzészavar pontos típusának és súlyosságának megállapítása céljából. A diagnózishoz a kilégzett szén-monoxid szintjének vizsgálatánál kardiorespiratorikus poligráfiát (Somnoscreen Plus Tele RC, Somnomedics GMBH Németország) a mikrovezikulák és a survivin plazmaszintjének vizsgálata során polyszomnográfát (Somnoscreen Plus Tele PSG Somnomedics GmbH, Németország) használtunk, minden esetben a vonatkozó irányelveknek megfelelően. A kardiopulmonalis eseményeket manuálisan értékeltük az Amerikai Alvástársaság (AASM) irányelve alapján. A rögzített adatok alapján az AHI-t, az oxigén deszaturációs indexet (ODI), a légzészavar indexet (RDI), a teljes alvási időt (TST), az alvásperiódust (SPT), a TST90% -ot, a minimális szaturációt (minSat) és az aurosal indexet (AI) használtuk az OSA súlyosságának megállapításához.

3.3 Kilégzett szén-monoxid mérése

A kilégzett szén-monoxidot egy kereskedelemben kapható eszközzel (Pico Smokerlyzer, Bedfont Scientific Ltd., Egyesült Királyság), a gyártó előírásaival megegyezően mértük. A vizsgálatban résztvevő alanyok mély lélegzetvételt követően 15 másodpercig visszatartották a lélegzetüket, majd egyenletes sebességgel a készülékbe lélegeztek. A műszer meghatározta a kilégzett szén-monoxid szintet, valamint megbecsülte a vér karboxihemoglobin százalékos arányát. Az eredményeink kiértékeléséhez csak a kilégzett szén-monoxid adatokat használtuk fel.

3.4 A mikrovezikulák mérése

A vizsgálat során vett vérmintákat azok levételét követően azonnal feldolgoztuk. Centrifugálással vérlemezke-mentes plazmát (PFP) hoztunk létre, amit aliquotokra osztottuk és -80°C -on tároltuk. A mintákat kiolvasztást követően foszfáttal pufferolt sóoldatban (1:500) hígítottuk és a különböző sejt eredetű MV-k azonosítására fluorokró-m-konjugált monoklonális antitestekkel festettük, végül FACSCalibur flow citométer (BD Biosciences, San Jose, USA) alkalmazásával vizsgáltuk.

Az abszolút MV-szám meghatározásához PKH26 referencia mikrogyöngyöket (Sigma–Az Aldrich Co., St. Louis, USA) használtunk. A háttér fluoreszcenciát az izotípus-kontroll antitesthez hasonlítottuk. Minden antitest a BD Biosciences Pharmingen-től (San Jose, CA, USA) származott.

3.5 Plazma survivin mérések

A plazma survivin szinteket meghatározásához a mintákat a vérvételt követően 2 órán belül feldolgoztuk, majd centrifugáltuk. A plazmát elválasztottuk és $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A survivin mérésére kereskedelmiileg beszerezhető ELISA kiteket (DSV00, R&D Systems, Abingdon, Egyesült Királyság) használtunk. A plazma survivin szintjét duplikátumban mértük, ezek átlagát használtuk.

3.6 Statisztikai elemzések

Vizsgálatainkban a statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, US) programmal végeztük.

A kilégzett szén-monoxid szint mérésekor az adatok normalitását a Kolmogorov-Smirnov teszttel elemeztük. A klinikai jellemzőket az ANOVA és a post-hoc Bonferroni tesztekkel, míg a csoportokat a chi-négyzet és Fisher tesztekkel hasonlítottuk össze. A kilégzett szén-monoxid szintet Mann-Whitney és Wilcoxon (párosított, nem parametrikus) tesztekkel hasonlítottuk össze, a csoportok tekintetében a Kruskal-Wallis és Dunns post hoc tesztekkel használtuk. A kilégzett szén-monoxid és a klinikai változók közötti kapcsolat felmérésére a Spearman-tesztet alkalmaztuk.

A mikrovezikulák szintjének vizsgálatánál a csoporton belüli változásokat ismételt méréses ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel elemeztük. A mikrovezikulák napi változásainak csoportok közötti összehasonlítására kétirányú ANOVA tesztet, az egyes időpontokban kapott eredmények összehasonlításához ez követően végzett Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk. A mikrovezikulák koncentrációit az idő

függvényében fejeztük ki, és minden egyes alanyra kiszámítottuk a görbe alatti területeket a koncentráció-idő görbe (AUC) vonatkozásában. A napi variabilitás mértéke/nagysága és az OSA súlyossága közötti kapcsolat értékeléséhez az AUC értékeket korreláltattuk a PSG során regisztrált klinikai változókkal.

