Aus der

Medizinischen Klinik und Poliklinik V

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Retikulierte Thrombozyten als neuer Biomarker bei obstruktiver Schlafapnoe

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dorian Manuel Kern

aus
Wuppertal

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten:	Priv. Doz. Dr. Tobias Petzold
Zweites Gutachten:	Prof. Dr. Amanda Tufman
Drittes Gutachten:	Priv. Doz. Dr. Lisa Gross
weitere Gutachten:	

Promovierte Mitbetreuerin:	Dr. Pontus Mertsch, Prof. Dr. Katrin Milger-Kneidinger
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2024

Zusammenfassung

Obstruktive Schlafapnoe (OSA) ist ein häufiges Krankheitsbild, das mit einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität sowie einer Erhöhung des Risikos für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen einhergeht. Der Goldstandard zur Diagnose von OSA ist die Polysomnographie, doch deren begrenzte Verfügbarkeit trägt zur ausgeprägten Unterdiagnostizierung der Krankheit bei. Das Ziel dieser Dissertation ist die Erforschung von Zusammenhängen zwischen OSA und retikulierten Thrombozyten (*reticulated platelets*, RP), zellkernlosen Vorformen der reifen Thrombozyten mit residualer RNA. Während bereits unterschiedliche Einflüsse von OSA auf Thrombozyten bekannt sind, wurde eine Untersuchung des RP-Anteils bei OSA-Erkrankten zuvor nicht beschrieben. Retikulierte Thrombozyten kommen zusätzlich als Biomarker zur Ergänzung der OSA-Diagnostik in Frage. 78 Studienteilnehmende dieser Fall-Kontroll-Studie der Schlafambulanz des LMU-Klinikums München wurden anhand des Apopnoe-Hypopnoe-Index (AHI) einer Experimentalgruppe aus 63 OSA-Erkrankten und einer Kontrollgruppe aus 15 Gesunden zugeteilt. Daraufhin wurden die retikulierten Thrombozyten mithilfe von Thiazol-Orange (TO) und anti-CD-41-Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die OSA-Kennwerte AHI und DI (Desaturationsindex) korrelieren mit dem prozentualen Anteil der RP (AHI: r = 0,698**; DI: r = 0,545**) sowie den absoluten RP-Werten (AHI: r = 0,520**, DI: r = 0,487**). OSA-Erkrankte wiesen signifikant höhere prozentuale (Median = 17,20%, *IQA* = 7,50%) und absolute RP-Werte (Median = 39.980/µl, *IQA* = 20.420/µl) auf als gesunde Personen der Kontrollgruppe (Median = 8,56%, *IQA* = 7,37%; Median = 18.800/µl, *IQA* = 26.600/µl). Es wurde ein Cut-off-Wert von 12,7% für den Anteil der retikulierten Thrombozyten als Biomarker für OSA ermittelt, welcher mit einer Sensitivität von 84,1% und einer Spezifität von 80,0% einhergeht. Wichtige Limitationen der Studie bestanden in der geringen Anzahl an gesunden Kontrollpersonen und der unzureichenden Standardisierung der RP-Bestimmung in der Durchflusszytometrie. Vor einem klinischen Einsatz sind weitere Studien notwendig, die den Einsatz dieses Biomarkers in Populationen mit einer geringeren OSA-Prävalenz prüfen. Der erstmals beobachtete Anstieg des Anteils thrombogener, unreifer Thrombozyten gibt weitere Einsichten in die pathophysiologische Rolle von Thrombozyten bei OSA und der Entstehung kardiovaskulärer Folgeerkrankungen.

Abstract

Obstructive sleep apnea (OSA) is a common condition associated with a significant reduction in quality of life as well as an increased risk of developing cardiovascular disease. The gold standard for diagnosing OSA is polysomnography, but its limited availability contributes to the severe underdiagnosis of the disease. The aim of this dissertation is to investigate the relationship between OSA and reticulated platelets (RP), immature platelets with residual RNA. While various effects of OSA on thrombocytes are already known, an increased proportion of RP in OSA patients has not been previously described. Additionally, reticulated platelets may be a potential biomarker to improve diagnosis of OSA prior to performing polysomnography. 78 study participants of this case-control study of the sleep clinic of the LMU Klinikum Munich were assigned to an experimental group of 63 OSA patients and a control group of 15 healthy subjects based on the apopnea-hypopnea index (AHI). Subsequently, reticulated platelets were stained using thiazole orange (TO) and anti-CD-41 antibodies and determined by flow cytometry. OSA indices AHI and DI (desaturation index) correlated with the percentage of RP (AHI: r = 0.698**; DI: r = 0.545**) and absolute RP levels (AHI: r = 0.520**, DI: r = 0.487**). OSA patients showed significantly higher percentages of RP (median = 17.20%, IQR = 7.50%) as well as absolute RP values (median = 39,980/µl, IQR = 20,420/µl) than healthy subjects in the control group (median = 8.56%, IQR = 7.37%; median = 18,800/µl, IQR = 26,600/µl). A cut-off value of 12.7% for the percentage of reticulated platelets as a biomarker for OSA was determined, which was associated with a sensitivity of 84.1% and a specificity of 80.0% for OSA. Important limitations of the study were the small number of healthy control subjects and the insufficient standardization of RP determination in flow cytometry. Further studies testing the use of this biomarker in populations with lower OSA prevalence are needed before clinical use can be considered. The increase in the proportion of thrombogenic immature platelets observed for the first time provides further insight into the pathophysiological role of platelets in OSA and the development of cardiovascular sequelae.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **1**

Abstract **2**

Inhaltsverzeichnis **3**

Abbildungsverzeichnis **5**

Tabellenverzeichnis **6**

Abkürzungsverzeichnis **7**

1. Einleitung **1**

1.1 Obstruktive Schlafapnoe (OSA) 1

1.2 Retikulierte Thrombozyten: Entstehung und Bedeutung 8

1.3 OSA und retikulierte Thrombozyten – Relevanz und Plausibilität 11

1.4 Zielsetzung der Dissertation 13

2. Material und Methoden **15**

2.1 Studienkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien 15

2.2 Ethik und Einwilligung 16

2.3 Anamnese und klinische Untersuchung 16

2.4 Auswertung der Fragebögen 16

2.5 Polygraphie und Polysomnographie 17

2.6 Studiendesign und Studienprotokoll 18

2.7 Blutentnahme und Transport 20

2.8 Materialien und experimentelle Methoden 21

2.9 Vorbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie 22

2.10 Durchflusszytometrie: Methoden und Gating-Strategie 22

2.11 Statistische Methoden 24

3. Ergebnisse **28**

3.1 Beschreibung der Studienpopulation 28

3.2 Ergebnisse der schlafmedizinischen Untersuchungen und Blutwerte 34

3.3 Zusammenhänge zwischen OSA und retikulierten Thrombozyten (Hypothese 1) 41

3.4 OSA-Erkrankte weisen höhere RP-Werte als Gesunde auf (Hypothese 2) 44

3.5 Vergleich der retikulierten Thrombozyten bei unterschiedlichen OSA-Schweregraden 45

3.6 Identifikation möglicher Einflussfaktoren auf RP-Werte 46

3.7 Bestimmung eines optimalen Cut-off-Wertes 47

4. Diskussion 50

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 50

4.2 Diskussion der Methoden 50

4.3 Diskussion der Ergebnisse 54

4.4 Sind retikulierte Thrombozyten als Biomarker für OSA geeignet? 60

Literaturverzeichnis 67

Affidavit 79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die Rolle von oxidativem Stress bei obstruktiver Schlafapnoe	*6*
Abbildung 2	Transmissionselektronenmikroskopie von nicht-retikulierten und retikulierten Thrombozyten	*9*
Abbildung 3	Zuordnung der Studienteilnehmenden zur Experimentalgruppe bzw. Kontrollgruppe	*20*
Abbildung 4	Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Darstellung von retikulierten Thrombozyten	*24*
Abbildung 5	Ergebnisse des ESS-Fragebogens	*30*
Abbildung 6	Ergebnisse des aktualisierten STOP-BANG-Fragebogen	*31*
Abbildung 7	Kardiovaskuläre Risikofaktoren in der Studienpopulation	*32*
Abbildung 8	Komorbiditäten in der Studienpopulation	*34*
Abbildung 9	Verteilung des Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) in der Studienpopulation	*36*
Abbildung 10	Aufteilung der OSA-Erkrankte in 3 Schweregrade	*37*
Abbildung 11	Verteilung des Desaturationsindex (DI) in der Studienpopulation	*38*
Abbildung 12	Verteilung der der retikulierten Thrombozyten in der Studienpopulation	*39*
Abbildung 13	Abhängigkeit der RP-Werte vom Apopnoe-Hypopnoe-Index	*42*
Abbildung 14	Abhängigkeit der RP-Werte vom Desaturationsindex	*43*
Abbildung 15	Vergleich der retikulierten Thrombozyten in Kontroll- und Experimenta/gruppe	*45*

Abbildung 16	Vergleich der retikulierten Thrombozyten innerhalb der 3 OSA-Schweregrade	*46*
Abbildung 17	ROC-Kurve für die Prädiktion von OSA durch die prozentualen RP-Werte	*47*
Abbildung 18	ROC-Kurve für die Prädiktion von OSA durch die absoluten RP-Werte	*48*
Abbildung 19	Mechanismen der Aktivierung von Thrombozyten bei OSA	*57*

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Klinische Studien zu Einsatzgebieten der retikulierten Thrombozyten	*11*
Tabelle 2	Materialien, Geräte und Software	*21*
Tabelle 3	Soziodemographische und klinische Daten	*29*
Tabelle 4	Nächtliche Atemwerte und Blutwerte	*35*
Tabelle 5	Korrelationen zwischen den nächtlichen Atemwerten und den retikulierten Thrombozyten	*41*
Tabelle 6	Vergleich zwischen retikulierten Thrombozyten und anderen beispielhaften Biomarkern	*63*

Abkürzungsverzeichnis

AHI	Apopnoe-Hypopnoe-Index
AUC	*Area under the curve*
BMI	Body-Mass-Index
COPD	*Chronic obstructive pulmonary disease*
CPAP	Continuous positive airway pressure
CRP	C-reaktives Protein
DI	Desaturationsindex
EEG	Elektroenzephalogramm
ENOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
EPO	Erythropoetin
ESS	*Epworth Sleepiness Scale*
FACS	*Fluorescence activated cell sorting*
FSC-A	*Forward scatter – area*
FSC-W	*Forward scatter – width*
IH	Intermittierende Hypoxie
IL-6	Interleukin-6
IQA	Interquartilabstand
M	Mittelwert
MPV	*Mean platelet volume*
OSA	Obstruktive Schlafapnoe
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
PBS	*Phosphate buffered saline*
PDW	*Platelet-distribution-width*
PFA	Paraformaldehyd
PSG	Polysomnographie
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROC	*Receiver operating characteristic*
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	*Reticulated platelets* = Retikulierte Thrombozyten
RP %	Prozentualer Anteil der retikulierten Thrombozyten
RP absolut	Gesamtzahl der retikulierten Thrombozyten
RPE	R-Phycoerythrin
SD	*Standard deviation*
SpO2 ≤ 90%	Schlafdauer mit Sauerstoffsättigung unter 90%
SSC-A	*Side Scatter – area*
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha
TO	Thiazol-Orange
TRAP	*Thrombin receptor activating peptide*
TST	*Total Sleeping Time*
8-OHdG	8-Hydroxy-2-deoxyguanosin
95%-KI	95%-Konfidenzintervall

1. Einleitung

1.1 Obstruktive Schlafapnoe (OSA)

1.1.1 Einführung in das Krankheitsbild

Die obstruktive Schlafapnoe (OSA) ist durch das Auftreten von nächtlichen Atemaussetzern nach teilweisem oder vollständigem Kollaps der oberen Atemwege gekennzeichnet und gilt als die häufigste Form der schlafbezogenen Atemstörungen (Kline, 2016). Die pharyngealen Obstruktionen führen zu einer Reduktion (Hypopnoe) oder einem vollständigen Aussetzen (Apnoe) des Atemflusses und dadurch zur Entstehung einer intermittierenden Hypoxämie (IH). Diese obstruktiven Ereignisse gehen häufig mit einer als Arousal bezeichneten kortikalen Weckreaktion einher, die eine Fragmentierung der physiologischen Schlafarchitektur zugunsten flacherer Schlafstadien bewirkt (Shahveisi et al., 2018).

Zusätzlich zu einem lauten, unregelmäßigen Schnarchen mit Atemaussetzern berichten viele Betroffene über eine stark gesteigerte Tagesschläfrigkeit (*excessive daytime sleepiness,* EDS) und Erschöpfung als Folge des nicht erholsamen Schlafes (Prasad et al., 2018). Weitere häufige Symptome sind kognitive Beeinträchtigungen wie Konzentrationsschwäche und Reizbarkeit, depressive Verstimmung, morgendliche Kopfschmerzen, Libidoverlust und Nykturie (Osman et al., 2018).

Der pharyngeale Kollaps entsteht allgemein durch ein Ungleichgewicht von dilatierenden und obstruierenden Faktoren. Ein Großteil der Patient*innen weist prädisponierende anatomische Faktoren auf, sodass bereits im Wachzustand eine erhöhte Muskelaktivität der pharyngalen Dilatoren notwendig ist, um die Atemwege offen zu halten. Diese anatomische Vulnerabilität führt dann zu Obstruktionen, wenn es zu einer schlafbezogenen Reduktion der Muskelaktivierung kommt (White, 2005). Weitere Faktoren, welche die Entstehung von OSA begünstigen, sind eine niedrige Schwelle für das Auftreten von respiratorischen Arousals sowie eine geringe ventilatorische Stabilität bei der Reaktion auf Blutgasveränderungen (Osman et al., 2018).

Das mittlere Manifestationsalter des Schlafapnoesyndroms liegt zwischen 45 und 55 und tritt bei Frauen etwa 10 Jahre später auf (Konietzko, 1998). Epidemiologische Untersuchungen der *Wisconsin Sleep Cohort* Studie schätzten die OSA-Prävalenz auf 9% bei

Frauen und 24% bei Männern. Unter Einbezug des Kriteriums der *excessive daytime sleepiness* (EDS) wurde in dieser Studie das Vorliegen eines obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms (OSAS) definiert, welches bei 2% der Frauen und 4% der Männer vorlag (Young et al., 1993).

Es existieren zahlreiche bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer obstruktiven Schlafapnoe. Einer der wichtigsten ist das männliche Geschlecht, welches in populationsbasierten Studien ein 1,5–3fach erhöhtes Risiko für OSA bewirkt (Lee et al., 2008; Young et al., 1993). Außerdem gilt Adipositas, welche bei ca. 70% aller OSA-Erkrankten vorliegt (Wolk et al., 2003), als einer der wichtigsten Risikofaktoren. Dieser Zusammenhang wird unter anderem auf die verstärkte Fetteinlagerung in Halsstrukturen, eingeschränkte pulmologische Kapazitäten sowie endokrinologische Veränderungen bei Adipositas zurückgeführt (Konietzko, 1998; Young et al., 2002). Weitere Risikofaktoren für OSA sind Besonderheiten der kraniofazialen Anatomie, der Konsum von Alkohol und Nikotin, Nasenverstopfung, Menopause sowie eine erhöhte Chemorezeptorsensitivität bei der Atmungsregulation (Ryan & McNicholas, 2010; Young et al., 2002). Ein polygenetischer Einfluss unter anderem auf die Entstehung der prädisponierenden kraniofazialen Morphologie erscheint sehr wahrscheinlich, während die Rolle monogenetischer Faktoren auf die Entstehung von OSA noch weitestgehend unklar bleibt (Kent et al., 2010).

1.1.2 Diagnostik und Definitionen

Bei Verdacht auf OSA wird zunächst durch eine gezielte Anamnese, klinische Untersuchung sowie die Auswertung von Fragebögen, wie dem STOP-BANG-Fragebogen (s. Anhang) und der *Epworth Sleepiness Scale* (ESS, s. Anhang), die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von OSA eingeschätzt. Hierbei wird auf das Vorhandensein von Symptomen, Risikofaktoren und Komorbiditäten der obstruktiven Schlafapnoe geprüft. Daraufhin kann der Verdacht auf OSA unter Beurteilung der Prätest-Wahrscheinlichkeit, Komorbiditäten und Ressourcen zunächst mithilfe von ambulanten Polygraphie-Systemen geprüft werden, welche bei hoher Prätest-Wahrscheinlichkeit für den diagnostischen Nachweis eingesetzt werden können („S3-Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen – Kapitel ‚Schlafbezogene Atmungsstörungen'", 2017). Die definitive Diagnostik setzt jedoch meist die Durchführung einer Polysomnographie in einem Schlaflabor voraus. Hierbei wird während des Schlafs eine 12-Kanal-Messung aufgezeichnet, die ein Elektroenzephalogramm (EEG), Elektrookulogramm (EOG), Elektromyogramm (EMG), eine Pulsoxymetrie, ein Schnarchmikrofon, eine Pulsoxymetrie sowie

eine Messung des Atemflusses, der Atemexkursionen und der Körperposition beinhaltet (McNicholas, 2008).

In der Polygraphie oder Polysomnographie lässt sich bei OSA definitionsgemäß ein erhöhter Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) feststellen. Der AHI berechnet sich aus der Summe der auftretenden Apnoen und Hypopnoen pro Stunde Schlafzeit. Eine Apnoe liegt vor, wenn es zu einem Abfall des Atemflusses ≥ 90% für eine Dauer von mindestens 10 Sekunden kommt. Eine Hypopnoe liegt vor, wenn es zu einer Reduktion des Atemflusses ≥ 30% für mindestens 10 Sekunden, verbunden mit einem Absinken der arteriellen Sauerstoffsättigung um 3% oder einem EEG-Nachweis von Arousals kommt (Berry et al., 2012). Zusätzlich äußern sich die Apnoephasen in einem erhöhten Desaturationsindex (DI), der die Anzahl der Sauerstoffentsättigungen von mindestens 3% welche mehr als 10 Sekunden andauern pro Stunde angibt. Der Referenzbereich für Gesunde liegt bei ≤ 5 relevanten Sauerstoffentsättigungen pro Stunde Schlaf (Rashid et al., 2020). OSA kann ab einem AHI ≥ 5/h in Verbindung mit einer typischen klinischen Symptomatik oder relevanten Komorbidität diagnostiziert werden; bei einem AHI ≥ 15/h liegt eine OSA definitionsgemäß auch bei asymptomatischen Patient*innen vor („S3-Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen – Kapitel ‚Schlafbezogene Atmungsstörungen'", 2017). OSA kann daraufhin in die Schweregrade leichte OSA (AHI 5-15/h), mittelgradige OSA (AHI 15-30/h) und schwere OSA (AHI ≥ 30) eingeteilt werden (Sateia, 2014).

1.1.3 Komorbiditäten und Risiken von OSA

Eine unbehandelte obstruktive Schlafapnoe gilt als Risikofaktor für die Entstehung von arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 sowie kardiovaskulären Folgeerkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, kardiale Arrhythmien, pulmonale Hypertonie, Schlaganfall und vaskuläre Demenz (Floras, 2018; Kasai et al., 2012; Konecny et al., 2014; Reutrakul & Mokhlesi, 2017b; Sharma & Culebras, 2016).

OSA gilt als häufigster sekundärer Risikofaktor für eine arterielle Hypertonie; insbesondere therapieresistente Formen sind häufig mit OSA assoziiert (Floras, 2018). Während bei ca. 20-40% aller Patient*innen mit arterieller Hypertonie gleichzeitig eine OSA vorliegt, erhöht sich der Anteil bei Patient*innen mit therapieresistenter arterieller Hypertonie sogar auf 71% (Konecny et al., 2014; Phillips & O'driscoll, 2013).

Eine Vielzahl von Studien beschreibt weiterhin einen Zusammenhang zwischen OSA und gesteigerter Insulinresistenz, gestörtem Glukosehaushalt und einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 2, welches auch BMI-unabhängig besteht (Aronsohn et al., 2010; Hamilton & Naughton, 2013; Reutrakul & Mokhlesi, 2017b).

Während Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 und Vorhofflimmern bereits eigenständige Risikofaktoren für weitere kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen, zeigen sich auch unabhängige Effekte durch OSA. Erkrankte weisen ein 3,1fach erhöhtes Risiko für das Auftreten von Schlaganfällen auf (Floras, 2018) und die OSA-Prävalenz bei Patient*innen, die einen Schlaganfall erlitten, liegt bei über 60% (Parra et al., 2000). Dieser Effekt konnte auch unabhängig vom BMI und dem Vorliegen von arterieller Hypertonie oder Vorhofflimmern bestätigt werden (Yaggi et al., 2005).

Bei Untersuchungen der *Sleep Heart Health Study* (Gottlieb et al., 2010) und darauffolgenden Metaanalysen (Loke et al., 2012) zeigte sich außerdem ein geschlechtsabhängiger Zusammenhang zwischen OSA und koronarer Herzkrankheit sowie Herzinsuffizienz. Während OSA einen unabhängigen Prädiktor für Herzinsuffizienz und koronare Herzkrankheit bei Männern unter 70 Jahren darstellte, konnte der gleiche Effekt bei Frauen nicht bestätigt werden (Gottlieb et al., 2010).

Die Vielzahl an kardiovaskulären Erkrankungen, für deren Entstehung und Progression OSA einen Risikofaktor darstellt, äußert sich unter anderem in einer Erhöhung der kardiovaskulären Mortalität sowie Gesamtmortalität bei schwerer OSA (Fu et al., 2017; Marin et al., 2005).

1.1.4 Sympathikus, oxidativer Stress und Komorbiditäten von OSA

Eine Vielzahl von Forschungsarbeiten führt diese hohe kardiovaskuläre Morbidität bei OSA auf einen erhöhten Sympathikotonus sowie einen gesteigerten Zustand von oxidativem Stress sowie dauerhafter, wenn auch niedriggradiger, Inflammation zurück, die zusammenwirkend eine endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose begünstigen (Lavie, 2009).

Durch intermittierende Hypoxien (IH) während der Apnoephase kommt es zu einer Chemorezeptor-vermittelten Aktivierung des Sympathikus, die mit einer gesteigerten Zirkulation von Katecholaminen sowie einer Aktivierung des RAAS-Systems einhergeht und auch nach Wegfallen des hypoxischen Stimulus anhält (Phillips & O'driscoll, 2013). Diese chronische Aktivierung begünstigt über einen erhöhten Gefäßwiderstand und va-

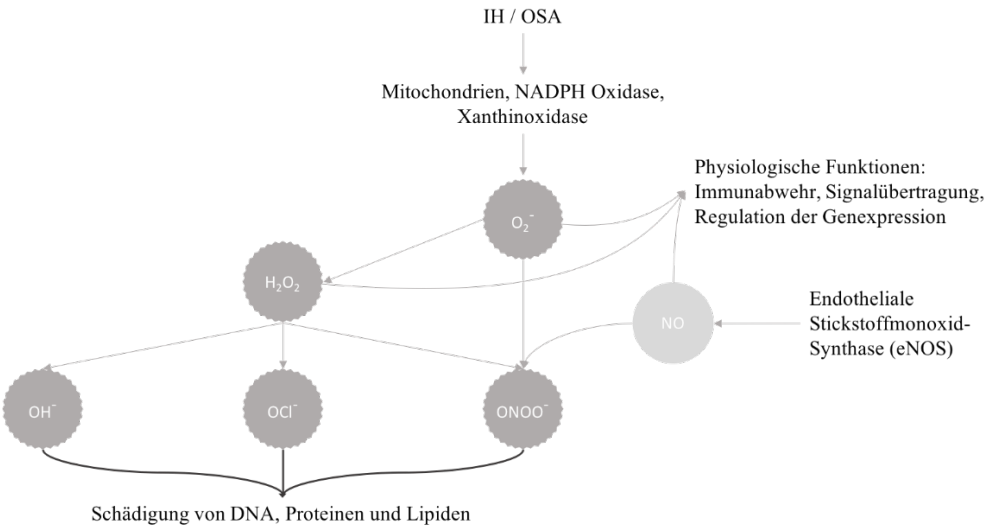
skuläres Remodeling das Entstehen von arterieller Hypertonie und anderen OSA-assoziierten Erkrankungen (Baranchuk et al., 2010; Bradley & Floras, 2009; Loke et al., 2012; Salman et al., 2020). Die gesteigerte Sympathikusaktivität übt weiterhin Einflüsse auf die Regulation des Glukosehaushaltes aus, sodass eine Bedeutung für den Zusammenhang von OSA und Diabetes mellitus Typ 2 vermutet wird (Reutrakul & Mokhlesi, 2017b).

Neben den Sympathikus-vermittelten Einflüssen wird OSA zunehmend als eine Erkrankung verstanden, die maßgeblich durch einen Zustand von oxidativem Stress charakterisiert ist. Oxidativer Stress beschreibt ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Verbrauch von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidanionen und Reaktiven Stickstoffspezies (RNS) wie Peroxynitrit (Badran et al., 2014). Diese Radikale besitzen wichtige physiologische Funktionen als humorale Signalstoffe, führen jedoch im Übermaß durch die Modifikation von Membranen, Lipiden, Proteinen und DNA zu Zell- und Gewebeschädigungen (Lavie, 2009). Eine Vielzahl von Studien konnte bei OSA-Erkrankten erhöhte Biomarker der Lipidperoxidation, Proteincarbonylation und DNA-Oxidation nachweisen, welche als Marker für oxidativen Stress gelten (Barceló et al., 2000; Kizawa et al., 2009; Lavie et al., 2004; Vatansever et al., 2011; Yamauchi et al., 2005).

Abbildung 1 zeigt, wie intermittierende Hypoxien exzessive Reduktionsreaktionen in Mitochondrien sowie die Aktivierung der NADPH-Oxidase und Xanthinoxidase in Phagozyten und Endothelzellen auslösen, wodurch vermehrt ROS und RNS entstehen.

Abbildung 1

Die Rolle von oxidativem Stress bei obstruktiver Schlafapnoe



Anmerkung. In Anlehnung an Badran et al., 2014. Intermittierende Hypoxien (IH) lösen eine gesteigerte Produktion von ROS und RNS aus, die in einer selbstverstärkenden Kaskade zur Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden führt.

Der Hauptvertreter aus der Gruppe der ROS ist das Superoxidanion, welches selbstständig die Formation weiterer ROS und RNS wie Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit verursacht (Lavie, 2009). Letzteres entsteht durch die Reaktion von Superoxidanionen mit dem endothelialen Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO), einem essenziellen Faktor für eine intakte vaskuläre Funktion und Reaktivität (Arnold et al., 1977; Ignarro et al., 1987; Varadharaj et al., 2015). Bei OSA-Erkrankten kommt es zusätzlich zur Neutralisierung von NO zu einer reduzierten Expression und Dysfunktion der NO-produzierenden endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), sodass die NO-Bioverfügbarkeit am Endothel sinkt (Badran et al., 2014; Varadharaj et al., 2015).

