

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



Autoreferát dizertační práce

**Syndrom spánkové apnoe jako rizikový faktor rozvoje metabolických
onemocnění**

Sleep apnea syndrome as risk factor for development metabolic impairments

Mgr. Martin Weizenstein

Praha, 2016

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady: Preventivní medicína, Doc. MUDr. Alexander Čelko, CSc.

Školící pracoviště: Ústav tělovýchovného lékařství

Autor: Mgr. Martin Weiszenstein

Školitel: Doc. MUDr. Jan Polák, Ph.D.

Školitel konsultant (byl – li):

Oponenti: prof. MUDr. Viliam Donič, CSc., Lekárska fakulta UPJŠ v Košicích;
RNDr. Hana Malínská, Ph.D., IKEM - Odd. metabolismu diabetu

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: 30.11.2016

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Obsah

Úvod	6
Metody	9
Cíle práce	13
Publikace č. 1: Vliv materiálu kultivačních destiček na proteomický profil 3T3-L1 diferencovaných preadipocytů	14
Publikace č. 2: Vliv různých pericelulárních koncentrací kyslíku na proteomický profil a funkční charakteristiky v 3T3-L1 diferencovaných preadipocytech	17
Publikace č. 3: Diferenciální účinky mírné a těžké hypoxie na adipogenezi, syntézu lipidů a lipolýzu v 3T3-L1 diferencovaných adipocytech.....	19
Publikace č. 4: Inhibice lipolýzy zlepšuje diabetický fenotyp v myším modelu syndromu obstrukční spánkové apnoe	22
Závěr a diskuze	27
Literatura.....	30
Seznam publikací	34

Shrnutí

Nadměrné hromadění tukové tkáně je v příčinné souvislosti s rozvojem inzulinové rezistence a glukózové intolerance s následným rozvojem diabetes mellitus 2. typu a zvýšenou kardiovaskulární mortalitou. Ačkoli jsou epidemiologické důkazy relativně přesvědčivé, mechanismy zprostředkovávající nežádoucí účinky obezity a přidružených metabolických poruch prozatím zůstávají jen částečně objasněny. Mezi faktory, které mohou hrát kauzální roli, byly zařazeny zvýšená lipolytická aktivita a s tím související zvýšené uvolňování volných mastných kyselin z tukové tkáně. Nadměrné hromadění tukové tkáně včetně všech souvisejících komorbidit je spojováno s rozvojem některých spánkových poruch včetně syndromu obstrukční spánkové apnoe (OSA). OSA je relativně časté onemocnění, které je mimo jiné charakterizováno částečným uzavřením horních cest dýchacích v průběhu spánku, tzv. intermitentní hypoxií. To má dle závažnosti za následek pokles saturace hemoglobinu spojenou s tkáňovou hypoxií. Expozice buněčných kultur *in vitro* intermitentní i soustavné hypoxií byla v rámci dosavadního výzkumu limitována přítomností artefaktů a fyzikálními zákony difúze kyslíku v tekutinách a tudíž výsledky řady experimentů jsou obtížně interpretovatelné. V rámci práce na této dizertační práci byl navrhnout a optimalizován systém, který umožňuje expozici kultivovaných buněk definované pericelulární koncentraci a stal se tak důležitým nástrojem pro budoucí metabolický výzkum nejen v naší laboratoři. Jak bylo potvrzeno v této práci, hypoxie v tukové tkáni, i expozice buněčných kultur snížené koncentraci pericelulárního kyslíku měla za následek zvýšenou lipolytickou aktivitu a vyšší akumulaci triglyceridů oproti kontrolním podmínkám. Dále bylo potvrzeno, že farmakologická intervence inhibítorem lipolýzy (acipimoxem) zcela zabránila rozvoji diabetického fenotypu při expozici IH v myším modelu OSA. Tyto výsledky naznačují, že intervence v tukové tkáni, např. inhibice lipolýzy mohou představovat zásadní krok při hledání nové léčby metabolických komorbidit spojených právě s přítomností OSA a obezity.

Summary

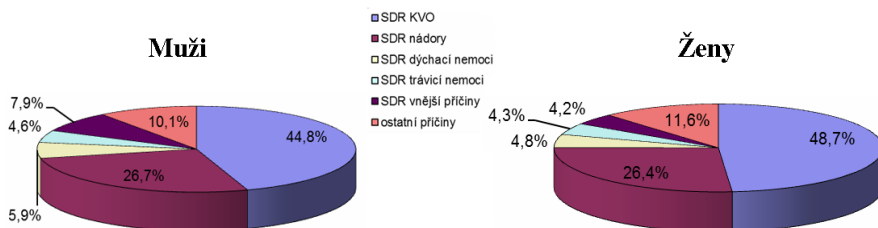
Excessive accumulation of adipose tissue is causally related to the development of insulin resistance and glucose intolerance with subsequent development of type 2. diabetes and increased cardiovascular mortality. Although there is relatively convincing epidemiological evidence, mechanisms mediating adverse effects of obesity and associated metabolic disorders still remain only partially elucidated. Among the factors that may play a causal role were determined increased lipolytic activity and related increased release of free fatty acids from adipose tissue. Excessive accumulation of adipose tissue, including all related comorbidities is associated with the development of sleep disorders including obstructive sleep apnea syndrome (OSA). OSA is a relatively common disease that is characterized by the partial obturation of the upper airway during sleep, the so-called Intermittent hypoxia. IH according to the severity of the resulting decrease in hemoglobin saturation is also associated with adipose tissue hypoxia. As confirmed in this study, both mild and severe hypoxia in adipose tissue, even upon exposure to cell cultures resulted in increased lipolytic activity and increased accumulation of triglycerides compared to control conditions. Furthermore, it was confirmed that pharmacological intervention of this diabetic phenotype may completely prevent its development. This may be a crucial step in the search for some new treatments of metabolic comorbidities which are associated with the development of OSA and obesity. Exposures of cell culture and tissues to intermittent and continuous hypoxia was due to present artifacts and limitations very difficult to interpret. In this study, we have managed to design a system that allowed us to bypass these limitations and it can become an important tool in the context of future metabolic research, not only in our laboratory.

Úvod

Preventivní medicína reprezentuje široký obor, který podává znalosti a dovednosti z oblasti podpory a udržení zdraví, zdravého životního stylu, primární, sekundární a terciární prevence onemocnění, seznamuje s efektivním poskytováním informací při zjištěných rizicích a při přímém ohrožení zdraví. Využívá poznatků z vědních oborů - lékařských, sociálních, pedagogických, psychologických a molekulárně-biologických a je nedílnou součástí péče o zdraví. Ze samotné podstaty proniká obor preventivní medicíny mnoha oblastmi, počínaje základním výzkumem (např. pochopení mechanismu účinků škodlivých faktorů zevního i vnitřního prostředí, životních procesů patogenů či identifikace a ověření buněčných mechanismů primární i sekundární prevence), přes mnohé oblasti epidemiologie, surveillance, sledování rizikových faktorů až po spolupráci na normativních a legislativních regulacích definujících doporučené či závazné požadavky v oblastech pracovního i veřejného zdraví. Předložená práce svým zaměřením a výsledky odpovídá experimentálnímu konci spektra pracovních činností v oboru preventivní medicíny a následuje tak odkazu významných českých osobností tohoto oboru. V tomto ohledu nelze nezmínit odkaz prof. MUDr. Karla Rašky, DrSc., který shledával ve spolupráci epidemiologie s laboratorní/experimentální prací (konkrétně v podobně mikrobiologického a virologického výzkumu) základní předpoklad úspěšného boje se smrtícími nemocemi (ZPRÁVY CEM, SZÚ Praha 1999).

Konzumní způsob života společně s výrazně zrychleným životním stylem, jehož součástí je konzumace jídel bohatých na tuky, nepravidelná tělesná a pohybová aktivita, kouření, nadměrný stres a psychická zátěž mají za následek významný rozvoj civilizačních onemocnění. Srdeční infarkty a mozkové mrtvice jsou hlavní příčinou úmrtí ve všech rozvinutých částech světa, včetně České republiky (Obr. 1). Každý rok na celém světě umírá odhadem 17 milionů lidí na kardiovaskulární onemocnění (WHO). Většinu předčasných úmrtí z těchto důvodů by bylo možné předejít tím, že budou kontrolovány hlavní rizikové faktory, jako jsou obezita a s ní spojený vysoký krevní tlak, dislipidémie, diabetes mellitus a vznik metabolického syndromu. S prevencí těchto onemocnění je tedy nutné začít již v primárním stádiu tak, aby se těmto chorobám dalo efektivně zabránit.

Obrázek 1: Příčiny úmrtí u mužů a u žen v ČR v roce 2012 – jejich podíl v %



Zdroj: ÚZIS ČR, převzato ze: Zpráva o zdraví obyvatel ČR, 2014

Obezita, která je dávana do příčinné souvislosti právě s rozvojem kardiovaskulárních onemocnění, postihuje přibližně 20 % evropské a 35 % americké populace a představuje významné zdravotní a sociální komplikace (Zpráva o zdraví obyvatel ČR, 2014). Nadměrné hromadění tukové tkáně je spojeno se zvýšenou celkovou a kardiovaskulární mortalitou (Lastra a Sowers 2013; Song et al. 2014), stejně jako s vyšším výskytem rakoviny (Carmichael 2006; Hong et al. 2012a; Han et al. 2013). V rámci prevence těchto onemocnění je podstatné pochopení mechanismů, které spojují obezitu s metabolickými a kardiovaskulárními poruchami, včetně zhoršené regulace lipolýzy a změny v profilech adipokinů, tj. proteinů produkovaných v tukové tkáni s parakrinními anebo endokrinními účinky (Northcott et al. 2012). Molekulární a endokrinní cesty, které způsobují dysfunkce adipocytů a představují potenciální cíle pro efektivní farmakologické intervence, byly prozatím nedostatečně prozkoumány.

S narůstajícím výskytem epidemie obezity u stárnoucí populace je spojeno i zvýšené riziko přidružených chorob jako např. obstrukční spánková apnoe (OSA). OSA vzniká hypertrofií a následnou obstrukcí horních cest dýchacích a lze jej označit jako vážné, potenciálně život ohrožující onemocnění. OSA významně přispívá ke zvýšené kardiovaskulární mortalitě (Shahar et al. 2001; Redline et al. 2010). OSA zvyšuje riziko srdečního selhání o 140 %, riziko cévní mozkové příhody o 60 % a riziko vzniku ischemické choroby srdeční o 30 % (Shahar et al. 2001). Mechanismy vysvětlující vztah mezi OSA a rozvojem kardiovaskulárních chorob prozatím nejsou dostatečně prozkoumány. Mezi dílčí mechanismy, které mohou hrát významnou asociační úlohu, patří trvalá aktivace sympatiky, změny v nitrohrudním tlaku (Parker et al. 1999) a oxidační stres, a v důsledku toho i rozvoj zánětlivých procesů v kardiovaskulárním systému (Lavie et al. 2003; Lavie 2003).

Diabetes mellitus 2. typu je velkým problémem veřejného zdraví s vysokou morbiditou, mortalitou a náklady na zdravotní péči (Tancredi et al. 2015). Některé studie naznačují, že většina pacientů s diabetem 2. typu trpí také OSA (Punjabi et al. 2004b). Neustále přibývající údaje z epidemiologických a klinických studií ukazují, že výskyt OSA je nezávisle spojen se změnami v metabolismu glukózy a vystavuje tak pacienty zvýšenému riziku rozvoje diabetu 2. typu (Foster et al. 2009). Experimentální studie na lidech a zvířatech prokázaly, že intermitentní hypoxie a krátká doba trvání spánku v důsledku spánkové fragmentace mají nežádoucí účinky na celkový metabolismus glukózy (Weissenstein et al. 2016; Polak et al. 2012).