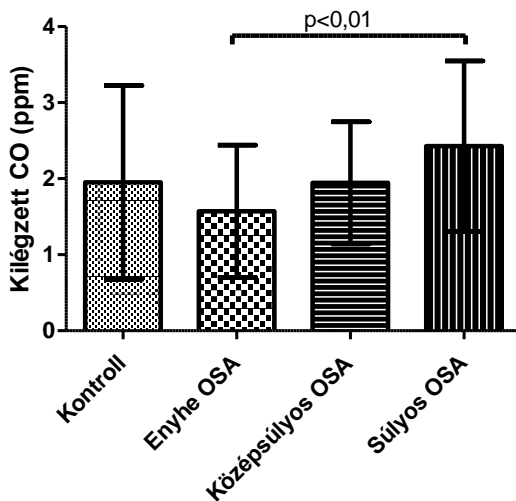
A plazma survivin szint meghatározásakor az adatok normalitását Kolmogorov-Smirnov teszttel értékeltük. A klinikai jellemzőket az OSA és a kontrollcsoport között t-teszt, Mann-Whitney és a chi-négyzet teszttel hasonlítottuk össze. A plazma survivin szintjének összehasonlítását a két csoport között minden időpontban Mann-Whitney teszttel végeztük, a plazma survivin szint esti és reggeli változásaihoz Wilcoxon tesztet használtunk. A survivin koncentráció és a klinikai, demográfiai változók korrelációját Spearman-teszttel vizsgáltuk. A Kruskal-Wallis tesztet követően alkalmazott Dunn tesztet használtuk a plazma survivin szintek összehasonlításához az OSA súlyosság függvényében. Az elhízott és nem elhízott OSA-csoportban a plazma survivin koncentrációit a nem elhízott kontrollokéval Kruskal-Wallis-tesztet követő Dunn-teszttel hasonlítottuk össze. A hipoxiás és nem-hipoxiás OSA alcsoportokat Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze.

4 Eredmények

4.1 A kilégzett szén-monoxid szintek összevetése a nem dohányos OSA és a kontroll csoport résztvevőiben

Nem találtunk különbséget az eCO-szintekben a nem dohányos OSA és a kontroll csoport résztvevői között

2. ábra. A kilégzett szén-monoxid szintek az OSA súlyossága szerint.

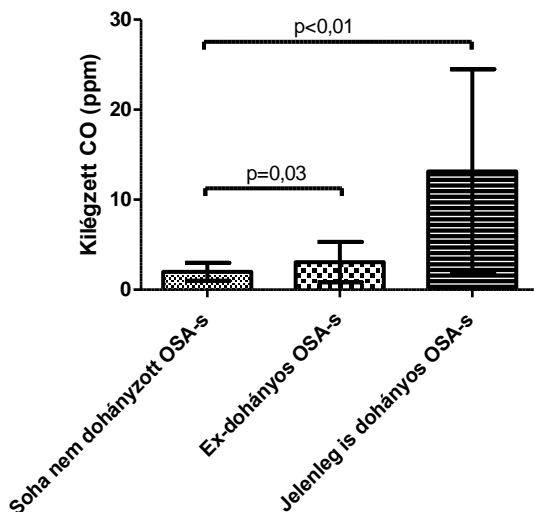


Az ábrán az este mért kilégzett CO-szinteket az átlag \pm SD érték szerint ábrázoltuk.

4.2 Az eCO-szintek összehasonlítása nem dohányos, ex-dohányos és aktív dohányos OSA-s betegekben

A nem dohányos OSA-s betegekhez hasonlítva szignifikánsan magasabbnak találtuk az este mért eCO szintet az ex-dohányosokban és az aktív dohányosokban (3. ábra).

3. ábra. A kilégzett szén-monoxid szintek a nem dohányos, ex-dohányos és aktív dohányos OSA-s résztvevőkben.