Oxidativer Stress wirkt über eine direkte Schädigung von Zellen und Molekülen sowie über indirekte Mechanismen wie die Senkung der NO-Bioverfügbarkeit am Endothel und eine Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen als ein hauptursächlicher Faktor bei der Entstehung endothelialer Dysfunktion (Badran et al., 2014). Diese stellt die früheste vaskuläre Veränderung in OSA-Modellen dar und gilt als Prädiktor für die Progression von kardiovaskulären Erkrankungen in der Gesamtpopulation (Varadharaj et al., 2015). In Verbindung mit den häufig komorbiden Faktoren des metabolischen Syndroms

bei OSA (Castaneda et al., 2018) erklärt dieses Modell die Entstehung von Atherosklerose und das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei OSA.

1.1.5 Therapie der OSA

Die obstruktive Schlafapnoe wird in den meisten Fällen mit einer nächtlichen Überdruckatmung (*continuous positive airway pressure*, CPAP) behandelt. Die Aufrechterhaltung eines erhöhten Druckniveaus von ca. 4 - 15mbar in den oberen Atemwegen stellt die effektivste verfügbare Maßnahme zur Behandlung der Atemstörungen dar (Ballester et al., 1999). Die Indikation für eine CPAP-Therapie wird in Abhängigkeit von den Symptomen, Begleiterkrankungen und Ergebnissen der Polysomnographie gestellt. Bei einem AHI ≥ 15/h besteht eine klare Therapieindikation; bei einem AHI von 5-15/h kann bei gleichzeitigem Bestehen von Symptomen oder Begleiterkrankungen auch eine CPAP-Therapie indiziert sein („S3-Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen – Kapitel ‚Schlafbezogene Atmungsstörungen'", 2017).

Eine konsequente Anwendung der CPAP-Therapie führt neben einer Verbesserung der Tagesschläfrigkeit, Lebensqualität und neurokognitiven Symptomen (Cao et al., 2017) auch zu einer Senkung des Blutdrucks (Haentjens et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die CPAP-Therapie erhöhtem oxidativen Stress und Inflammation bei OSA entgegenwirkt (Alonso-Fernandez et al., 2009; Arias et al., 2008; Carpagnano et al., 2003; Schulz et al., 2000). Auch die erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei OSA kann durch die CPAP-Therapie reduziert und sogar normalisiert werden (Fu et al., 2017; Marin et al., 2005; Qureshi et al., 2015; Sharma & Culebras, 2016).

Die Verringerung des Körpergewichts gilt als eine wichtige Therapiemaßnahme bei adipösen Patient*innen, da eine Gewichtszunahme bzw. Gewichtsabnahme mit einer Progression bzw. Regression der Krankheitsaktivität einhergeht (Young et al., 1993, 2002). Außerdem sollten OSA-Erkrankte informiert werden, dass der Konsum von Alkohol zu einem erhöhten AHI, verstärktem Schnarchen und einer weiteren Störung der Schlafarchitektur führen kann (Burgos-Sanchez et al., 2020). Während von einem Zusammenhang zwischen Rauchen und einem erhöhten Risiko für OSA ausgegangen wird, besteht nur eine unzureichende Datenlage für die Annahme, dass eine Nikotinkarenz OSA positiv beeinflusst (Krishnan et al., 2014).

Zusätzlich kann bei leichter und mittelgradiger OSA sowie bei jenen Betroffenen mit schwerer OSA, die eine CPAP-Therapie ablehnen, der Einsatz von Unterkieferprotrusi-

onsschienen als Ersatz für eine CPAP-Therapie in Betracht gezogen werden. Ein weiterer Therapieansatz betrifft die Lageabhängigkeit von OSA, da sich bei vielen Patient*innen ein erhöhter AHI in Rückenlage zeigt. Bei leicht- bis mittelgradiger OSA kann bei erwiesener Lageabhängigkeit mithilfe unterschiedlicher Verfahren eine Vermeidung der Rückenlage eingesetzt werden, wenn andere Therapien wie die CPAP-Therapie nicht ausreichend toleriert werden („S3-Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen – Kapitel ‚Schlafbezogene Atmungsstörungen'", 2017). Weiterhin existiert eine Vielzahl chirurgischer Verfahren, welche das Ziel verfolgen, Obstruktionen zu reduzieren oder zu beseitigen. Zum Einsatz kommen unter anderem Tonsillektomien, Uvulopalatopharyngoplastiken und Osteotomien sowie Neurostimulationsverfahren des Nervus hypoglossus (Steffen et al., 2021). Diese und weitere Verfahren sollten stets im Einzelfall und unter Beurteilung der individuellen Anatomie geprüft werden und kommen vor allem bei CPAP-Intoleranz zum Einsatz („S3-Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen – Kapitel ‚Schlafbezogene Atmungsstörungen'", 2017).

1.2 Retikulierte Thrombozyten: Entstehung und Bedeutung

In dieser Dissertation werden Einflüsse der obstruktiven Schlafapnoe auf Thrombozyten, insbesondere die Subpopulation der retikulierten Thrombozyten untersucht.

1.2.1 Thrombozyten und Thrombopoese

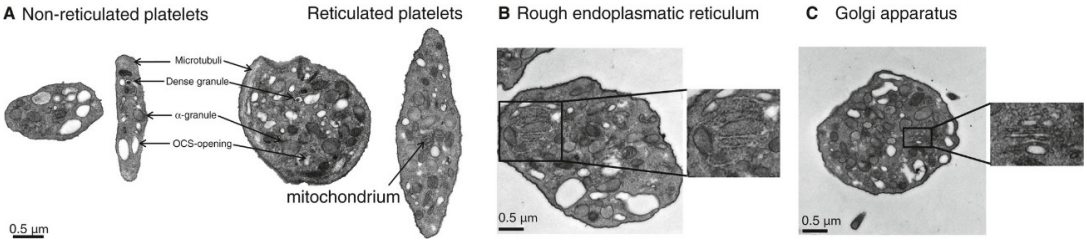
Thrombozyten sind scheibenförmige, zellkernlose Zellen von 1-3µm Durchmesser, die neben der Hämostase und Wundheilung spezielle Funktionen bei der Angiogenese, Inflammation und Immunität erfüllen (Machlus & Italiano, 2013). Sie zirkulieren etwa für 5-11 Tage im Blut, bis sie schließlich in der Leber, Lunge und Milz abgebaut werden (Jelkmann, 2010). Sie entstehen aus den Megakaryozyten, spezifischen polyploiden Progenitorzellen im Knochenmark, die durch Endomitose, eine Zellkernteilung ohne Zellteilung, große Mengen an Protein und Zellmaterial generieren (Hoffmann, 2014). Nach der Reifung der Megakaryozyten kommt es zur Abschnürung mehrerer tubulärer Fortsätze, der Proplättchen, aus denen pro Megakaryozyt insgesamt etwa 5000 Thrombozyten entstehen (Hoffmann, 2014; Machlus & Italiano, 2013). Die Megakaryozyten entstehen ihrerseits aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, ein Prozess, der von Thrombopoetin (TPO) reguliert wird und in Bedarfssituationen um ein Vielfaches beschleunigt werden kann (Hoffmann, 2014).

1.2.2 Retikulierte Thrombozyten: Morphologie und Funktion

Am Ende der Thrombopoese werden unausgereifte Thrombozyten aus dem Knochenmark in die Peripherie freigelassen, die als retikulierte Thrombozyten (*reticulated platelets* = RP) bezeichnet werden. Diese größeren, zellkernlosen Vorformen unterscheiden sich dadurch von nicht-retikulierten, das heißt adulten Thrombozyten, dass RP über die Fähigkeit einer residualen Proteinbiosynthese verfügen, da sie noch Granula mit mRNA sowie Zellorganellen für die Proteinbiosynthese enthalten (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2

Transmissionselektronenmikroskopie von nicht-retikulierten und retikulierten Thrombozyten



Anmerkung. Quelle: Hille et al., 2020. Morphologie von nicht-retikulierten Thrombozyten und retikulierten Thrombozyten (A), mit Nachweis der für Proteinbiosynthese- und Modifikation notwendigen Zellorganellen: raues Endoplasmatisches Retikulum (B) und Golgi-Apparat (C)

Ein weiteres Merkmal der retikulierten Thrombozyten ist eine vermehrte Expression der Oberflächenproteine P-Selektin, Glykoprotein Ib und IIb/IIIa sowie eine erhöhte intrazelluläre Thromboxan-A2-Konzentration, sodass davon ausgegangen wird, dass RP über ein höheres thrombogenes Potential verfügen (Guthikonda et al., 2008; Meintker & Krause, 2020).

Vor der Maturation in adulte Thrombozyten besitzen RP eine geringe Zirkulationsdauer von weniger als einem Tag und Konzentrationsanstiege der Subpopulation lassen sich bereits 2-3 Tage vor dem Anstieg der reifen Thrombozyten feststellen (Hoffmann, 2014). Aufgrund des frühzeitigen Anstiegs und der kurzen Lebensspanne kommt den RP, analog zu den Retikulozyten der Erythropoese, eine Bedeutung als Marker der Thrombopoese zu (Dusse & Freitas, 2014).

1.2.3 Retikulierte Thrombozyten: Nachweismethoden und Einsatzgebiete

Bei der Erstbeschreibung der retikulierten Thrombozyten 1969 durch Ingram und Coopersmith wurde noch Methylenblau benutzt, um die neu entdeckten Zellen, die damals nach akutem Blutverlust in Beagle-Hunden beobachtet wurden, anzufärben (Ingram & Coopersmith, 1969). Seit 1990 hat sich die Färbung der RP mit dem Fluoreszenzfarbstoff Thiazol-Orange (TO) bewährt, der durch die Bindung an residuale mRNA eine Bestimmung der RP mithilfe der Durchflusszytometrie ermöglicht (Kienast & Schmitz, 1990a).

Thiazol-Orange ist ein Cyanin-Farbstoff, der an Nukleinsäuren bindet und daraufhin eine 3000fache Verstärkung der Fluoreszenz bewirkt (Harrison et al., 1997). TO besitzt viele Eigenschaften, die es zu einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff bei der Darstellung von RP in der Durchflusszytometrie machen. TO wird durch Licht mit einer Wellenlänge von 488ηm angeregt, wie es durch die Argonlaser in Durchflusszytometern produziert wird; außerdem kann TO Zellmembranen übertreten, ohne dass ein Permeabilisationsschritt notwendig ist (Harrison et al., 1997). Die Einführung der durchflusszytometrischen Bestimmung der RP mithilfe von Thiazol-Orange sowie die Entwicklung kommerzieller Analysatoren führte dazu, dass der Nutzen der RP-Bestimmung bei unterschiedlichen klinischen Fragestellungen wie etwa bei der Differentialdiagnostik von Thrombozytopenien erforscht wurde (s. Tabelle 1).

Tabelle 1

Klinische Studien zu Einsatzgebieten der retikulierten Thrombozyten

Einsatzgebiet	Zielsetzung
Thrombozytopenie	Differenzierung von hyper- und hypoproliferativen Thrombozytopenien
	Evaluation der Thrombopoese nach Chemotherapie
	Evaluation der Thrombopoese nach Transplantation von Knochenmark oder peripheren hämatopoetischen Stammzellen
	Management von Thrombozytentransfusionen
Akutes Koronarsyndrom (ACS)	Prädiktion des Outcomes
	Monitoring von Thrombozytenaggregationshemmern
Ischämischer Schlaganfall	Prädiktion des Outcomes
Infektion	Prädiktion und Diagnose von Sepsis

Anmerkung. In Anlehnung an Hoffmann, 2014; Meintker & Krause, 2020.

Während das Potential von RP als nicht-invasiver Marker bei unterschiedlichen Krankheitsbildern bestätigt werden konnte, zeigten sich auch Limitationen, unter anderem durch große Variationen in den Nachweismethoden und Referenzwerten, die einen breiten klinischen Einsatz verhinderten (Hoffmann, 2014; Meintker & Krause, 2020). Seitdem wurden Einflussfaktoren bezüglich Typ und Konzentration der eingesetzten Fluorophore, Inkubationszeit, Fixation und der Auswertung der Durchflusszytometrie identifiziert und ein zweidimensionaler Gating-Prozess etabliert (vgl. Kapitel 2.10), um eine höhere Reproduzierbarkeit zu erreichen (Hoffmann, 2014; Meintker & Krause, 2020).

1.3 OSA und retikulierte Thrombozyten – Relevanz und Plausibilität

OSA ist ein häufiges Krankheitsbild, das unbehandelt einen maßgeblichen, negativen Einfluss auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität der betroffenen Patient*innen ausübt (Young et al., 2002). Das Ausmaß von Symptomen wie der deutlich erhöhten Tagesschläfrigkeit und kognitiven Einschränkungen wird beispielsweise dadurch deutlich, dass

ein starker Zusammenhang zwischen OSA und vermehrten Verkehrsunfällen und arbeitsbezogenen Unfällen besteht (Aldrich, 1989; Barbẽ et al., 1998; Lindberg et al., 2001). Eine umfassende Studienlage belegt die Rolle von OSA als einen entscheidenden Risikofaktor für arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und weitere Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Doch trotz der weitreichenden medizinischen Konsequenzen fanden Young et al. (1997) bei einer Population mit Zugang zu medizinischer Versorgung, dass 93% der Frauen und 82% der Männer mit moderater bis schwerer OSA nicht diagnostiziert wurden. Auch aus ökonomischen Gesichtspunkten zeigt sich die Dringlichkeit, OSA umfassender zu diagnostizieren und zu behandeln. Eine Studie durch Kapur et al. (1999) schätzte die Kosten, die durch nicht-diagnostizierte OSA in den USA entstehen, auf 3,4 Milliarden US-Dollar pro Jahr. Diese Untersuchungen zeigen, dass mit Blick auf die hohe OSA-Prävalenz ein zu niedriges gesellschaftliches und medizinisches Bewusstsein für OSA besteht und dass die Erhöhung der Diagnoserate eine hohe Dringlichkeit besitzt.

In einer 2022 veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe Petzold et al zu den Einflüssen von neutrophilen Granulozyten auf die Entstehung von retikulierten Thrombozyten zeigte sich, dass durch oxidativen Stress die Produktion von unreifen Thrombozyten angeregt wird (Petzold et al., 2022). Da oxidativer Stress ein charakteristisches Merkmal von OSA ist, wurde im Rahmen dieser Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob OSA-Erkrankte erhöhte RP-Werte aufweisen. Vorläufige Ergebnisse in dieser Kohorte mit einer niedrigen Fallzahl gaben Hinweise, dass tatsächlich eine Verschiebung der Thrombozytenpopulation zugunsten jüngerer Spezies stattfindet und dass ein Zusammenhang zwischen dem Anteil der RP und dem AHI-Wert besteht.

Aufgrund dieser Vorergebnisse wird in dieser Dissertation untersucht, ob ein Einfluss der obstruktiven Schlafapnoe auf die Subpopulation der retikulierten Thrombozyten nachgewiesen werden kann (s. Kapitel 1.4).

Diverse Studien haben sich bereits mit dem Einfluss von OSA auf Thrombozyten auseinandergesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei OSA unter Einfluss von Sympathikus, oxidativem Stress und Inflammation zu einer übermäßigen Aktivierung von Thrombozyten kommt (s. Kapitel 4.3.2). Dies konnte unter anderem anhand der Thrombozyten-Indizes MPV (*mean platelet volume*) sowie PDW (*platelet distribution width*) gezeigt werden, welche Maße für die Größenverteilung der Thombozyten darstellen. Da es bei der Aktivierung der Thombozyten zu einer morphologischen Veränderung von der diskoiden Grundform zu einer sphärischen Form sowie zur Formation von Pseudopodien kommt, sind aktivierte Thrombozyten im Durchschnitt größer. Daher gelten MPV und PDW als repräsentativ für die Thrombozytenaktivierung (Vagdatli et al., 2010). Es konnte

gezeigt werden, dass die Parameter MPV und PDW mit OSA-Kennwerten wie dem AHI und DI einerseits sowie mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus anderseits korrelieren (Kanbay et al., 2013a; Kodiatte et al., 2020; Nena et al., 2012). Während Varol et al. (2011) eine Reduktion der MPV-Werte bei Patient*innen mit schwerem OSA nach CPAP-Therapie fanden, konnten andere Studien zwar eine Reduktion der PDW unter CPAP-Therapie feststellen, aber einen Einfluss auf MPV nicht bestätigen (Çörtük et al., 2016). Auch bei der Bestimmung humoraler Marker der Thrombozytenaktivierung wie P-Selektin, sCD40L sowie *Membran-derived microparticles* (PMP) konnte ein erhöhtes Niveau unter OSA-Erkrankten sowie ein Einfluss der CPAP-Therapie auf diese Marker festgestellt werden (Gabryelska et al., 2018).

Genauere Mechanismen, welche bei OSA-Erkrankten die Thrombozyten beeinflussen, sind noch Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussion (s. Kapitel 4.3.2). Insbesondere ist ein Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und OSA, der aufgrund der oben erwähnten Vorarbeit vermutet werden kann, in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die Erforschung des Zusammenhangs zwischen OSA und RP könnte zu einem besseren Verständnis der Einflüsse von OSA auf die Thrombozyten beitragen. Da RP außerdem durch ein hohes thrombotisches Potential gekennzeichnet sind (Guthikonda., 2008; Meintker & Krause, 2020), könnte dieser Zusammenhang auch weitere Erklärungen für das gehäufte Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei OSA-Erkrankten bieten.

1.4 Zielsetzung der Dissertation

In dieser Dissertation wird der vermutete und bisher nicht beschriebene Zusammenhang zwischen OSA und einer Erhöhung der retikulierten Thrombozyten untersucht.

Es wird die Hypothese aufgestellt, dass bei OSA-Erkrankten ein positiver Zusammenhang zwischen Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) und Desaturationsindex (DI) einerseits und den prozentualen sowie absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten anderseits besteht (Hypothese 1). Weiterhin wird die Hypothese gestellt, dass OSA-Erkrankte signifikant höhere RP-Werte aufweisen als Kontrollpatient*innen, bei denen kein OSA vorliegt (Hypothese 2). Es wird geprüft, ob anhand der RP-Werte eine Zuordnung zu unterschiedlichen OSA-Schweregaden möglich ist. Außerdem soll untersucht werden, ob Einflussfaktoren auf diesen vermuteten Zusammenhang identifiziert werden können. Weiterhin soll ein Zusammenhang zwischen den retikulierten Thrombozyten und dem

bereits intensiv erforschten MPV-Wert untersucht werden, der sowohl als Marker für OSA als auch für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen gilt.

Schließlich besteht ein weiteres Primärziel dieser Dissertation in der Frühevaluation von retikulierten Thrombozyten als Biomarker bei obstruktiver Schlafapnoe. Ein solcher Biomarker könnte die Diagnostik von OSA unterstützen, indem er dazu beiträgt, die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von OSA vor Durchführung einer Polysomnographie einzuschätzen. Denn obwohl die Polysomnographie im Schlaflabor ein wichtiges und aussagekräftiges diagnostisches Mittel ist, handelt es sich um eine zeitaufwendige und teure Untersuchung (Medical Advisory Secretariat, 2006), die nicht immer verfügbar ist und eine Hürde für Betroffene darstellen kann. Daher stellt die Prüfung von Biomarkern für die Ergänzung der OSA-Diagnostik ein wichtiges Ziel dar, um der beschriebenen Unterdiagnostizierung entgegenzuwirken. Doch obwohl bereits zahlreiche Biomarker für den Einsatz bei OSA untersucht wurden, zeigten diese allesamt relevante Limitationen (s. Kapitel 4.3.2), sodass bisher kein Biomarker klinischen Einsatz findet (Shih & Malhotra, 2011).

Durch Shih und Malhotra (2011) wurden Kriterien aufgestellt, die den diagnostischen Nutzen neuer Biomarker speziell bei obstruktiver Schlafapnoe beurteilen. Anhand dieser Kriterien soll evaluiert werden, ob RP die notwendigen Eigenschaften aufweisen, um die Diagnostik von OSA zu unterstützen. Hierzu soll geprüft werden, ob ein Cut-off-Wert gefunden werden kann, der bei Einsatz in der klinischen Praxis genutzt werden kann, um das Risiko einer OSA-Erkrankung zu beurteilen und die Notwendigkeit für die Durchführung einer Polysomnographie einzuschätzen.

Die Erforschung des Zusammenhangs von OSA und retikulierten Thrombozyten soll zusammenfassend weitere Einblicke in die Einflüsse von OSA auf die Thrombozyten sowie die Struktur der verschiedenen Subpopulationen ermöglichen. Durch die Evaluation von RP als Biomarker bei OSA soll außerdem geprüft werden, ob die Bestimmung der RP-Werte das Potential besitzt, den diagnostischen Prozess bei OSA zu unterstützen.

2. Material und Methoden

2.1 Studienkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien

Die Untersuchungen wurden bei erwachsenen, einwilligungsfähigen Patient*innen aus der schlafmedizinischen Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik V des LMU Klinikums München durchgeführt. Zusätzlich wurden 8 weitere Patient*innen aus der allgemeinen und pneumologischen Ambulanz in die Studie eingeschlossen, bei denen durch eine klinische Anamnese und Untersuchung sowie eine ambulante Polygraphie das Vorliegen einer schlafbezogenen Atemstörung ausgeschlossen wurde.

Alle einwilligungsfähigen Patient*innen, welche die regulären Sprechstunden der Ambulanzen in dem Zeitraum vom 1.10.2019 bis zum 1.11.2020 besuchten, wurden, sofern keine Ausschlusskriterien vorlagen, gezielt auf eine Studienteilnahme angesprochen. Ausschlusskriterien waren dann erfüllt, wenn der/die Patient/in aktuell, oder zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der letzten 10 Jahre mit einer CPAP-Therapie behandelt wurde. Dieses Kriterium wurde nicht erfüllt, wenn der/die Patient/in lediglich an maximal 3 Nächten in den letzten Monaten eine CPAP-Therapie einsetzte, um die Nutzung der CPAP-Maske zu testen. Weitere Ausschlusskriterien für eine Studienaufnahme waren eine aktive Tumorerkrankung, hämatologische Erkrankungen und die aktuelle Einnahme von Chemotherapeutika oder weiteren Medikamenten, welche die Hämatopoese beeinflussen könnten.

Patient*innen, bei denen der/die behandelnde Arzt/Ärztin anhand der Polysomnographie das Vorliegen einer zentralen Schlafapnoe diagnostizierte, wurden ebenfalls von der weiteren Studienteilnahme ausgeschlossen.

Ein Ausschluss aus der weiteren Auswertung nach Studienaufnahme erfolgte dann, wenn die Ergebnisse der schlafmedizinischen Untersuchung, insbesondere der Apnoe-Hypopnoe-Index oder Desaturationsindex nicht vorlagen, bspw. wenn Studienteilnehmende nicht zur schlafmedizinischen Untersuchung erschienen sind. Auch wenn die Ergebnisse der Blutanalysen, insbesondere der retikulierten Thrombozyten nicht vorlagen, erfolgte ein nachträglicher Ausschluss von den weiteren Analysen. Dies war etwa dann der Fall, wenn es zu Fehlern bei der Durchführung des Staining-Protokolls kam, sodass eine durchflusszytometrische Auswertung nicht möglich war.

2.2 Ethik und Einwilligung

Bei der Studie handelt es sich um ein Projekt des LMU Klinikums Campus Innenstadt, Medizinische Klinik und Poliklinik V, in Kooperation mit dem LMU Klinikum Campus Großhadern. Alle Patient*innen und Proband*innen wurden umfassend und verständlich über die studienbezogenen Maßnahmen und Ziele ärztlich aufgeklärt und das schriftliche Einverständnis wurde dokumentiert. Eine ausführliche Beschreibung der Studie wurde der Ethikkommission vorgelegt, die am 23.01.2020 die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkannte (Referenznummer 19-797).

2.3 Anamnese und klinische Untersuchung

Bei allen Studienteilnehmenden wurde eine detaillierte Anamnese und körperliche Untersuchung durchgeführt. Hierbei wurde explizit nach dem Vorliegen von Symptomen schlafbezogener Atemstörungen, kardiovaskulären Risikofaktoren, Körpergröße und Gewicht zur Ermittlung des BMI, Vorerkrankungen sowie nach den gegenwärtig eingenommenen Medikamenten gefragt. Außerdem wurden der systolische und diastolische Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt.

2.4 Auswertung der Fragebögen

Die Studienteilnehmenden wurden gebeten, die beiden Fragebögen STOP-BANG und *Epworth Sleepiness Scale* (ESS) zu beantworten (s. Anhang).

2.4.1 STOP-BANG-Fragebogen

Der STOP-BANG-Fragebogen wurde als einfach durchzuführende Screening-Untersuchung zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer OSA entwickelt (Nagappa et al., 2015). Der Test besteht aus subjektiven Parametern (STOP) sowie demographischen Parametern (BANG) und wurde in dieser Studie in der aktualisierten Version nach Chung F et al. eingesetzt. Das Akronym STOP-BANG bezieht sich auf die Fragebogen-Items: *snoring history, tired during the day, observed stop of breathing while sleeping, high blood pressure, BMI ≥ 35 kg/m², age ≥ 50 years old, neck circumference ≥ 43cm in men / ≥ 41cm in women*, *male gender*. Werden 0-2 Fragen mit ja beantwortet liegt nach dem aktualisierten STOP-BANG-Fragebogen ein niedriges Risiko für eine OSA vor, bei 3-4 mit ja beantworteten Fragen liegt ein mittleres Risiko vor. Ein hohes Risiko für OSA liegt gemäß dem Fragebogen vor, wenn 5-8 Fragen mit ja beantwortet

wurden, oder mindestens 2 der 4 ersten Fragen mit ja beantwortet wurden und zusätzlich entweder das männliche Geschlecht, ein erhöhter Nackenumfang oder ein BMI ≥ 35kg/m² vorliegen (Chung et al., 2014).

2.4.2 *Epworth Sleepiness Scale* (ESS)

Die *Epworth Sleepiness Scale* (ESS) ist ebenfalls ein einfach einzusetzender, verbreiteter Fragebogen, der anhand der subjektiven Einschätzung der Wahrscheinlichkeit, in 8 täglichen Situationen einzuschlafen, ein Maß für die Tagesschläfrigkeit beziehungsweise *excessive daytime sleepiness* bietet. Der Test wurde ursprünglich 1990 für den Einsatz bei unterschiedlichen Krankheiten wie etwa Narkolepsie entworfen; in dieser Studie wurde die überarbeitete Version von 1997 eingesetzt (M. Johns & Hocking, 1997).

Das Ziel der ESS ist es, anhand von alltäglichen Situationen wie z.B. Sitzen, Lesen, oder dem Warten im Auto während einer Verkehrspause die *situtional sleep propensity* (SSP), das heißt die übliche Schläfrigkeit während diesen potenziell schlaffördernden Situationen, zu messen. Hierzu wird die Wahrscheinlichkeit, in diesen Situationen einzuschlafen, anhand einer 4-stufigen Likert-Skala (0, 1, 2 und 3) retrospektiv eingeschätzt, sodass eine Gesamtpunktzahl von 0-24 erreicht werden kann. Das Ergebnis soll eine Objektivierung der *average sleep propensity* (ASP), das heißt der durchschnittlichen Schläfrigkeit in alltäglichen Situationen, ermöglichen (Johns MW, 2003).