S ohledem na všechny komorbidity spojené s výskytem OSA by měla být léčba tohoto onemocnění komplexní. U lehčích případů OSA jsou doporučována režimová opatření jako je snížení BMI u nemocných subjektů, návlek spaní na boku a v přesně vymezených případech je možná i chirurgická terapie. Prozatím nejúčinnějším způsobem léčby pacientů se středně těžkou a těžkou OSA je terapie pomocí tzv. přetlakového dýchání. Jedná se o terapii označovanou jako CPAP (continuous positive airway pressure), která existuje v mnoha modifikacích lišících se typem a rozsahem dechové podpory ve spánku. Tato léčba je aplikována pomocí obličejové nebo nosní masky a dochází při ní ke vzniku pozitivního tlaku vzduchu v dýchacích cestách pomocí vzduchu vhněného do masky tak, aby se předešlo jejich uzavření, a tím i hypoxickým epizodám a fragmentaci spánku. Je nutné připomenout, že tato léčba je pouze symptomatická a

je omezena na používání obličejové masky během spánku po dobu alespoň čtyř hodin. Na základě hypotézy, že by OSA mohla být spojena s výskytem inzulinové rezistence a rozvojem diabetu, se některé studie zaměřily na to, zda by léčba OSA pomocí CPAP mohla změnit tento škodlivý účinek. Studie zkoumající vliv CPAP na glukózovou toleranci a citlivost k inzulinu u pacientů s OSA přinesly smíšené výsledky, což bohužel nevede k jasnému závěru (Pamidi a Tasali 2012). Z devíti randomizovaných kontrolovaných studií, které zkoumaly vliv CPAP na metabolismus glukózy, prokázaly pouze čtyři příznivý terapeutický vliv léčby CPAPem (Pamidi a Tasali 2012). I když některé studie v rámci CPAP terapie prokázaly zlepšení markerů citlivosti na inzulin, jako je například snížení HbA1c nebo HOMA-IR, nelze z dostupných důkazů vyvodit žádné pevné závěry. Jak bylo zmíněno výše, OSA je spojena se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem. Vliv léčby CPAPem na kardiovaskulární mortalitu a vysoký krevní tlak byl předmětem mnoha studií. Výsledkem bylo, že léčba významně snižuje riziko kardiovaskulárního selhání a dalších přidružených komorbidit. (Marin et al. 2012; Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E 2005; Anandam et al. 2013). Např. Anandam et al. (2013) zkoumali vliv léčby CPAPem na dlouhodobou kardiovaskulární mortalitu u pacientů trpících OSA, a také u kontrolní skupiny bez OSA. Celkově bylo do této kohortové studie zahrnuto 570 pacientů s těžkou formou OSA (index apnoe / hypopnoe (AHI) ≥ 30 / h) a dále kontrolní skupina 269 subjektů (AHI < 5 / h). Pacienti byli léčeni CPAPem a sledováni po dobu průměrně 79 měsíců (76-88 měsíců). Během studie mělo 48 subjektů fatální kardiovaskulární příhodu. Kontrolní skupina vykazovala nejnižší kardiovaskulární úmrtnost (0,28 na 100 osoboroků (95% CI: 0,08 - 0,71)) následovaná skupinou s OSA, ale léčenou CPAPem (0,56 na 100 osoboroků (95% CI: 0,20-1,23)). Nejvyšší pozorovaná kardiovaskulární úmrtnost byla u skupiny pacientů s OSA bez léčby (2,1 na 100 osobo-roků (95% CI: 1,37-2,92)).

CPAP je prozatím nejúčinnějším řešením při léčbě OSA, bohužel je tato léčba některými pacienty z různých důvodů odmítána nebo není tolerována. Vzhledem k tomu, že prozatím neexistuje spolehlivá alternativa léčby komorbidit spojených s OSA, je nutné se v rámci prevence a léčby tohoto nebezpečného omezení zaměřit na případné farmakologické intervence, které by zmírnily nebo zcela zabránily rozvoji nepříznivých změn v cílových tkáních. Tato idea je základní motivací předložené disertační práce, která se zabývá možností prevence rozvoje diabetu u myšího modelu OSA, a to perorálním podáním látky acipimox, která je účinným inhibitorem lipolýzy, a je rovněž registrována pro humánní použití (Olbetam, Pfizer). V dalších studiích, které jsou součástí této práce, byl podrobněji zkoumán vliv hypoxie na metabolismus a strukturu tukových buněk (adipocytů), které jsou hlavním zdrojem cirkulujících volných mastných kyselin, a zároveň představují buňky výrazně ovlivněné hypoxií při OSA. Zájem o metabolismus tukové tkáně byl dále podpořen faktem, že je k dispozici řada farmakologicky účinných látek, které modulují metabolismus adipocytů, zejména proces lipolýzy (blokátory adrenergických receptorů, acipimox, natriuretické peptidy). Pokud by se podařilo prokázat, že tuková tkáň a lipolýza (hydrolyza lipidů a uvolnění mastných kyselin do cirkulace) je zásadním faktorem v rozvoji diabetes mellitus 2. typu při OSA, otevřela by se tak cesta k prevenci rozvoje diabetes u OSA skrze inhibici lipolýzy v tukové tkáni, například u pacientů, kteří netolerují CPAP.

Metody

Fyzikální limitace expozice adherentních buněk hypoxií

Standardní kultivace buněčných kultur *in vitro* probíhá v polystyrenových kultivačních destičkách, s následně chemicky, či jinak upraveným povrchem pro lepší adhezenci a proliferaci buněk. Buňky adherují a proliferují na dně jednotlivých jamek v kultivační destičce a jsou převrstveny kultivačním médiem, které poskytuje živiny pro růst a metabolické procesy pěstovaných buněk. Tyto kultivační destičky jsou typicky umístěny v CO₂ inkubátoru, který zajišťuje stálé životní podmínky: teplotu (37 °C), vlhkost (100%) a koncentraci CO₂ uvnitř inkubátoru (5%). Tento způsob pěstování buněk je však zatížen základní fyzikální limitací.

Na základě některých testování navzájem nezávislémi autory i v naší laboratoři bylo zjištěno, že koncentrace O₂ v pericelulárním prostoru, tedy ve vodném kultivačním médiu bezprostředně obklopujícím kultivované buňky, se dramaticky liší od koncentrace O₂ uvnitř inkubátoru, kde koncentrace O₂ činí ~20 %. Klíčovými faktory determinující rychlost transportu O₂ z plynné fáze skrze kultivační médium až do pericelulárního prostoru jsou: difúzní vzdálenost – (zásadní roli hraje výška vodního sloupce v kultivační jamce), mechanické vibrace a také teplota média (Metzen et al. 1995; Otto a Baumgardner 2001; Baumgardner a Otto 2003; Zhdanov et al. 2010). Některé matematické modely a empirické měření profilů rozpuštěného O₂ v médiu ukázaly, že ekvilibrace hladiny O₂ mezi pericelulárním prostorem a plynnou fází nad kultivačním médiem může trvat až několik hodin (Metzen et al. 1995; Allen et al. 2001; Pettersen et al. 2005; Zhdanov et al. 2010), v tomto případě se nicméně nebere v potaz metabolická aktivita buněčných kultur a tudíž se jedná pouze o dobu nutnou k prosté fyzikální difúzi mezi dvěma prostředími. V závislosti na výšce vodního sloupce a jiných podmínkách. Bylo prokázáno, že při použití standardně rozšířené polystyrenové kultivační desky, dokonce i rozsáhlé a rychlé změny v koncentracích okolního O₂ (150 až 0 mm Hg) jsou nedostatečně reflektovány v kultivačním médiu a pericelulární úroveň kyslíku dosahuje pouze přibližně polovičních hladin (80-50 mmHg) (Yuan et al. 2004).

Velmi důležitým a zásadním faktorem, který ovlivňuje dlouhodobou hladinu pericelulárního kyslíku, je vlastní metabolismus buněčných kultur, který spotřebovává O₂. Bylo zjištěno, že spotřeba O₂ metabolicky aktivními buňkami často přesahuje limit fyzikální difuze O₂ skrze vrstvu kultivačního média. To má za následek, že ačkoli jsou kultivační destičky umístěny v atmosféře inkubátoru se stálou 20% hladinou O₂, samotné buňky jsou vystaveny různým hladinám hypoxie až kompletní anoxii (Metzen et al. 1995; Allen et al. 2001).

Faktor pericelulární koncentrace O₂ je v současné době na základě standardních kultivačních protokolů napříč většinou laboratoří bohužel obvykle zcela ignorován. Byly však vyvinuty i systémy, které některé z limitací uvedených výše řeší. Mezi tyto lze počítat systémy založené na konstantní perfuzi kultivačního média skrze kultivační jamku (kultivační médium je předem probubláváno a ekvilibrováno na požadovanou koncentrací O₂) nebo systémy založené na konstantním pohybu a promíchávání kultivačního média k urychlení difuze plynu. Mezi zásadní nedostatky těchto přístupů patří zejména technická a finanční

náročnost takových řešení vyžadující nákladné vybavení a zejména pak smykový stres buněk (shear stress) indukovaný proudem kapaliny přes buněčné membrány. Mezi další limitace patří omezená možnost multiplikace a omezené množství kultivačních jamek, na které lze tyto metody aplikovat. Podobné limitace se týkají i systému založených na principu mikrofluidity, kdy jsou buňky kultivovány pouze ve vrstvě média o síle pouze několika mikrometrů (Koch 1984; Lam et al. 2009; Polinkovsky et al. 2009; Oppegard et al. 2010; Tsapikouni et al. 2012). Ačkoliv difuze plynů skrze takto tenkou vrstvu média je urychlena, je tento přístup zatížen limitovaným množstvím média, které je následně dostupné např. pro analýzu buňkami produkovaných nebo spotřebovaných metabolitů. Nízký objem média nebo osmolarita by mohly negativně modifikovat růst buněk, reakce na podněty nebo omezit dobu trvání expozice v určitých typech buněčných linií.

Souhrnně lze tedy říci, že fyzikální zákony difúze plynu v kapalinách mohou významně komplikovat modelování přesné situace *in vivo*, kdy se změny v hladinách kyslíku dějí v rámci sekund maximálně minut (během apnoických epizod OSA).

Systém pro expozici adherentních buněk intermitentní hypoxií

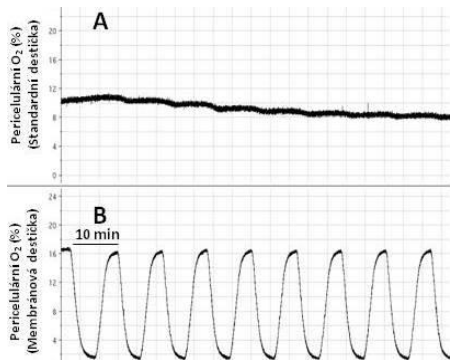
In vitro výzkum účinků intermitentní hypoxie na buněčné úrovni vyžaduje spolehlivou a reprodukovatelnou expozici kultivovaných buněk častým a rychlým změnám pericelulární koncentrace O₂, tak aby bylo možno přesně napodobit situaci *in vivo*. Bohužel, jak bylo popsáno výše, fyzikální zákony difúze plynu v kultivačním médiu značně limitují rychlou změnu pericelulární koncentrace O₂.

V naší laboratoři byl navržen systém, který je schopen výše zmíněné limitace obejít a stal se tak důležitým experimentálním modulem v rámci našich experimentů.