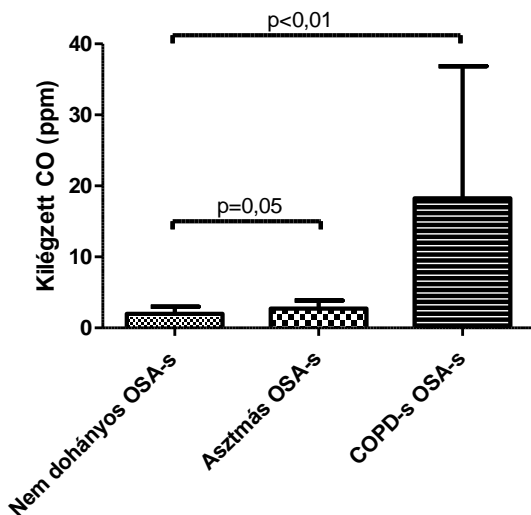


Az ábrán az esti kilégzett CO-szint átlag \pm SD értékét jelenítettük meg.

4.3 A krónikus légúti betegségben szenvedő, illetve nem szenvedő OSA-s betegek eredményeinek összehasonlítása

Az asztmás és OSA-s betegek esti eCO-szintje tendenciájában magasabb volt a nem dohányos OSA-s betegekhez képest. A COPD-ben szenvedő OSA-s betegek eCO-szintje mind este, mind reggel magasabb volt a nem dohányos OSA-s csoporthoz viszonyítva (4. ábra).

4. ábra. A kilégzett szén-monoxid szint kapcsolata a krónikus légúti betegséggel.

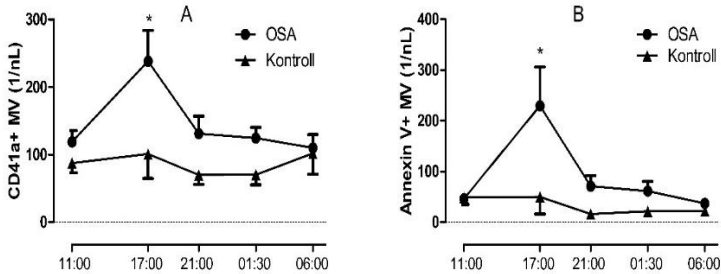


Az ábrán az esti kilégzett CO-szintek átlag \pm SD értékét jelenítettük meg.

4.4 A keringő mikrovezikulák diurnális változásai a különböző csoportokban

A CD41+ és az Annexin V+ MV értékek szignifikáns változást mutattak OSA-ban (mindkét esetben $p < 0,01$) a kontroll csoporthoz képest ($p = 0,65$ és $p = 0,47$). Az OSA-s betegekben a többi mérési időponthoz viszonyítva mind a CD41+, mind az Annexin V+ MV szint 17: 00-kor volt szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb (5. ábra).

5. ábra. A CD41+ (A) és az Annexin V+ (B) mikrovezikulák diurnális változása OSA-s betegekben, illetve egészséges egyéneknél.

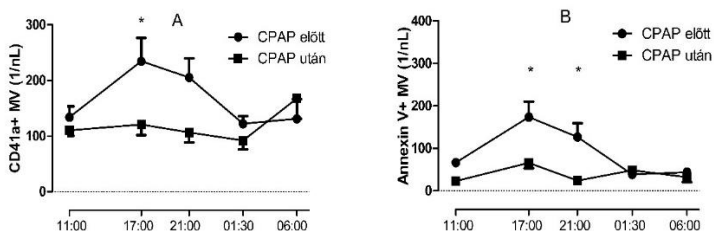


*: $p < 0,05$ vs. kontroll. Az ábrán az adatokat átlag \pm SEM-ben jelenítettük meg.

4.5 A CPAP kezelés hatása a keringő mikrovezikulákra

Két hónapos CPAP kezelést követően a CD41+ és az Annexin V+ MV-k diurnális változása mérséklődött a 2 hónapos CPAP-kezelést követően. A kezeltlen OSA-s betegekben 17 órakor megfigyelt mikrovezikula csúcs szignifikánsan csökkent 2 hónapos CPAP-terápia hatására (CD41+ és az Annexin V+ MV-k esetén egyaránt $p < 0,05$, 6. ábra).

6. ábra. A CPAP kezelés hatása a CD41+ (A) és az Annexin V+ (B) mikrovezikulák diurnális változására OSA-ban szenvedő betegekben.