Die Normalwerte der ESS liegen zwischen 0-10 Gesamtpunkten; Werte zwischen 11-24 kennzeichnen *excessive daytime sleepiness*. Zur Interpretation der Ergebnisse des ESS wird folgende Einteilung empfohlen: 0-5 *Lower Normal Daytime Sleepiness*, 6-10 *Higher Normal Daytime Sleepiness*, 11-12 *Mild Excessive Daytime Sleepiness*, 13-15 *Moderate Excessive Daytime Sleepiness*, 16-24 *Severe Excessive Daytime Sleepiness* (Johns, 2022).

2.5 Polygraphie und Polysomnographie

Für die Diagnostik und somit für die Zuordnung zur Experimental- bzw. Kontrollgruppe wurden zunächst ambulante Polygraphien und im Anschluss teilstationär durchgeführte Polysomnographien eingesetzt. Die Polygraphien wurden teilweise im Schlaflabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik V erstellt und befundet und teilweise auswärtig über das Personal der zuweisenden Schlaflabore.

Bei der Polygraphie wurden die nächtliche Sauerstoffsättigung, der Atemfluss, die Atmungsanstrengung, die Herzfrequenz sowie die Körperlage aufgezeichnet. Hierdurch werden unter anderem Apnoephasen identifiziert, sodass nach standardisierten Techniken durch technisches Personal der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI), der Desaturationsindex (DI) und andere respiratorische Kennwerte ermittelt werden können.

Bei Patient*innen mit einem auffälligen Polygraphieergebnis oder Hinweisen auf das Vorliegen einer SBA wurde zusätzlich eine Polysomnographie eingesetzt. Die Polysomnographien wurden alle im Schlaflabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik V unter der Überwachung durch medizinisches Personal und mittels des PSG-Systems „*ALICE-LE*“ erstellt und ausgewertet.

Im Rahmen dieser Aufzeichnungen wurden eine nasale und orale Atemflussmessung, thorakale und abdominale Atemexkursionsmessungen sowie eine Pulsoxymetrie durchgeführt. Zusätzlich wurde ein kontinuierliches Elektroenzephalogramm, Elektromyogramm und Elektrookulogramm abgeleitet. Anhand dieser Werte können neben einer genauen Bestimmung der respiratorischen Parameter wie des AHI und DI unter anderem auch die Schlafdauer mit reduzierter Sauerstoffsättigung ($SpO2 \leq 90\%$) sowie die Struktur der Schlafphasen analysiert werden.

2.6 Studiendesign und Studienprotokoll

Es handelt sich um eine Fall-Kontroll-Studie, bei der Patient*innen, bei denen eine obstruktive Schlafapnoe diagnostiziert wurde sowie eine Kontrollgruppe von Studienteilnehmenden, bei denen eine obstruktive Schlafapnoe ausgeschlossen werden konnte, untersucht wurden.

Die Experimentalgruppe mit 63 Probanden bestand aus allen eingeschlossenen Patient*innen der Schlafambulanz mit bisher nicht behandelter OSA.

Die Kontrollgruppe bestand aus 15 Studienteilnehmenden, bei denen eine obstruktive Schlafapnoe ausgeschlossen werden konnte. Hierzu zählten 7 Patient*innen, die im Rahmen der routinemäßigen Schlafambulanz aufgenommen wurden sowie 8 Studienteilnehmenden aus den allgemeinen und pneumologischen Ambulanzen, bei denen kein Verdacht auf eine obstruktive Schlafapnoe bestand.

Die Zuordnung der Studienteilnehmenden zur Kontroll- bzw. Experimentalgruppe wurde gemäß den ICSD-3 Leitlinien zur Diagnose von OSA durchgeführt (s. Abbildung 3). Hierbei wird die Diagnose OSA gestellt, wenn ein $AHI \geq 15/h$ oder ein AHI zwischen 5-15/h

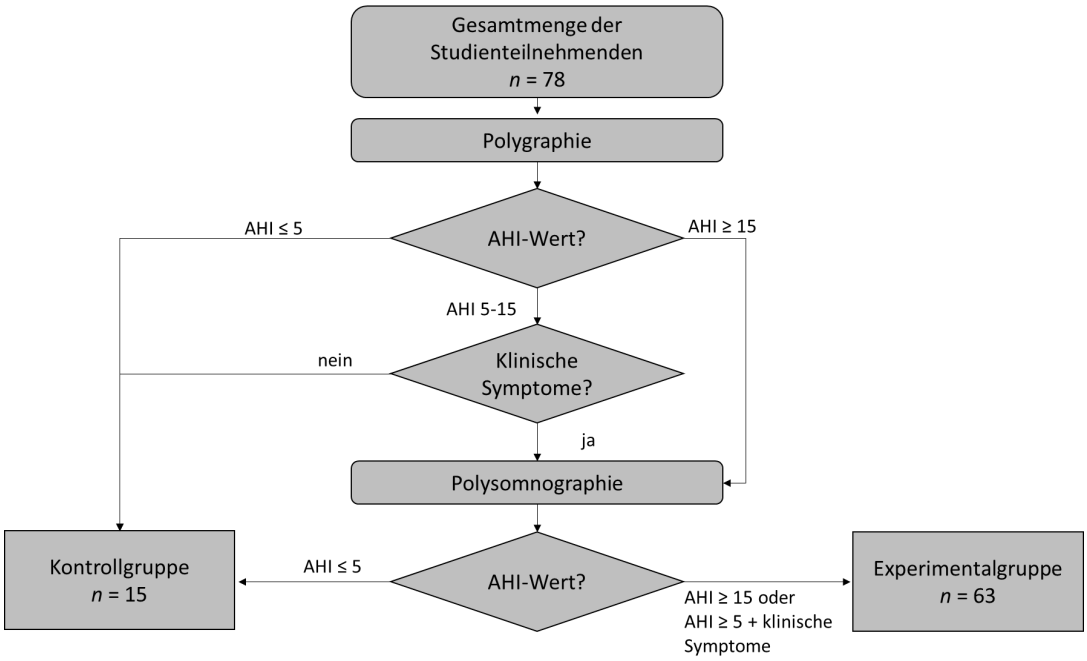
in Kombination mit einer typischen Symptomatik oder relevanten klinischen Komorbidität gegeben ist („S3-Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen – Kapitel ‚Schlafbezogene Atmungsstörungen'", 2017).

Bei allen Studienteilnehmenden wurde nach einer gezielten Anamnese und klinischen Untersuchung eine ambulante Polygraphie durchgeführt oder eine auswärtig durchgeführte Polygraphie ausgewertet. Wenn diese einen unauffälligen AHI-Wert ≤ 5/h zeigte und kein weiterer Verdacht auf eine schlafbezogene Atemstörung (SBA) bestand, wurden die Studienteilnehmenden der Kontrollgruppe zugeordnet. Studienteilnehmende, die einen AHI zwischen 5-15/h und keine weiteren Hinweise auf eine SBA aufwiesen, wurden ebenfalls der Kontrollgruppe zugeordnet.

Studienteilnehmende mit einem AHI zwischen 5-15/h, bei denen Symptome oder relevante Komorbiditäten einer obstruktiven Schlafapnoe vorlagen sowie Studienteilnehmende mit einem AHI ≥ 15 in der Polygraphie wurden für mindestens eine, jedoch regulär über zwei Nächte, mittels Polysomnographie untersucht. Die Studienteilnehmenden, die hierbei einen AHI ≤ 5 aufwiesen, wurden ebenfalls der Kontrollgruppe zugeordnet. Studienteilnehmende, die in der Polysomnographie einen AHI ≥ 5 in Verbindung mit einer klinischen Symptomatik oder einen AHI ≥ 15 zeigten, wurden gemäß der S3-Leitlinie als OSA-erkrankt diagnostiziert und der Experimentalgruppe zugeordnet. Eine weitere Aufteilung der Experimentalgruppe erfolgte daraufhin in "Mild": AHI 5-15, „Moderat": AHI 15-30 sowie „Schwer": AHI ≥ 30. Abbildung 3 veranschaulicht den beschriebenen Algorithmus zur Zuordnung der Studienteilnehmenden zur Experimentalgruppe bzw. Kontrollgruppe.

Abbildung 3

Zuordnung der Studienteilnehmenden zur Experimentalgruppe bzw. Kontrollgruppe



2.7 Blutentnahme und Transport

Nach der Zuordnung zur Experimentalgruppe oder Kontrollgruppe erfolgte bei den Studienteilnehmenden eine kubitale Blutentnahme im Rahmen der Routinebestimmungen. Hierbei wurden zusätzlich zu der Blutabnahme im Rahmen der regulären klinischen Versorgung der Schlafambulanz insgesamt ca. 20 ml Citratblut abgenommen, welches für die Bestimmung der retikulierten Thrombozyten benötigt wurde.

Die Blutproben wurden daraufhin im Labor des Klinikum Großhadern gemäß einem Staining-Protokoll (siehe Kapitel 2.9) für retikulierte Thrombozyten vorbereitet und in der Durchflusszytometrie ausgewertet.

2.8 Materialien und experimentelle Methoden

Tabelle 2

Materialien, Geräte und Software

Name	Hersteller	CAS-Nummer
Allgemeine Materialien		
Phosphate buffered saline (PBS)	*Polysciences, Inc*	19540-A
Paraformaldehyd (PFA)	*Sigma-Aldrich*	30525-89-4
15 ml Konisches Zentrifugenröhrchen, Polypropylen	*Corning Falcon*	
50 ml Konisches Zentrifugenröhrchen, Polypropylen	*Corning Falcon*	
Pipette 0,5–10 ul	*Eppendorf*	
Pipette 10–100 ul	*Eppendorf*	
Pipette 100–1000 ul	*Eppendorf*	
Pipettenspitzen	*Eppendorf*	
Antikörper und Fluorophore		
Thiazol-Orange (TO)	*Sigma-Aldrich*	107091-89-4
Anti-Human-CD41:RPE	*Bio-Rad*	MCA467PE
Geräte und Software		
Centrifuge 5804 R	*Eppendorf*	
FacsCanto II Cell Analyzer	*BD BioSciences*	
Minishaker MS1 Vortex	*Ika*	
Kaluza	*BD*	
Flowjo	*TreeStar, Inc.*	

2.9 Vorbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie

Die Markierung der RP sowie das Gating-Protokoll wurden analog zu bereits publizierten Protokollen (Hedley et al., 2015a; Wu et al., 2015) unter Einsatz von Thiazol-Orange (TO) und anti-CD41-Antikörpern durchgeführt. Dieses Protokoll basiert auf dem Einsatz von jeweils zwei FACS-Proben pro Patient; eine TO-markierte Messprobe sowie eine Referenzprobe, die kein TO enthält und die für die Bestimmung des Zielbereiches benutzt wird.

Hierzu wurden 20 µl des Citratbluts in einem Zentrifugenröhrchen mit 500 µl 1%-PFA-Lösung vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen für die Durchflusszytometrie zu fixieren. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen mit PBS aufgefüllt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde so abgekippt, dass etwa 200 µl der Probe enthalten blieben, die daraufhin mit einer Pipette vermischt wurden.

Anschließend wurden jeweils 100 µl der zentrifugierten Probe in zwei FACS-Röhrchen transferiert. Zu beiden FACS-Röhrchen wurde 1 µl anti-CD-41-RPE Antikörper hinzugefügt. Zu einem der FACS-Röhrchen, der späteren Messprobe, wurden daraufhin 100 µl Thiazol-Orange mit einer Konzentration von 250 ηg/ml hinzugegeben. Zu dem anderen FACS-Röhrchen, der Referenzprobe, wurden stattdessen 100 µl PBS hinzugegeben. Anschließend wurden beide Proben für 30 Minuten in einem lichtgeschützten Bereich bei Raumtemperatur gelagert. Nach einer weiteren Zugabe von 500 µl PBS zu beiden Proben wurde die durchflusszytometrische Auswertung an einem *FacsCanto II Cell Analyzer, BD Biosciences*, durchgeführt.

2.10 Durchflusszytometrie: Methoden und Gating-Strategie

Bevor die RP in der Messprobe bestimmt werden konnten, wurde in der Referenzprobe der Zielbereich identifiziert, der als CD-41/TO- positiv definiert wird, in dem sich erwartungsgemäß die Zellpopulation der retikulierten Thrombozyten (RP) abzeichnet (s. Abbildung 4).

Durch das erste Gate, das auf einem Diagramm von SSC-A und FSC-A markiert wurde, wurden die Zellpopulationen, die sich im unteren linken Bereich finden, selektiert. In diesem Bereich bilden sich unter anderem die Thrombozyten ab, die ein geringeres SSC-A und FSC-A Signal als z.B. bestimmte Leukozytenpopulationen produzieren (Givan, 2001).

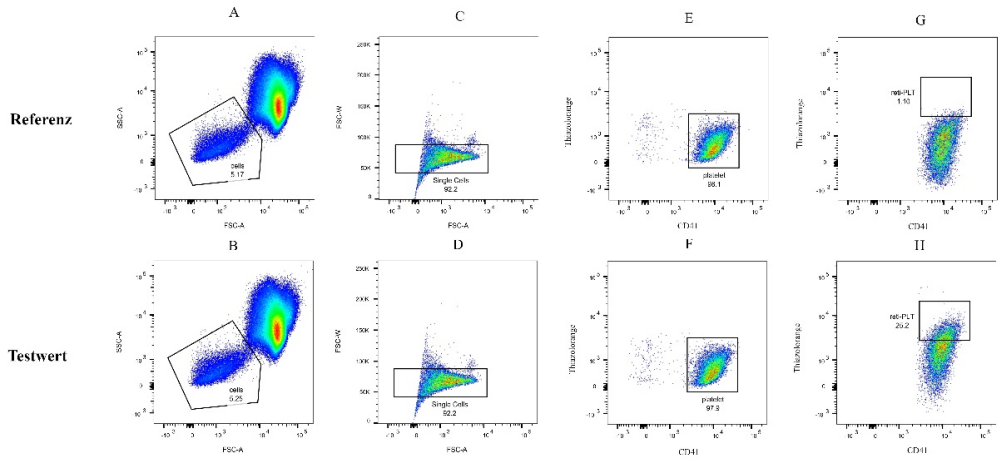
Im nächsten Gating-Schritt wurden die Doubletten ausgeschlossen, d.h. Events, die durch die gleichzeitige Messung von mehreren Partikeln verursacht werden, da sie zu schnell nacheinander durch den Analysepunkt getreten sind und daher nicht differenziert werden konnten. Da hierdurch der weitere Gating-Prozess gestört wird, wurden die Doubletten in einem Diagramm aus FSC-W und FSC-A herausgefiltert, sodass nur Singletten, also durch ein einzelnes Partikel verursachte Events, übrigblieben. Nun wurden in einem Plot aus SSC und anti-CD-41-RPE-Signal die CD-41 negativen Zellen wie etwa Erythrozyten von der CD-41-positiven Thrombozytenpopulation abgegrenzt.

Anschließend wurde in einem Diagramm aus TO- und anti-CD41-RPE-Signal ein Gate markiert, das die oberen 1% der Thrombozyten der PBS-Kontrollprobe einschließt, die demnach die stärkste TO-Autofluoreszenz ohne vorherige Markierung mit TO aufweisen (Givan, 2001). Hierdurch wird ein TO-positiver Referenzbereich definiert, der eine zuverlässige Bestimmung der RP im TO-markierten Teströhrchen erlaubt (Hedley et al., 2015b).

Nachdem der positive Zielbereich bei der PBS-Kontrolle gesetzt wurde, wurde zuletzt die Testprobe nach den gleichen Schritten analysiert. Im markierten Zielbereich fanden sich nun die Zellen, die eine höheres TO-Fluoreszenzsignal als 99% der Thrombozyten der unmarkierten Kontrollprobe aufwiesen. Diese, als TO-positiv definierte Zellpopulation, stellt die retikulierten Thrombozyten dar, da diese aufgrund ihres erhöhten Gehalts an Nukleinsäuren nach TO-Markierung ein verstärktes Fluoreszenzsignal produzieren (Matic et al., 2001). Abbildung 4 zeigt die Durchführung der Gating-Strategie an einer beispielhaften Studienprobe.

Abbildung 4

Gating-Strategie bei der durchflusszytometrischen Darstellung von retikulierten Thrombozyten



Anmerkung. **AB** SSC-A gegen FSC-A: Kleine Zellpopulationen inkl. Thrombozyten werden abgegrenzt von größeren Zellen z.B. Leukozyten sowie Debris. **CD** FSC-W gegen FSC-A: Gating der Singletten **EF** CD41-Signal gegen TO-Signal: CD41-positive Zellen wie Thrombozyten werden unter Ausschluss von CD41-negativen Zellen wie z.B. Erythrozyten markiert. **G** CD41-Signal gegen TO-Signal: In der Referenzprobe wird der TO-positive Zielbereich im Vergleich zu den 1% der Thrombozyten mit dem stärksten TO-Autofluoreszenzsignal definiert. **H** CD41-Signal gegen TO-Signal: In der Messprobe wird der Testwert der retikulierten Thrombozyten in dem definierten Bereich ermittelt (hier: 25,2%).

2.11 Statistische Methoden

Die Daten aus den Anamnesegesprächen wurden protokolliert und durch bereits vorhandene klinische Daten ergänzt.

Neben biographischen Daten wurden folgende Informationen der Studienteilnehmenden erfragt, dokumentiert und in der weiteren statistischen Analyse berücksichtigt:

Allgemeine Daten: Name, Geburtsdatum, Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe, Body-Mass-Index (BMI)

Kardiovaskuläre Risikofaktoren: Diabetes mellitus, Nikotinabusus (hier definiert als: regelmäßiger Zigarettenkonsum aktuell oder innerhalb der letzten 3 Jahren), arterielle Hypertonie, positive Familienanamnese auf kardiovaskuläre Erkrankungen im Alter von unter 70 Jahren, Dyslipidämie

Relevante Komorbiditäten: Ausgesuchte Komorbiditäten wurden erhoben, die entweder als OSA-assoziiert gelten oder einen potenziellen Einflussfaktor auf RP darstellen könnten. Erhoben wurde das Vorliegen von: kardialen Arrhythmien (z.B. Vorhofflimmern, Vorhofflattern), koronarer Herzkrankheit, zerebrovaskulären Ereignissen (z.B. Schlaganfall), pneumologischen Vorerkrankungen (z.B. COPD, Asthma bronchiale)

Regelmäßige Einnahme von verschreibungspflichtigen Medikamenten

Auswertung der Fragebögen: Aktualisierter STOP-BANG Fragebogen, *Epworth Sleepiness Scale* (ESS)

Ergebnisse der Polygraphie und Polysomnographie: Apnoe-Hypopnoe Index (AHI), Desaturationsindex (DI), Schlafdauer mit reduzierter Sauerstoffsättigung (SpO2 ≤ 90%), *Total Sleeping Time* (TST). Bei Vorliegen zweier Polysomnographie-Ergebnisse wurde der Mittelwert der jeweiligen Werte gebildet und für die weiteren Analysen verwendet. Da die eingesetzten Polygraphie-Geräte die SpO2 ≤ 90%-Dauer sowie die *Total Sleeping Time* (TST) nicht angeben, fehlt dieser Wert bei einem Teil der Studienteilnehmenden.

Blutwerte: Gesamtzahl der Thrombozyten, Mittleres Thrombozytenvolumen (MPV), Gesamtzahl der retikulierten Thrombozyten, prozentualer Anteil der retikulierten Thrombozyten, Leukozyten

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm *IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, IL) Statistics 26*.

Die Beschreibung der Studienpopulation erfolgt unter Angabe von absoluten bzw. relativen Häufigkeiten sowie der Mittelwerte (*M*) mit Standardabweichung (*SD*). Bei nichtnormalverteilten Daten wird die Verteilung der Daten durch Median und Interquartilabstand (*IQA*) beschrieben. Es wurden alle erhobenen Daten analysiert; Ausreißer wurden als alle Werte mit einem korrespondierenden Z-Wert außerhalb des Referenzbereiches zwischen -2 und 2 definiert und angegeben. Es wurden keine Ausreißer ausgeschlossen. *p*-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant gewertet (*), *p*-Werte ≤ 0,01 als hochsignifikant (**). Zusätzlich wurden in einigen Fällen 95%-Konfidenzintervalle (95%-*KI*) angegeben.

Die Prüfung der Normalverteilung erfolgte durch visuelle Inspektion der jeweiligen Histogramme bzw. Q-Q Plots sowie durch Einsatz des Shapiro-Wilk-Tests.

Einleitend wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei OSA-Erkrankten ein positiver Zusammenhang zwischen Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) und Desaturationsindex (DI) einerseits und den prozentualen sowie absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten anderseits besteht (Hypothese 1).

Für die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen den OSA-Kennwerten AHI und DI einerseits und den Werten der RP anderseits wurde eine Korrelationsanalyse für nicht-parametrische Daten mithilfe der Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. Hierbei wird der Rangkorrelationskoeffizient *r* mit Signifikanz *p* angegeben.

Anschließend wurde eine bivariate Regressionsanalyse durchgeführt, um zu untersuchen welcher Anteil der Streuung der prozentualen und absoluten Werte der RP durch den AHI bzw. DI erklärt werden kann. Hierbei werden der F-Wert und dessen Freiheitsgrade, der Regressionskoeffizient β und der Wert von *t*, die Signifikanz *p,* die Modellgüte als korrigiertes R^2 sowie die Effektstärke f^2 nach Cohen (1992) angegeben.

Die zweite Hypothese dieser Dissertation lautet, dass OSA-Erkrankte signifikant höhere RP-Werte aufweisen als Studienteilnehmende der Kontrollgruppe, bei denen keine OSA vorliegt (Hypothese 2).

Bei der Analyse von Unterschieden zwischen nicht-normalverteilten Daten wie den prozentualen und absoluten RP-Werten innerhalb der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Die Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests für unverbundene Stichproben werden als Mediane der beiden Gruppen sowie *U*-Werte mit asymptomatischer Signifikanz und der Effektstärke *r* nach Cohen (1992) angegeben.

Weiterhin erfolgte eine Aufteilung der Experimentalgruppe in die 3 OSA-Schweregrade “Mild“: AHI 5-15, „Moderat“: AHI 15-30 und „Schwer“: AHI ≥ 30. Um zu untersuchen, ob sich die Werte der RP zwischen diesen Gruppen sowie der Kontrollgruppe unterscheiden, wurde der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben eingesetzt. Die Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests werden unter Bestimmung der Chi-Quadrat-Werte sowie der Signifikanz *p* angegeben. Um zu identifizieren, welche Gruppen sich signifikant unterscheiden, wurde als Post-hoc Test der Dunn-Bonferonni-Test durchgeführt; die Ergebnisse werden als *z*-Wert und Signifikanz *p* angegeben.

Zur Analyse des möglichen Einflusses weiterer Faktoren wurde eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt. Bei den untersuchten möglichen Einflussfaktoren handelt es

sich neben dem Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) um Alter, Geschlecht, BMI, kardiovaskuläre Risikofaktoren, die Einnahme von Medikamenten sowie das Vorliegen von pneumologischen Komorbiditäten. Aufgrund der Multikollinearität zwischen den nächtlichen Atemwerten wurden die Variablen DI und SpO2 ≤ 90% nicht in das Regressionsmodell eingeschlossen. Auch hier werden der F-Wert und dessen Freiheitsgrade, die Regressionskoeffizienten β und die Werte von *t*, die Signifikanzen *p,* die Modellgüte als korrigiertes R^2 sowie die Effektstärke f^2 nach Cohen (1992) angegeben.

Abschließend soll in dieser Dissertation eine Frühevaluation von RP als Biomarker für die Diagnostik von OSA erfolgen. Um zu beurteilen, inwieweit die Bestimmung der RP das Vorliegen einer obstruktiven Schlafapnoe voraussagen kann, wurde eine *receiver operating characteristic* Kurve (ROC-Kurve) ausgewertet.

Zur Beurteilung der Modellgüte des ROC-Modells wurde die *area under the curve* (AUC) bestimmt. Eine AUC von 1 beschreibt ein bestmögliches Modell, dass immer zutreffend zwischen gesund und erkrankt unterscheiden kann; ein Modell mit einer AUC von 0,5 hingegen entscheidet mit einer 50:50 Wahrscheinlichkeit richtig. Die Koordinatenpunkte, das heißt die jeweiligen Testwerte mit zugehöriger Sensitivität und 1-Spezifität der ROC-Kurve, können dem Anhang entnommen werden.

Für die Ermittlung eines optimalen Cut-off-Wertes wurde der Testwert mit dem maximalen *Youden*-Index identifiziert, der als Sensitivität + Spezifität - 1 definiert ist (Perkins & Schisterman, 2006). Der *Youden*-Index berechnet den Punkt im ROC-Modell, der am weitesten von der Chance-Diagonale entfernt ist und daher die effektivste Trennung der beiden Gruppen ermöglicht.

Einen alternativen optimalen Cut-off-Wert bietet der *closest to* (0,1), der den Testwert beschreibt, der am nächsten zur oberen linken Ecke der ROC-Kurve liegt. Dieser Wert kann bestimmt werden durch:

$$\min \left[\sqrt{(1 - Sensitivität)^2 + (1 - Spezifität)^2}\right]$$ (Perkins & Schisterman, 2006)

3. Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Studienpopulation

3.1.1 Aufteilung der Studienpopulation

Im Zeitraum vom 01.10.2019 bis 01.03.2021 wurden insgesamt 78 Studienteilnehmende in die Studie aufgenommen, die sich in den Sprechstunden der schlafmedizinischen und allgemeinen Ambulanzen des LMU Klinikums München, Medizinische Klinik und Poliklinik V, vorgestellt haben. Anhand des zuvor beschriebenen Algorithmus wurden 63 Studienteilnehmende der Experimentalgruppe, bestehend aus Patient*innen mit neu diagnostizierter bzw. zuvor nicht-behandelter OSA, zugeordnet. Die Kontrollgruppe bestand aus 15 Studienteilnehmenden, bei denen eine schlafbezogene Atemstörung ausgeschlossen werden konnte. Hierzu zählten 7 Patient*innen der Schlafambulanz sowie 8 zusätzliche Proband*innen aus den allgemeinen und pneumologischen Ambulanzen, die sich für eine Studienteilnahme bereit erklärten und bei denen das Vorliegen von OSA ausgeschlossen wurde.

Im Folgenden wird das Studienkollektiv anhand von soziodemographischen bzw. klinischen Faktoren charakterisiert und die Ergebnisse der Schlaflaboruntersuchungen sowie der Blutanalysen beschrieben.

Tabelle 3 zeigt die Verteilung der soziodemographischen und klinischen Daten (Alter, Geschlecht, BMI, Ergebnis der Fragebögen, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Komorbiditäten) innerhalb der gesamten Studienpopulation sowie als Vergleich der Experimental- und Kontrollgruppe.