Podstatou našeho řešení je systém, který umožňuje kultivaci adherentních buněk při definované (tedy přesně známé) a v čase konstantní koncentraci O₂ na buněčné úrovni a to nezávisle na množství buněk, stupni jejich diferenciaci nebo metabolické aktivitě. Zároveň je podstatou řešení zařízení, které umožňuje rychlou změnu pericelulární koncentrace O₂ na buněčné úrovni, a to v horizontu 1-2 minut, čímž je umožněna expozice buněk tzv. „intermitentní hypoxií“. Zařízení tak představuje jedinečný *in vitro* model užitečný v mnoha biomedicínských oblastech, např. při výzkumu mechanismů ischemie-reperfuze, poruch plicních funkcí nebo syndromu spánkové apnoe. Schematické znázornění řešení je vyobrazeno na Obr. 4. Toto zařízení využívá difúze plynů skrze fluorokarbonovou membránu, která je vysoce propustná pro plyny (při síle membrány 25 μm je O₂ permeabilita > 6300 cm³/(m² x d x bar), CO₂ permeabilita > 7000 cm³/(m² x d x bar). Tato membrána tvoří dno kultivační jamky - adherující buňky tedy rostou přisedlé na tuto membránu (kontaktní povrch jamky). Difúze plynů (zejména O₂ a CO₂) tak probíhá pouze skrze tuto propustnou membránu namísto řádově pomalejší difúze skrze vrstvu kultivačního média. Tímto mechanismem je jednak zaručena konstantní pericelulární koncentrace O₂, která odpovídá koncentraci O₂ v atmosféře obklopující spodní stranu kultivační membrány (rozdíl < 1 % O₂). Touto klíčovou změnou v paradigmatu kultivace buněk *in vitro* je umožněna druhá unikátní vlastnost - možnost rychlé změny v pericelulární koncentraci O₂ v

průběhu 1-2 minut (v závislosti na amplitudě požadované změny v koncentracích O₂: při změně z 16 % O₂ na 1 % O₂ dojde k plné změně za 120 sekund, viz. Obr. 3).

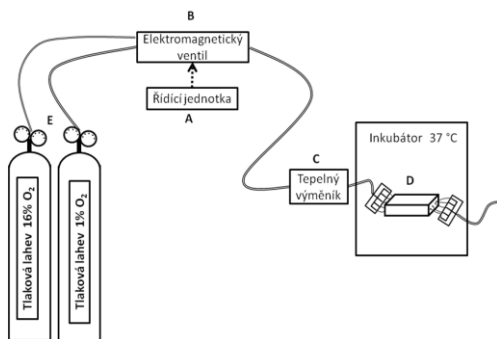
Obrázek 3: Změny v pericelulární koncentraci kyslíku v průběhu expozice intermitentní hypoxii při využití standardní kultivační destičky (A) v porovnání s destičkou, kde je dno konstruováno z plyno-propustného materiálu (B). Doba trvání jednoho cyklu = 10 minut



Technické řešení sestává z těchto komponent (Obr. 4)

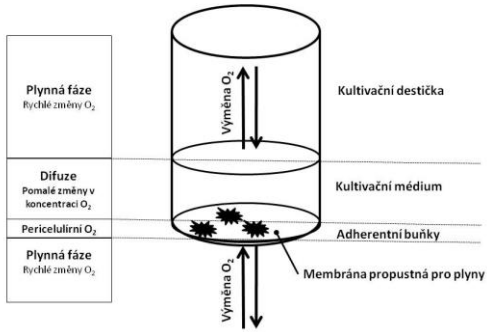
Řídicí jednotka obsahující programovatelný mikroprocesor řídící časování a dávkování směsi plynů do držáku destiček (A), elektromagnetické ventily (B), spojovací hadička určená k předehřátí vzduchu - tepelný výměník (C), držák s kultivační destičkou (D), tlakové lahve (E). Variabilní zapojení jednotlivých elektromagnetických ventilů (např. paralelně) pod kontrolou mikroprocesoru umožňuje provádět variabilní profily expozice, včetně intermitentní hypoxie, díky směsim plynů uložených v tlakových lahvích.

Obrázek 4: Jednotlivé komponenty IH systému



Programovatelnost a konstrukce tohoto systému umožňuje v uživatelsky definovaných časových úsecích výměnu směsi plynů uvnitř držáku a exponovat tak buňky intermitentní hypoxii v libovolných amplitudách

Obrázek 5: Schéma znázorňující výměnu plynů v jamce kultivační destičky. Difúze plynů probíhá skrze dno (fluorokarbonovou membránu) přímo k adhezujícím buňkám.



Cíle práce

V rámci tohoto PhD projektu jsme testovali hypotézy, zda poruchy v regulaci lipolýzy, a dalších funkčních a strukturálních charakteristikách adipocytů (např. adipogeneze) hrají klíčovou roli pro rozvoj diabetu DM2T u syndromu obstrukční spánkové apnoe.

Specifické cíle jednotlivých prací jsou:

Publikace č. 1: Cílem studie bylo definovat metodologický přístup, který by umožnil expozici 3T3-L1 buněk intermitentní hypoxii s využitím technologie využívající kultivaci buněk na fluorokarbonové membráně.

Publikace č. 2: Cílem studie bylo zkoumat přímý účinek různých úrovní pericelulární koncentrace O_2 (1%, 4% a 20%) na proteomický profil a akumulaci triglyceridů v 3T3-L1 diferencovaných preadipocytech.

Publikace č. 3: Cílem této studie bylo zkoumat účinky mírné (4% O_2) a těžké (1% O_2) hypoxie na klíčové adipocytární funkce, zejména na diferenciaci adipocytů, akumulaci triglyceridů a lipolýzu.

Publikace č. 4: Cílem této studie bylo definovat úlohu lipolýzy v tukové tkáni při expozici myši intermitentní hypoxii a zda-li lze vzniklý diabetický fenotyp ovlivnit farmakologickou inhibicí lipolýzy.

Publikace č. 1: Vliv materiálu kultivačních destiček na proteomický profil 3T3-L1 diferencovaných preadipocytů

Úvod a cíle studie:

Ačkoli *in vitro* experimenty využívající buněčné linie představují rutinní přístup v biomedicínských disciplínách, existuje málo informací o tom, jaký vliv mají chemické a fyzikální vlastnosti konstrukčního materiálu kultivačních destiček na funkční a strukturální charakteristiky pěstovaných buněk. V této studii jsme využili proteomické analýzy k ozřejmění rozdílů v proteinové expresi mezi 3T3-L1 preadipocyty pěstovanými na standardních kultivačních destičkách vyrobených z polystyrenu v porovnání s buňkami pěstovanými na destičkách, u nichž je dno (kontaktní povrch pro pěstované buňky) vyrobeno z fluorokarbonové membrány (produkt optimalizovaný pro pokročilé aplikace mikroskopického zobrazování).

Výsledky

2-D elektroforéza a MALDI spektrometrie

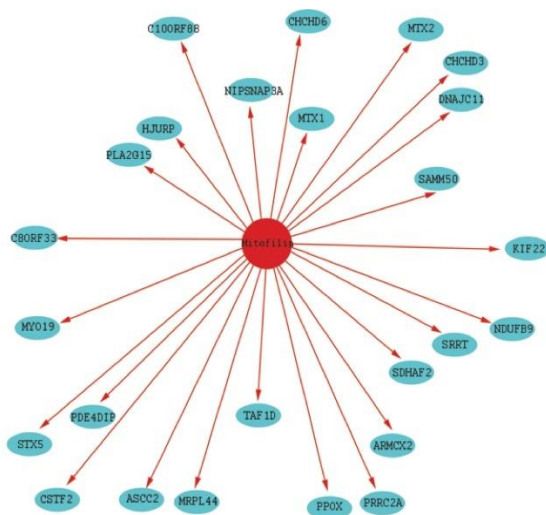
Výsledky profilů exprese proteinů s izoelektrickými body v rámci rozmezí pH 4,0 až 7,0 a s molekulovou hmotností mezi 20 a 150 kDa byly vysoce reprodukovatelné jak pro adipocyty kultivované na polystyrenových destičkách, tak i na destičkách s povrchem z fluorokarbonu. V rámci experimentálních setů byla pozoruhodná rozdílnost proteinových profilů adipocytů z polystyrenových destiček a adipocytů z fluorokarbonových destiček při jejich vzájemném srovnání. Průměrný počet spotů detekován na 2-DE gelech ze vzorků adipocytů pěstovaných na polystyrenovém povrchu byl kolem 500, ale jen asi 400 ze vzorků adipocytů pěstovaných na fluorokarbonovém povrchu. Rozdíly v intenzitě odpovídajících míst byly analyzovány pro každou dvojici gelů (polystyren vs. fluorokarbon), spoty s 2-krát vyšší nebo 2-krát nižší intenzitou byly považovány za reprezentativní proteiny se změněnou expresí. Bylo zjištěno, že celkem $43 \pm 3\%$ všech vizualizovaných buněčných proteinů je rozdílně exprimovaných mezi buňkami pěstovanými na polystyrenovém versus fluorokarbonovém povrchu. Následně, bylo vybráno 30 spotů z rozdílně exprimovaných proteinů pro hmotnostní spektrometrii, následnou identifikaci a určení příslušnosti k jednotlivým signalizačním kaskádám. Většina identifikovaných proteinů jsou strukturálního charakteru nebo jsou zapojeny do metabolismu glukózy nebo mitochondriálních metabolických drah.

Analýza signálních drah, hydrofobnost materiálů a bazální lipolýza

Pro další pochopení funkčních důsledků vlivu povrchu na funkční charakteristiky byl datový soubor identifikovaných proteinů podroben softwarové analýze příslušnosti k jednotlivým signalizačním kaskádám. U buněk kultivovaných na fluorokarbonovém povrchu byly down-regulovány proteiny více kanonických drah, jednalo se zejména o rodinu proteinů 14-3-3, které jsou významně asociovány s oxidačním stresem a

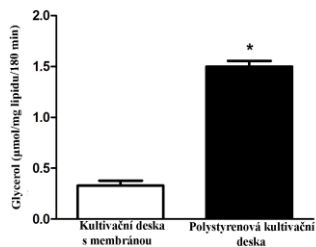
metabolickými dráhami. Následně byla zkoumána role detekovaných proteinů v signalizaci a v metabolických sítích se zvláštním zájmem v proteinech, které se objevují na strategických místech, a představují tak síť "uzlů", které mohou mít významný vliv nebo interagují s mnoha dalšími proteiny v buňce. Tato analýza naznačuje, že mitofilin (M60_mouse), klíčový člen mitochondriálního vnitřního membránového organizačního systému (MINOS), je centrálně umístěný uzel ovlivňující několik drah (Obr. 6), včetně metabolismu substrátu a mitochondriálního přenosu elektronů.

Obrázek 6: Grafická interpretace síťové analýzy ukazuje interakce mitofilinu s ostatními proteiny vnitrobuněčné signalizace včetně strukturálních proteinů.



