

Agata Gabryelska

**Wpływ hipoksemii na zmianę ekspresji czynnika HIF-1 alfa u chorych na zespół
obturacyjnego bezdechu sennego**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Zakład Medycyny Snu i Zaburzeń Medycznych
Międzywydziałowa Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. n. med. Piotr Białasiewicz
Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Dariusz Nowak

Promotor: prof. nadzw. dr hab. n. med. Piotr Białasiewicz

Łódź 2019

Streszczenie

Wstęp

Obturacyjny bezdech senny (OBS) jest przewlekłą chorobą układu oddechowego charakteryzującą się nawracającymi przerwami w oddychaniu podczas snu spowodowanymi zapadaniem się górnych dróg oddechowych. Szacuje się, że na OBS o umiarkowanym i ciężkim nasileniu choruje około 23% kobiet 49% mężczyzn. Jednym z typowych następstw bezdechów i słyceń oddychania jest nawracająca przewlekła hipoksja, która może wpływać na zmiany w transkrypcji genów, jak również powodować potranslacyjne modyfikacje białek.

Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za homeostazę metabolizmu tlenu jest czynnik indukowany hipoksemią 1 (HIF-1), składający się z dwóch podjednostek: α i β . Podjednostka HIF-1 α jest tlenowrażliwa, w warunkach normoksji ulega szybkiej degradacji, natomiast stabilizuje się podczas hipoksji. Dane dotyczące HIF-1 α w OBS są ograniczone i w znacznej większości są oparte na modelu zwierzęcym choroby. Sugerują one, że nawracająca przewlekła hipoksja może powoduje wzrost stężenia HIF-1 α .

Cel

Celem pracy była ocena i analiza zależności stężenia białka HIF-1 α w surowicy krwi obwodowej oraz ekspresji HIF-1 α na poziomie mRNA w populacji pacjentów chorych na OBS i w grupie osób zdrowych z uwzględnieniem wpływu jednorazowego leczenia aparatem CPAP (ciągle dodatnie ciśnienie powietrza). Oceniona została również wartość predykcyjna stężenia białka HIF-1 α w surowicy krwi obwodowej w diagnostyce OBS.

Materiały i Metody

Do badania zostało włączonych 84 pacjentów. Badanie zostało podzielone na 2 części: przekrojową (n=84) i obserwacyjną (n=16). W części przekrojowej, wszyscy pacjenci zostali poddani polisomnografii (PSG) diagnostycznej i na podstawie zostali przydzieleni do jednej z dwóch grup: grupa OBS (n=60) i grupa kontrolna (n=24). Próbkę krwi zostały pobrane pacjentom wieczorem (21:00-22:00) przed i rano (6:00-7:00) po badaniu PSG. 16 pacjentów, którzy zostali zakwalifikowani do leczenia aparatem CPAP, włączono do części obserwacyjnej badania, w której zostali poddani jednorazowej terapii CPAP pod kontrolą PSG. Od pacjentów ponownie zostały pobrane próbki krwi tak jak w części przekrojowej. Stężenie białka HIF-1 α w surowicy zostały oznaczone przy użyciu testów immunoenzymatycznych ELISA. Natomiast, ocenę ekspresji mRNA HIF-1 α wykonano za pomocą real-time PCR.

Wyniki

W badaniu przekrojowym mediana stężenia białka HIF-1 α w surowicy krwi była istotnie wyższa u pacjentów z OBS w porównaniu grupy kontrolnej, zarówno w wieczornym (1490,1 (IQR 396,8 – 1008,1) vs. 727 (IQR 329,0 - 968,9); $p < 0,001$), jak i porannym (1368,9 (IQR 1122,2 – 2010,6) vs. 702,1 (IQR 1021,6 - 2095,7); $p < 0,001$) pobraniu krwi. Równocześnie nie zaobserwowano różnicy pomiędzy wieczornym i porannym pobraniem. Nie wykazano różnic w ekspresji mRNA HIF-1 α pomiędzy grupą OBS i grupą kontrolną, zarówno w wieczornym (3,16 (IQR 0,38 – 5,28) vs. 2,00 (IQR 1,05 – 3,36); $p = 0,381$), jak i porannym pobraniu (2,21 (IQR 0,20 – 4,39) vs. B 2,78 (IQR 1,79 – 3,80); $p = 0,414$). Nie zaobserwowano również różnic w wieczornej i porannej ekspresji mRNA HIF-1 α .

Wieczorne i poranne stężenie białka HIF-1 α korelowało z nasileniem choroby (odpowiednio $r = 0,375$, $p < 0,001$ i $r = 0,362$, $p < 0,001$). Wykazano również korelację pomiędzy wieczornym i porannym stężeniem białka HIF-1 α z liczbą desaturacji podczas snu (odpowiednio $r = 0,384$, $p < 0,001$ i $r = 0,433$, $p < 0,001$) i z minimalną saturacją podczas badania PSG (odpowiednio $r = -0,297$, $p = 0,006$ i $r = -0,250$, $p = 0,022$).

Pole pod krzywą dla porannego stężenia białka HIF-1 α , jako markera OBS wyniosło 0,841 (95% CI 0,753-0,929; ($p < 0,001$)). Na podstawie indeksu Youdena wyznaczono poziom odcięcia porannego stężenia białka HIF-1 α , które wyniosło 1055,6 pg/ml, o następujących wartościach diagnostycznych: czułość 80%, swoistość 83%, pozytywna wartość predykcyjna 92% i negatywna wartość predykcyjna 63%.