Tabelle 3

Soziodemographische und klinische Daten

Parameter	Gesamt	Experimental-gruppe	Kontroll-gruppe
Alter, Mittelwert (*SD*)	53,9 (13,3)	56,7 (10,8)	42,1 (16,7)
Männlich, *n* (%)	55 (70,5)	45,0 (71,4)	10,0 (66,7)
Weiblich, *n* (%)	23 (29,5)	18,0 (28,6)	5,0 (33,3)
BMI, Mittelwert (*SD*)	29,7 (6,3)	30,9 (6,3)	25,0 (4,2)
Regelmäßige Medikation, *n* (%)	45,0 (57,7)	40,0 (63,5)	5,0 (33,3)
ESS, Median (*IQA*)	7 (10)	8 (11)	3 (1)
STOP-BANG, Median (*IQA*)	3 (1)	3 (0)	1 (0)
Diabetes mellitus, *n* (%)	16,0 (20,5)	16,0 (25,4)	0 (0)
Arterielle Hypertonie, *n* (%)	44,0 (56,4)	42,0 (66,7)	2,0 (13,3)
Pos. Familienanamnese, *n* (%)	19,0 (24,4)	16,0 (25,4)	3,0 (20,0)
Nikotinabusus, *n* (%)	37,0 (47,4)	29,0 (46,0)	8,0 (53,3)
Dyslipidämie, *n* (%)	28,0 (35,9)	27,0 (42,8)	1 (6)
Koronare Herzkrankheit, *n* (%)	9,0 (11,5)	9,0 (14,3)	0 (0)
Kardiale Arrhythmie, *n* (%)	5,0 (6,4)	5,0 (7,9)	0 (0)
Pneumologische Vorerkrankung, *n* (%)	21,0 (26,9)	18,0 (23,1)	3,0 (20,0)
Zerebrovaskuläre Ereignisse, *n* (%)	3,0 (3,8)	3,0 (4,7)	0 (0)

3.1.2 Soziodemographische Struktur

Die Studienteilnehmenden waren zwischen 25 und 84 Jahren alt (*M* = 53,9 Jahre, *SD* = 13,3 Jahre); es zeigte sich ein älterer Altersdurchschnitt in der Experimentalgruppe (*M* = 56,7 Jahre, *SD* = 10,8) gegenüber der Kontrollgruppe (*M* = 42,1 Jahre, *SD* = 16,7).

Insgesamt bestand die Studienpopulation aus 55 Männern (70,5%) und 23 Frauen (29,5%). Die Geschlechterverteilung innerhalb der beiden Gruppen war ähnlich (Experimentalgruppe: 71,4% Männer und 28,6% Frauen; Kontrollgruppe 66,7% Männer und 33,3% Frauen).

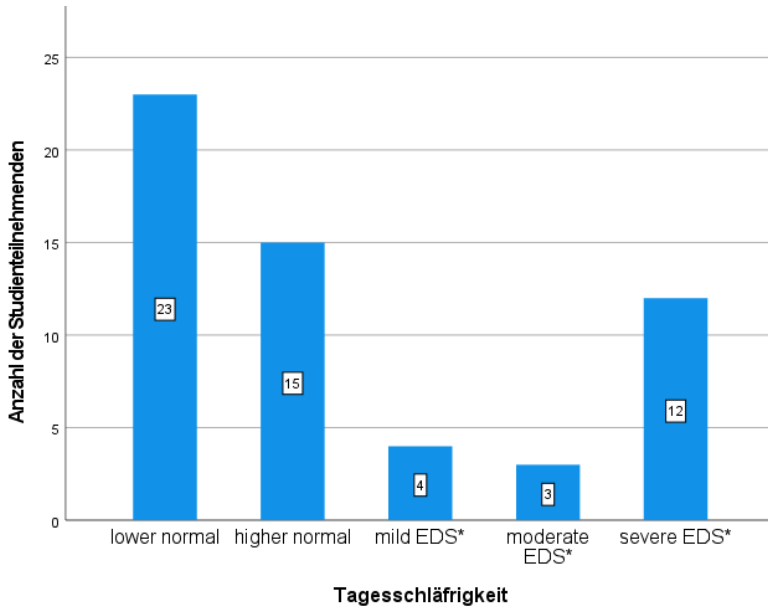
Der durchschnittliche BMI innerhalb der Experimentalgruppe betrug 30,9 kg/m² (*SD* = 6,3 kg/m²) und lag damit im Bereich der Adipositas Grad 1; der durchschnittliche BMI in der Kontrollgruppe betrug 25,0 kg/m² (*SD* = 4,2 kg/m²), was dem Übergangsbereich zwischen Normalgewicht und Präadipositas entspricht (WHO, 1998).

3.1.3 Auswertung der Fragebögen

Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der *Epworth Sleepiness Scale* (*ESS*), nach der eine Aufteilung anhand der Gesamtpunktzahl in die fünf Gruppen „*lower normal*“, „*higher normal*“, „*mild excessive daily sleepiness*“, „*moderate excessive daily sleepiness*“ und „*severe excessive daily sleepiness*“ durchgeführt wurde.

Abbildung 5

Ergebnisse des ESS-Fragebogens



Anmerkung. n = 60, * *excessive daytime sleepiness.* Nicht abgebildet: 18 Fragebogen wurden nicht oder fehlerhaft ausgefüllt.

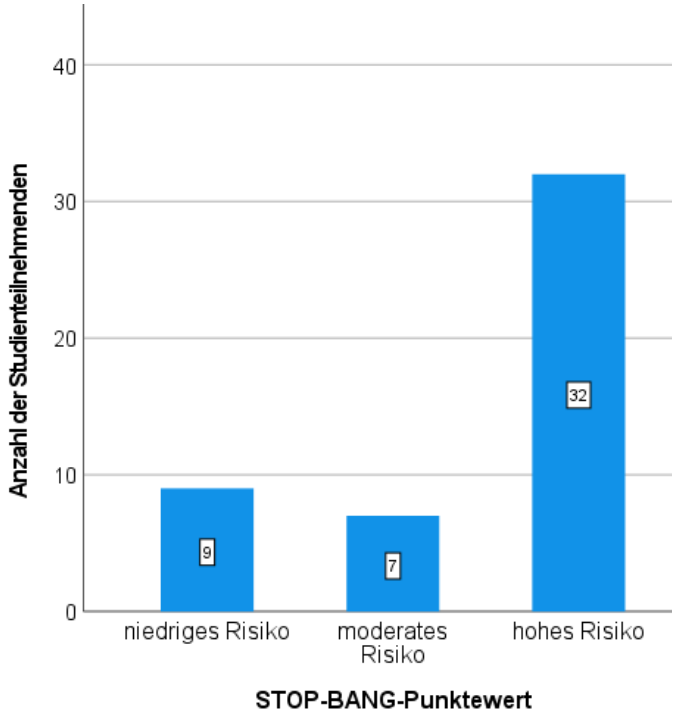
Insgesamt lagen die Ergebnisse von 60 Personen vor, 18 Fragebögen wurden nicht oder fehlerhaft ausgefüllt. Die meisten Studienteilnehmenden zeigten niedrig- oder hochnormale Werte (*n* = 38), während 19 Studienteilnehmende das Kriterium für *excessive daytime sleepiness* mit einem ESS-Punktewert von über 10 erfüllten. Die Ergebnisse von 12 Studienteilnehmenden fielen unter die Kategorie *severe excessive*

daytime sleepiness (ESS-Punktewert zwischen 16-24). Der *Median* der ESS-Punktzahl in der Experimentalgruppe lag bei 8 (*IQA* = 11) und damit im Bereich „*higher normal*“, während sich der *Median* in der Kontrollgruppe bei 3 (*IQA* = 1) und damit im Bereich „*lower normal*“ befand.

Abbildung 6 zeigt die Aufteilung der Studienteilnehmenden nach dem Risikoprofil für das Vorliegen einer OSA anhand der Ergebnisse des aktualisierten STOP-Bang-Fragebogen.

Abbildung 6

Ergebnisse des aktualisierten STOP-BANG-Fragebogen



Anmerkung. n = 48. Nicht abgebildet: 30 Fragebogen wurden nicht oder fehlerhaft ausgefüllt.

Insgesamt lagen die Ergebnisse von 48 Personen vor, 30 Fragebögen wurden nicht oder fehlerhaft ausgefüllt. Die Auswertung ergab bei 9 Personen ein niedriges Risiko, bei 7 Personen ein moderates Risiko und bei 32 Personen ein hohes Risiko für das Vorliegen einer OSA. Der Median in der Experimentalgruppe lag bei 3 (*IQA* = 0) was einem hohen Risiko entspricht; der Median in der Kontrollgruppe lag bei 1 (I*QA* = 0), was einem niedrigen Risiko für das Vorliegen einer OSA entspricht.

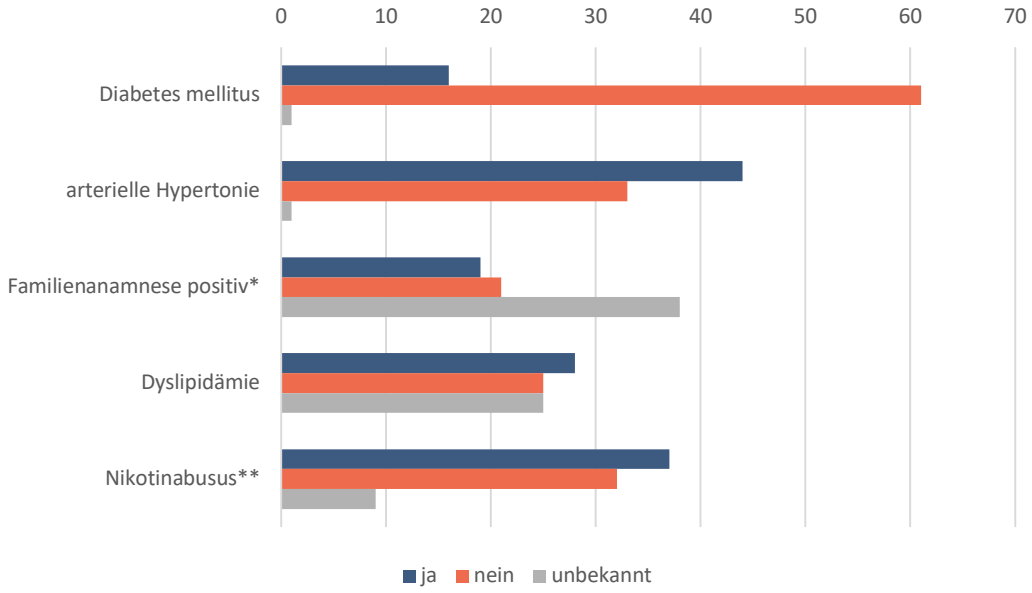
Die Tagesschläfrigkeit, gemessen durch die Gruppenzugehörigkeit in der ESS, korrelierte signifikant mit dem AHI (r = 0,264, p = 0,047) und DI (r = 0,295, p = 0,26), aber nicht mit der SpO2 ≤ 90% (r = 0,170, p = 0,259). Ein höherer Punktewert im STOP-BANG-Fragebogen ging mit einem höheren AHI (r = 0,443, p = 0,002), DI (r = 0,553, p < 0,001) und einem höheren OSA-Schweregrad (r = 0,505, p < 0,001) einher.

3.1.4 Kardiovaskuläre Risikofaktoren in der Studienpopulation

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der Erhebung der kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, positive Familienanmnese für kardiovaskuläre Erkrankungen, Dyslipidämie und Nikotinabusus in der gesamten Studienpopulation.

Abbildung 7

Kardiovaskuläre Risikofaktoren in der Studienpopulation



Anmerkung. * positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen (im Alter von unter 70 Jahren), ** regelmäßiger Zigarettenkonsum aktuell oder innerhalb der letzten 3 Jahre. n = 78

Die am häufigsten vertretenden kardiovaskulären Risikofaktoren unter allen Studienteilnehmenden waren arterielle Hypertonie (n = 44, 56,4%) und Nikotinabusus (n = 37, 47,4%). Diabetes mellitus war in der Studienpopulation mit 19 Fällen sehr häufig

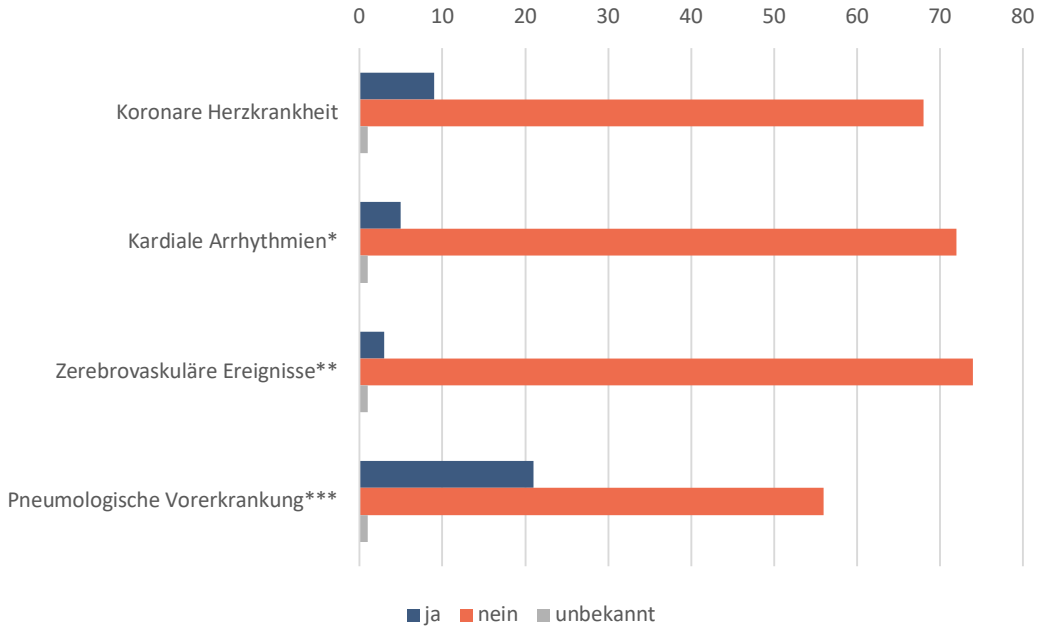
vertreten; es fanden sich dabei alle 19 Fälle in der Experimentalgruppe (vgl. Tabelle 3). Auch die Risikofaktoren arterielle Hypertonie (66,7% der Experimentalgruppe, 13,3% der Kontrollgruppe) sowie Dyslipidämie (42,8% der Experimentalgruppe, 6% der Kontrollgruppe) lagen deutlich häufiger in der Experimentalgruppe vor. Hierbei ist zu bemerken, dass 25 (32,1%) der Studienteilnehmenden keine Angabe zum Vorliegen einer Dyslipidämie machen konnten. Auch die Frage nach dem Vorliegen einer positiven Familienanamnese für Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der Familie konnte bei 38 (48,7%) der Studienteilnehmenden nicht klar beantwortet werden. Während eine positive Familienanamnese für Herz-Kreislauferkrankungen mit 25,4% innerhalb der Experimentalgruppe gegenüber 20,0% in der Kontrollgruppe häufiger bestand, war ein aktueller oder vergangener Nikotinabusus mit 53,3% in der Kontrollgruppe häufiger als in der Experimentalgruppe mit 46,0% vertreten.

3.1.5 Komorbiditäten in der Studienpopulation

Abbildung 8 zeigt die Häufigkeit folgender Komorbiditäten in der gesamten Studienpopulation: koronare Herzkrankheit, kardiale Arrhythmien, zerebrovaskuläre Ereignisse und pneumologische Vorerkrankung.

Abbildung 8

Komorbiditäten in der Studienpopulation



Anmerkung. * bekannte Herzrhythmusstörung (z.B. Vorhofflimmern, Vorhofflattern), ** vorbekanntes zerebrovaskuläres Ereignis (z.B. Schlaganfall), *** chronische Lungenerkrankungen (z.B. chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen (COPD), Asthma bronchiale). *n = 78*

Bei den häufigsten Vorerkrankungen unter den Studienteilnehmenden handelte es sich um pneumologische Vorerkrankungen (*n* = 21, 26,9%) sowie koronare Herzkrankheit (*n* = 9, 11,5%). Kardiale Arrhythmien (*n* = 5, 6,4%) sowie zerebrovaskuläre Ereignisse (*n* = 3, 3,8%) lagen hingegen selten vor. Mit Ausnahme der pneumologischen Vorerkrankungen (23,1% der Experimentalgruppe gegenüber 20,0% der Kontrollgruppe) traten alle weiteren 18 dokumentierten Komorbiditäten in der Experimentalgruppe auf. Zusammenfassend fanden sich sowohl kardiovaskuläre Risikofaktoren als auch die untersuchten Komorbiditäten häufiger in der Experimentalgruppe (vgl. Tabelle 3).

3.2 Ergebnisse der schlafmedizinischen Untersuchungen und Blutwerte

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der schlafmedizinischen Untersuchung, insbesondere die Werte des Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) und Desaturationsindex (DI) innerhalb der gesamten Studienpopulation, der Experimentalgruppe sowie der

Kontrollgruppe dargestellt (siehe Tabelle 4). Außerdem wird die Verteilung der retikulierten Thrombozyten, der Gesamtthrombozytenzahl und des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) beschrieben und Zusammenhänge zwischen den einzelnen Blutwerten beschrieben. Weiterhin werden Zusammenhänge der nächtlichen Atemwerten und retikulierten Thrombozyten zu einigen klinischen und soziodemographischen Werten aufgezeigt.

Tabelle 4

Nächtliche Atemwerte und Blutwerte

Parameter	**Gesamt**	**Experimental-gruppe**	**Kontrollgruppe**
	Nächtliche Atemwerte		
AHI [*n*/h], Median (*IQA*)	25,7 (36,7)	34,1 (34,2)	3,3 (4,6)
DI [*n*/h], Median (*IQA*)	20,3 (35,3)	28,8 (36,9)	2,3 (2,5)
SpO2 ≤ 90% [min], Median (*IQA*)	9,2 (13,7)	10,4 (14,2)	0,19 (0,29)
TST* [min], Mittelwert (*SD*)	263,5 (70,6)	267,9 (71,0)	206,6 (34,2)
	Blutwerte		
Thrombozyten [x1000/µl], Mittelwert (*SD*)	246,2 (58,3)	242,9 (56,5)	257,8 (65,1)
Anteil der RP [%], Median (*IQA*)	15,75 (8,57)	17,20 (7,50)	8,56 (7,57)
RP absolut [x1000/µl], Median (*IQA*)	37,47 (19,62)	39,98 (20,42)	18,80 (26,61)
MPV* [fl], Mittelwert (*SD*)	10,52 (0,93)	10,52 (0,99)	10,49 (0,65)
Leukozyten [1000/µl], Mittelwert (*SD*)	6,55 (1,82)	6,65 (1,79)	6,20 (1,94)

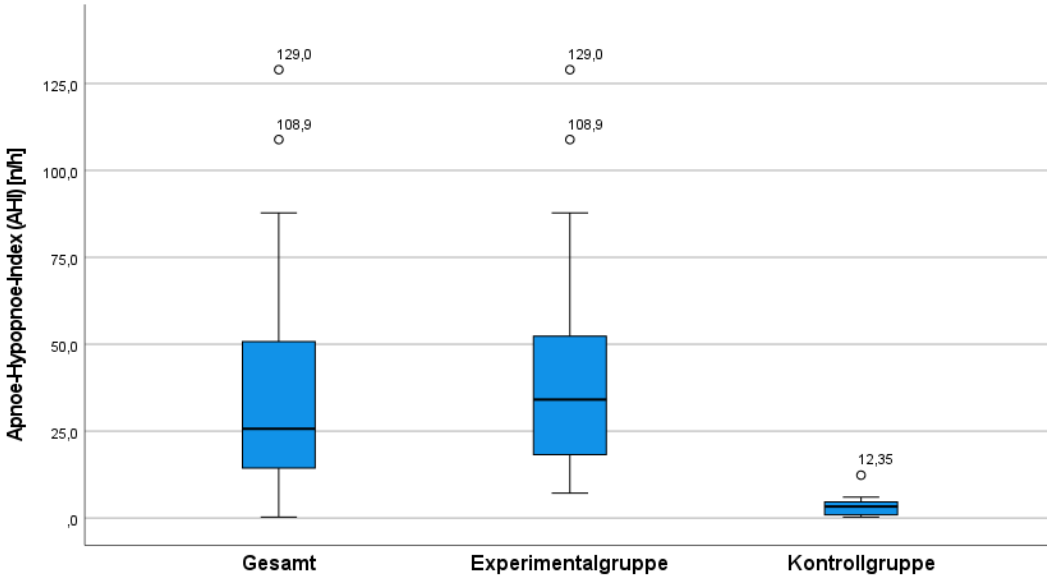
Anmerkung. ** total sleeping time*, *** mean platelet volume*

3.2.1 Apnoe-Hypopnoe-Index (DI) und Desaturationsindex (DI): Verteilung und Zusammenhänge

Abbildung 9 zeigt die Verteilung des Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) innerhalb der gesamten Studienpopulation, der Experimentalgruppe sowie der Kontrollgruppe.

Abbildung 9

Verteilung des Apnoe-Hypopnode-Index (AHI) in der Studienpopulation



Anmerkung. *n* = 78

In der gesamten Studienpopulation betrug der Median des AHI 25,7/h (*IQA* = 36,7/h) mit einem Maximum von 129,0/h und einem Minimum von 0,3/h. In der Experimentalgruppe betrug der Median des AHI 34,1/h (*IQA* = 34,2/h) und in der Kontrollgruppe 3,3/h (*IQA* = 4,6/h).

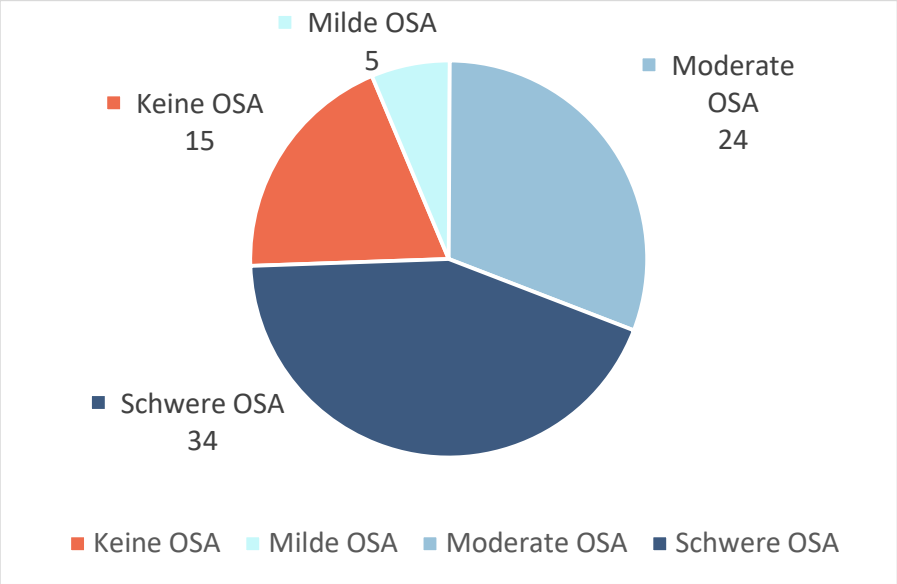
Die AHI-Werte innerhalb der Experimentalgruppe sowie Kontrollgruppe zeigten keine Normalverteilung im Shapiro-Wilk-Test ($p < 0{,}01$ in der Experimentalgruppe, $p = 0{,}014$ in der Kontrollgruppe), sodass bei der weiteren Auswertung im Zusammenhang mit dem AHI nicht-parametrische Tests eingesetzt wurden.

Anhand des AHI wurde die Experimentalgruppe weiterhin in die Gruppen „milde OSA“ (AHI 5-15/h), „moderate OSA“ (AHI 15-30/h) und „schwere OSA“ (AHI ≥ 30/h) eingeteilt. Abbildung 10 zeigt die Aufteilung der Studienpopulation in die Zugehörigkeit zur

Kontrollgruppe oder Experimentalgruppe, welche anhand der genannten 3 Schweregrade weiter unterteilt wurde.

Abbildung 10

Aufteilung der OSA-Erkrankten in 3 Schweregrade



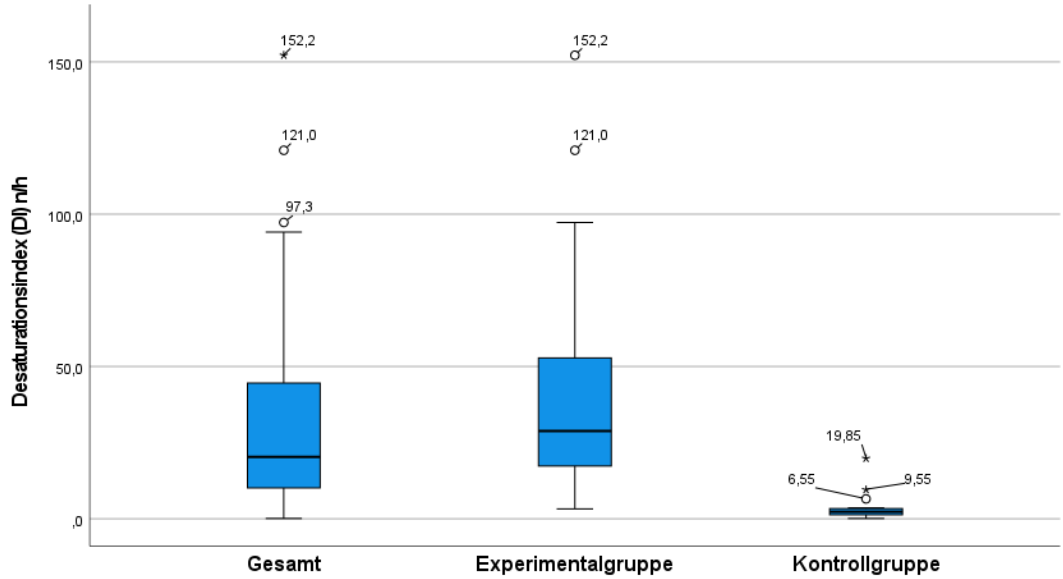
Anmerkung. Milde OSA: AHI 5-15/h, Moderate OSA: AHI 15-30/h, Schwere OSA: AHI ≥ 30/h

Bei 5 Studienteilnehmenden wurde eine „milde OSA“ diagnostiziert (AHI 5-15/h); bei 24 wurde eine „moderate OSA“ (AHI 15-30/h) diagnostiziert. Die größte Unterguppe (*n* = 34) stellt die Gruppe „schwere OSA“ (AHI ≥ 30/h) dar.

Abbildung 11 zeigt nun die Verteilung des Desaturationsindex (DI) innerhalb der gesamten Studienpopulation, der Experimentalgruppe sowie der Kontrollgruppe.

Abbildung 11

Verteilung des Desaturationsindex (DI) in der Studienpopulation



Anmerkung. *n* = 78

In der gesamten Studienpopulation betrug der Median des DI 20,3/h (*IQA* = 35,3/h) mit einem Maximum von 152,2/h und einem Minimum von 0,1/h. In der Experimentalgruppe betrug der Median 28,8/h (*IQA* = 36,9/h), in der Kontrollgruppe lag er bei 2,3/h (*IQA* = 2,5/h).

Die DI-Werte innerhalb der beiden Gruppen zeigten keine Normalverteilung im Shapiro-Wilk-Test ($p \leq 0{,}01$ in der Experimentalgruppe, $p = 0{,}03$ in der Kontrollgruppe), sodass im Zusammenhang mit dem DI ebenfalls nicht-parametrische Tests eingesetzt wurden.