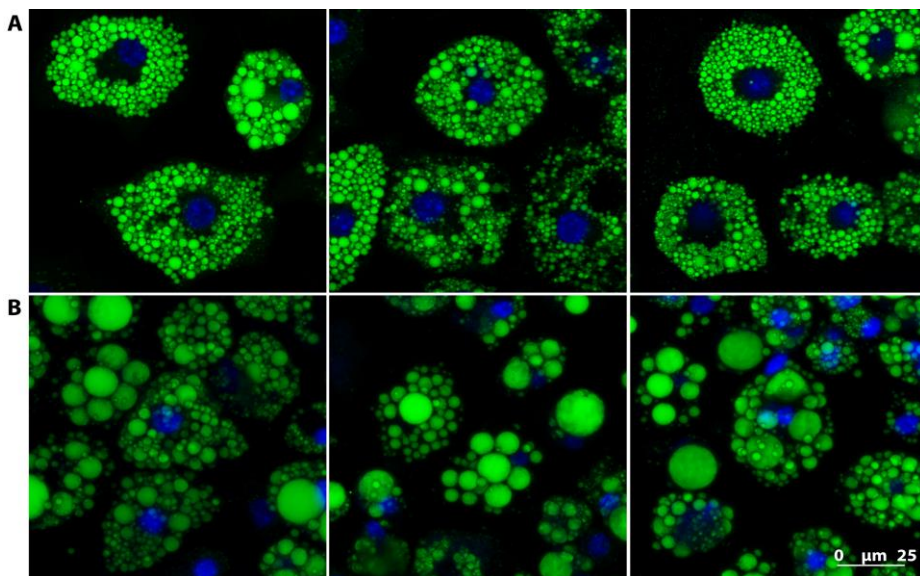
Fluorokarbonové destičky vykazovaly vyšší materiálovou hydrofobnost než standardní polystyrénové desky (kontaktní úhel vody $66,9 \pm 1,2^\circ$ oproti $48,1 \pm 1,0^\circ$ C). Preadipocyty diferencované na polystyrénových destičkách vykazovaly 3,6krát vyšší bazální (nestimulovanou) lipolýzu ve srovnání s buňkami pěstovanými na fluorokarbonové membráně ($0,33 \pm 0,05$ vs. $1,50 \pm 0,06$ pmol glycerol / mg lipidu / 180 min, $p < 0,05$; Obr. 7). Tvar buněk a mikroskopická morfolgie lipidových inkluzí jsou znázorněny na Obr. 8.

Obrázek 7: Bazální lipolýza buněk pěstovaných na fluorokarbonovém a polystyrénovém povrchu



Lipolýza je vyjádřena jako glycerol uvolněný do kultivačního média za 180 minut. Hodnoty jsou normalizovány na obsah triglyceridů na jamku a vyjádřeny jako průměr \pm SEM. N = 3 pro každou kultivační podmínku, * p < 0,05.

Obrázek 8: Vizualizace adipocytů pěstovaných na fluorokarbonové destičce (A) a polystyrénové destičce (B)



Lipidové droplety barveny BODIPY 493/503 (zelená) a jádra barvena Hoechst 33342 (modrá). Buňky pěstované na fluorokarbonovém povrchu (A) obsahují četné menší lipidové inkluze, zatímco buňky pěstované na polystyrénu obsahují větší lipidové inkluze.

Publikace č. 2: Vliv různých pericelulárních koncentrací kyslíku na proteomický profil a funkční charakteristiky v 3T3-L1 diferencovaných preadipocytech

Úvod a cíle studie

Pericelulární koncentrace kyslíku je důležitým faktorem v regulaci buněčných funkcí, včetně diferenciaci buněk, jejich růstu a metabolismu mitochondriální energie. Hypoxie v tukové tkáni je spojena se změněným sekrečním profilem adipokinů a může hrát významnou roli při vývoji diabetu 2. typu. Experimenty *in vitro* jsou nepostradatelným nástrojem metabolického výzkumu, nicméně fyzikální zákony difúze plynů prozatím komplikovaly dlouhodobou expozici adherentních buněk při požadovaných pericelulárních koncentracích O₂. Cílem této studie bylo zkoumat přímý účinek různých úrovní O₂ (1%, 4% a 20%) na proteomický profil a akumulaci triglyceridů v 3T3-L1 diferencovaných preadipocytech.

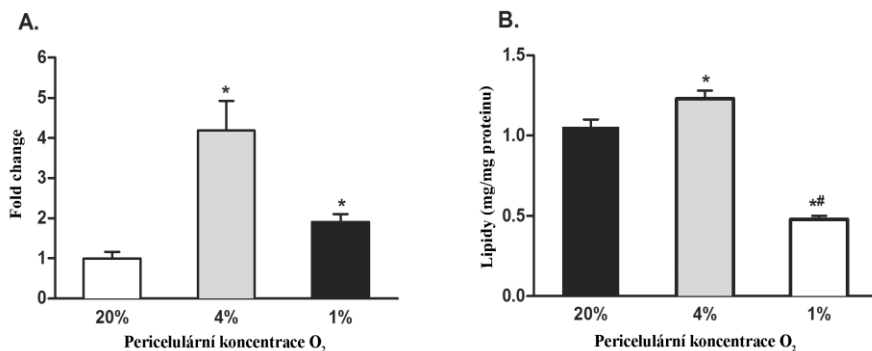
Výsledky

Syntéza lipidů

Bylo zjištěno, že adipocyty pěstované a diferencované v rámci 4% hladiny O₂ akumulovaly 4,2 ± 0,8 resp. 2,2 ± 0,2 krát více lipidů než byl obsah lipidů v buňkách vystavených 20% O₂, nebo 1% O₂, (Obr. 9A). V rámci působení 1% hladiny O₂ byl sice tento efekt snížen, ale zůstal statisticky významný, když byl obsah lipidových inkluzí normalizován na obsah proteinů (1,0 ± 0,1, 1,2 ± 0,1 a 0,5 ± 0,1 mg lipidů / mg proteinu při 20%, 4% a 1% O₂, v uvedeném pořadí, vše p < 0,05), (Obr. 9B).

Ve srovnání s buňkami kultivovanými v 20% a 1% O₂, byla v rámci 4% hladiny O₂ zvýšena buněčná viabilita (vyjádřeno jako počet buněk v jamkách na konci období diferenciaci) o 220 ± 20 % a 230 ± 40 %, v tomto pořadí, (p < 0,05).

Obrázek 9: Akumulace triglyceridů v rámci působení 1%, 4% a 20% O₂.



3T3-L1 buňky byly kultivovány v rámci požadované pericelulární koncentrace O₂ po dobu 14 dnů. Akumulace lipidů byla hodnocena pomocí barvení Oil Red O. **A)** Údaje jsou vyjádřeny jako změna vzhledem ke kontrolní skupině (20% O₂),

B) Údaje jsou normalizovány na celkový obsah proteinů. * P < 0,05 pro srovnání s 20% O₂

2-D elektroforéza a MALDI spektrometrie

Celkově bylo detekováno cca 400 stabilních spotů s isoelektrickým bodem (pI) 4-7 a 300 stabilních spotů s pI 6-11 a s molekulovou hmotností 20-150 kDa na každém 2-DE gelu. Gely byly porovnány s použitím Image Master software a následně ručně kontrolovány kvůli vyšší přesnosti. Různé intenzity odpovídajících spotů byly analyzovány z vhodných párů gelů (20% O₂ oproti 1% O₂ a 20% O₂ oproti 4% O₂). Spoty s 2-násobně vyšší nebo 2-násobně nižší intenzitou, byly identifikovány jako rozdílně exprimované proteiny. Analyzované profily exprese proteinů s isoelektrickým bodem v rozmezí pH 4.0-7.0 a molekulové hmotnosti adipocytů kultivovaných při různých úrovních pericelulární koncentrace O₂ vykazovaly vysokou reprodukovatelnost. Byly pozorovány významné rozdíly v exprimovaných profilech mezi adipocyty vystavených hypoxickým podmínkám (1% O₂, nebo 4% O₂) nebo kontrolním podmínkám (20% O₂).

Celkově jsme zjistili, že 26 spotů bylo ovlivněno v úrovních 4% a 1% O₂ (17 proteinů up-regulováno a 9 proteinů down-regulováno). Analýza signalizačních kaskád odhalila, že mezi ovlivněné procesy patří energetické dráhy mitochondriálního metabolismu a syntéza triglyceridů. Tyto procesy byly významně up-regulovány hypoxií.

Publikace č. 3: Diferenciální účinky mírné a těžké hypoxie na adipogenezi, syntézu lipidů a lipolýzu v 3T3-L1 diferencovaných adipocytech

Úvod a cíle studie

Nadměrná akumulace tukové tkáně příčinně souvisí s rozvojem inzulínové rezistence, DM2T a se zvýšenou kardiovaskulární mortalitou (Carmichael 2006; Hong et al. 2012b; Lastra a Sowers 2013; Song et al. 2014). Ačkoli jsou epidemiologické důkazy přesvědčivé, mechanismy zprostředkovávající nežádoucí metabolické účinky obezity zůstávají prozatím objasněny pouze částečně. Hypoxie tukové tkáně představuje významný faktor ovlivňující funkci adipocytů a může tak přispět k rozvoji metabolických vad (Ye et al. 2007). In vitro studie prokázaly, že hypoxie může způsobit změny v genové expresi, v sekreci adipokinů, vyvolává inzulínovou rezistenci v adipocytech (He et al. 2011; Trayhurn 2013; Wang et al. 2007), reguluje růst buněk, jejich viabilitu a ovlivňuje jejich diferenciaci a celkový metabolismus (Balin a Pratt 2002; Horikoshi et al. 1986, 1991).

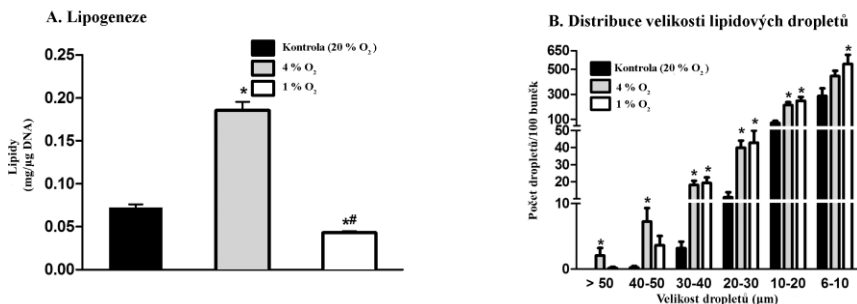
Cílem této studie bylo zkoumat účinky mírné (4% O₂) a těžké (1% O₂) hypoxie na klíčové adipocytární funkce, zejména na diferenciaci adipocytů, akumulaci triglyceridů a lipolýzu. Máme rovněž za cíl řešit možné mechanismy zprostředkovávající hypoxií indukované změny v rámci některých metabolických drah.

Výsledky

Lipogeneze a distribuce velikosti lipidových dropletů

Vystavení mírné hypoxií výrazně stimulovalo lipogenezi a to o 375 %, zatímco těžká hypoxie měla opačný účinek, inhibice o 43 % (0,07 ± 0,004 vs 0,19 ± 0,01 vs 0,04 ± 0,002 mg lipidů / μg DNA pro kontrolu, mírnou a závažné hypoxie, v daném pořadí, vše p <0,05, ANOVA). Pomocí podrobnější analýzy bylo zjištěno, že mírná hypoxie byla spojena se zvýšeným počtem největších lipidových dropletů v adipocytech (> průměr 30 μm) o 540 % větší ve srovnání s kontrolními podmínkami (25,6 ± 1,12 vs. 4,0 ± 0,4 droplety / 100 buněk, p <0,05). Důležité je, že vystavení těžší hypoxií stimulovalo tvorbu převážně menších lipidových dropletů, zatímco velké droplety nebyly přítomny. To vedlo ke snížení celkového obsahu triglyceridů v porovnání s mírnou hypoxií. Údaje jsou uvedeny na obrázku 10. Další výsledky jsou součástí vlastní publikace

Obrázek 10: Vliv mírné a těžké hypoxie na klíčové adipocytární parametry



Vystavení buněk mírné a závažné hypoxii vykazovalo rozdílný vliv na akumulaci triglyceridů - lipogenezi (A), a schopnosti vytvářet velké lipidové inkluze (B). * P <0,05 pro srovnání s expozicí 20% O₂, #p <0,05 pro srovnání s expozicí 4% O₂ (ANOVA). N = 6 pro A, N = 9 pro B.