W badaniu obserwacyjnym nie zaobserwowano różnicy pomiędzy wieczornym, a porannym stężeniem białka HIF-1 α w surowicy krwi (986,6 (IQR 539,6 – 2323,2) vs. 1151,8 (IQR 631,1 – 2129,1); $p = 0,352$), ani mRNA HIF-1 α (3,35 (IQR 2,66 – 5,25), vs. 4,20 (IQR 2,36 – 5,77); $p = 0,733$) po jednorazowym leczeniu aparatem CPAP.

Wnioski

Istnieją różnice w stężeniu białka HIF-1 α w surowicy krwi obwodowej pomiędzy populacją pacjentów chorych na OBS, a grupą osób zdrowych, którym nie towarzyszą różnice w ekspresji HIF-1 α na poziomie mRNA. Co więcej, istnieje zależność pomiędzy stężeniem białka HIF-1 α w surowicy krwi obwodowej, a nasileniem OBS w badanej grupie pacjentów, w przeciwieństwie do ekspresji HIF-1 α na poziomie mRNA. Poranne stężenie białka HIF-1 α może być potencjalnym markerem w diagnostyce OBS. Jednorazowe leczenie aparatem CPAP nie ma wpływu na stężenie białka HIF-1 α w surowicy krwi obwodowej w populacji pacjentów chorych na OBS, ani na ekspresję HIF-1 α na poziomie mRNA.

English Summary

Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is a chronic condition that is characterised by recurrent pauses in breathing during sleep, caused by collapse of upper airway. It is estimated that moderate and severe OSA affects approximately 23% women and 49% men. One of typical complications of OSA is recurrent intermittent hypoxia, which might cause modifications of gene transcription as well as posttranslational protein modification. The main factor responsible for oxygen metabolism homeostasis is hypoxia inducible factor 1 (HIF-1), comprised of 2 subunits: α i β . Subunit HIF-1 α is oxygen sensitive, and in normoxia, it is subject to degradation, while it stabilizes in hypoxic environment. Data regarding HIF-1 α in OSA is limited and in vast majority is based on animal model of the disorder. It suggests that recurrent intermittent hypoxia, causes increase in HIF-1 α protein.

Aim

The aim of the study was the investigation of HIF-1 α serum protein level and mRNA HIF-1 α expression in OSA patients and healthy control group including assessment of the effect of one night CPAP (continuous positive air pressure) therapy. Additionally, diagnostic value of HIF-1 α serum protein level in OSA diagnosis was assessed.

Materials and Methods

Eighty-four individuals were enrolled in the study. The study was divided into 2 parts: cross-sectional (n=84) and observational (n=16). In cross-sectional part, all patients underwent polysomnography (PSG) examination and based on the results were divided into two groups: OSA group (n=60) and control group (n=24). Peripheral blood was collected in the evening (9:00-10:00 pm) before and in the morning (6:00-7:00 am) after the PSG. Sixteen patients, who qualified for CPAP therapy, were included in observational study, in which they underwent one night CPAP treatment during PSG. Similarly, blood samples were collected as in cross-sectional part of the study. HIF-1 α serum protein level was measured using ELISA immunoenzyme testing, while HIF-1 α mRNA expression was assessed by real-time PCR.

Results

In cross sectional part of the study a median of HIF-1 α serum protein concentration was significantly higher in OSA patients compared to control group, both in the evening (1490,1 (IQR 396,8 – 1008,1) vs. 727 (IQR 329,0 - 968,9); $p < 0,001$), and in the morning (1368,9 (IQR 1122,2 – 2010,6) vs. 702,1 (IQR 1021,6 - 2095,7); $p < 0,001$) blood samples. There was no difference between evening and morning HIF-1 α serum protein level. No differences were observed in HIF-1 α mRNA expression between OSA group and control group, both in the evening (3,16 (IQR 0,38 – 5,28) vs. 2,00 (IQR 1,05 – 3,36); $p = 0,381$), and in the morning (2,21 (IQR 0,20 – 4,39) vs. 2,78 (IQR 1,79 – 3,80); $p = 0,414$) blood samples. There was no difference between evening and morning HIF-1 α mRNA expression.

Evening and morning HIF-1 α serum protein level correlated with severity of the disorder (respectively $r = 0,375$, $p < 0,001$ and $r = 0,362$, $p < 0,001$). Additionally, evening and morning HIF-1 α serum protein level correlated with number of desaturation during sleep (respectively $r = 0,384$, $p < 0,001$ and $r = 0,433$, $p < 0,001$) and with minimal saturation during PSG examination (respectively $r = -0,297$, $p = 0,006$ and $r = -0,250$, $p = 0,022$).

Area under the curve for morning HIF-1 α serum protein level, as a diagnostic factor for OSA was 0,841 (95% CI 0,753-0,929; ($p < 0,001$)). Based on Youden index cut off point for morning HIF-1 α serum protein level was set at 1055,6 pg/ml, and had following predictive parameters: sensitivity 80%, specificity 83%, positive predictive value 92% and negative predictive value 63%.

In observational part of the study, no differences were observed between evening and morning HIF-1 α serum protein level (986,6 (IQR 539,6 – 2323,2) vs. 1151,8 (IQR 631,1 – 2129,1); $p = 0,352$), and between evening and morning HIF-1 α mRNA expression (3,35 (IQR 2,66 – 5,25), vs. 4,20 (IQR 2,36 – 5,77); $p = 0,733$) following one night CPAP treatment.

Conclusions

Differences in HIF-1 α serum protein level between OSA and control group were observed, but were not present in HIF-1 α mRNA expression. Furthermore, there was a positive correlation between OSA severity and HIF-1 α serum protein level, but not HIF-1 α mRNA expression. Morning HIF-1 α serum protein level might be a potential diagnostic marker in OSA diagnosis. One night CPAP treatment does not influence neither HIF-1 α serum protein level, nor HIF-1 α mRNA expression.