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und dem AHI ($r = 0{,}06$, $p = 0{,}569$) oder dem DI ($r = 0{,}05$, $p = 0{,}65$). Dies unterscheidet unser Studienkollektiv von zuvor beschriebenen Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen den nächtlichen Atemwerten und dem Alter beschrieben ist (Leppänen et al., 2017).

Im Vergleich der medianen nächtlichen Atemwerte in Abhängigkeit vom Geschlecht mittels Mann-Whitney-U-Test zeigt sich, dass Männer analog zu vorherigen Studien (Terry Young et al., 2002b) höhere Werte (AHI = 28,7; DI = 25,0) aufwiesen als Frauen (AHI = 18,1; DI = 16,9). Diese Unterschiede erwiesen sich jedoch nicht als signifikant (AHI: $U = 484{,}5$, $p = 0{,}10$; DI: $U = 461{,}5$, $p = 0{,}06$).

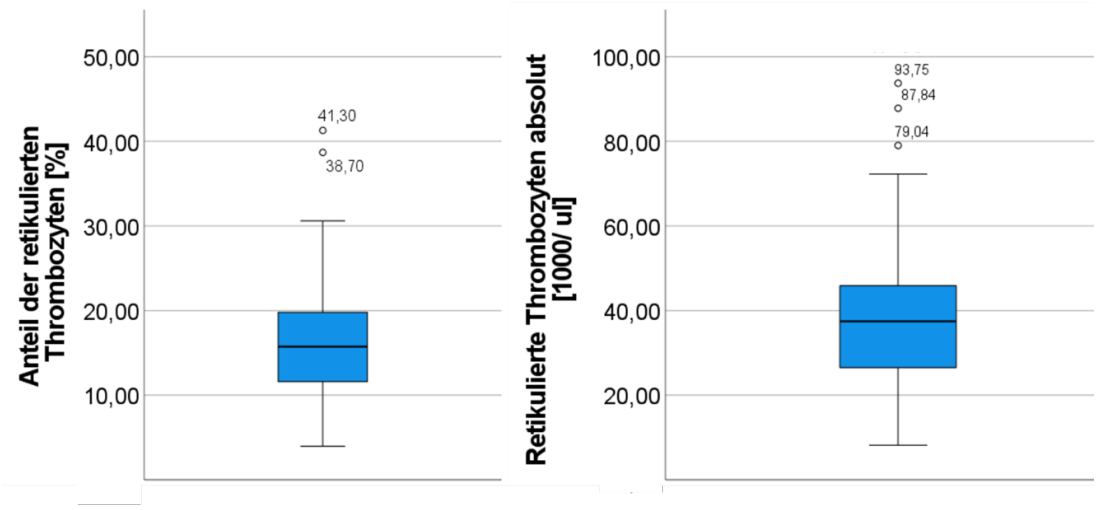
Es bestand aber ein deutlicher sowie signifikanter Zusammenhang zwischen dem BMI und den Werten AHI (r = 0,451, p < 0,001), DI (r = 0,591, p < 0,001), und SpO2 ≤ 90% (r = 0,400, p = 0,001) sowie dem OSA-Schweregrad (r = 0,442, p ≤ 0,001).

3.2.2 Retikulierte Thrombozyten: Verteilung und Zusammenhänge

Abbildung 12 zeigt die Verteilung des prozentualen Anteils der retikulierten Thrombozyten an der Gesamtpopulation der Thrombozyten sowie der absoluten Anzahl der retikulierten Thrombozyten unter allen Studienteilnehmenden.

Abbildung 12

Verteilung der der retikulierten Thrombozyten in der Studienpopulation



Anmerkung. links: Anteil der retikulierten Thrombozyten [%], n = 78. rechts: absolute Werte der retikulierten Thrombozyten [x1000/µl], n = 69.

Der Median des prozentualen Anteils an retikulierten Thrombozyten in der gesamten Studienpopulation betrug 15,75% (*IQA* = 8,57%) mit einem Maximum von 41,30% und einem Minimum von 3,98%.

Der Median der absoluten Werte der retikulierten Thrombozyten in der gesamten Studienpopulation betrug 37,47 (*IQA* = 19,62) [x1000/µl] mit einem Maximum von 93,75 [x1000/µl] und einem Minimum von 8,18 [x1000/µl].

Eine Analyse der Ausreißer, definiert als die Messwerte mit einem *Z*-Wert außerhalb des Referenzbereiches -2 bis 2, wurde durchgeführt und in Abbildung 12 dargestellt. Bei dem prozentualen RP-Wert ließen sich so 2 Ausreißer feststellen mit den jeweiligen Werten von 38,7% sowie 41,3% (*Z*-Wert = 3,11 und 3,47). Bei den absoluten RP-Werten handelte es sich um die 3 absoluten RP Werte von mehr als 79,04 [x1000/µl] (*Z*-Wert 2,33; 2,83 sowie 3,16). Diese Ausreißer wurden in den weiteren Analysen nicht ausgeschlossen.

Innerhalb der beiden Gruppen zeigte sich im Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung des prozentualen Anteils der RP (Experimentalgruppe: p = 0,002, Kontrollgruppe: p = 0,047) oder der absoluten Anzahl der RP (Experimentalgruppe: p = 0,003, Kontrollgruppe: p = 0,042), sodass auch im Zusammenhang mit RP nicht-parametrische Tests eingesetzt wurden.

Es zeigten sich moderate bzw. schwache Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil der RP und den Komorbiditäten arterielle Hypertonie (r = 0,341, p = 0,002), Herzrhythmusstörungen (r = 0,262, p = 0,21) und Diabetes mellitus (r = 0,309, p = 0,006).

3.2.3 Gesamtthrombozytenzahl und mittleres Thrombozytenvolumen (MPV): Verteilung und Zusammenhänge

In diesem Kapitel werden die Verteilung der Thrombozytenzahl und des mittleren Thrombozytenvolumen (*mean platelet volume*, MPV) sowie Zusammenhänge zu weiteren klinischen Daten und den RP beschrieben. Bei 9 Studienteilnehmenden wurden diese Werte nicht erhoben, sodass die Ergebnisse von 69 Studienteilnehmenden ausgewertet werden konnten.

Die Gesamtwerte der Thrombozyten lagen in der Studienpopulation zwischen 98.000/µl und 409.000/µl (M = 246.173/µl, SD = 58.295/µl).

Das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) [fl] lag in der Studienpopulation zwischen 8,30 und 14,00 (M = 10,51fl, SD = 0,93fl).

Es zeigte sich eine moderate Korrelation zwischen den Gesamtwerten der Thrombozyten und dem Geschlecht (r = 0,314, p = 0,009). Ein Zusammenhang zu den nächtlichen Atemwerten AHI, DI oder SpO2 ≤ 90% bestand nicht. Während die Thrombozytengesamtzahl mit den absoluten Werten der RP erwartungsgemäß moderat korreliert (r = 0,390, $p \leq$ 0,001), zeigte sich kein Zusammenhang zu dem prozentualen Anteil der RP. Es bestand jedoch ein negativer, moderater Zusammenhang zwischen der Thrombozytengesamtzahl und MPV (r = - 0,304, p = 0,011).

Neben diesem negativen Zusammenhang zur Thrombozytengesamtzahl korrelierte der MPV-Wert positiv mit dem AHI (r = 0,289, p = 0,016) und DI (r = 0,318, p = 0,008). Eine Korrelation zu der Schlafdauer mit reduzierter Sauerstoffsättigung (SpO2 ≤ 90%) fand sich nicht. Außerdem korrelierte MPV schwach mit dem prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten (r = 0,244, p = 0,043). Ein Zusammenhang zwischen MPV und den absoluten RP-Werten bestand nicht (r = 0,071, p = 0,563).

3.3 Zusammenhänge zwischen OSA und retikulierten Thrombozyten (Hypothese 1)

In dieser Dissertation wurde die Hypothese 1 aufgestellt, dass ein positiver Zusammenhang zwischen Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) und Desaturationsindex (DI) einerseits und den prozentualen sowie absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten anderseits besteht (Hypothese 1).

Tabelle 5 zeigt Korrelationen zwischen den nächtlichen Atemwerten AHI, DI und SpO2 ≤ 90% und den prozentualen und absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten.

Tabelle 5

Korrelationen zwischen den nächtlichen Atemwerten und den retikulierten Thrombozyten

	AHI	**DI**	**SpO2 ≤ 90%**	**RP %**	**RP absolut**
AHI		,881**	,698**	,652**	,520**
DI	,881**		,766**	,545**	,487**
SpO2 ≤ 90%	,698**	,766**		,374**	,285*
RP %	,652**	,545**	,374**		,832**
RP absolut	,520**	,487**	,285*	,832**	

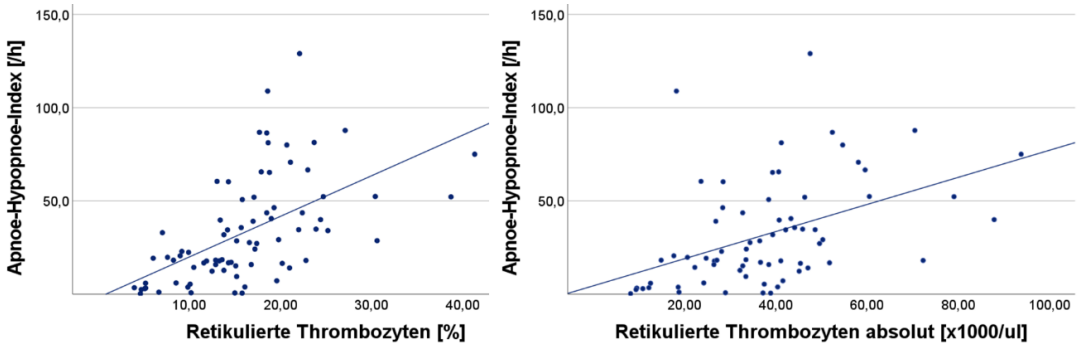
Anmerkung: *p < 0,05, **p < 0,01. Der AHI, DI und SpO2 ≤ 90% korrelieren erwartungsgemäß stark untereinander, genauso wie die relativen und absoluten RP-Werte.

3.3.1 Der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) und die retikulierten Thrombozyten zeigen eine starke Korrelation

Die Werte des Apnoe-Hypopnoe-Index zeigen eine positive Korrelation zu dem prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten an der Gesamtpopulation (r = 0,698, p < 0,001) und zu den absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten (r = 0,520, p < 0,001; vgl. Tabelle 5). Dies entspricht jeweils einer starken Korrelation (Cohen, 1992).

Abbildung 13

Abhängigkeit der RP-Werte vom Apnoe-Hypopnoe-Index



Anmerkung. links: AHI und Anteil der retikulierten Thrombozyten [%], n = 78, korrigiertes R^2 = 0,307, rechts: AHI und absolute Werte der retikulierten Thrombozyten [x1000/µl], n = 69, korrigiertes R^2 = 0,195.

Die bivariate Regressionsanalyse ergab, dass der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) einen Einfluss auf den prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten hat (F (1,76) = 35,089, p < 0,001). Der geschätzte Effekt bei Anstieg des Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) um 1/h entspricht einem Anstieg des prozentualen Anteils der retikulierten Thrombozyten um 0,145% (β = 0,145, t = 5,942, p < 0.001). Durch den AHI ließen sich 30,7% der Varianz des prozentualen Anteils der retikulierten Thrombozyten erklären (korrigiertes R^2 = 0,307). Dies entspricht mit f^2 = 0.67 einem starken Effekt (Cohen, 1992).

Auch auf die absoluten Werte der retikulierten Thrombozyten fand sich ein Einfluss des AHI (F (1,67) = 17,475, p < 0,001). Der geschätzte Effekt bei Anstieg des AHI um 1/h liegt bei einer Zunahme der retikulierten Thrombozyten um 284/µl (β = 0,284, t = 4,180,

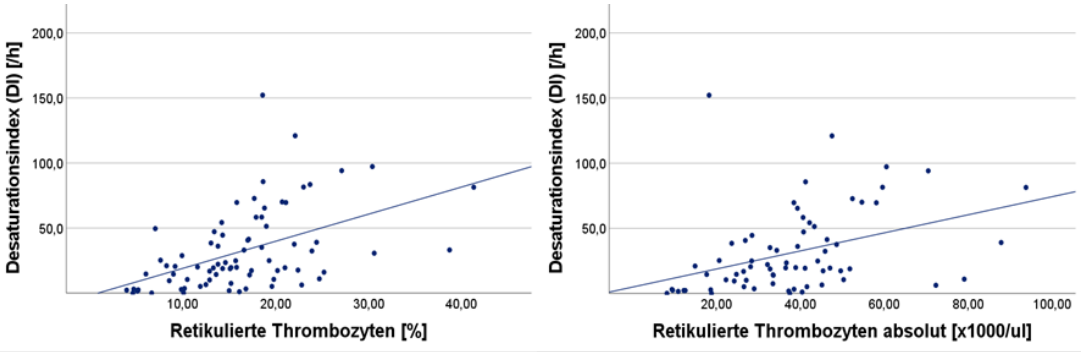
p < 0,001). Durch den AHI ließen sich 19,5% der Varianz der absoluten Werte der retikulierten Thrombozyten erklären (korrigiertes R^2 = 0,195). Dies entspricht mit f^2 = 0,49 einem starken Effekt (Cohen, 1992).

3.3.2 Der Desaturationsindex (DI) und die RP-Werte zeigen eine moderate bis starke Korrelation

Auch die Werte des Desaturationsindex (DI) zeigen in dieser Studienpopulation eine positive Korrelation (vgl. Tabelle 5) zu dem prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten (r = 0,545, p < 0,001), was einer starken Korrelation entspricht. Weiterhin bestätigte sich eine positive Korrelation zu den absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten (r = 0,487, p < 0,001); dies entspricht einer moderaten Korrelation (Cohen, 1992).

Abbildung 14

Abhängigkeit der RP-Werte vom Desaturationsindex



Anmerkung. links: AHI und Anteil der retikulierten Thrombozyten [%], n = 78, korrigiertes R^2 = 0,236, rechts: AHI und absolute Werte der retikulierten Thrombozyten [x1000/µl], n = 69, korrigiertes R^2 = 0,137.

Die bivariate Regressionsanalyse zeigte, dass der Desaturationsindex (DI) einen Einfluss auf den prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten hat (F (1,76) = 24,148, p < 0,001). Der geschätzte Effekt beim Anstieg des DI um 1/h entspricht einem Anstieg des Anteils der retikulierten Thrombozyten um 0,116% (β = 0,116, t = 4,914, p < 0,001). Durch den DI ließen sich 23,6% der Varianz des prozentualen Anteils der retikulierten Thrombozyten erklären (korrigiertes R^2 =0,236). Dies entspricht mit f^2 = 0.56 einem starken Effekt (Cohen, 1992).

Auch auf die absoluten Werte der retikulierten Thrombozyten zeigte sich ein Einfluss des Desaturationsindex (F (1,67) = 11,808, p < 0,001). Der geschätzte Effekt beim Anstieg des DI um 1/h liegt bei einem Anstieg der retikulierten Thrombozyten um 216/µl (β = 0,216, t = 3,436, p = 0,001). Durch den DI ließen sich 13,7% der Varianz der absoluten Werte der retikulierten Thrombozyten erklären (korrigiertes R^2 = 0,137). Dies entspricht mit f^2 = 0,39 einem mittleren Effekt (Cohen, 1992).

3.3.3 Die Schlafdauer unter reduzierter Sauerstoffsättigung (SpO2 ≤ 90%) und die RP-Werte zeigen eine moderate bzw. milde Korrelation

Die Schlafdauer unter reduzierter Sauerstoffsättigung (SpO2 ≤ 90%) korreliert sowohl positiv mit dem prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten (r = 0,374, p < 0,001), was einem moderaten Effekt entspricht, als auch mit den absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten (r = 0,285, p = 0,005), was einem milden Effekt entspricht (Cohen, 1992; vgl. Tabelle 5).

3.4 OSA-Erkrankte weisen höhere RP-Werte als Gesunde auf (Hypothese 2)

Die zweite Hypothese, die in dieser Dissertation geprüft werden soll, lautet, dass OSA-Erkrankte signifikant höhere RP-Werte aufweisen als gesunde Kontrollpersonen.

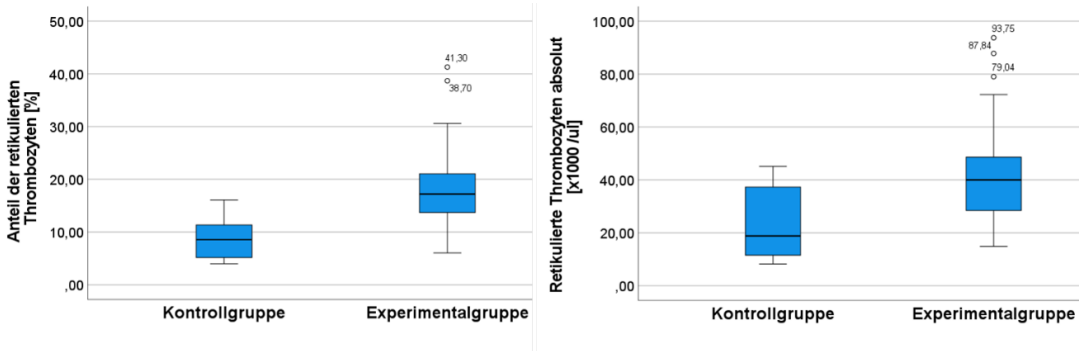
Hierzu wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben eingesetzt.

Die Studienteilnehmenden innerhalb der Experimentalgruppe wiesen signifikant höhere prozentuale Werte der RP (Median = 17,20%, *IQA* = 7,50%) auf als Studienteilnehmende in der Kontrollgruppe (Median = 8,56%, *IQA* = 7,37%; U = 110,000, p < 0,001). Dies entspricht mit r = 0,52 nach Cohen (1992) einem starken Effekt.

Auch bei den absoluten Werten der RP zeigten sich signifikant höhere Werte innerhalb der Experimentalgruppe (Median 39.980/µl, *IQA* 20.420/µl) als in der Kontrollgruppe (Median 18.800/µl, *IQA* 26.600/µl; U = 159,000, p < 0,001). Dies entspricht mit r = 0,43 nach Cohen (1992) einem mittleren Effekt. Abbildung 15 zeigt einen Vergleich der Werte der retikulierten Thrombozyten in der Kontroll- und Experimentalgruppe.

Abbildung 15

Vergleich der retikulierten Thrombozyten in Kontroll- und Experimentalgruppe



Anmerkung. links: Anteil der retikulierten Thrombozyten [%], *n* = 78. rechts: absolute Werte der retikulierten Thrombozyten [x1000/µl], *n* = 69.

3.5 Vergleich der retikulierten Thrombozyten bei unterschiedlichen OSA-Schweregraden

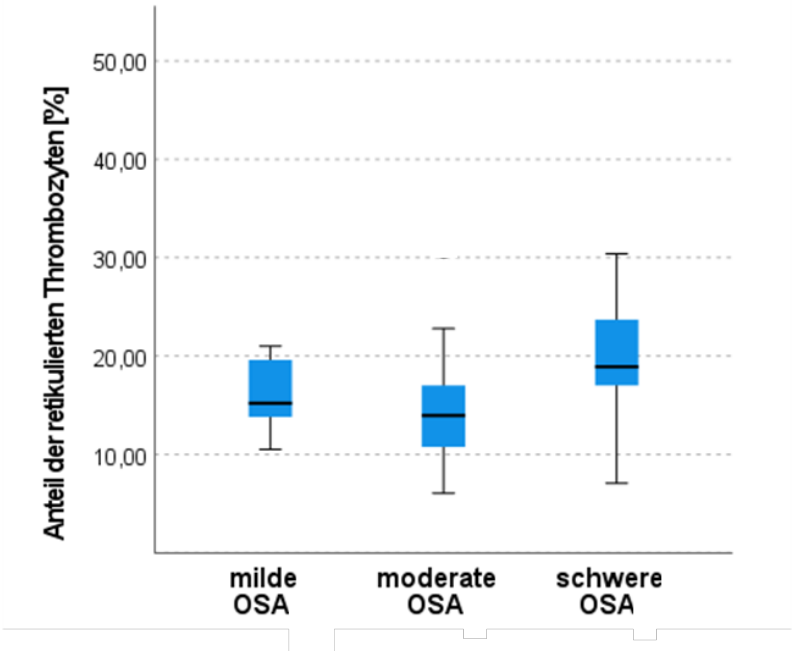
Anhand des AHI wurde die Experimentalgruppe in die Gruppen „milde OSA“ (AHI 5-15/h), „moderate OSA“ (AHI 15-30/h) und „schwere OSA“ (AHI ≥ 30/h) eingeteilt (vgl. Abbildung 10). In diesem Abschnitt wird untersucht, ob sich die prozentualen Anteile der retikulierten Thrombozyten zwischen den 3 Schweregraden unterscheiden. Hierzu wurde der Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben eingesetzt. Zum spezifischen Gruppenvergleich wurde die Bonferonni-Korrektur als Post-hoc-Test eingesetzt.

Der Kruskal-Wallis-Test ergab, dass sich der Anteil der retikulierten Thrombozyten an der Gesamtpopulation zwischen den unterschiedlichen OSA-Schweregraden unterscheidet (Chi-Quadrat (2) = 15,035, $p < 0{,}001$).

Der Post-hoc-Test zeigt, dass ein signifikanter Unterschied lediglich zwischen den Gruppen „moderate OSA“ und „schwere OSA“ besteht ($z = -3{,}844$, $p < 0{,}001$). Zwischen den Gruppen „milde OSA“ und „moderate OSA“ sowie zwischen „milde OSA“ und „schwere OSA“ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der RP-Werte. Abbildung 16 vergleicht die Verteilung der RP-Werte in Abhängigkeit vom Schweregrad.

Abbildung 16

Vergleich der retikulierten Thrombozyten innerhalb der 3 OSA-Schweregrade



Anmerkung. Lediglich zwischen den Gruppen „moderate OSA“ und „schwere OSA“ besteht ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils der RP; eine stetige Zunahme der Werte bei steigendem Schweregrad bestätigte sich nicht.

3.6 Identifikation möglicher Einflussfaktoren auf RP-Werte

Um mögliche weitere Einflussfaktoren auf die retikulierten Thrombozyten in dieser Studienpopulation zu analysieren, wurde eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt.

Da die schlafmedizinischen Parameter stark untereinander korrelieren ($r \geq 0{,}7$), besteht Multikollinearität, was eine Verletzung der Voraussetzungen für lineare Regression darstellt (Schneider, 2007). Deswegen werden die nächtlichen Atemwerte DI und SpO2 ≤ 90% nicht in dieses Regressionsmodell eingeschlossen, sondern lediglich der AHI als Hauptuntersuchungsparameter.

Zur Analyse möglicher Einflussfaktoren wurden neben dem Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) der Einfluss von Alter, Geschlecht, BMI, kardiovaskulären Risikofaktoren, Einnahme von Medikamenten sowie von pneumologischen Komorbiditäten untersucht.

Die multiple Regressionsanalyse (siehe Anhang) zeigte, dass neben dem AHI als stärkstem Einflussfaktor ($\beta = 0{,}427$, $p = 0{,}009$) auch das Alter ($\beta = 0{,}356$, $p = 0{,}019$) und der Body-Mass-Index ($\beta = 0{,}329$, $p = 0{,}042$) einen Einfluss auf den Anteil der retikulierten

Thrombozyten hatte (F = 4,15, p = 0,001). Die Einnahme von Medikamenten sowie das Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren oder pneumologischen Vorerkrankungen zeigten keinen signifikanten Einfluss.

Durch das Regressionsmodel mit den Variablen AHI und den genannten vermuteten Einflussfaktoren konnte 47,7% der Varianz des Anteils der retikulierten Thrombozyten erklärt werden, was nach Cohen (1992) mit f^2 = 0,91 einem starken Effekt entspricht.

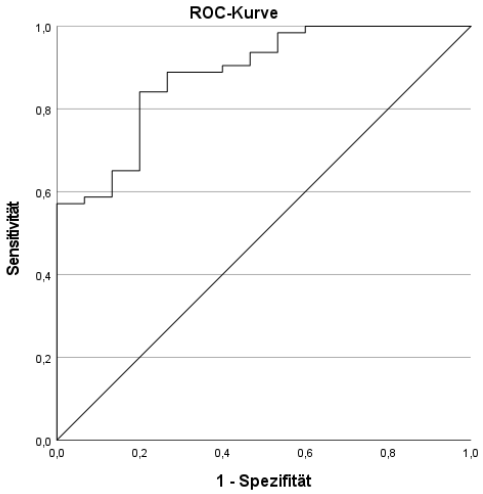
3.7 Bestimmung eines optimalen Cut-off-Wertes

Zuvor konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen RP und AHI besteht und dass OSA-Erkrankte höhere RP-Werte aufwiesen als gesunde Kontrollpersonen. In diesem Kapitel wird anhand einer ROC-Kurve getestet, ob RP-Werte genutzt werden können, um die Zugehörigkeit zur Experimentalgruppe bzw. Kontrollgruppe festzustellen und somit das Vorliegen einer OSA unter den Studienteilnehmenden vorauszusagen.

Abbildung 17 zeigt die ROC-Kurve zur Prädiktion von OSA anhand des Anteils der retikulierten Thrombozyten. Die *AUC* betrug 0,884 (p < 0,001, 95%-Konfidenzintervall: 0,796 - 0,974) dies entspricht mit einem Wert zwischen 0,8 - 0,9 einem „guten“ Modell (Mandrekar, 2010).

Abbildung 17

ROC-Kurve für die Prädiktion von OSA durch die prozentualen RP-Werte



Anmerkung. AUC (area under the curve) = 0,884. Die diagonale Bezugslinie repräsentiert ein Modell ohne prädiktive Eigenschaften (*AUC* 0,5), das zufällig zwischen erkrankt

und gesund entscheidet. Der Graph im oberen linken Quadranten repräsentiert die Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher Grenzwerte für den Anteil der RP.

Mithilfe des *Youden*-Index und des *closest to* (0,1) wurden zwei Verfahren eingesetzt, um einen geeignet Cutoff-Wert zu bestimmen (siehe Kapitel 2.11).

Der maximale *Youden*-Index *J* = 0,641 für die prozentualen Werte der retikulierten Thrombozyten lag bei einem Wert von 12,7% vor.

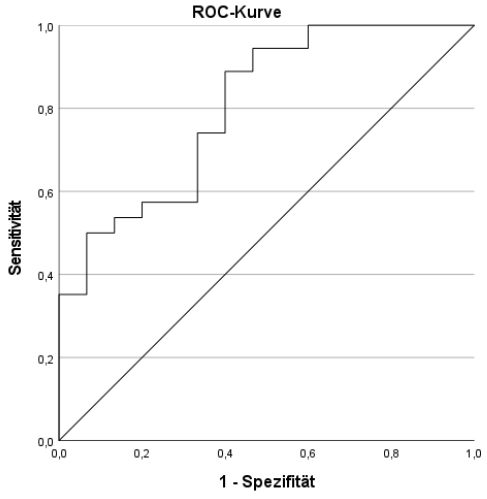
Der *closest to* (0,1)-Wert von 0,255 fand sich ebenfalls bei dem RP-Wert von 12,7%, sodass der Wert mit dem höchsten *Youden*-Index und der *closest to* (0,1) identisch sind.