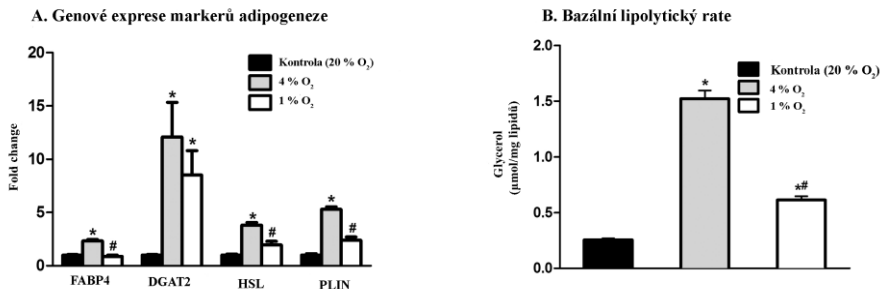
Markery diferenciace adipocytů

Genové exprese klíčových markerů diferenciace adipocytů v rámci expozice normoxii, mírné a závažné hypoxii expozice jsou shrnuty na obrázku 11. Údaje naznačují, že mírná hypoxie (4% O₂) podporovala diferenciaci / adipogenezi. S tím souvisí zvýšená genová exprese FABP4, DGAT, HSL a perilipinu (2,3 ± 0,1, 12,1 ± 3,3, 3,8 ± 0,3 a 5,3 ± 0,2) (všechny p <0,05). Naproti tomu expozice těžké hypoxii (1% O₂) vedla k výrazně nižší indukcii genové exprese u DGAT, HSL a perilipinu (8,5 ± 2,3, 1,9 ± 0,4 a 2,4 ± 0,3, vše p <0,05), žádná změna nebyla zjištěna v expresi FABP4 (0,9 ± 0,1 změna, p > 0,05).

Bazální lipolýza

Expozice mírné hypoxii (4% O₂) zvýšila spontánní lipolýzu o 488 % (glycerol v médiu: 0,26 ± 0,01 proti 1,53 ± 0,07 μmol / mg lipidů / 180 min, p <0,05), zatímco těžká hypoxie (1% O₂) vykazovala nižší účinek stimulace spontánní lipolýzy a to 135 % (0,26 ± 0,01 proti 0,61 ± 0,30 pmol / mg lipidů / 180min, p <0,05).

Obrázek 11: Vliv mírné a těžké hypoxie na klíčové adipocytární parametry



Vystavení buněk mírné a závažné hypoxii vykazovalo rozdílný vliv na diferenciaci pre-adipocytů ve zralé adipocyty- posuzováno podle genové exprese specifických pro zrání adipocytů (A). Stimulace bazální lipolýzy při expozici mírné hypoxii (B). * P <0,05 pro srovnání s expozicí 20% O₂, #p <0,05 pro srovnání s expozicí 4% O₂ (ANOVA). N = 6 pro A, B.

Publikace č. 4: Inhibice lipolýzy zlepšuje diabetický fenotyp v myším modelu syndromu obstrukční spánkové apnoe

Úvod a cíle studie:

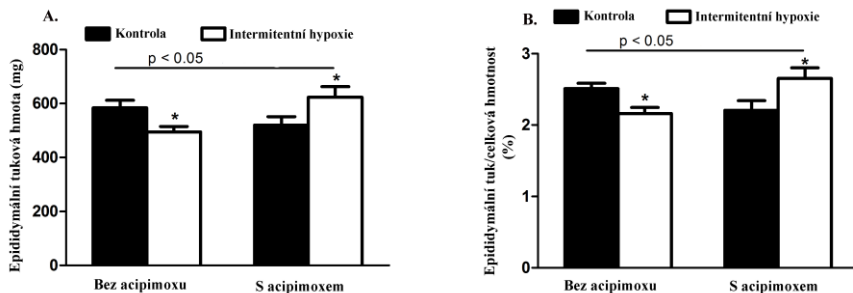
Syndrom obstrukční spánkové apnoe reprezentuje s prevalencí 5-15 % významný zdravotní problém v lidské populaci. Opakující se částečné nebo úplné uzavření horních cest dýchacích během spánku vede k pravidelným poklesům hladiny kyslíku v krvi (hypoxemie) a významně přispívá ke spánkové fragmentaci. Předchozí výzkumy identifikovaly OSA jako nezávislý rizikový faktor pro hypertenzi, kardiovaskulární choroby, mozkové mrtvice, a celkovou mortalitu (Sánchez-de-la-Torre et al. 2013; Punjabi et al. 2004a). Některé studie v poslední době naznačují, že obstrukční spánková apnoe je nezávisle na ostatních rizikových faktorech spojena s intolerancí glukózy, inzulínovou rezistencí a DM2T (Brianchon-Marjollet et al. 2015; Tasali et al. 2008). Ačkoliv epidemiologické souvislosti mezi OSA a poruchou metabolismu glukózy byly opakovaně potvrzeny, mechanismy spojující OSA s poruchou glukózové homeostázy prozatím nebyly spolehlivě vysvětleny. Cílem této studie bylo ověřit hypotézu, že zvýšená lipolýza tukové tkáně hraje ústřední roli v patogenezi metabolismu glukózy spojené s expozicí IH. Na myším modelu OSA bylo testováno: a) objasnění vlivu IH na bazální a stimulovanou lipolýzu v adipocytech a b) stanovení, zda farmakologické potlačení lipolýzy zabrání rozvoji hyperglykémie, glukózové intolerance, inzulínové rezistence a dysfunkci β -buněk pankreatu.

Výsledky

Parametry adipocytů

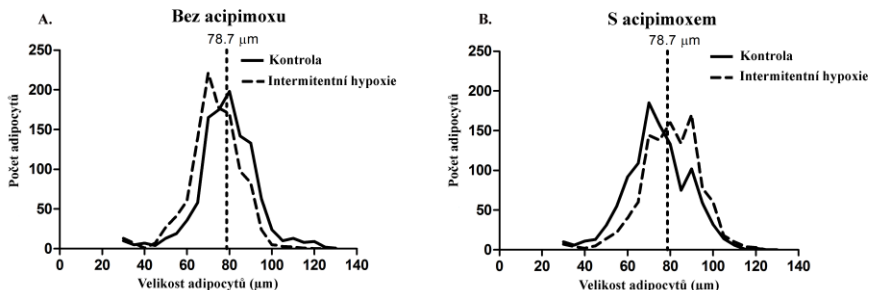
Celková tělesná hmotnost se u IH-exponovaných myší snížila o $7,9 \pm 0,5$ % ($24,8 \pm 0,5$ g vs. $22,6 \pm 0,4$ g, $p < 0,05$), zatímco myši léčené acipimoxem ztratily pouze $2,2 \pm 1,0$ % ($23,8 \pm 0,3$ g vs. $23,3 \pm 0,3$ g, $p < 0,05$). V souladu s tím, došlo u myší vystavených IH ke snížení hmotnosti epididymální tukové tkáně o 15 % ($583,3 \pm 28,9$ vs. $494,7 \pm 20,6$ mg, $p < 0,05$). Celkově tedy došlo ke snížení poměru epididymálního tuku na celkové tělesné hmotnosti ve srovnání s hmotností myší vystavených kontrolním podmínkám ($2,5 \pm 0,1$ vs. $2,2 \pm 0,1$ %, $p < 0,05$) (Obr. 12). Průměrná velikost adipocytů se snížila o 8 % ($78,7 \pm 1,8$ vs. $72,4 \pm 1,4$ μm , $p < 0,05$). Distribuce velikosti adipocytů byla u IH-exponovaných myší posunuta doleva (Obr. 13). Podávání acipimoxu v průběhu expozice IH zabránilo IH-indukovaným změnám, došlo tedy ke zvýšení hmotnosti epididymální tukové tkáně ($520,3 \pm 30,4$ vs. $623,2 \pm 38,9$ mg, $p < 0,05$), zachování velikosti adipocytů ($74,6 \pm 3,4$ vs. $80,2 \pm 1,7$ μm , $p > 0,05$) a posunutí distribuce velikosti adipocytů k normálním hodnotám (Obr. 12, 13). V samostatné skupině myší, které nebyly vystaveny IH ani kontrolním podmínkám, neovlivnilo podávání acipimoxu tělesnou hmotnost.

Obrázek 12: Množství epididymální tukové tkáně



A. Epididymální tuková hmota (mg) u myši vystavených kontrolním podmínkám nebo intermitentní hypoxií (IH) po dobu 14 dnů při léčbě acipimoxem nebo bez léčby, **B.** Podíl epididymální tukové hmoty na celkové tělesné hmotnosti (%) u myši vystavených kontrolním podmínkám nebo IH po dobu 14 dní při léčení acipimoxem nebo bez léčby. * p < 0,05

Obrázek 13: Distribuce velikosti adipocytů



A. Histogram distribuce velikosti adipocytů u myši bez léčby. **B.** Histogram distribuce velikosti adipocytů u myši léčených acipimoxem. Přerušovaná čára představuje průměrnou velikost adipocytů z kontrolní skupiny bez léčby.

Vliv na acipimoxu na poruchy metabolismu glukózy vyvolaných expozičními IH

U myši vystavených IH byly lačné hladiny glukózy zvýšeny o 76 % ($86,6 \pm 6$ oproti $152,2 \pm 5,4$ mg / dl, p < 0,05) a glukózová tolerance se zhoršila o 33 % ($AUC_{glucose} = 18,2 \pm 0,7$ vs. $24,2 \pm 0,5 \times 10^3$ mg / dl / 120 min $\times 10^3$) (Obr. 14). Podávání acipimoxu zabránilo IH-indukovaným změnám lačných hladin glukózy ($137,0 \pm 148,9$ oproti $6 \pm 4,9$ mg / dl, p < 0,05) a glukózové tolerance ($26,9 \pm 0,9$ vs. $24,8 \pm 0,7 \times 10^3$ mg / dl / 120

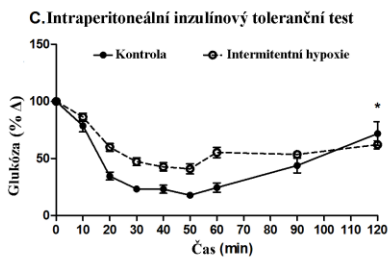
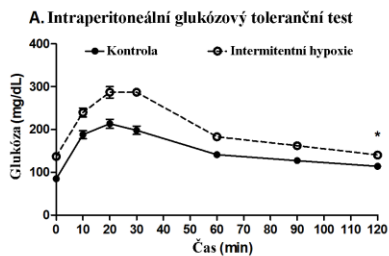
min x 103, $p > 0,05$). Lačné hladiny inzulínu, stejně jako inzulínová senzitivita byly hodnoceny pomocí indexu HOMA-IR. Negativní efekt byl pozorován hlavně v játrech, kde byla po expozici IH snížena inzulínová senzitivita o 46 % a 36 %. Léčba acipimoxem tomuto efektu nezabránila (pokles o 38 % a 37 %, $p < 0,05$).

Inzulínová senzitivita v postprandiálním stavu, se u myši exponovaných IH zhoršila o 34 % ($5,2 \pm 0,5$ vs. $6,9 \pm 0,3 \times 10^3$ mg / dl / 120 min, $p < 0,05$), ale tento účinek byl zmírněn podáváním acipimoxu během expozice IH ($10,0 \pm 0,9$ vs. $8,2 \pm 0,7 \times 10^3$ mg / dl / 120 min, $p > 0,05$).