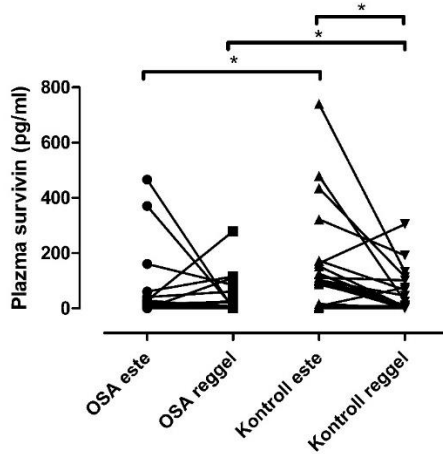


*: $p < 0,05$ CPAP előtt vs. CPAP után. Az ábrán az adatokat átlag \pm SEM-ben jelenítettük meg.

4.6 A plazma survivin szintek csoportok közötti összehasonlítása és korrelációja a klinikai változókkal

Az OSA-s csoportban alacsonyabb plazma survivin szintet találtunk mind este ($p < 0,01$), mind reggel ($p = 0,02$) a kontroll csoporthoz hasonlítva. Az OSA-s betegekben estétől reggelig nem következett be változás a plazma survivin koncentrációban ($p = 0,79$), szemben a kontrollokban reggel tapasztalt csökkent szintekkel. ($p < 0,01$, 7. ábra).

7. ábra. A plazma survivin szintje este és reggel OSA-ban és a kontroll csoportban.

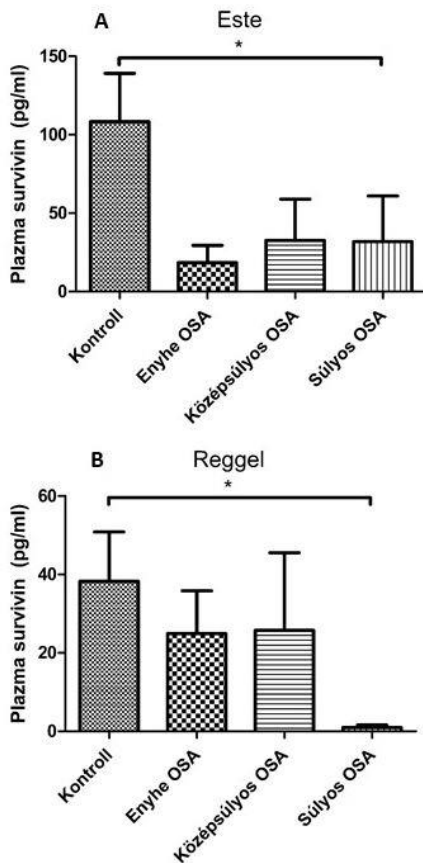


A plazma survivin koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt az OSA-ban este (* $p < 0,05$) és reggel (* $p < 0,05$). A plazma survivin szintje estétől reggelig szignifikánsan csökkent a kontroll csoportban (* $p < 0,05$), miközben OSA fennállása esetén nem változott ($p = 0,79$).

4.7 A plazma survivin szintje az OSA súlyossága függvényében

Szignifikáns különbséget találtunk a súlyos OSA als csoport és a kontroll csoport survivin koncentráció között. ($p < 0,05$ mindkét időpontban, 8.ábra).

8. ábra. A plazma survivin szintje és az OSA súlyosságának kapcsolata.

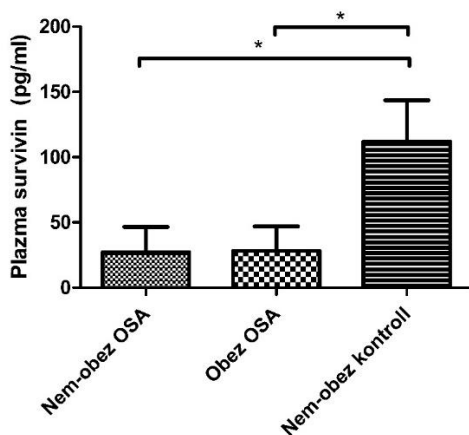


Szignifikáns különbség volt a plazma survivin szintjeiben a vizsgálatban résztvevők négy alcsoportja között este ($p = 0,01$, A panel) és reggel ($p = 0,04$, B panel), illetve szignifikáns különbség mutatható ki a súlyos OSA-s betegek és a kontroll csoportok között (* mind $p < 0,05$).