Bei Einsatz des Cut-off-Wertes von 12,7% für den prozentualen Anteil der RP wurden OSA-Erkrankte mit einer Sensitivität von 84,12% und einer Spezifität von 80% erkannt (siehe Anhang).

Abbildung 18 zeigt die ROC-Kurve für den Einsatz der absoluten RP-Werte als Prädiktor für OSA. Die *AUC* betrug 0,804 ($p < 0,001$, 95%-Konfidenzintervall 0,677 - 0,930); dies entspricht mit einem Wert zwischen 0,8 - 0,9 ebenfalls einem „guten“ Modell (Mandrekar, 2010).

Abbildung 18

ROC-Kurve für die Prädiktion von OSA durch die absoluten RP-Werte



Anmerkung. AUC (area under the curve) = 0,804. Die diagonale Bezugslinie repräsentiert ein Modell ohne prädiktive Eigenschaften (*AUC* 0,5), das zufällig zwischen erkrankt und gesund entscheidet. Der Graph im oberen linken Quadranten repräsentiert die Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher Grenzwerte für die absoluten Werte der RP.

Der maximale *Youden*-Index *J* von 0,489 für die absoluten Werte der retikulierten Thrombozyten lag bei einem Wert von 24,48 [x1000/µl] vor.

Der *closest to* (0,1) Wert von 0,415 ergab sich ebenfalls bei dem RP-Wert von 24,48 [x1000/µl]. Somit waren der Cut-Off-Wert mit dem höchsten *Youden*-Index und der *closest to* (0,1) erneut identisch.

Bei Einsatz des absoluten RP-Wertes 24,48 [x1000/µl] als Cut-Off-Wert wurden OSA-Erkrankte mit einer Sensitivität von 88,89% und einer Spezifität von 60% erkannt.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Dissertation wurde erstmalig die Rolle von retikulierten Thrombozyten (RP) im Zusammenhang mit obstruktiver Schlafapnoe (OSA) untersucht. Hierzu wurden die Polysomnographien und Polygraphien von 78 Studienteilnehmenden ausgewertet und eine durchflusszytometrische Bestimmung der retikulierten Thrombozyten durchgeführt. Es erfolgte eine Aufteilung in eine Experimentalgruppe aus OSA-Erkrankten und eine Kontrollgruppe aus Studienteilnehmenden, bei denen OSA ausgeschlossen werden konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) und der Desaturationsindex (DI) mit der Höhe der retikulierten Thrombozyten zusammenhängen. Die genannten OSA-Kennwerte korrelieren mit dem prozentualen Anteil der RP (AHI: r = 0,698**; DI: r = 0,545**) sowie den absoluten RP-Werten (AHI: r = 0,520**; DI: r = 0,487**). In der Regressionsanalyse zeigte sich außerdem, dass der AHI dazu geeignet ist, die prozentualen Werte der retikulierten Thrombozyten vorauszusagen (R^2 = 0,307). OSA-Erkrankte zeigten signifikant höhere prozentuale (Median = 17,20%, *IQA* = 7,50%) und absolute RP-Werte (Median = 39.980/µl, *IQA* = 20.420/µl) als gesunde Studienteilnehmende (Median = 8,56%, *IQA* = 7,37%; Median = 18.800/µl, *IQA* = 26.600/µl). Es zeigte sich eine Abhängigkeit der RP-Werte vom OSA-Schweregrad; eine klare Zuordnung zum OSA-Schweregrad anhand der RP-Werte war jedoch nicht möglich.

Es wurde ein Cut-off-Wert von 12,7% für den Anteil der retikulierten Thrombozyten ermittelt, anhand dessen OSA-Erkrankte von gesunden Kontrollpatient*innen unterschieden werden können. Bei Einsatz dieses Cut-off-Wertes wurden OSA-Erkrankte mit einer Sensitivität von 84,1% und einer Spezifität von 80,0% erkannt.

4.2 Diskussion der Methoden

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Studie, an der 63 OSA-Erkrankte und 15 Kontrollpersonen teilnahmen. Alle Patient*innen, welche die Schlafambulanz während des Studienzeitraums besuchten, wurden auf die Bereitwilligkeit zur Studienteilnahme angesprochen. Darüber hinaus wurden 8 Patient*innen aus den allgemeinen und pneumologischen Ambulanzen eingeschlossen, bei denen kein Verdacht auf eine schlafbezogene Atemstörung bestand. Neben der Ablehnung der Studienteilnahme war der häufigste Grund für die Nichtteilnahme eine zu häufige Anwendung der CPAP-

Therapie vor Studieneinschluss. Andere Ausschlusskriterien, wie das Vorliegen hämatologischer Erkrankungen oder die Einnahme hämatologisch wirksamer Medikamente, wurden nur in Einzelfällen erfüllt.

Die Zuordnung zur Experimentalgruppe der OSA-Erkrankten bzw. zur Kontrollgruppe erfolgte anhand der aktuellen Leitlinien zur Diagnostik von OSA und beinhaltete die Berücksichtigung des AHI sowie der klinischen Symptomatik und Komorbiditäten. Andere Studien definierten teilweise alle Personen als OSA-erkrankt, die einen AHI ≥ 5 aufwiesen (Reutrakul & Mokhlesi, 2017a) und berücksichtigten damit nicht, dass Personen mit einem AHI zwischen 5-15 ohne klinische Symptome oder typische Komorbidität nicht die aktuellen OSA-Diagnosekriterien erfüllen („S3-Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen – Kapitel ‚Schlafbezogene Atmungsstörungen'", 2017).

Während der Studie zeigte sich, dass nur bei wenigen Studienteilnehmenden der Schlafambulanz eine obstruktive Schlafapnoe ausgeschlossen werden konnte. Es bestand demnach eine sehr hohe Prävalenz von OSA in diesem vorselektierten Studienkollektiv aus Patient*innen der Schlafambulanz einer universitären Klinik. Ein Grund dafür könnte sein, dass der Großteil der Studienteilnehmenden schon aufgrund des klinischen Verdachts der zuweisenden Ärzt*innen oder sogar wegen einer auswärtig durchgeführten Polygraphie in die Schlafambulanz überwiesen wurde. Dies führte dazu, dass nur 7 Patient*innen ohne OSA aus der Schlafambulanz eingeschlossen werden konnten. Um einen aussagekräftigen Vergleich der retikulierten Thrombozyten zwischen OSA-Erkrankten und Gesunden zu ermöglichen, wurden 8 weitere Studienteilnehmende aus den weiteren Ambulanzen eingeschlossen. Daher ist die Kontrollgruppe (n = 15) deutlich kleiner als die Experimentalgruppe (n = 63*)* und nicht vollständig repräsentativ für die gewünschte Zielpopulation, das heißt für den Einsatz bei Patient*innen, bei denen der Verdacht auf eine OSA-Erkrankung besteht. Außerdem wurde bei einem Teil der Kontrollgruppe nur eine Polygraphie zum Ausschluss von OSA durchgeführt, da eine angeschlossene Polysomnographie im Schlaflabor nicht notwendig war, wenn ein AHI ≤ 5 vorlag. Dadurch fehlten bei diesen Studienteilnehmenden die Schlafdauer mit reduzierter Sauerstoffsättigung (SpO2 < 90%) und die *Total Sleeping Time (TST)*, welche von den ambulanten Polygraphie-Systemen nicht aufgezeichnet werden. Auffallend zeigte sich außerdem eine geringe *TST* in der Kontrollgruppe von 206,6 Minuten, sodass eine eingeschränkte Aussagekraft aufgrund der kurzen Schlafdauer besteht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass gesunde Kontrollpersonen häufiger mit einem ambulanten Polygraphiesystem untersucht wurden, welches keine Aufzeichnung der *TST* erlaubt. Außerdem sind Studienteilnehmende der Kontrollgruppe seltener zu einer zweiten

Nacht im Schlaflabor erschienen, in der aufgrund der Gewöhnung an die Messsituation häufig eine längere *Total Sleeping Time* erreicht werden konnte.

Der weitere Vergleich der Experimentalgruppe und Kontrollgruppe zeigt, dass die Kontrollgruppe durch eine deutlich jüngere Altersstruktur sowie eine geringere Anzahl von kardiovaskulären Risikofaktoren und Komorbiditäten charakterisiert war (s. Kapitel 3.1). Um den Einfluss dieser Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf die RP abzuschätzen, wurden weitere mögliche Einflussfaktoren auf die RP anhand einer multiplen Regression ausgewertet. Hier zeigte sich, dass außer dem AHI als stärkstem Einflussfaktor ($\beta = 0{,}427$) auch das Alter ($\beta = 0{,}356$) und der Body-Mass-Index ($\beta = 0{,}329$) als Einflussfaktoren wirken. Da der BMI und das Alter in der Experimentalgruppe im Durchschnitt höher waren, können sie als mögliche Confounder gewirkt haben. Eine Möglichkeit zur Kontrolle hierfür in zukünftigen Studien könnte die Durchführung eines Matchings von BMI und Alter sein.

Die Bestimmung der retikulierten Thrombozyten erfolgte in der Durchflusszytometrie unter Einsatz von Thiazol-Orange (TO) und anti-CD41-Antikörpern analog zu beschriebenen Protokollen (Hedley et al., 2015a; Wu et al., 2015). Hierbei wurden jeweils zwei FACS-Proben pro Patient eingesetzt; eine TO-markierte Messprobe sowie eine weitere Referenzprobe, die kein TO enthält und als Maß für das Signal durch TO-Autofluoreszenz dient. Durch das Gating wurde der CD-41/TO- positive Zielbereich identifiziert, indem sich die Zellpopulation der retikulierten Thrombozyten (RP) abzeichnet.

Kienast et al. beurteilten TO als einen geeigneten Farbstoff für den Nachweis von RP, da es durch Licht mit der Wellenlänge der eingesetzten Argon-Laser angeregt wird und ein starkes Fluoreszenzsignal bei der Bindung von RNA auslöst (Kienast & Schmitz, 1990b). Die durchflusszytometrische Auswertung bei Einsatz von Thiazol-Orange ist jedoch mit Schwierigkeiten bezüglich der Spezifität und Reproduzierbarkeit behaftet, die bereits einem routinemäßigen Einsatz der RP in unterschiedlichen Einsatzgebieten im Weg stand (Hoffmann, 2014; Meintker & Krause, 2020). Es fehlt weiterhin eine vollständige Standardisierung der Methode und es werden unterschiedliche Vorgaben bezüglich den eingesetzten Farbstoffen und Testbedingungen wie Temperatur und Inkubationszeit angewandt (Hedley et al., 2015a).

Ein Problem bei der Färbung mit Thiazol-Orange besteht in der nicht-spezifischen Bindung an α-Granula (Robinson et al., 1998). Leichte Konzentrationsunterschiede von TO oder verlängerte Inkubationszeiten können zu einem starken Anstieg des Fluoreszenz-

signales führen, was eventuell auf das Entstehen einer Anfärbung der α-Granula zurückzuführen ist (Kienast & Schmitz, 1990a). Robinson et al. konnten zeigen, dass ein Degranulationsschritt nach Stimulation der Thrombozyten mit *thrombin receptor activating peptide* (TRAP) das TO-Signal, das durch Bindung im Bereich der α-Granula entsteht, reduzieren kann (Robinson et al., 1998).

In dem Staining-Protokoll dieser Arbeit war vorgesehen, dass die FACS-Analysen nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten stattfinden, was leider nicht immer erfüllt werden konnte. Während Kienast et al. einen deutlichen Anstieg des TO-Signals erst ab einer Inkubationsdauer von 2,5 Stunden beobachteten (Kienast & Schmitz, 1990a), zeigten sich während dieser Studie bereits bei leicht verlängerten Inkubationszeiten höhere RP-Werte. Ein genaueres Einhalten der Inkubationszeit oder auch das Einsetzen von TRAP hätte vermutlich zur Messung niedriger RP-Werte geführt und könnte eine Erklärung für die insgesamt hohen RP-Werte sein, die in dieser Studie beobachtet wurden. In zukünftigen Studien sollte die Dauer bis zur FACS-Auswertung dokumentiert und in die Analysen mit einbezogen werden, um die Auswirkung des zeitlichen Faktors beurteilen können.

Die Auswertung der FACS-Ergebnisse erfolgte mithilfe der *Flowjo* Software von *Treestar, Inc*. Eine Verblindung in Form einer Auswertung der Daten durch eine Person, die die klinischen Daten der Studienteilnehmenden nicht kannte, konnte nicht durchgeführt werden. Daher kann ein potenzielles Bias bei der Auswertung der Daten nicht ausgeschlossen werden. Es wurde ein Cut-off Wert von 1% innerhalb der Referenzprobe gesetzt; andere Studien wählten neben 1% auch einen Cut-off Wert von 5% (Hedley et al., 2015b).

Es zeigt sich, dass weiterhin keine hinreichende Standardisierung des RP-Nachweises hinsichtlich der genauen Testbedingungen besteht. Zum Einsatz eines Cut-off-Wertes für einen Biomarker bei OSA ist jedoch eben diese Standardisierung der Referenzbereiche notwendig. Eine Möglichkeit besteht in dem Einsatz von hämatologischen Analysatoren, z.B. dem *Sysmex-XE 5000* oder *CELL-DYN Sapphire* von *Abbott*, die eine automatische Bestimmung der RP bei akzeptabler Präzision ermöglichen (Meintker et al., 2013).

Zusammenfassend zeigten sich relevante Limitationen dieser Studie. Aufgrund der geringen Anzahl an Kontrollpersonen, die innerhalb der Schlafambulanz eingeschlossen wurden konnten, wurden Studienteilnehmende aus den weiteren Ambulanzen einbezo-

gen. Mögliche Confounder stellten hierbei der BMI und das Alter der Studienteilnehmenden dar. Eine Verblindung bei der Auswertung der FACS-Ergebnisse war nicht möglich. Eine unzureichende Standardisierung und Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Auswertung der RP stellen Hindernisse dar, welche möglicherweise durch den Einsatz automatischer Analysatoren vermieden werden könnten.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 OSA geht mit einer Erhöhung der retikulierten Thrombozyten einher

In diesem Studienkollektiv aus 63 OSA-Erkrankten und 15 Gesunden konnte ein Zusammenhang zwischen den nächtlichen respiratorischen Ereignissen, gemessen an AHI, DI und der Schlafdauer mit reduzierter Sauerstoffsättigung (SpO2 ≤ 90%), und einer Erhöhung der retikulierten Thrombozyten im Blut gezeigt werden.

Der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) korreliert mit dem prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten an der Gesamtpopulation (r = 0,698, p < 0,001) sowie den absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten (r = 0,520, p < 0,001). Durch den AHI (β = 0,145) ließen sich 30,7% der Varianz des prozentualen Anteils der retikulierten Thrombozyten erklären (korrigiertes R^2 = 0,307; f² = 0.67).

Der Desaturationsindex (DI) korreliert mit dem prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten (r = 0,545, p < 0,001) sowie den absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten (r = 0,487, p < 0,001). Durch den DI (β = 0,116) ließen sich 23,6% der Varianz des prozentualen Anteils der retikulierten Thrombozyten erklären (korrigiertes R^2 = 0,236, f^2 = 0.56).

Die Schlafdauer mit reduzierter Sauerstoffsättigung (SpO2 ≤ 90%) korreliert mit dem prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten (r = 0,374, p < 0,001) sowie den absoluten Werten der retikulierten Thrombozyten (r = 0,285, p = 0,005).

Diese Ergebnisse bestätigen Hypothese 1, das heißt es wird verifiziert, dass ein positiver Zusammenhang zwischen den Krankheitsparametern von OSA und der Höhe der retikulierten Thrombozyten besteht.

Der stärkste Zusammenhang zeigte sich zwischen dem Apnoe-Hypopnoe-Index und dem prozentualen Anteil der retikulierten Thrombozyten. Doch auch der Desaturationsindex (DI) sowie die Schlafdauer mit reduzierter Sauerstoffsättigung (SpO2<90%) korre-

lieren deutlich mit den RP-Werten. Dies legt nahe, dass nicht nur die Anzahl der respiratorischen Ereignisse, sondern auch die Häufigkeit und das Ausmaß der Entsättigungen relevant sind. Dieser Effekt war bei der Analyse der prozentualen RP-Werte ausgeprägter als bei den absoluten RP-Werten. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass der Einfluss anderer Faktoren auf die Gesamtzahl der Thrombozyten bei der Auswertung der relativen RP-Werte reduziert wird.

Auch Hypothese 2 konnte durch die Ergebnisse bestätigt werden. Bei OSA-Erkrankten fand sich ein signifikant höherer prozentualer RP-Anteil (Median = 17,20%, *IQA* = 7,50%) als bei gesunden Kontrollpersonen (Median = 8,56%, *IQA* = 7,37%; $U = 110{,}000$, $p < 0{,}001$). Auch die absoluten RP-Werte innerhalb der Experimentalgruppe waren signifikant höher (Median = 39.980/µl, *IQA* = 20.420/µl) als in der Kontrollgruppe (Median = 18.800/µl, *IQA* = 26.600/µl; $U = 159{,}000$, $p < 0{,}001$; vgl. Abbildung 15).

Eine multiple Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um weitere Einflussfaktoren auf RP zu identifizieren. Hierbei bestätigte sich der AHI als stärkster Einflussfaktor ($\beta = 0{,}427$). Weitere signifikante Einflussfaktoren waren das Alter ($\beta = 0{,}356$) und der BMI ($\beta = 0{,}329$). Der Einfluss von Alter und BMI auf RP wurde bereits durch andere Autoren/Autorinnen beschrieben; die Daten dieser Dissertation unterstützen die bereits veröffentlichten Ergebnisse (Goudswaard et al., 2021; Hoffmann et al., 2013).

Das Vorliegen anderer Faktoren wie zum Beispiel pneumologischer Vorerkrankungen zeigte keinen signifikanten Einfluss. Ursprünglich bestand die Vermutung, dass pneumologische Vorerkrankungen, die analog zu OSA mit einer Hypoxie einhergehen können, ebenfalls ein Stimulus für die RP-Entstehung sein könnten. Dies bestätigte sich anhand dieser Daten nicht, sodass eine Hypoxie vermutlich nicht alleinige Ursache der erhöhten RP-Werte ist oder die vertretenen Vorerkrankungen nicht mit einer relevanten Hypoxie einhergingen. Um die genannte Vermutung genauer zu prüfen, sollten in weiteren Untersuchungen die Art und Schwere der pneumologischen Vorerkrankung genauer berücksichtigt werden, um zu beurteilen, ob die vorliegenden Krankheiten mit einer relevanten nächtlichen Hypoxie einhergehen. Bei der genaueren Differenzierung und Auswertung der RP bei Patient*innen mit z.B. fibrotischen Lungenerkrankungen, chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) oder pulmonaler Hypertonie, könnte neben dem Einfluss der Hypoxie auch die Rolle der Inflammation auf die RP untersucht werden. Hierfür sollten krankheitsspezifische Marker als Maß für die Schwere und die Wahrscheinlichkeit für das Entstehen von nächtlicher Hypoxie einbezogen werden.

Ein Zusammenhang zwischen RP und OSA wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Zuvor wurden RP als Marker für die Evaluation anderer Krankheitsbilder untersucht (s. Tabelle 1), wie zur Evaluation der Thrombopoese bzw. von Thrombozytopenien und zur Prädiktion des Outcomes bei Sepsis, Schlaganfall und akutem Koronarsyndrom (Hoffmann, 2014).

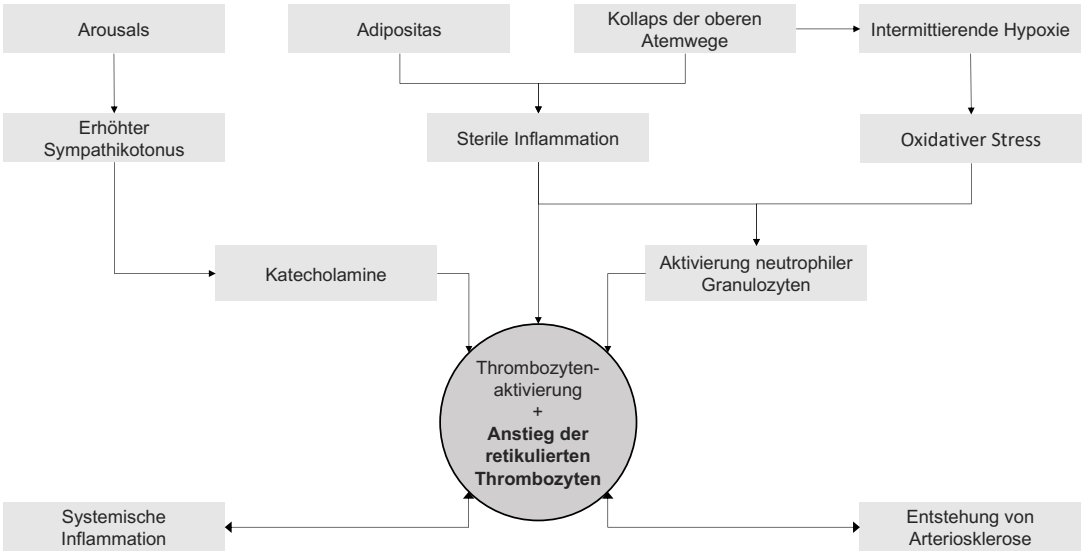
Die dargestellten Ergebnisse ergänzen das Verständnis der Rolle von thrombozytären Faktoren bei OSA und sind von besonderer Relevanz, da RP über ein höheres thrombogenes Potential verfügen (Guthikonda et al., 2008; Meintker & Krause, 2020). Dies könnte ein weiterer Faktor sein, um die deutlich erhöhte Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen bei OSA zu erklären.

4.3.2 OSA und retikulierte Thrombozyten: Mechanismen und aktueller Forschungsstand

In Kapitel 1.3. wurden bereits einige bekannte Auswirkungen von OSA auf die Morphologie und Funktion von Thrombozyten aufgezeigt. Im Folgenden soll dargestellt werden, wie es zur Aktivierung von Thrombozyten bei OSA kommt, um mögliche Ursachen für den beobachteten Anstieg der RP zu diskutieren. Abbildung 19 zeigt das Zusammenwirken von Sympathikus, oxidativem Stress und Inflammation bei der Aktivierung von Thrombozyten.

Abbildung 19

Mechanismen der Aktivierung von Thrombozyten bei OSA



Anmerkung. In Anlehnung an Gabryelska et al., 2018. Durch eine Aktivierung des Sympathikus und die Entstehung von oxidativem Stress und Inflammation entsteht eine persistierende Aktivierung von Thrombozyten bei OSA. Eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten im Knochenmark unter oxidativem Stress und steriler Inflammation bewirkt einen Anstieg der retikulierten Thrombozyten.

Der erhöhte Sympathikotonus bei OSA, welcher durch nächtliche Arousals und intermittierende Hypoxien (IH) verursacht werden kann, wurde mit der Entstehung zahlreicher Komorbiditäten von OSA wie arterieller Hypertonie assoziiert (s. Kapitel 1.1.4). Darüber hinaus beeinflusst eine vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen die Thrombozyten, denn Noradrenalin wirkt als direkter Aktivator von Thrombozyten (Larsson et al., 1994; Phillips & O'driscoll, 2013).

Oxidativer Stress ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung endothelialer Dysfunktion und kardiovaskulärer Erkrankungen bei OSA (s. Kapitel 1.1.4). Darüber hinaus sind Einflüsse von oxidativem Stress auf Thrombozyten bekannt. Das Superoxidanion, welches als Hauptvertreter der ROS gilt, kann eine Thrombozytenaktivierung bewirken (Freedman, 2008). Wie in Kapitel 1.1.4 beschrieben, sinkt bei OSA die NO-Bioverfügbarkeit am Endothel (Badran et al., 2014; Varadharaj et al., 2015).. Dies führt zusätzlich zu einer reduzierten NO-abhängigen Hemmung der Thrombozytenaktivierung, Expression thrombozytärer Oberflächenproteine wie P-Selektin und endothelialer Thrombozytenadhäsion (Cheung et al., 1997; Yoneyama et al., 2002).

Ein weiterer relevanter Faktor für die Aktivierung von Thrombozyten ist die Entstehung von Inflammation. ROS führen über eine gesteigerte Expression von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie NF-κB zu einer proarteriosklerotischen Kaskade, die eine Zirkulation von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen beinhaltet (Lavie, 2009). Außerdem führt der Kollaps der oberen Atemwege bei OSA durch mechanische Irritation zu einem lokalen Entzündungsprozess, der auch systemisch wirksam sein kann (Gabryelska et al., 2018). Eine weitere Ursache von Inflammation bei OSA besteht in der hohen Prävalenz von Adipositas, welche zur Entstehung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF-α und IL-6 führt (Corgosinho et al., 2020). Diese Zytokine können eine weitere Aktivierung der Thrombozyten bewirken (Theofilis et al., 2021).

So begünstigt das Zusammenspiel aus Sympathikus, oxidativem Stress und Inflammation eine persistierende Thrombozytenaktivierung bei OSA-Erkrankten (Gabryelska et al., 2018). Möglicherweise spielen diese Mechanismen auch eine Rolle als Auslöser für den Anstieg der retikulierten Thrombozyten. Eine Veränderung der Thrombozytenpopulation zugunsten jüngerer, thrombogener Spezies könnte einen weiteren Weg der Aktivierung des thrombozytären Systems bei OSA darstellen.

Hinweise in der aktuellen Literatur, welche die Beobachtung einer Vermehrung der RP in OSA unterstützen, finden sich unter anderem im MPV-Wert. Dieser Thrombozytenindex wird als Marker von OSA sowie kardiovaskulärer und metabolischer Komorbiditäten von OSA angesehen (Kanbay et al., 2013b). Die Erhöhung des MPV in OSA wird darauf zurückgeführt, dass aktivierte Thrombozyten ein größeres Volumen haben, sodass ein erhöhtes MPV die verstärkte Thrombozytenaktivierung widerspiegeln könnte (Gabryelska et al., 2018). Möglicherweise spielt auch hier eine Vermehrung der retikulierten Thrombozyten eine Rolle. Da MPV ein Maß für die Thrombozytengröße ist und in Tieren und Menschen gezeigt wurde, dass RP größer als reife Thrombozyten sind, könnte die Erhöhung des MPV in OSA auch teilweise einen erhöhten Anteil der RP repräsentieren (Hamad et al., 2021). Diquattro et al. fand bereits einen Zusammenhang (R^2 = 0.619) zwischen RP und einem erhöhten MPV (Diquattro et al., 2009). Dieses Ergebnis bestätigt sich innerhalb der in dieser Dissertation untersuchten Population. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen den prozentualen RP-Werten und MPV *(r* = 0,244, $p < 0,05$). Des Weiteren bestätigte sich der vorbeschriebene positive Zusammenhang zwischen MPV und AHI *(r* = 0,289, $p < 0,05$) und der negative Zusammenhang zwischen MPV und der Gesamtzahl der Thrombozyten (r = - 0,304, $p < 0,05$; Hoffmann

et al., 2013). Dieser gegensätzliche Effekt auf MPV bei steigenden absoluten Thrombozytenwerten könnte eine Ursache sein, dass MPV und die absoluten RP-Werte in dieser Dissertation keine signifikante Korrelation zeigten.