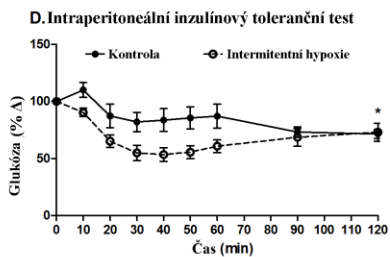
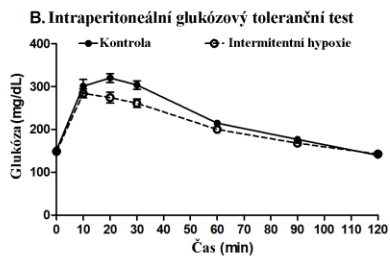
Expozice IH narušila funkci β -buněk pankreatu (HOMA-beta), která se s podáváním acipimoxu zlepšila jen částečně. Podávání acipimoxu za fyziologických podmínek nemělo žádný zjištělý účinek na glukózovou toleranci nebo inzulínovou senzitivitu, jak bylo prokázáno v oddělené skupině myši, které nebyly vystaveny žádným experimentálním úkonům (Obr. 14E, F) Fosforylace Akt (Thr 308) v kosterním svalu byla během expozice IH snížena o 30 % (fold change: $1,00 \pm 0,10$ vs. $0,70 \pm 0,08$, $p = 0,06$), avšak negativní vliv pozorovaný při expozici IH nebyl přítomen ve skupině léčené acipimoxem (fold change: $0,67 \pm 0,11$ vs. $0,66 \pm 0,04$, $p > 0,05$). Opačné výsledky byly pozorovány v tukové tkáni, kde se pAKT při expozici IH zvýšila o 96 %, (fold change: $1,0 \pm 0,12$ vs. $1,96 \pm 0,09$ pro kontrolní a IH-exponované skupiny, $p < 0,05$), stejně jako ve skupinách léčených acipimoxem (fold change: $1,42 \pm 0,14$ vs. $2,45 \pm 0,18$, $p < 0,05$). Podávání acipimoxu snížilo pAKT ve svalech (fold change: $1,00 \pm 0,10$ vs. $0,67 \pm 0,11$ u kontrolních skupin bez léčby acipimoxem a kontrolních skupin léčených acipimoxem, $p = 0,07$), ale nemělo žádný vliv na pAKT v tukové tkáni (fold change: $1,0 \pm 0,12$ vs. $1,42 \pm 0,14$ u kontrolních skupin bez léčby acipimoxem a kontrolních skupin léčených acipimoxem, $p > 0,05$)

Obrázek 14: Intraperitoneální glukózové a inzulínové toleranční testy

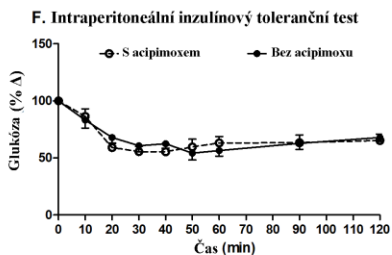
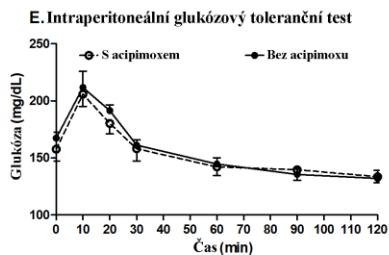
Bez acipimoxu



S acipimoxem



Neexponované myši



Jednotlivé hodnoty hladiny glukózy v plazmě po intraperitoneálním podání 1 g / kg glukózy u myši vystavených kontrolním podmínkám a intermitentní hypoxii (IH) po dobu 14 dní bez léčby (A) nebo s léčbou acipimoxem (B). Jednotlivé hodnoty hladiny glukózy v plazmě po intraperitoneálním podání 0,5 IU / kg inzulínu u myši vystavených kontrolním podmínkám a IH po dobu 14 dní bez léčby (C) nebo s léčbou acipimoxem (D). Jednotlivé hodnoty hladiny glukózy v plazmě po intraperitoneálním podání 1 g / kg glukózy

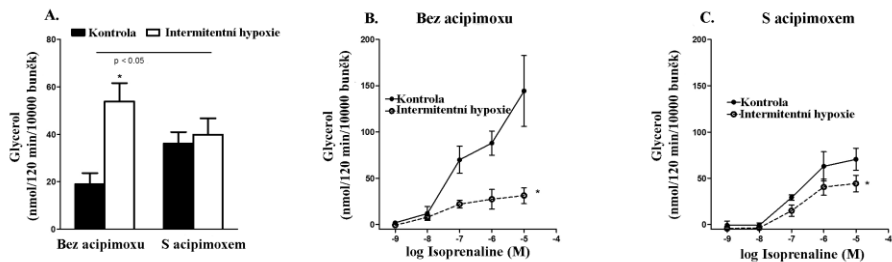
u neexponovaných myší (E). Jednotlivé hodnoty hladiny glukózy v plazmě po intraperitoneálním podání 0,5 IU / kg inzulinu u neexponovaných myší (F).

Vliv acipimoxu na lipolýzu a hladiny FFA v plazmě

V izolovaných adipocytech od myší vystavených IH se lipolýza zvýšila o 184 % ($19,0 \pm 4,7$ vs. $53,8 \pm 7,7$ nmol / 120 min / 10,000 buněk, $p < 0,05$). Léčba acipimoxem zabránila IH-indukované stimulaci lipolýzy ($36,1 \pm 4,8$ vs. $39,8 \pm 6,8$ nmol / 120 min / 10,000 buněk pro kontrolní skupinu a IH-exponovanou skupinu, v tomto pořadí, $p > 0,05$). Obr. 15) Paralelně, se s IH expozicí zvýšily hladiny FFA v plazmě o 54 % ($274,1 \pm 22,3$ vs. $420,9 \pm 25,9$ pmol / l, $p < 0,05$). Tento účinek byl zmírněn podáváním acipimoxu ($324,3 \pm 41,1$ vs. $306,5 \pm 28,1$ μ mol / L pro kontrolní a IH-exponované skupiny, v tomto pořadí, $p > 0,05$).

Podání isoprenalinu stimulovalo lipolýzu v závislosti na koncentraci za všech experimentálních podmínek (Obr. 15). Citlivost lipolytické dráhy na podání isoprenalinu byla hodnocena jako polovina maximální efektivní koncentrace (EC50 [ISO]) a byla ovlivněna jak expozicí IH tak i léčbou acipimoxem (EC 50 [ISO] = $1,1 \pm 0,4$, $0,6 \pm 0,4$, $1,3 \pm 0,5$ a $1,5 \pm 0,5$ nmol/L pro kontrolní skupinu, IH-exponovanou skupinu, acipimoxem léčenou kontrolní skupinu a acipimoxem léčenou IH-exponovanou skupinu, v tomto pořadí, ANOVA, $p > 0,05$). Odpověď na isoprenalin, projevující se jako maximální lipolýza dosažená při podání nejvyšší koncentrace isoprenalinu byla potlačena jak u IH-exponovaných skupin bez acipimoxu tak i u IH-exponovaných skupin léčených acipimoxem ($144,3 \pm 38,3$ vs. $31,2 \pm 8,7$ a $70,5 \pm 12,0$ vs. $44,3 \pm 9,0$ nmol / 120 / min 10,000 buněk, v daném pořadí, ANOVA, $p < 0,05$).

Obrázek 15: Bazální a stimulovaná lipolýza



A. Bazální lipolýza v adipocytech izolovaných z myší vystavených kontrolním podmínkám nebo intermitentní hypoxii po dobu 14 dní, léčených acipimoxem nebo bez léčby, B. Isoprenalinem stimulovaná lipolýza u myší vystavených kontrolním podmínkám a intermitentní hypoxii po dobu 14 dní, bez léčby (B) nebo s acipimoxem (C). * P < 0,05 pro vliv intermitentní hypoxie. N = 5 pro všechny skupiny s výjimkou stimulované lipolýzy ve skupině léčené acipimoxem, kde n = 4

Závěr a diskuze

V úvodu této dizertační práce jsem se snažil shrnout aktuální poznatky o krátkém trvání spánku a jiných poruchách spánku, jejich vlivu na metabolismus a dále na molekulárních a endokrinních mechanismech zprostředkovávajících příčinnou souvislost mezi OSA a vznikem glukózové intolerance, inzulínové rezistence, zhoršené sekrece inzulínu a nakonec vzniku DM2T. Na základě literárních zdrojů, lze dojít k závěru, že zvýšení lipolýzy s modifikovaným uvolňováním adipokinů v tukové tkáni, aktivace intermitentní hypoxií-indukovaného sympatického nervového systému, generování reaktivních kyslíkových radikálů a vzniku prozánětlivých stavů celého těla jsou s největší pravděpodobností nejvýznamnější mediátory způsobující tuto souvislost. Některé z těchto mechanismů představují potenciální léčebné cíle, nicméně jedině s intenzivním budoucím výzkumem bude zjištěno, jak se zaměřit na výše uvedené molekulární mechanismy, tak aby poskytovaly vhodný podklad při prevenci a léčbě tohoto onemocnění.

Základním cílem předkládané disertační práce je tedy přispět k pochopení mechanismů, kterými je zprostředkována vazba mezi nadměrnou akumulací tukové tkáně, rozvojem spánkových poruch jako je syndrom obstrukční spánkové apnoe a s tím souvisejících závažných metabolických komplikací jako vznik glukózové intolerance, inzulínové rezistence s rozvojem DM2T. Do této práce jsou celkově zahrnuty 3 *in vitro* a 1 *in vivo* studie. V první *in vitro* studii jsme se zabývali metodologickým přístupem kultivace adipocytů na povrchu umožňujícím volitelně určovat dostupnost pericelulárního kyslíku. Ve zbylých dvou *in vitro* studiích jsme tyto znalosti využili pro ověření našich hypotéz stran důkazu, že pericelulární koncentrace kyslíku má zásadní vliv na některé základní charakteristiky adipocytů tj. hlavně lipolytickou aktivitu a akumulaci triglyceridů. V *in vivo* studii jsme se zabývali možnou prevencí vzniku diabetického fenotypu při OSA skrze potenciální farmakologickou intervenci v podobě inhibice lipolýzy v tukové tkáni látkou acipimox.

Výzkum vlivu hypoxie na tukovou tkáň je limitován dosavadními laboratorními metodami a znalostmi. Pokusili jsme se proto definovat nový experimentální přístup v adipocytárním výzkumu, který umožňuje expozici adherentních buněk *in vitro* v prostředí s definovanou pericelulární koncentrací kyslíku bez dosavadních limitací a artefaktů, kterými byl dosavadní výzkum zatížen a jeho výsledky byly velmi těžko interpretovatelné. V rámci tohoto projektu jsme vyvinuli systém, který umožňuje aktuální limitace obehjít a stal se nedílnou součástí našich experimentů

V metodologické studii (č. 1) jsme prokázali, že kultivační povrch může mít zásadní vliv na některé funkční a strukturální charakteristiky pěstovaných buněk. Proteomická analýza nám odhalila, že mezi nejvíce ovlivněnými byly proteiny, které se podílí na mitochondriální morfologii a cytoskeletální organizaci. Tohoto metodologického přístupu bylo poté využito k realizaci dalších studií.

Ve studii označené číslem 2 jsme se zabývali proteomickým profilem adipocytů při snížené dostupnosti pericelulárního kyslíku. V této studii jsme pomocí proteomické analýzy zjistili, že variabilní dostupnost pericelulárního kyslíku je velmi důležitým faktorem v regulaci buněčných funkcí tím, že byly významně postiženy dráhy podílející se na energetickém metabolismu a syntéze triglyceridů v tukových

buňkách. Zároveň jsme prokázali, že snížená dostupnost kyslíku (hypoxie) stimuluje akumulaci lipidů v kultivovaných buňkách.

Ve studii č. 3 jsme zkoumali vliv mírné a těžké hypoxie na základní adipocytární funkce tj. akumulaci triglyceridů, spontánní lipolýzu, diferenciaci a tvorbu a velikost intracelulárních lipidových inkluzí. Tato studie prokázala, že adipocyty reagují na chronicky sníženou dostupnost O₂ různě a to v závislosti na závažnosti hypoxie. Mírná hypoxie (4% O₂) stimulovala adipogenezi, lipogenezi a zvýšila bazální lipolýzu. Toto zjištění podporuje možný negativní vliv hypoxie v tukové tkáni v rozvoji obezity a zvýšeného uvolňování FFA, čímž přispívá k rozvoji inzulínové rezistence, glukozové intolerance a dysfunkce β-buněk u pacientů s OSA a diabetem. Závažnější hypoxická expozice (1% O₂) byla charakterizována nižší diferenciací adipocytů a sníženou stimulací lipolýzy pravděpodobně díky limitaci metabolických procesů v důsledku závažné hypoxie DM2T.