4.8 Az elhízás hatása

A kontroll csoporthoz viszonyítva mind a nem elhízott, mind az elhízott OSA-s betegek plazma survivin szintje alacsonyabb volt (mindkettő $p < 0,05$), míg nem volt különbség az elhízott és nem elhízott OSA-s betegek tekintetében ($p > 0,05$, 9. ábra).

9. ábra. A plazma survivin szintje az elhízott és nem elhízott OSA-s, valamint a és a kontroll csoportban.



Szignifikánsan magasabb volt a plazma survivin koncentráció a nem elhízott kontroll csoport résztvevőiben a nem elhízott és az elhízott OSA-s betegekhez képest (* mindkettő $p < 0,05$), miközben nem mutatható ki különbség a két OSA-s (nem elhízott vs. elhízott) betegcsoport között ($p > 0,05$).

5 Következtetések

5.1 Kilégzett szén-monoxid szintek obstruktív alvási apnoeaban

- A kilégzett szén-monoxid súlyos OSA-ban szenvedő betegekben megemelkedik
- A potenciális napszaki változások miatt a kilégzett szénmonoxid mérések időpontját standardizálni kell.

5.2 A plazma mikrovezikulák szintjének napszaki változása és az obstruktív alvási apnoe súlyossága közötti összefüggés

- Jelentős napi ingadozást tapasztalható a vérlemezke eredetű és az Annexin V+ MV-k esetében, 17 órai csúccsal.
- A diurnális ingadozás mértéke összefügg az OSA súlyosságával és CPAP kezelés hatására mérséklődik.
- A potenciális napszaki változások miatt a mikrovezikula mérések időpontját standardizálni kell

5.3 A plazma survivin szintje obstruktív alvási apnoeaban

- Obstruktív alvási apnoeaban csökken a plazma survivin szintje, ami összefüggést mutat a betegség súlyosságával.
- A plazma survivin csökkenését magas CRP érték kíséri, ami együttesen a gyulladás fokozódására utal.

6 Saját publikációk jegyzéke

6.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. **Kis A.**, Meszaros M., Tarnoki DL., Tarnoki AD., Lazar Zs., Horvath P., Kunos L., Bikov A. (2019) Exhaled carbon monoxide levels in obstructive sleep apnoea. JOURNAL OF BREATH RESEARCH 13(3):036012

Impakt faktor: 2,929

2. Bikov A., Kunos L., Pallinger E., Lazar Zs., **Kis A.**, Horvath G., Losonczy G., Komlosi ZI. (2017) Diurnal variation of circulating microvesicles is associated with the severity of obstructive sleep apnea. SLEEP AND BREATHING 21(3):595-600.

Impakt faktor: 2,162

3. Kunos L., Horvath P., **Kis A.**, Tarnoki DL., Tarnoki AD., Lazar Zs., Bikov A. (2018) Circulating Survivin Levels in Obstructive Sleep Apnoea. LUNG 196(4): 417-424

Impakt faktor: 1,817

6.2 Disszertációtól független publikációk, könyvfejezetek és összefoglaló közlemények

1. Meszaros, M., Horvath, P., **Kis, A.**, Kunos, L., Tarnoki, AD., Tarnoki, DL., Lazar, Zs., Bikov, A. (2021) Circulating levels of clusterin and complement factor H in patients with obstructive sleep apnea. BIOMARKERS IN MEDICINE 15:5 pp. 323-330.

Impakt faktor: 2,479

2. Meszaros, M., **Kis, A.**, Kunos, L., Tarnoki, AD., Tarnoki, DL., Lazar, Zs., Bikov, A. (2020) The role of hyaluronic acid and hyaluronidase-1 in

obstructive sleep apnoea. SCIENTIFIC REPORTS 10:1 Paper: 19484.

Impakt faktor: 3,998

3. **Kis A.**, Eszes N., Tamasi L., Losonczy Gy., Csekeo A., Csomor J., Muller V. (2013) Sarcoidosis lymphoma syndrome – the value of PET-CT in the diagnosis. WORLD JOURNAL OF SURGERY ONCOLOGY 11:235.

Impakt faktor: 1,963

4. Kosa JP., **Kis A.**, Bacsi K., Balla B., Nagy Zs., Takacs I., Speer G., Lakatos P. (2011) The protective role of bone morphogenetic protein-8 in the glucocorticoid-induced apoptosis on bone cells. BONE 48(5):1052-7.