Ein weiterer Hinweis in der Literatur, der das Vorliegen erhöhter RP-Werte in OSA unterstützt, besteht darin, dass sich bei OSA-Erkrankten erhöhte P-Selektin-Werte zeigten (Gabryelska et al., 2018). Dieses Zelladhäsionsmolekül wird mit der Entstehung von Atherosklerose in Verbindung gesetzt (Burger & Wagner, 2003). Durch die geringere NO-Bioverfügbarkeit bei OSA kommt es auch zu einer verstärkten Expression von P-Selektin (Cheung et al., 1997; Yoneyama et al., 2002). Retikulierte Thrombozyten sind ebenfalls durch eine vermehrte Expression von P-Selektin gekennzeichnet (Meintker & Krause, 2020). Eine Erhöhung des RP-Anteils könnte also eine weitere Ursache für die bekannte Erhöhung der P-Selektin-Werte bei OSA sein. Dies könnte ein zusätzlicher Mechanismus sein, über den hohe RP-Werte die Entstehung von Atherosklerose in OSA-Erkrankten begünstigen.

Weitere Erklärungen zu möglichen Mechanismen der Aktivierung von retikulierten Thrombozyten finden sich in Untersuchungen der Arbeitsgruppe Petzold et. al zu den Einflüssen von neutrophilen Granulozyten auf Megakaryozyten durch *„plucking“*, eine direkte Interaktion, bei der das Wachstum und die Freisetzung von Proplättchen aus Megakaryozyten stimuliert wird (Petzold et al., 2022). Nach CXCR4-CXCL12-gesteuerter Migration der neutrophilen Granulozyten in das Knochenmark wird hierbei über NOX-2 abhängige ROS die finale Phase der Freisetzung unreifer Thrombozyten reguliert. Über diese Mechanismen könnten neutrophile Granulozyten eine essenzielle Rolle bei der Verschiebung von Thrombozytenpopulationen zugunsten jüngerer Spezies in einem Umfeld von steriler Inflammation und oxidativem Stress einnehmen. OSA gilt als eine Erkrankung, deren Pathophysiologie maßgeblich durch diese Faktoren gekennzeichnet ist. Daher erscheint es plausibel, dass der in dieser Dissertation beschriebene Anstieg von retikulierten Thrombozyten bei OSA teilweise durch die Einflüsse von neutrophilen Granulozyten auf die Thrombopoese vermittelt sein könnte. Während andere bekannte Regulatoren der Thrombopoese wie Zytokine teilweise über genetisch vermittelte Prozesse Einfluss nehmen, handelt es sich bei diesem Mechanismus vermutlich um eine kurzfristigere Möglichkeit der Aktivierung der Thrombozyten. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um eine gesteigerte Freisetzung von retikulierten Thrombozyten vermittelt über neutrophile Granulozyten bei OSA-Patient*innen zu belegen. Aufgrund der beschriebenen erhöhten Thrombogenität und der geringeren Sensibilität gegenüber Thrombozytenaggregationshemmern (Guthikonda et al., 2008; Meintker & Krause,

2020) stellen diese Mechanismen weitere therapeutische Ansätze dar, um der erhöhten Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei OSA entgegenzuwirken.

4.4 Sind retikulierte Thrombozyten als Biomarker für OSA geeignet?

4.4.1 Biomarker in OSA: Relevanz und aktueller Forschungsstand

Ein weiteres Primärziel dieser Dissertation besteht in der Evaluation der retikulierten Thrombozyten als Biomarker für OSA. Der Goldstandard für die Diagnostik von OSA besteht in der Durchführung einer Polysomnographie. Dies geht jedoch mit einem hohen Zeitaufwand und hohen Kosten einher, da für die Untersuchung ein Aufenthalt im Schlaflabor mit Betreuung der Patient*innen und die Auswertung der Ergebnisse durch ausgebildetes Personal notwendig sind. Dies führt aktuell zu langen Wartezeiten auf Polysomnographien (McNicholas, 2008), was eine Hürde für Betroffene bedeuten kann und die Zeit bis zur Diagnosestellung verlängert. Aufgrund der hohen Prävalenz und massiven Unterdiagnostizierung von OSA (Young et al., 1997) kann eine zu geringe Verfügbarkeit von Polysomnographien zu einer unzufriedenstellenden medizinischen Versorgung von OSA-Erkrankten führen. Eine Alternative bietet der Einsatz von Polygraphie-Heimsystemen, wodurch eine Verringerung der Kosten und eine höhere Verfügbarkeit erreicht werden kann. Ein großer Nachteil dieser Systeme ist jedoch, dass es häufig zu Messproblemen kommt, wodurch die Ergebnisse nicht auswertbar sind und somit dennoch eine Polysomnographie notwendig wird. Außerdem werden beim Einsatz von ambulanten Polygraphien die Schlafphasen nicht aufgezeichnet, sodass es zu falsch niedrigen Ergebnissen kommen kann und der Bezug der respiratorischen Werte auf den Schlaf erschwert ist (McNicholas, 2008).

Aktuell werden als Screening-Verfahren die OSA-Fragebögen ESS und STOP-BANG eingesetzt, die auch in dieser Arbeit erhoben wurden. Diese zeigen aber relevante Limitationen. Die ESS misst zwar die subjektive Tagesschläfrigkeit, doch der Fragebogen wurde nicht für den Einsatz bei der Diagnostik von OSA validiert (Fleming et al., 2018b) und hat nur eine geringe Sensitivität von 66% (Rosenthal & Dolan, 2008). Der STOP-BANG-Fragebogen hingegen zeigt bei einem Cut-off-Wert ≥ 3 eine hohe Sensitivität von 84%, jedoch nur eine geringe Spezifität von 56,4% (Chung et al., 2016). Bereits 2017 betonte die *American Academy of Sleep Medicine* (AASM) daher die Notwendigkeit für

aussagekräftigere Screening-Instrumente, darunter auch im Blut nachweisbare Biomarker.

Der Einsatz eines Biomarkers könnte der Unterdiagnostizierung von OSA entgegenwirken, indem Patient*innen für die Polysomnographie selektiert werden, die ein erhöhtes Risiko für OSA aufweisen. Außerdem stellt ein Biomarker einen objektiven Parameter dar, was einen Vorteil gegenüber subjektiven Fragebögen bedeutet. Zahlreiche Biomarker wurden bereits im Zusammenhang mit OSA vorgeschlagen und geprüft, doch alle zeigten bisher Limitationen, die einem klinischen Einsatz im Wege standen (Fleming et al., 2018a; Montesi et al., 2012). Im folgenden Abschnitt werden ausgewählte Biomarker vorgestellt, die zuvor für den Einsatz bei OSA in Betracht gezogen wurden.

Ein Großteil der Biomarker, die bisher für den Einsatz bei OSA in Betracht gezogen wurden, gelten als Marker von Inflammation, Metabolismus oder von oxidativem Stress. Dadurch erfüllen diese Marker das Kriterium der Plausibilität, da sie vermutlich eng mit wichtigen pathophysiologischen Vorgängen der obstruktiven Schlafapnoe verbunden sind.

Eine Erhöhung von Entzündungsparametern wie IL-6, TNFα und CRP konnte nach Schlafentzug bei gesunden Studienteilnehmenden nachgewiesen werden (Patel et al., 2009). Ein wichtiger Störfaktor ist hierbei das weit verbreitete Vorliegen von Adipositas, da auch Adipozyten die proinflammatorischen Zytokine TNFα und IL-6 produzieren (Montesi et al., 2012). Steiropolus et al. konnten jedoch zeigen, dass TNFα-Werte bei OSA-Erkrankten auch im Vergleich zu gesunden adipösen Kontrollpersonen erhöht waren (Steiropoulos et al., 2010). Während einige Studien einen signifikanten Abfall von Entzündungsparametern wie CRP, Lipoproteinen, Homozystein und TNFα nach einer CPAP-Therapie beschreiben (Arias et al., 2008; Steiropoulos et al., 2007), bestätigte sich dieser Effekt in einer weiteren randomisierten kontrollierten Studie nicht (Kohler et al., 2009). Ein allgemeines Problem bei dem Einsatz von Entzündungsparametern als Biomarker für OSA besteht darin, dass Entzündungswerte bei unterschiedlichsten Krankheitsbildern erhöht sein können, so auch bei der unter OSA-Erkrankten weit verbreiteten Adipositas (Montesi et al., 2012).

Bei metabolischen Parametern, die als Biomarker diskutiert wurden, handelt es sich aufgrund des engen Zusammenhanges zwischen OSA und Diabetes mellitus meist um Parameter des Glukosestoffwechsels. Aronsohn et al. konnten 2010 einen BMI-unabhängigen Anstieg von HbA1c bei OSA-Erkrankten zeigen, dessen Ausmaß vom OSA-Schweregrad abhing. So wiesen Patient*innen eine Erhöhung des HbA1c von 1,49% bei

milder OSA, von 1,93% bei moderater OSA und 3,69% bei schwerer OSA auf. Dieser Befund konnte auch bei Studienteilnehmenden ohne Diabetes oder Glukosetoleranzstörung bestätigt werden (Aronsohn et al., 2010). Da OSA und Diabetes mellitus häufig zusammen und in Kombination mit Adipositas auftreten, konnte sich der HbA1c bisher nicht klar als nützlicher Biomarker durchsetzen und wird aktuell hauptsächlich für die Diabetes mellitus-Überwachung bei OSA-Erkrankten eingesetzt (Montesi et al., 2012).

Zu den untersuchten Biomarkern aus dem Bereich des oxidativen Stresses zählen 8-Isoprostan, ein Marker für Lipidoxidation, 8-OHdG, ein Marker für oxidativen Stress an Nukleinsäuren sowie Stickstoffmonoxid (NO). Carpagnano et al. konnten erhöhte 8-Isoprostan-Level in morgendlichen Atemkondensaten von OSA-Erkrankten feststellen, die sich nach CPAP-Therapie deutlich reduzierten (Carpagnano et al., 2002). Peres et al. konnten diesen Zusammenhang zwischen AHI und 8-Isoprostan-Spiegel bestätigen (Peres et al., 2020). Die Ausscheidung von Isoprostanen zeigte eine Abhängigkeit vom OSA-Schweregrad und bestand unabhängig vom BMI. Auch der Marker 8-Hydroxy-2-deoxyguanosin (8-OHdG) zeigte einen höheren Plasmaspiegel und eine höhere Ausscheidung bei OSA-Erkrankten. Auch hier kam es zu einem Absinken der Werte unter CPAP-Therapie (Orrù et al., 2020). Auch bestimmte NO-Exhalationswerte wie der maximale NO-Atemwegsfluss (*J'awNO*) waren bei schwerer OSA erhöht und zeigten einen Abfall unter CPAP-Therapie (Dang-Thi-Mai et al., 2021).

Ein weiterer vielversprechender OSA-Biomarker, der in erhöhter Konzentration unter OSA-Erkrankten nachgewiesen werden konnte, ist Cystein. Dieser Zusammenhang bestätigte sich sowohl unter adipösen als auch nicht-adipösen Studienteilnehmenden. Nach 6-monatiger CPAP-Therapie zeigte sich auch hier eine signifikante Abnahme der Cysteinwerte (Cintra et al., 2011).

Die genannten Biomarker weisen unterschiedliche Stärken auf, wie den Einbezug in wichtige pathophysiologische Mechanismen von OSA, das Ansprechen auf eine CPAP-Therapie und die Unabhängigkeit von möglichen Einflussfaktoren wie Adipositas. Dennoch konnte bisher keinem dieser Biomarker ein ausreichender diagnostischer Nutzen nachgewiesen werden, der einen routinemäßigen klinischen Einsatz begründete (Fleming et al., 2018a; Montesi et al., 2012).

4.4.2 Evaluation des Anteils der retikulierten Thrombozyten als Biomarker bei OSA

Mithilfe einer ROC-Analyse wurde ermittelt, dass der prozentuale Anteil der RP (*AUC* = 0,884) besser zur Prädiktion von OSA geeignet ist als die absolute Anzahl der retikulierten Thrombozyten (*AUC* = 0,80).

Tabelle 6 zeigt, dass die in dieser Studienpopulation ermittelte *AUC* der prozentualen und absoluten RP Werte für die Prädiktion von OSA höher als die *AUC* anderer beispielhafter Biomarker und klinischer Parameter ist (Fleming et al., 2018b).

Tabelle 6

Vergleich zwischen retikulierten Thrombozyten und anderen beispielhaften Biomarkern

Biomarker	**AUC**	**95% - KI**
Prozentualer Anteil der RP	0,88	0,80 – 0,97
RP-Werte absolut	0,80	0,68 – 0,93
HbA1c + CRP + EPO	0,78	0,71 – 0,86
HbA1c	0,68	0,61 – 0,76
CRP	0,72	0,63 – 0,81
IL-6	0,63	0,54 – 0,72
Alter	0,63	0,54 – 0,72
BMI	0,78	0,71 – 0,85
Halsumfang	0,74	0,67 – 0,81
Systolischer Blutdruck	0,59	0,45 – 0,72
Diastolischer Blutdruck	0,51	0,40 – 0,62
STOP-BANG	0,70	0,61 – 0,80
ESS	0,53	0,42 – 0,64

Anmerkung. In Anlehnung an: Fleming et al., 2018.

Durch Shih und Malhotra wurden Kriterien aufgestellt, anhand derer Biomarker für OSA evaluiert werden können (Shih & Malhotra, 2011). Ein idealer Biomarker weise demnach

eine hohe Sensitivität und Spezifität für OSA auf. Es soll eine Dosis-Wirkung-Beziehung bestehen und eine Korrelation zur Schwere der Krankheit, um eine Einschätzung des Schweregrades anhand der Höhe des Biomarkers zu ermöglichen. Weiterhin soll eine effektive Therapie den Biomarker beeinflussen, sodass ein Therapiemonitoring möglich ist. Als viertes Kriterium soll der Biomarker in einen wichtigen kausalen Mechanismus bei der Pathophysiologie von OSA eingebunden sein, sodass er ein mögliches Ziel für neue Therapien bietet. Schließlich soll eine Prädiktion des kardiovaskulären Risikos durch den Biomarker möglich sein und eine Beeinflussung des Biomarkers zu einem niedrigeren kardiovaskulären Risiko führen (Shih & Malhotra, 2011). Montesi et al. nennen als weitere Gütekriterien für OSA-Biomarker die einfache und preiswerte Messbarkeit und die Mitwirkung bei mehreren unterschiedlichen pathophysiologischen Vorgängen von OSA (Montesi et al., 2012). Im Folgenden soll geprüft werden, ob der prozentuale Anteil der RP die genannten Kriterien als Biomarker für OSA zufriedenstellend erfüllt.

Zur Beurteilung des diagnostischen Nutzens von retikulierten Thrombozyten als Biomarker bei OSA wurden die Sensitivität und Spezifität für die Diagnose von OSA ermittelt. Als optimaler Cut-off-Wert wurde ein RP-Wert von 12,7% bestimmt, welcher mit einer Sensitivität von 84,1% und einer Spezifität von 80,0% für das Erkennen von OSA verbunden ist.

Bei einer Sensitivität von 84,1% wird der Großteil der OSA-Erkrankten anhand dieses Cut-off-Wertes erkannt. Eine Spezifität von 80% bedeutet eine Falsch-Positiv-Rate von 20%, sodass nur jede fünfte Polysomnographie auf Basis dieses Biomarkers unnötig durchgeführt würde. Der Anteil der RP als Biomarker zeigt demnach eine Sensitivität, die dem STOP-BANG-Test entspricht, bei zugleich höherer Spezifität. Diese Ergebnisse sind sogar einer Kombination der diskutierten Biomarker HbA1c, CRP und EPO mit einer Sensitivität von 81% und Spezifität von 60% überlegen (Fleming et al., 2018b). Hierbei ist jedoch auf die beschriebenen Limitationen zu verweisen (siehe Kapitel 4.2).

Das Kriterium einer Dosis-Wirkung-Beziehung sowie eines Zusammenhangs zwischen der Höhe des Biomarkers und dem OSA-Schweregrad kann als teilweise erfüllt angesehen werden. Es zeigte sich eine enge Korrelation zwischen dem AHI und den RP-Werten ($r = 0{,}698$, $p < 0{,}001$). Außerdem wurde bestätigt, dass sich der Anteil der RP zwischen den unterschiedlichen OSA-Schweregraden unterscheidet (Chi-Quadrat (2) = 15,035, $p < 0{,}001$). Ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nur zwischen den Gruppen „moderate OSA“ und „schwere OSA“ ($z = -3{,}844$, $p < 0{,}001$). Zwischen den Gruppen „milde OSA“ und „moderate OSA“ sowie zwischen den Gruppen „milde OSA“ und „schwere OSA“ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der RP-Werte. Somit zeigte sich eine

Dosis-Wirkung Beziehung zwischen AHI und RP, aber eine eindeutige Zuordnung zu einem OSA-Schweregrad anhand der RP-Werte war nicht möglich.

Ein Ansprechen der RP auf eine Therapie wurde in dieser Dissertation nicht geprüft. Ein Absinken der RP-Werte unter CPAP-Therapie würde die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen und den diagnostischen Wert von RP in OSA erhöhen. Auch kann aktuell nicht beurteilt werden, inwieweit retikulierte Thrombozyten in einen oder mehrere pathophysiologische Prozesse involviert sind. Möglicherweise bewirken die bekannten Einflüsse auf Thrombozyten in OSA wie der Sympathikus, oxidativer Stress, Inflammation und Adipositas auch eine Erhöhung der retikulierten Thrombozyten. Um dies zu beurteilen sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Ein weiteres Kriterium für einen idealen Biomarker bei OSA betrifft das Vorliegen eines Zusammenhanges zur Entstehung von Folgeerkrankungen. Es zeigten sich Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil der RP und den Komorbiditäten arterielle Hypertonie (r = 0,341, p = 0,002), Herzrhythmusstörungen (r = 0,262, p = 0,21) und Diabetes mellitus (r = 0,309, p = 0,006). Diese Beobachtungen sind jedoch wahrscheinlich auch darauf zurückzuführen, dass diese Komorbiditäten deutlich häufiger in der Experimentalgruppe vorlagen (siehe Kapitel 3.1.5). Dadurch können weitere Faktoren, welche die Experimentalgruppe kennzeichnen, wie ein höherer AHI, BMI und ein höheres Alter für die beobachteten Zusammenhänge verantwortlich sein. Andere Studien konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen RP und kardiovaskulären Erkrankungen wie dem akuten Koronarsyndrom und zerebrovaskulären Erkrankungen zeigen (Hannawi et al., 2018; Lakkis et al., 2004). Außerdem wird RP ein höheres thrombogenes Potential gegenüber reifen Thrombozyten zugeschrieben (Meintker & Krause, 2020) und sie könnten eine Ursache für erneute thrombotische Ereignisse unter doppelter Thrombozytenaggregationshemmung mit Aspirin und Clopidogrel sein (Armstrong et al., 2017). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, welche kardiovaskulären Erkrankungen mit retikulierten Thrombozyten in Verbindung stehen und ob eine Beeinflussung der retikulierten Thrombozyten eine mögliche Therapiemaßnahme darstellen könnte.

Das letzte Kriterium für Biomarker von OSA betrifft die einfache und preiswerte Durchführbarkeit der Bestimmung des Biomarkers. Die Bestimmung der RP in dieser Arbeit mithilfe der Durchflusszytometrie kann als aufwändig betrachtet werden und weist den Nachteil der fehlenden Standardisierung auf. Unterschiede in den Referenzbereichen der RP zwischen Laboren stehen der Anwendung eines einheitlichen Cut-off-Wertes im Wege. Durch den Einsatz von Analysatoren wie dem *Sysmex-XE 5000* oder *CELL-DYN*

Sapphire von *Abbott* könnte ein höheres Maß and Vergleichbarkeit über unterschiedliche Labore und eine einfachere und günstigere Bestimmung der RP erreicht werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die Bestimmung der retikulierten Thrombozyten ein wichtiges Instrument für das Screening auf darstellen könnten. Die ermittelte Sensitivität von 84,1% und Spezifität von 80,0% müssen sich noch in weiteren Studien, insbesondere in weniger vorselektierten Kohorten, bestätigen. Zukünftige Studien sollten unter anderem eine größere Anzahl an gesunden Kontrollen einschließen, eine Verblindung bei der Auswertung der FACS-Ergebnisse einsetzen und eine größere Vergleichbarkeit der Experimental- und Kontrollgruppe gewährleisten. Wenn sich diese Ergebnisse bestätigen, könnten RP ein wichtiges Screening-Tool zur Risikostratifizierung für OSA vor der Durchführung einer Polysomnographie sein.

Die vielversprechenden Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass retikulierte Thrombozyten einen Zusammenhang mit OSA aufweisen und dass ihnen ein wichtiger diagnostischer Nutzen zukommen könnte. Bevor ein klinischer Einsatz erwogen werden kann, sind noch weitere Studien notwendig, die diese Ergebnisse bestätigen und untersuchen, welche Mechanismen den beobachteten Anstieg von RP bei OSA-Erkrankten vermitteln. Von besonderem Interesse sind außerdem der Einfluss der CPAP-Therapie auf die retikulierten Thrombozyten sowie mögliche Zusammenhänge zwischen RP und kardiovaskulären Folgeerkrankungen von OSA. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der Rolle von Thrombozyten bei OSA und der Identifikation weiterer Einsatzgebiete der retikulierten Thrombozyten beitragen.

Literaturverzeichnis

Aldrich, M. S. (1989). Automobile Accidents in Patients with Sleep Disorders. *Sleep*, *12*(6), 487–494. https://doi.org/10.1093/sleep/12.6.487

Alonso-Fernandez, A., Garcia-Rio, F., Arias, M. A., Hernanz, A., de la Pena, M., Pierola, J., Barcelo, A., Lopez-Collazo, E., & Agusti, A. (2009). Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax*, *64*(7), 581–586. https://doi.org/10.1136/thx.2008.100537

Arias, M. A., García-Río, F., Alonso-Fernández, A., Hernanz, A., Hidalgo, R., Martínez-Mateo, V., Bartolomé, S., & Rodríguez-Padial, L. (2008). CPAP decreases plasma levels of soluble tumour necrosis factor-alpha receptor 1 in obstructive sleep apnoea. *The European Respiratory Journal*, *32*(4), 1009–1015. https://doi.org/10.1183/09031936.00007008

Armstrong, P. C., Hoefer, T., Knowles, R. B., Tucker, A. T., Hayman, M. A., Ferreira, P. M., Chan, M. V., & Warner, T. D. (2017). Newly formed reticulated platelets undermine pharmacokinetically short-lived antiplatelet therapies. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308763

Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., & Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(8), 3203–3207. https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3203

Aronsohn, R. S., Whitmore, H., Van Cauter, E., & Tasali, E. (2010). Impact of untreated obstructive sleep apnea on glucose control in type 2 diabetes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1164/rccm.200909-1423OC

Badran, M., Ayas, N., & Laher, I. (2014). Cardiovascular complications of sleep apnea: Role of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. https://doi.org/10.1155/2014/985258

Ballester, E., BADIA, J. R., HERNÁNDEZ, L., CARRASCO, E., de PABLO, J., FORNAS, C., RODRIGUEZ-ROISIN, R., & MONTSERRAT, J. M. (1999). Evidence of the Effectiveness of Continuous Positive Airway Pressure in the Treatment of Sleep Apnea/Hypopnea Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *159*(2), 495–501. https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.2.9804061

Baranchuk, A., McIntyre, W. F., & Baranchuk, A. (2010). Obstructive sleep apnea and atrial fibrillation. *Nature and Science of Sleep*, *2*, 39. https://doi.org/10.2147/NSS.S7625

Barbẽ, F., PERICÁS, J., MUÑOZ, A., FINDLEY, L., ANTÓ, J. M., AGUSTÍ, A. G. N., & de LLUC JOAN, M. (1998). Automobile Accidents in Patients with Sleep Apnea Syndrome. *American*

Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, *158*(1), 18–22. https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.1.9709135

Barceló, A., Miralles, C., Barbé, F., Vila, M., Pons, S., & Agustí, A. G. (2000). Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *The European Respiratory Journal*, *16*(4), 644–647. https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.16d13.x

Berry, R. B., Budhiraja, R., Gottlieb, D. J., Gozal, D., Iber, C., Kapur, V. K., Marcus, C. L., Mehra, R., Parthasarathy, S., Quan, S. F., Redline, S., Strohl, K. P., Davidson Ward, S. L., Tangredi, M. M., & American Academy of Sleep Medicine. (2012). Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, *8*(5), 597–619. https://doi.org/10.5664/jcsm.2172

Bradley, T. D., & Floras, J. S. (2009). Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *The Lancet*, *373*(9657), 82–93. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61622-0

Burger, P. C., & Wagner, D. D. (2003). Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*, *101*(7), 2661–2666. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2002-07-2209

Burgos-Sanchez, C., Jones, N. N., Avillion, M., Gibson, S. J., Patel, J. A., Neighbors, J., Zaghi, S., & Camacho, M. (2020). Impact of Alcohol Consumption on Snoring and Sleep Apnea: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, *163*(6), 1078–1086. https://doi.org/10.1177/0194599820931087

Cao, M. T., Sternbach, J. M., & Guilleminault, C. (2017). Continuous positive airway pressure therapy in obstuctive sleep apnea: benefits and alternatives. In *Expert Review of Respiratory Medicine*. https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1305893

Carpagnano, G. E., Kharitonov, S. A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M. P., Gramiccioni, E., & Barnes, P. J. (2002). Increased 8-Isoprostane and Interleukin-6 in Breath Condensate of Obstructive Sleep Apnea Patients. *Chest*, *122*(4), 1162–1167. https://doi.org/10.1378/chest.122.4.1162

Carpagnano, G. E., Kharitonov, S. A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M. P., Gramiccioni, E., & Barnes, P. J. (2003). 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*, *124*(4), 1386–1392. https://doi.org/10.1378/chest.124.4.1386

Castaneda, A., Jauregui-Maldonado, E., Ratnani, I., Varon, J., & Surani, S. (2018). Correlation between metabolic syndrome and sleep apnea. *World Journal of Diabetes*, *9*(4), 66. https://doi.org/10.4239/WJD.V9.I4.66

Cheung, P. Y., Salas, E., Schulz, R., & Radomski, M. W. (1997). Nitric oxide and platelet function: implications for neonatology. *Seminars in Perinatology*, *21*(5), 409–417. https://doi.org/10.1016/S0146-0005(97)80006-7

Chung, F., Abdullah, H. R., & Liao, P. (2016). STOP-Bang Questionnaire: A Practical Approach to Screen for Obstructive Sleep Apnea. *Chest*, *149*(3), 631–638. https://doi.org/10.1378/CHEST.15-0903

Chung, F., Yang, Y., Brown, R., & Liao, P. (2014). Alternative scoring models of STOP-bang questionnaire improve specificity to detect undiagnosed obstructive sleep apnea. *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, *10*(9), 951–958. https://doi.org/10.5664/jcsm.4022

Cintra, F., Tufik, S., D'Almeida, V., Calegare, B. F. A., de Paola, A., Oliveira, W., Rizzi, C., Roizenblatt, S., & Poyares, D. (2011). Cysteine. *Chest*, *139*(2), 246–252. https://doi.org/10.1378/chest.10-0667