Ve studii č. 4 jsme se zaměřili na úlohu lipolýzy v tukové tkáni při expozici myši intermitentní hypoxií, představující validovaný model syndromu OSA. Zjistili jsme, že expozice IH vede k rozvoji diabetického fenotypu (inzulínové rezistenci a glukózové intoleranci), stimuluje lipolýzu v tukové tkáni a zvyšuje hladiny FFA v plazmě. Předpokládali jsme, že zvýšená lipolýza v tukové tkáni pravděpodobně představuje kauzální mechanismus spojující expozici IH s hyperglykemií, glukózovou intolerancí, inzulínovou rezistencí, a dysfunkcí β-buněk pankreatu. Jelikož inhibice lipolýzy perorálně podaným acipimoxem zabránila rozvoji diabetu, IH-indukovanému zvýšení lipolýzy i zvýšení plazmatických hladin FFA u myši exponovaných IH. Tato studie demonstrovala možnost použití inhibitoru lipolýzy (např. acipimox, který je v Evropě i USA registrován jako humánní léčivo) u pacientů s OSA v prevenci nebo léčbě

V souhrnu na základě našich studií můžeme konstatovat, že adipocyty významně reagují na variabilní dostupnost pericelulárního kyslíku. Předchozí studie prokázaly, že u OSA dochází k závažné tkáňové hypoxii (Reinke et al. 2011) a proto se domníváme, že naše studie významně přispěly k pochopení kauzální úlohy adipocytů v rozvoji DM2T u OSA. Na základě předložených *in vitro* studií lze předpokládat, že hypoxie v tukové tkáni přispívá k akumulaci lipidů a tudíž k rozvoji obezity. Centrální úlohy hypoxie v tukové tkáni lze účinně využít pro farmakologické intervence zaměřené na ovlivnění lipolýzy v adipocytech i sekrece adipokinů (uvolňování FFA do cirkulace), jako primární a sekundární prevenci rozvoje DM2T u OSA nebo k terapii metabolických komplikací spojených s OSA.

Ačkoli je OSA standardně léčena pomocí pozitivního přetlaku v dýchacích cestách s pomocí obličejové masky (CPAP), tato léčba vyžaduje denní používání masky alespoň po dobu 4 hodin v průběhu spánku, aby bylo dosaženo prokázaných zdravotních benefitů (snížení kardiovaskulární morbidity a mortality a zlepšení metabolických funkcí). Limitací léčby pomocí přetlaku je compliance pacientů vedoucí k tomu, že je tato léčba mnoha pacienty z různých důvodů odmítána, špatně tolerována nebo nedostatečně aplikována. Navíc existují pochybnosti zda-li terapie CPAP během spánku např. zlepšuje robustní parametry kompenzace diabetu např. HbA1c (Zhao et al. 2015). Je tedy nutné hledání využití některých inovativních přístupů (pravděpodobně farmakoterapie) k prevenci či minimalizaci zdravotních rizik spojených s výskytem OSA.

Pro případnou farmakologickou intervenci je zásadní pochopení mechanismů, které jsou zodpovědné za rozvoj diabetu při OSA, charakterizované jak spánkovou fragmentací, tak intermitentnímu hypoxickému prostředí. V našich studiích jsme se zaměřili na tukovou tkáň, zejména adipocyty, jako klíčové hráče v rozvoji metabolických poruch při expozici soustavné a intermitentní hypoxii. Prokázali jsme, že adipocyty metabolicky reagují na sníženou dostupnost pericelulárního kyslíku způsobem, který by mohl přispívat k rozvoji inzulinové rezistence a následně DM2T. Tyto nálezy nás vedly k pilotnímu ověření možnosti cíleného ovlivnění metabolismu adipocytů skrze inhibici lipolýzy v prevenci rozvoje DM2T. K tomuto účelu jsme využili myšího modelu spánkové apnoe a prokázali, že farmakologická inhibice lipolýzy perorálně podávaným léčivem registrovaným pro humánní užití (acipimox), zcela zabránila rozvoji diabetického fenotypu při expozici intermitentní hypoxii. Terapie acipimoxem představuje potenciální možnost ve farmakologické léčbě metabolických komorbidit spojených s OSA, včetně DM2T.

V tomto kontextu je vhodné zmínit, že myšlenka využití acipimoxu v léčbě DM2T byla již v minulosti zkoumána s nejednoznačnými výsledky, s nadějnou krátkodobou účinností (Santomauro et al. 1999), a s ambivalentní dlouhodobou účinností (Dean et al. 1992). Na základě naší pilotní studie potvrzující účinnost acipimoxu v prevenci rozvoje DM2T lze spekulovat, že vhodnou indikací k léčbě acipimoxem může být právě přítomnost OSA, kdy dochází díky hypoxii a stresu při apnoických epizodách k aktivaci sympatiku a tím k opakované stimulaci lipolytické aktivity v tukové tkáni. Tato hypotéza však musí být v budoucnu ověřena v rámci dvojité-slepé randomizované klinické studie.

Literatura

- ALLEN, C B, B K SCHNEIDER a C W WHITE, 2001. Limitations to oxygen diffusion and equilibration in vitro cell exposure systems in hyperoxia and hypoxia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. roč. 281, č. 4, s. L1021–L1027. ISSN 1040-0605.
- ANANDAM, Anil, Monali PATIL, Morohunfolu AKINNUSI, Philippe JAOUDE a Ali a. EL-SOLH, 2013. Cardiovascular mortality in obstructive sleep apnoea treated with continuous positive airway pressure or oral appliance: An observational study. *Respirology* [online]. roč. 18, č. 8, s. 1184–1190. ISSN 13237799. Dostupné z: doi:10.1111/resp.12140
- BALIN, Arthur K a Loretta PRATT, 2002. Oxygen modulates the growth of skin fibroblasts. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* [online]. roč. 38, č. 5, s. 305–310. ISSN 1543-706X. Dostupné z: doi:10.1290/1071-2690(2002)038<0305:OMTGOS>2.0.CO;2
- BAUMGARDNER, J E a C M OTTO, 2003. In vitro intermittent hypoxia: challenges for creating hypoxia in cell culture. *Respir.Physiol Neurobiol*. 16. 7., roč. 136, č. 1569–9048 (Print), s. 131–139.
- BRIANÇON-MARJOLLET, Anne, Martin WEISZENSTEIN, Marion HENRI, Amandine THOMAS, Diane GODIN-RIBUOT a Jan POLAK, 2015. The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms. *Diabetology & metabolic syndrome* [online]. roč. 7, s. 25. ISSN 1758-5996. Dostupné z: doi:10.1186/s13098-015-0018-3
- CARMICHAEL, A R, 2006. Obesity as a risk factor for development and poor prognosis of breast cancer. *BJOG*. 10., roč. 113, č. 1470–0328 (Print), s. 1160–1166.
- DEAN, J D, S MCCARTHY, D J BETTERIDGE, C WHATELY-SMITH, J POWELL a D R OWENS, nedatováno. The effect of acipimox in patients with type 2 diabetes and persistent hyperlipidaemia. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* [online]. roč. 9, č. 7, s. 611–5. ISSN 0742-3071. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1511566>
- FOSTER, Gary D, Mark H SANDERS, Richard MILLMAN, Gary ZAMMIT, Kelley E BORRADAILE, Anne B NEWMAN, Thomas A WADDEN, David KELLEY, Rena R WING, F Xavier Pi SUNYER, Valerie DARCEY, Samuel T KUNA a SLEEP AHEAD RESEARCH GROUP, 2009. Obstructive sleep apnea among obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* [online]. 6., roč. 32, č. 6, s. 1017–9. ISSN 1935-5548. Dostupné z: doi:10.2337/dc08-1776
- HAN, J M, T Y KIM, M J JEON, J H YIM, W G KIM, D E SONG, S J HONG, S J BAE, H K KIM, M H SHIN, Y K SHONG a W B KIM, 2013. Obesity is a risk factor for thyroid cancer in a large, ultrasonographically screened population. *Eur.J.Endocrinol*. 6., roč. 168, č. 1479–683X (Electronic), s. 879–886.
- HE, Q., Z. GAO, J. YIN, J. ZHANG, Z. YUN a J. YE, 2011. Regulation of HIF-1 activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. *AJP: Endocrinology and Metabolism* [online]. 1. 5., roč. 300, č. 5, s. E877–E885. ISSN 0193-1849. Dostupné z: doi:10.1152/ajpendo.00626.2010
- HONG, S, Q CAI, D CHEN, W ZHU, W HUANG a Z LI, 2012a. Abdominal obesity and the risk of colorectal adenoma: a meta-analysis of observational studies. *Eur.J.Cancer Prev*. 11., roč. 21, č. 1473–5709 (Electronic), s. 523–531.
- HONG, Shanyou, Quancai CAI, Dafan CHEN, Wei ZHU, Wen HUANG a Zhaoshen LI, 2012b. Abdominal obesity and the risk of colorectal adenoma: a meta-analysis of observational studies. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* [online]. 11., roč. 21, č. 6, s. 523–31. ISSN 1473-5709. Dostupné z: doi:10.1097/CEJ.0b013e328351c775

- HORIKOSHI, T, A K BALIN a D M CARTER, 1986. Effect of oxygen on the growth of human epidermal keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. roč. 86, č. 4, s. 424–427. ISSN 0022-202X.
- HORIKOSHI, T, A K BALIN a D M CARTER, 1991. Effects of oxygen tension on the growth and pigmentation of normal human melanocytes. *The Journal of investigative dermatology*. roč. 96, č. 6, s. 841–844.
- KOCH, C J, 1984. A thin-film culturing technique allowing rapid gas-liquid equilibration (6 sec) with no toxicity to mammalian cells. *Radiat.Res.*
- LAM, R H, M C KIM a T THORSEN, 2009. Culturing aerobic and anaerobic bacteria and mammalian cells with a microfluidic differential oxygenator. *Anal.Chem.*
- LASTRA, G a J R SOWERS, 2013. Obesity and cardiovascular disease: role of adipose tissue, inflammation, and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Horm.Mol.Biol.Clin.Investig.* 9., roč. 15, č. 1868–1891 (Electronic), s. 49–57.
- LAVIE, Lena, 2003. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep medicine reviews.* 2., roč. 7, č. 1, s. 35–51. ISSN 1087-0792.
- LAVIE, Lena, Rachel LOTAN, Irit HOCHBERG, Paula HERER, Peretz LAVIE a Andrew P LEVY, 2003. Haptoglobin polymorphism is a risk factor for cardiovascular disease in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep.* 8., roč. 26, č. 5, s. 592–5. ISSN 0161-8105.
- MARIN, J M, A AGUSTI, I VILLAR, M FORNER, D NIETO, S J CARRIZO, F BARBE, E VICENTE, Y WEI, F J NIETO a S JELIC, 2012. Association between treated and untreated obstructive sleep apnea and risk of hypertension 1. *JAMA.*
- MARIN JM, CARRIZO SJ, VICENTE E, Agusti AG, 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*. roč. 365, s. 1046–53.
- METZEN, E, M WOLFF, J FANDREY a W JELKMANN, 1995. Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. *Respir.Physiol [online]*. 5., roč. 100, č. 0034–5687 (Print), s. 101–106. ISSN 00345687. Dostupné z: doi:10.1016/0034-5687(94)00125-J
- NORTHCOTT, J M, A YEGANEH, C G TAYLOR, P ZAHRAKKA a J T WIGLE, 2012. Adipokines and the cardiovascular system: mechanisms mediating health and disease. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 8., roč. 90, č. 1205–7541 (Electronic), s. 1029–1059.
- OPPEGARD, S C, A J BLAKE, J C WILLIAMS a D T EDDINGTON, 2010. Precise control over the oxygen conditions within the Boyden chamber using a microfabricated insert. *Lab Chip.* 21. 9., roč. 10, č. 1473–0197 (Print), s. 2366–2373.
- OTTO, C M a J E BAUMGARDNER, 2001. Effect of culture PO₂ on macrophage (RAW 264.7) nitric oxide production. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 2., roč. 280, č. 0363–6143 (Print), s. C280–C287.
- PAMIDI, Sushmita a Esra TASALI, 2012. Obstructive Sleep Apnea and Type 2 Diabetes: Is There a Link? *Frontiers in Neurology [online]*. roč. 3. ISSN 1664-2295. Dostupné z: doi:10.3389/fneur.2012.00126
- PARKER, J D, D BROOKS, L F KOZAR, C L RENDER-TEIXEIRA, R L HORNER, T DOUGLAS BRADLEY a E A PHILLIPSON, 1999. Acute and chronic effects of airway obstruction on canine left ventricular performance. *American journal of respiratory and critical care medicine [online]*. 12., roč. 160, č. 6, s. 1888–96. ISSN 1073-449X. Dostupné z: doi:10.1164/ajrccm.160.6.9807074