Impakt faktor: 4,147

5. **Kis A.**, Sutto Z., Tamasi L., Eszes N., Losonczy Gy., Mathe Zs., Langer R., Nemeth A. and Muller V. (2010) Spontaneous Pneumomediastinum After Kidney Transplantation: Case Report. TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 42:2350-2352.

Impact faktor: 0,784

6. Kiss J., Balla B., Kosa JP., Borsy A., Podani J., Takacs I., Lazary A., Nagy Zs., Bacsi K., **Kis A.**, Szlavay E., Szendroi M., Speer G., Orosz L. and Lakatos P. (2010) Gene expression patterns in the bone tissue of women with fibrous dysplasia. AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART A. 152A(9):2211-2220.

Impakt faktor: 2,125

7. Bacsi K., Kosa JP., Lazary A., Balla B., Horvath H., **Kis A.**, Nagy Zs., Takacs I., Lakatos P., Speer G. (2009) LCT 13910 C/T polymorphism, serum calcium, and bone mineral density in

postmenopausal women. *OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL* 20:639-45.

Impakt faktor: 3,864

8. Kim, MD., Baumlin, N., Dennis, JS., Yoshida, M., **Kis, A.**, Aguiar, C., Schmid, A., Mendes, E., Salathe, M. (2021) Losartan reduces cigarette smoke-induced airway inflammation and mucus hypersecretion. *ERJ OPEN RESEARCH* 7(1):00394-2020.
9. Meszaros, M., **Kis, A.**, Horvath, G. (2020) Alvásdiagnosztika. *ORVOSKÉPZÉS* 91:4 pp. 642-648.
10. Bohacs, A., Eszes, N., Kovats, Zs., Nagy, A., **Kis, A.**, Halasz, A., Csiszer, E., Schonauer, N., Toth, K., Madurka, I., Elek, J., Gieszer, B., Farkas, A., Radeczky, P., Bogyo, L., Renyi-Vamos, F., Lang, Gy., Kovacs, L., Muller, V. (2019) Tüdőtranszplantáció cystás fibrosisban (hazai tapasztalatok). *MUCOVISCIDOSIS HUNGARICA* 5:1 pp. 272-277.
11. Bohacs, A., Eszes, N., Kovats, Zs., Csiszer, E., Vincze, K., Lázár, Zs., Nagy, A., **Kis, A.**, et al. (2019) Tüdőtranszplantáció: fókuszban a betegek utógondozása. *ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE* 26:7-8 pp. 25-30.
12. Kis-Velicsek, A., Bohacs, A., **Kis, A.**, Vincze, K., Losonczy, Gy., Mathe, Cs., Muller, V. (2019) Tüdőtranszplantált betegek műtétet követő pulmonológiai fizioterápiás ellátása a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikán. *FIZIOTERÁPIA* 28:2 pp. 9-13.
13. **Kis A.**, Krick S., Baumlin N., Salathe M. (2016) Airway Hydration, Apical K(+) Secretion, and the Large-Conductance, Ca(2+)-activated and

Voltage-dependent Potassium (BK) Channel.
ANNALS OF THE AMERICAN THORACIC
SOCIETY 13(Suppl 2):S163-8.

14. Kis, A., Toth, L.A., Marton, D., Filip, D., Amitai, D., Goldstein, H., Vasas, Sz., Horvath, G. (2014) Inhalációs gyógyszerek hatásai a légúti érrendszerre. *MEDICINA THORACALIS* 67:4 pp. 281-286.
15. Mathe, Cs., **Kis, A.**, Csoosza, Gy., Szondy, K., Losonczy, Gy. (2012) Cisplatin nephrotoxicitás megelőzése fiziológiás sóoldat infúziójával. *MEDICINA THORACALIS* 65:3 pp. 183-184.
16. Toth, L.A., **Kis, A.**, Vasas, Sz., Horvath, G., Losonczy, Gy. (2012) Corticosteroidok akut légúti hatásai: újabb eredmények a laboratóriumi vizsgálatoktól a klinikai tapasztalatokig. *MEDICINA THORACALIS* 65:2 pp. 75-84.
17. Orosz, M., Galffy, G., **Kis, A.**, Agh, T., Meszaros, A., Kovacs, D. (2010) A COPD-s és asztmás betegek terápiás együttműködése. *MEDICINA THORACALIS* 63:6 pp. 412-417.