Corgosinho, F. C., Dâmaso, A. R., Marques, F. M. C., Thivel, D., Andrade, T. dos S., & de Mello, M. T. (2020). Obesity, Inflammation, and OSA: Exercise as Therapy. *Neurological Modulation of Sleep: Mechanisms and Function of Sleep Health*, 35–47. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816658-1.00004-1

Çörtük, M., Şimşek, G., Kiraz, K., Haytoğlu, S., Zitouni, B., Muluk, N. B., & Kürşat Arıkan, O. (2016). Effect of Continuous Positive Airway Pressure Treatment on Mean Platelet Volume and Platelet Distribution Width in Patients with Sleep Apnea Syndrome. *Eurasian J Pulmonol*, *18*, 85–94. https://doi.org/10.5152/ejp.2016.84803

Dang-Thi-Mai, K., Le-Dong, N.-N., Bui-Diem, K., Vu-Tran-Thien, Q., Nguyen-Nhu, V., & Duong-Quy, S. (2021). Exhaled Nitric Oxide as a Potential Biomarker of Continuous Positive Airway Pressure Therapy for Severe Obstructive Sleep Apnea Patients. *Current Respiratory Medicine Reviews*, *17*(3), 192–198. https://doi.org/10.2174/1573398X17666211029095400

Diquattro, M., Gagliano, F., CalabrÒ, G. M., Tommasi, M., Scott, C. S., Mancuso, G., Palma, B., & Menozzi, I. (2009). Relationships between platelet counts, platelet volumes and reticulated platelets in patients with ITP: Evidence for significant platelet count inaccuracies with conventional instrument methods. *International Journal of Laboratory Hematology*, *31*(2), 199–206. https://doi.org/10.1111/J.1751-553X.2007.01025.X

Dusse, L. M. S. A., & Freitas, L. G. (2014). Clinical applicability of reticulated platelets. In *Clinica Chimica Acta*. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.024

Fleming, W. E., Holty, J.-E. C., Bogan, R. K., Hwang, D., Ferouz-Colborn, A. S., Budhiraja, R., Redline, S., Mensah-Osman, E., Osman, N. I., Li, Q., Azad, A., Podolak, S., Samoszuk, M. K., Cruz, A. B., Bai, Y., Lu, J., Riley, J. S., & Southwick, P. C. (2018a). Use of blood biomarkers to screen for obstructive sleep apnea. *Nature and Science of Sleep*, *10*, 159–

167. https://doi.org/10.2147/NSS.S164488

Fleming, W. E., Holty, J. E. C., Bogan, R. K., Hwang, D., Ferouz-Colborn, A. S., Budhiraja, R., Redline, S., Mensah-Osman, E., Osman, N. I., Li, Q., Azad, A., Podolak, S., Samoszuk, M. K., Cruz, A. B., Bai, Y., Lu, J., Riley, J. S., & Southwick, P. C. (2018b). Use of blood biomarkers to screen for obstructive sleep apnea. *Nature and Science of Sleep*, *10*, 159–167. https://doi.org/10.2147/NSS.S164488

Floras, J. S. (2018). Sleep Apnea and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, *122*(12), 1741–1764. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.310783

Freedman, J. E. (2008). Oxidative stress and platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *28*(3). https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.159178

Fu, Y., Xia, Y., Yi, H., Xu, H., Guan, J., & Yin, S. (2017). Meta-analysis of all-cause and cardiovascular mortality in obstructive sleep apnea with or without continuous positive airway pressure treatment. *Sleep and Breathing*, *21*(1), 181–189. https://doi.org/10.1007/s11325-016-1393-1

Gabryelska, A., Łukasik, Z. M., Makowska, J. S., & Białasiewicz, P. (2018). Obstructive sleep apnea: From intermittent hypoxia to cardiovascular complications via blood platelets. *Frontiers in Neurology*, *9*(AUG), 635. https://doi.org/10.3389/FNEUR.2018.00635/BIBTEX

Givan, A. L. (2001). *Flow Cytometry: First Principles*. John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/0471223948

Gottlieb, D. J., Yenokyan, G., Newman, A. B., O'Connor, G. T., Punjabi, N. M., Quan, S. F., Redline, S., Resnick, H. E., Tong, E. K., Diener-West, M., & Shahar, E. (2010). Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation*, *122*(4), 352–360. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.901801

Goudswaard, L. J., Corbin, L. J., Burley, K. L., Mumford, A., Akbari, P., Soranzo, N., Butterworth, A. S., Watkins, N. A., Pournaras, D. J., Harris, J., Timpson, N. J., & Hers, I. (2021). Higher body mass index raises immature platelet count: evidence from Mendelian randomization analyses. *MedRxiv*, 2021.05.19.21257443. https://doi.org/10.1101/2021.05.19.21257443

Guthikonda, S., Alviar, C. L., Vaduganathan, M., Arikan, M., Tellez, A., DeLao, T., Granada, J. F., Dong, J. F., Kleiman, N. S., & Lev, E. I. (2008). Role of Reticulated Platelets and Platelet Size Heterogeneity on Platelet Activity After Dual Antiplatelet Therapy With Aspirin and Clopidogrel in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.05.031

Haentjens, P., Meerhaeghe, A. Van, Moscariello, A., Weerdt, S. De, Poppe, K., Dupont, A., & Velkeniers, B. (2007). The Impact of Continuous Positive Airway Pressure on Blood Pressure in Patients With Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Archives of Internal*

Medicine, *167*(8), 757. https://doi.org/10.1001/archinte.167.8.757

Hamad, M. A., Schanze, N., Schommer, N., Nührenberg, T., & Duerschmied, D. (2021). Reticulated Platelets—Which Functions Have Been Established by In Vivo and In Vitro Data? *Cells*, *10*(5). https://doi.org/10.3390/CELLS10051172

Hamilton, G. S., & Naughton, M. T. (2013). Impact of obstructive sleep apnoea on diabetes and cardiovascular disease. *Medical Journal of Australia*. https://doi.org/10.5694/mja13.10579

Hannawi, B., Hannawi, Y., & Kleiman, N. S. (2018). Reticulated Platelets: Changing Focus from Basics to Outcomes. In *Thrombosis and Haemostasis*. https://doi.org/10.1055/s-0038-1667338

Harrison, P., Robinson, M. S. C., Mackie, I. J., & Machin, S. J. (1997). Reticulated platelets. In *Platelets*. https://doi.org/10.1080/09537109777050

Hedley, B. D., Llewellyn-Smith, N., Lang, S., Hsia, C. C., MacNamara, N., Rosenfeld, D., & Keeney, M. (2015a). Combined accurate platelet enumeration and reticulated platelet determination by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *88*(5), 330–337. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21245

Hedley, B. D., Llewellyn-Smith, N., Lang, S., Hsia, C. C., MacNamara, N., Rosenfeld, D., & Keeney, M. (2015b). Combined accurate platelet enumeration and reticulated platelet determination by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *88*(5), 330–337. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21245

Hoffmann, J. J. M. L. (2014). Reticulated platelets: Analytical aspects and clinical utility. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0165

Hoffmann, J. J. M. L., Van Den Broek, N. M. A., & Curvers, J. (2013a). Reference intervals of reticulated platelets and other platelet parameters and their associations. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0624-OA

Hoffmann, J. J. M. L., Van Den Broek, N. M. A., & Curvers, J. (2013b). Reference intervals of reticulated platelets and other platelet parameters and their associations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *137*(11), 1635–1640. https://doi.org/10.5858/ARPA.2012-0624-OA

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(24), 9265–9269. https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265

Ingram, M., & Coopersmith, A. (1969). Reticulated Platelets following Acute Blood Loss. *British Journal of Haematology*, *17*(3), 225–229. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1969.tb01366.x

Jelkmann, W. (2010). *Blut* (pp. 477–502). https://doi.org/10.1007/978-3-642-01651-6_23

Johns, D. M. (2022). *The Epworth Sleepiness Scale*. https://epworthsleepinessscale.com/about-the-ess/

Johns, M., & Hocking, B. (1997). Daytime sleepiness and sleep habits of Australian workers. *Sleep*, *20*(10), 844–849. https://doi.org/10.1093/sleep/20.10.844

Johns MW. (2003). The clinical assessment of daytime sleepiness in patients with obstructive sleep apnea. 2003, pp. 283-2. *Surgery for Snoring and Obstructive Sleep Apnea.*, 283–295.

Kanbay, A., Tutar, N., Kaya, E., Buyukoglan, H., Ozdogan, N., Oymak, F. S., Gulmez, I., & Demir, R. (2013a). Mean platelet volume in patients with obstructive sleep apnea syndrome and its relationship with cardiovascular diseases. *Blood Coagulation & Fibrinolysis : An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, *24*(5), 532–536. https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32835e98da

Kanbay, A., Tutar, N., Kaya, E., Buyukoglan, H., Ozdogan, N., Oymak, F. S., Gulmez, I., & Demir, R. (2013b). Mean platelet volume in patients with obstructive sleep apnea syndrome and its relationship with cardiovascular diseases. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, *24*(5), 532–536. https://doi.org/10.1097/MBC.0B013E32835E98DA

Kasai, T., Floras, J. S., & Bradley, T. D. (2012). Sleep Apnea and Cardiovascular Disease. *Circulation*, *126*(12), 1495–1510. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.070813

Kent, B. D., Ryan, S., & McNicholas, W. T. (2010). The genetics of obstructive sleep apnoea. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, *16*(6), 536–542. https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32833ef7fe

Kienast, J., & Schmitz, G. (1990a). Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood*, *75*(1), 116–121. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1688494

Kienast, J., & Schmitz, G. (1990b). Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood*, *75*(1), 116–121. https://doi.org/10.1182/blood.V75.1.116.116

Kizawa, T., Nakamura, Y., Takahashi, S., Sakurai, S., Yamauchi, K., & Inoue, H. (2009). Pathogenic role of angiotensin II and oxidised LDL in obstructive sleep apnoea. *The European Respiratory Journal*, *34*(6), 1390–1398. https://doi.org/10.1183/09031936.00009709

Kline, C. E. (2016). Exercise: shifting fluid and sleep apnoea away. *The European Respiratory Journal*, *48*(1), 23–25. https://doi.org/10.1183/13993003.00797-2016

Kodiatte, T. A., Manikyam, U. K., Rao, S. B., Jagadish, T. M., Reddy, M., Lingaiah, H. K. M., & Lakshmaiah, V. (2020). Mean Platelet Volume in Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of*

Laboratory Physicians, *4*(01), 005–009. https://doi.org/10.4103/0974-2727.98662

Kohler, M., Ayers, L., Pepperell, J. C. T., Packwood, K. L., Ferry, B., Crosthwaite, N., Craig, S., Siccoli, M. M., Davies, R. J. O., & Stradling, J. R. (2009). Effects of continuous positive airway pressure on systemic inflammation in patients with moderate to severe obstructive sleep apnoea: a randomised controlled trial. *Thorax*, *64*(1), 67–73. https://doi.org/10.1136/THX.2008.097931

Konecny, T., Kara, T., & Somers, V. K. (2014). Obstructive sleep apnea and hypertension: An update. *Hypertension*. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.00613

Konietzko, N. (1998). *Schlafapnoe* (N. Konietzko, H. Teschler, & L. Freitag (Eds.)). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58815-0

Krishnan, V., Dixon-Williams, S., & Thornton, J. D. (2014). Where there is smoke…there is sleep apnea: exploring the relationship between smoking and sleep apnea. *Chest*, *146*(6), 1673–1680. https://doi.org/10.1378/CHEST.14-0772

Lakkis, N., Dokainish, H., Abuzahra, M., Tsyboulev, V., Jorgensen, J., Ponce De Leon, A., & Saleem, A. (2004). Reticulated platelets in acute coronary syndrome: A marker of platelet activity [3]. In *Journal of the American College of Cardiology*. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.05.033

Larsson, P. T., Wallén, N. H., & Hjemdahl, P. (1994). Norepinephrine-induced human platelet activation in vivo is only partly counteracted by aspirin. *Circulation*, *89*(5), 1951–1957. https://doi.org/10.1161/01.CIR.89.5.1951

Lavie, L, & Lavie, P. (2009). Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *The European Respiratory Journal*, *33*(6), 1467–1484. https://doi.org/10.1183/09031936.00086608

Lavie, Lena. (2009). Oxidative Stress-A Unifying Paradigm in Obstructive Sleep Apnea and Comorbidities. *Progress in Cardiovascular Diseases*. https://doi.org/10.1016/j.pcad.2008.08.003

Lavie, Lena, Vishnevsky, A., & Lavie, P. (2004). Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep*, *27*(1), 123–128. https://doi.org/10.1093/sleep/27.1.123

Lee, W., Nagubadi, S., Kryger, M. H., & Mokhlesi, B. (2008). Epidemiology of obstructive sleep apnea: A population-based perspective. In *Expert Review of Respiratory Medicine*. https://doi.org/10.1586/17476348.2.3.349

Leppänen, T., Töyräs, J., Mervaala, E., Penzel, T., & Kulkas, A. (2017). Severity of individual obstruction events increases with age in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Medicine*, *37*. https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.06.004

Lindberg, E., Carter, N., Gislason, T., & Janson, C. (2001). Role of snoring and daytime

sleepiness in occupational accidents. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *164*(11), 2031–2035. https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.11.2102028

Loke, Y. K., Brown, J. W. L., Kwok, C. S., Niruban, A., & Myint, P. K. (2012). Association of obstructive sleep apnea with risk of serious cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. In *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.111.964783

Machlus, K. R., & Italiano, J. E. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. In *Journal of Cell Biology*. https://doi.org/10.1083/jcb.201304054

Mandrekar, J. N. (2010). Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *Journal of Thoracic Oncology*, *5*(9), 1315–1316. https://doi.org/10.1097/JTO.0B013E3181EC173D

Marin, J. M., Carrizo, S. J., Vicente, E., & Agusti, A. G. N. (2005). Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet (London, England)*, *365*(9464), 1046–1053. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71141-7

Matic, G. B., Rothe, G., & Schmitz, G. (2001). Flow Cytometric Analysis of Reticulated Platelets. *Current Protocols in Cytometry*. https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0710s17

McNicholas, W. T. (2008). Diagnosis of Obstructive Sleep Apnea in Adults. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *5*(2), 154–160. https://doi.org/10.1513/pats.200708-118MG

Medical Advisory Secretariat, M. A. (2006). Polysomnography in patients with obstructive sleep apnea: an evidence-based analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*, *6*(13), 1–38. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23074483

Meintker, L., Haimerl, M., Ringwald, J., & Krause, S. W. (2013). Measurement of immature platelets with Abbott CD-Sapphire and Sysmex XE-5000 in haematology and oncology patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *51*(11), 2125–2131. https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0252

Meintker, L., & Krause, S. W. (2020). Reticulated platelets - clinical application and future perspectives. *Journal of Laboratory Medicine*, *44*(5). https://www.degruyter.com/view/journals/labm/ahead-of-print/article-10.1515-labmed-2019-0166/article-10.1515-labmed-2019-0166.xml

Montesi, S. B., Bajwa, E. K., & Malhotra, A. (2012). Biomarkers of sleep apnea. *Chest*, *142*(1), 239–245. https://doi.org/10.1378/chest.11-2322

Nagappa, M., Liao, P., Wong, J., Auckley, D., Ramachandran, S. K., Memtsoudis, S., Mokhlesi, B., & Chung, F. (2015). Validation of the STOP-Bang Questionnaire as a Screening Tool for Obstructive Sleep Apnea among Different Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One*, *10*(12), e0143697. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143697

Nena, E., Papanas, N., Steiropoulos, P., Zikidou, P., Zarogoulidis, P., Pita, E., Constantinidis, T. C., Maltezos, E., Mikhailidis, D. P., & Bouros, D. (2012). Mean Platelet Volume and Platelet Distribution Width in non-diabetic subjects with Obstructive Sleep Apnoea Syndrome: New indices of severity. *Platelets*. https://doi.org/10.3109/09537104.2011.632031

Orrù, G., Storari, M., Scano, A., Piras, V., Taibi, R., & Viscuso, D. (2020). Obstructive Sleep Apnea, oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction-An overview of predictive laboratory biomarkers. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *24*(12), 6939–6948. https://doi.org/10.26355/EURREV_202006_21685

Osman, A. M., Carter, S. G., Carberry, J. C., & Eckert, D. J. (2018). Obstructive sleep apnea: current perspectives. In *Nature and Science of Sleep* (Vol. 10). https://doi.org/10.2147/NSS.S124657

Parra, O., ARBOIX, A., BECHICH, S., GARCÍA-EROLES, L., MONTSERRAT, J. M., LÓPEZ, J. A., BALLESTER, E., GUERRA, J. M., & SOPEÑA, J. J. (2000). Time Course of Sleep-related Breathing Disorders in First-Ever Stroke or Transient Ischemic Attack. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *161*(2), 375–380. https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.9903139

Patel, S. R., Zhu, X., Storfer-Isser, A., Mehra, R., Jenny, N. S., Tracy, R., & Redline, S. (2009). Sleep duration and biomarkers of inflammation. *Sleep*, *32*(2), 200–204. https://doi.org/10.1093/SLEEP/32.2.200

Peres, B. U., Allen, A. H., Shah, A., Fox, N., Laher, I., Almeida, F., Jen, R., & Ayas, N. (2020). Obstructive Sleep Apnea and Circulating Biomarkers of Oxidative Stress: A Cross-Sectional Study. *Antioxidants*, *9*(6), 476. https://doi.org/10.3390/antiox9060476

Perkins, N. J., & Schisterman, E. F. (2006). The Inconsistency of “Optimal” Cut-points Using Two ROC Based Criteria. *American Journal of Epidemiology*, *163*(7), 670. https://doi.org/10.1093/AJE/KWJ063

Petzold, T., Zhang, Z., Ballesteros, I., Saleh, I., Polzin, A., Thienel, M., Liu, L., Ul Ain, Q., Ehreiser, V., Weber, C., Kilani, B., Mertsch, P., Götschke, J., Cremer, S., Fu, W., Lorenz, M., Ishikawa-Ankerhold, H., Raatz, E., El-Nemr, S., … Massberg, S. (2022). Neutrophil “plucking” on megakaryocytes drives platelet production and boosts cardiovascular disease. *Immunity*, *55*(12). https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.10.001

Phillips, C. L., & O’driscoll, D. M. (2013). Hypertension and obstructive sleep apnea. In *Nature and Science of Sleep*. https://doi.org/10.2147/NSS.S34841

Prasad, B., Steffen, A. D., Van Dongen, H. P. A., Pack, F. M., Strakovsky, I., Staley, B., Dinges, D. F., Maislin, G., Pack, A. I., & Weaver, T. E. (2018). Determinants of sleepiness in obstructive sleep apnea. *Sleep*, *41*(2). https://doi.org/10.1093/sleep/zsx199

Qureshi, W. T., Nasir, U. Bin, Alqalyoobi, S., O’Neal, W. T., Mawri, S., Sabbagh, S., Soliman, E.

Z., & Al-Mallah, M. H. (2015). Meta-Analysis of Continuous Positive Airway Pressure as a Therapy of Atrial Fibrillation in Obstructive Sleep Apnea. *The American Journal of Cardiology*, *116*(11), 1767–1773. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2015.08.046

Rashid, N. H., Zaghi, S., Scapuccin, M., Camacho, M., Certal, V., & Capasso, R. (2020). The Value of Oxygen Desaturation Index for Diagnosing Obstructive Sleep Apnea: A Systematic Review. *The Laryngoscope*, lary.28663. https://doi.org/10.1002/lary.28663

Reutrakul, S., & Mokhlesi, B. (2017a). Obstructive Sleep Apnea and Diabetes: A State of the Art Review. *Chest*, *152*(5), 1070–1086. https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.05.009

Reutrakul, S., & Mokhlesi, B. (2017b). Obstructive Sleep Apnea and Diabetes: A State of the Art Review. In *Chest*. https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.05.009

Robinson, M. S. C., MacKie, I. J., Knam, K., Liesner, R., Goodall, A. H., Savmce, G. F., MacHin, S. J., & Harrison, P. (1998). Flow cytometric analysis of reticulated platelets: Evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *British Journal of Haematology*. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00563.x

Rosenthal, L. D., & Dolan, D. C. (2008). The Epworth sleepiness scale in the identification of obstructive sleep apnea. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, *196*(5), 429–431. https://doi.org/10.1097/NMD.0B013E31816FF3BF

Ryan, S., & McNicholas, W. (2010). The Effect of Continuous Positive Airway Pressure on C-Reactive Protein Levels in Patients With Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Chest*, *137*(2), 496–497. https://doi.org/10.1378/chest.09-1778

S3-Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen - Kapitell “Schlafbezogene Atemstörungen.” (2017). *Somnologie*, *20*(S2), 97–180. https://doi.org/10.1007/s11818-016-0093-1

Salman, L. A., Shulman, R., & Cohen, J. B. (2020). Obstructive Sleep Apnea, Hypertension, and Cardiovascular Risk: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Current Cardiology Reports*, *22*(2), 6. https://doi.org/10.1007/s11886-020-1257-y

Sateia, M. J. (2014). International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications. *Chest*, *146*(5), 1387–1394. https://doi.org/10.1378/chest.14-0970

Schneider, H. (2007). Nachweis und Behandlung von Multikollinearität. *Methodik Der Empirischen Forschung*, 183–198. https://doi.org/10.1007/978-3-8349-9121-8_13

Schulz, R., Mahmoudi, S., Hattar, K., Sibelius, U., Olschewski, H., Mayer, K., Seeger, W., & Grimminger, F. (2000). Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *162*(2 Pt 1), 566–570. https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.2.9908091

Shahveisi, K., Jalali, A., Moloudi, M. R., Moradi, S., Maroufi, A., & Khazaie, H. (2018). Sleep

Architecture in Patients With Primary Snoring and Obstructive Sleep Apnea. *Basic and Clinical Neuroscience Journal*, *9*(2), 147–156. https://doi.org/10.29252/nirp.bcn.9.2.147

Sharma, S., & Culebras, A. (2016). Sleep apnoea and stroke. *Stroke and Vascular Neurology*, *1*(4), 185–191. https://doi.org/10.1136/svn-2016-000038

Shih, J. L., & Malhotra, A. (2011). Could Vitamins Be Helpful to Patients With Sleep Apnea? *Chest*, *139*(2), 237–238. https://doi.org/10.1378/chest.10-2017

Steffen, A., Heiser, C., Galetke, W., Herkenrath, S.-D., Maurer, J. T., Eck, G., Woehrle, H., Löhler, J., & Randerath, W. (2021). Die Stimulation des Nervus hypoglossus in der Behandlung der obstruktiven Schlafapnoe – Aktualisiertes Positionspapier der Arbeitsgemeinschaft Schlafmedizin der DGHNO-KHC. *Laryngo-Rhino-Otologie*, *100*(01), 15–20. https://doi.org/10.1055/a-1327-1343

Steiropoulos, P., Papanas, N., Nena, E., Antoniadou, M., Serasli, E., Papoti, S., Hatzizisi, O., Kyriazis, G., Tzouvelekis, A., Maltezos, E., Tsara, V., & Bouros, D. (2010). Inflammatory Markers in Middle-Aged Obese Subjects: Does Obstructive Sleep Apnea Syndrome Play a Role? *Mediators of Inflammation*, *2010*. https://doi.org/10.1155/2010/675320

Steiropoulos, P., Tsara, V., Nena, E., Fitili, C., Kataropoulou, M., Froudarakis, M., Christaki, P., & Bouros, D. (2007). Effect of continuous positive airway pressure treatment on serum cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest*, *132*(3), 843–851. https://doi.org/10.1378/CHEST.07-0074

Theofilis, P., Sagris, M., Antonopoulos, A. S., Oikonomou, E., Tsioufis, C., & Tousoulis, D. (2021). Inflammatory Mediators of Platelet Activation: Focus on Atherosclerosis and COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 11170*, *22*(20), 11170. https://doi.org/10.3390/IJMS222011170

Vagdatli, E., Gounari, E., Lazaridou, E., Katsibourlia, E., Tsikopoulou, F., & Labrianou, I. (2010). Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia*, *14*(1), 28. /pmc/articles/PMC2843567/

Varadharaj, S., Porter, K., Pleister, A., Wannemacher, J., Sow, A., Jarjoura, D., Zweier, J. L., & Khayat, R. N. (2015). Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: a novel pathway in OSA induced vascular endothelial dysfunction. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *207*, 40–47. https://doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.012

Vatansever, E., Surmen-Gur, E., Ursavas, A., & Karadag, M. (2011). Obstructive sleep apnea causes oxidative damage to plasma lipids and proteins and decreases adiponectin levels. *Sleep & Breathing = Schlaf & Atmung*, *15*(3), 275–282. https://doi.org/10.1007/s11325-010-0378-8

White, D. P. (2005). Pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *172*(11), 1363–1370.

https://doi.org/10.1164/rccm.200412-1631SO

WHO, G. (1998). *WHO report obesity (1998) Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity*.

Wolk, R., Shamsuzzaman, A. S. M., & Somers, V. K. (2003). Obesity, Sleep Apnea, and Hypertension. In *Hypertension*. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000101686.98973.A3

Wu, Q., Ren, J., Hu, D., Jiang, P., Li, G., Anjum, N., Wang, G., Gu, G., Chen, J., Wu, X., Liu, S., Li, Y., Zhao, Y., & Li, J. (2015). An elevated percentage of reticulated platelet is associated with increased mortality in septic shock patients. *Medicine (United States)*. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000814

Yaggi, H. K., Concato, J., Kernan, W. N., Lichtman, J. H., Brass, L. M., & Mohsenin, V. (2005). Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMoa043104

Yamauchi, M., Nakano, H., Maekawa, J., Okamoto, J., Ohnishi, Y., Suzuki, T., & Kimura, H. (2005). Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest*. https://doi.org/10.1378/chest.127.5.1674

Yoneyama, Y., Suzuki, S., Sawa, R., Miura, A., Doi, D., Otsubo, Y., & Araki, T. (2002). Plasma nitric oxide levels and the expression of P-selectin on platelets in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, *187*(3), 676–680. https://doi.org/10.1067/MOB.2002.125764

Young, T, Evans, L., Finn, L., & Palta, M. (1997). Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep*, *20*(9), 705–706. https://doi.org/10.1093/sleep/20.9.705

Young, T, Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., & Badr, S. (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *The New England Journal of Medicine*, *328*(17), 1230–1235. https://doi.org/10.1056/NEJM199304293281704

Young, Terry, Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., & Badr, S. (1993). The Occurrence of Sleep-Disordered Breathing among Middle-Aged Adults. *New England Journal of Medicine*, *328*(17), 1230–1235. https://doi.org/10.1056/NEJM199304293281704

Young, Terry, Peppard, P. E., & Gottlieb, D. J. (2002a). Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *165*(9), 1217–1239. https://doi.org/10.1164/rccm.2109080

Young, Terry, Peppard, P. E., & Gottlieb, D. J. (2002b). Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *165*(9), 1217–1239. https://doi.org/10.1164/rccm.2109080

Affidavit

Eidesstattliche Versicherung

Kern, Dorian

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Retikulierte Thrombozyten als neuer Biomarker bei obstruktiver Schlafapnoe

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.09.24

Dorian Kern