- PETTERSEN, E O, L H LARSEN, N B RAMSING a P EBBESEN, 2005. Pericellular oxygen depletion during ordinary tissue culturing, measured with oxygen microsensors 1. *Cell Prolif.* 8., roč. 38, č. 0960–7722 (Print), s. 257–267.
- POLAK, J, B A BEAMER a N M PUNJABI, 2012. Obstructive sleep apnea and glucose metabolism . In: *Sleep Apnea: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment* . New York : Informa Healthcare , s. 300–317. ISBN 0849396972.
- POLINKOVSKY, M, E GUTIERREZ, A LEVCHENKO a A GROISMAN, 2009. Fine temporal control of the medium gas content and acidity and on-chip generation of series of oxygen concentrations for cell cultures 1. *Lab Chip*.
- PUNJABI, N M, E SHAHAR, S REDLINE, D J GOTTLIEB, R GIVELBER a H E RESNICK, 2004a. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am.J.Epidemiol.* 15. 9., roč. 160, č. 0002–9262 (Print), s. 521–530.
- PUNJABI, Naresh M, Eyal SHAHAR, Susan REDLINE, Daniel J GOTTLIEB, Rachel GIVELBER, Helaine E RESNICK a SLEEP HEART HEALTH STUDY INVESTIGATORS, 2004b. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *American journal of epidemiology* [online]. 9., roč. 160, č. 6, s. 521–30. ISSN 0002-9262. Dostupné z: doi:10.1093/aje/kwh261
- REDLINE, Susan, Gayane YENOKYAN, Daniel J GOTTLIEB, Eyal SHAHAR, George T O’CONNOR, Helaine E RESNICK, Marie DIENER-WEST, Mark H SANDERS, Philip A WOLF, Estella M GERAGHTY, Tauqeer ALI, Michael LEBOWITZ a Naresh M PUNJABI, 2010. Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study. *American journal of respiratory and critical care medicine* [online]. roč. 182, č. 2, s. 269–77. ISSN 1535-4970. Dostupné z: doi:10.1164/rccm.200911-1746OC
- REINKE, Christian, Shannon BEVANS-FONTI, Luciano F DRAGER, Mi-Kyung SHIN a Vsevolod Y POLOTSKY, 2011. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* [online]. 9., roč. 111, č. 3, s. 881–90. ISSN 1522-1601. Dostupné z: doi:10.1152/jappphysiol.00492.2011
- SÁNCHEZ-DE-LA-TORRE, Manuel, Francisco CAMPOS-RODRIGUEZ a Ferran BARBÉ, 2013. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease. *The Lancet Respiratory Medicine* [online]. 3., roč. 1, č. 1, s. 61–72. ISSN 22132600. Dostupné z: doi:10.1016/S2213-2600(12)70051-6
- SANTOMAURO, A T, G BODEN, M E SILVA, D M ROCHA, R F SANTOS, M J URSICH, P G STRASSMANN a B L WAJCHENBERG, 1999. Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes* [online]. 9., roč. 48, č. 9, s. 1836–41. ISSN 0012-1797. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480616>
- SHAHAR, E, C W WHITNEY, S REDLINE, E T LEE, A B NEWMAN, Nieto F JAVIER, G T O’CONNOR, L L BOLAND, J E SCHWARTZ a J M SAMET, 2001. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1., roč. 163, č. 1073–449X (Print), s. 19–25.
- SONG, X, P JOUSILAHTI, C D STEHOUWER, S SODERBERG, A ONAT, T LAATIKAINEN, J S YUDKIN, R DANKNER, R MORRIS, J TUOMILEHTO a Q QIAO, 2014. Cardiovascular and all-cause mortality in relation to various anthropometric measures of obesity in Europeans. *Nutr.Metab Cardiovasc.Dis.* 20. 9., č. 1590–3729 (Electronic).

- TANCREDI, Mauro, Annika ROSENGREN, Ann-Marie SVENSSON, Mikhail KOSIBOROD, Aldina PIVODIC, Soffia GUDBJÖRNSDÓTTIR, Hans WEDEL, Mark CLEMENTS, Sofia DAHLQVIST a Marcus LIND, 2015. Excess Mortality among Persons with Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* [online]. 10., roč. 373, č. 18, s. 1720–32. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoal1504347
- TASALI, E, B MOKHLESI a Caüter E VAN, 2008. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: interacting epidemics 2. *Chest*. 2., roč. 133, č. 0012–3692 (Print), s. 496–506.
- TRAYHURN, Paul, 2013. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiological reviews* [online]. roč. 93, č. 1, s. 1–21. ISSN 1522-1210. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00017.2012
- TSAPIKOUNI, T, E GARRETA, E MELO, D NAVAJAS a R FARRE, 2012. A bioreactor for subjecting cultured cells to fast-rate intermittent hypoxia. *Respir.Physiol Neurobiol.*
- WANG, Bohan, I Stuart WOOD a Paul TRAYHURN, 2007. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* [online]. 12., roč. 455, č. 3, s. 479–92. ISSN 0031-6768. Dostupné z: doi:10.1007/s00424-007-0301-8
- WEISZENSTEIN, Martin, Larissa A SHIMODA, Michal KOC, Ondrej SEDA a Jan POLAK, 2016. Inhibition of Lipolysis Ameliorates Diabetic Phenotype in a Mouse Model of Obstructive Sleep Apnea. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* [online]. 15. 3., s. rcm.2015-0315OC. ISSN 1044-1549. Dostupné z: doi:10.1165/rcmb.2015-0315OC
- YE, J, Z GAO, J YIN a Q HE, 2007. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 10., roč. 293, č. 0193–1849 (Print), s. E1118–E1128.
- YUAN, G, G ADHIKARY, A A MCCORMICK, J J HOLCROFT, G K KUMAR a N R PRABHAKAR, 2004. Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells. *J.Physiol.* 15. 6., roč. 557, č. 0022–3751 (Print), s. 773–783.
- ZHAO, Lijun, Peilin HUI, Yuping XIE, Yiping HOU, Xiaoquan WEI, Wei MA, Jinfeng WANG, Liya ZHOU a Wenjuan ZHANG, 2015. [Effect of CPAP therapy on dynamic glucose level in OSAHS patients with newly diagnosed T2DM]. *Zhonghua yi xue za zhi* [online]. 24. 11., roč. 95, č. 44, s. 3579–83. ISSN 0376-2491. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26813368>
- ZHDANOV, A V, V I OGURTSOV, C T TAYLOR a D B PAPKOVSKY, 2010. Monitoring of cell oxygenation and responses to metabolic stimulation by intracellular oxygen sensing technique 1. *Integr.Biol.(Camb.)*. 9., roč. 2, č. 1757–9708 (Electronic), s. 443–451.

Seznam publikací

Publikace autora, které jsou podkladem dizertační práce

Původní práce v časopisech s faktorem impaktu:

PAVLIKOVA, Nela, **WEISZENSTEIN Martin**, PALA Jan, HALADA Petr, SEDA Ondrej, ELKALAF Moustafa, TRNKA Jan, KOVAR Jan a POLAK Jan. The effect of cultureware surfaces on functional and structural components of differentiated 3T3-L1 preadipocytes. *Cellular and Molecular Biology Letters* 2015 DOI: 10.1515/cmb-le-2015-0054. ISSN 1689-1392. IF: 2,05

WEISZENSTEIN Martin, PAVLIKOVA Nela, ELKALAF Moustafa, HALADA Petr, SEDA Ondrej, TRNKA Jan, KOVAR Jan a POLAK Jan. The Effect of Pericellular Oxygen Levels on Proteomic Profile and Lipogenesis in 3T3-L1 Differentiated Preadipocytes Cultured on Gas-Permeable Cultureware. *PloS one* 2016 DOI:10.1371/journal.pone.0152382. ISSN 1932-6203. IF: 3,54

WEISZENSTEIN Martin, MUSUTOVA Martina, ELKALAF Moustafa, KOC Michal, PROCHAZKA Antonin, PALA Jan, GULATI Sumeet, TRNKA Jan, POLAK Jan. Differential effects of mild versus severe hypoxia on adipogenesis, lipid synthesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016 IF: 2.00

WEISZENSTEIN Martin, SHIMODA Larissa, KOC Michal, SEDA Ondrej a POLAK Jan. Inhibition of Lipolysis Ameliorates Diabetic Phenotype in a Mouse Model of Obstructive Sleep Apnea. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2016 DOI: 10.1165/rcmb.2015-0315OC. ISSN 1044-1549. IF: 3,80

Přehledná práce v časopise s faktorem impaktu:

BRIANÇON-MARJOLLET, Anne, **WEISZENSTEIN Martin**, HENRI Marion, THOMAS Amandine, GODIN-RIBUOT Diane a POLAK Jan. The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms. *Diabetology & Metabolic Syndrome* DOI: 10.1186/s13098-015-0018-3. ISSN 1758-5996 IF: 2,50

Publikace v časopisech bez faktoru impaktu:

POLÁK Jan, BAJANÍKOVÁ Eva, **WEISZENSTEIN Martin**., Syndrom obstrukční spánkové apnoe jako faktor rozvoje diabetes mellitus. *Diabetologie*. *Diabetologie* 2014, 234-241. Triton, Prague, 2014. ISBN 978-80-7387-755-2

Publikace autora bez vztahu k dizertační práci

ELKALAF, Moustafa, Petr TŮMA, **Martin WEISZENSTEIN**, Jan POLÁK a Jan TRNKA, 2016. Mitochondrial Probe Methyltriphenylphosphonium (TPMP) Inhibits the Krebs Cycle Enzyme 2-Oxoglutarate Dehydrogenase. *PloS one* [online]. roč. 11, č. 8, s. e0161413. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0161413

VRBA, Jiří, Radek GAŽÁK, Marek KUZMA, Barbora PAPOUŠKOVÁ, Jan VACEK, **Martin WEISZENSTEIN**, Vladimír KŘEN a Jitka ULRICHOVÁ, 2013. A novel semisynthetic flavonoid 7-O-galloyltaxifolin upregulates heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells via MAPK/Nrf2 pathway. *Journal of medicinal chemistry* [online]. 14. 2., roč. 56, č. 3, s. 856–66. ISSN 1520-4804. doi:10.1021/jm3013344

Weiszenstein, M. & Bocak, L. 2011. *Review of the genus Metanoeus from the Philippines*(Coleoptera: Lycidae). – *The Raffles Bulletin of Zoology*, 59(2): 47–53