

**Univerzita Karlova v Praze**  
**3. lékařská fakulta**



Dizertační práce

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

**Sleep apnea syndrome as risk factor for development metabolic  
impairments**

Školitel:

Doc. MUDr. Jan Polák, Ph.D.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze této práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31. 08. 2016

Mgr. Martin Weiszenstein

Podpis

Identifikační záznam:

WEISZENSTEIN, Martin. *Syndrom spánkové apnoe jako rizikový faktor rozvoje metabolických onemocnění*. [Sleep apnea syndrome as risk factor for development metabolic impairments]. Praha, 2016. Počet stran: 104, Dizertační práce, Ústav tělovýchovného lékařství Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta 2016, Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Doc. MUDr. Jan Polák, Ph.D.

Klíčová slova v češtině: obstrukční spánková apnoe, lipolýza, adipocyty, proteomika, diferenciaci, diabetes

Klíčová slova v angličtině: obstructive sleep apnea, lipolysis, adipocytes, proteomics, differentiation, diabetes

## **Předmluva a poděkování**

Předkládaná dizertační práce je založena na *in vitro* a *in vivo* studiích, uskutečněných v období od června 2013 do prosince 2016 v rámci Ústavu tělovýchovného lékařství a Centra pro výzkum diabetu 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze..

Práce byly podpořeny z finančních zdrojů Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK 226214), Grantové agentury České republiky (GACR 13-27735S), Agenturou pro zdravotnický výzkum ČR (AZV 15-30155A), PRVOUK P32, SVV 2015/2016.

Touto cestou bych rád poděkoval Doc. MUDr Janu Polákovi, Ph.D. za cenné rady při zpracování dizertační práce, za uvedení do problematiky metabolismu tukové tkáně a spánkových poruch, a také za umožnění maximální seberealizace v rámci práce v laboratoři. Dále bych rád poděkoval spolupracovníkům v laboratoři a kolegům na 3. LF UK za pomoc při plánování experimentů a jejich cenné rady. V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům za maximální podporu při studiu.

3. Lékařská fakulta UK, srpen 2016  
Martin Weiszenstein

## 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 hypoxii 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 navrhnut 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.

## Obsah

1. Úvod.....	8
2. Přehled literatury .....	13
3. Metody.....	30
4. Cíle práce .....	35
5. Publikace č. 1: Vliv materiálu kultivačních destiček na proteomický profil 3T3-L1 diferencovaných preadipocytů .....	36
6. Publikace č. 2: Vliv různých pericelulárních koncentrací kyslíku na proteomický profil a funkční charakteristiky v 3T3-L1 diferencovaných preadipocytech .....	44
7. Publikace č. 3: Diferenciální účinky mírné a těžké hypoxie na adipogenezi, syntézu lipidů a lipolýzu v 3T3-L1 diferencovaných adipocytech .....	49
8. Publikace č. 4: Inhibice lipolýzy zlepšuje diabetický fenotyp v myším modelu syndromu obstrukční spánkové apnoe.....	55
9. Závěr a diskuze.....	63
10. Seznam zkratk .....	67
11. Literatura .....	68
12. Přílohy .....	103

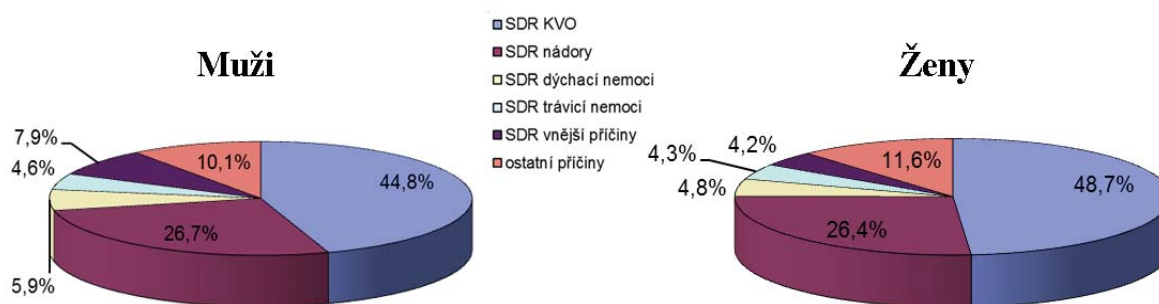
## 1. Úvod

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 příčinnou 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 sympatiku, 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 přibývajícím údajem 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 (Weiszenstein 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, nácvik 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 vháněného 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 inzulínové 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 inzulínu 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 inzulín, 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)  $\geq 30$  / 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 inhibítozem 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 moduluji metabolismus adipocytů, zejména proces lipolýzy (blokátory adrenergických receptorů, acipimox, natriuretické peptidy). Pokud by se podařilo prokázat, že tuková tkáň a lipolýza (hydrolýza 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.

## Seznam publikací:

### 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-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

## 2. Přehled literatury

### Fyziologie spánku

Spánek je aktivně regulovaný proces, který je charakterizován sníženým vědomím, svalovou relaxací a změněnou schopností reagovat na podněty a vyskytuje se u savců, ptáků, plazů, obojživelníků, ryb a dokonce i u některých bezobratlých. Lidský spánek lze rozdělit do několika fází: 1) NREM (Non Rapid Eye Movement) spánek, který je dále rozdělen do etap podle hloubky spánku ( fáze 1, stupeň 2 a stupeň 3 - jsou také označovány jako spánek pomalých vln (SWS), 2) REM (Rapid Eye Movement) - fáze vyskytující se každých 60-90 minut, zpočátku ve formě krátkých epizod.

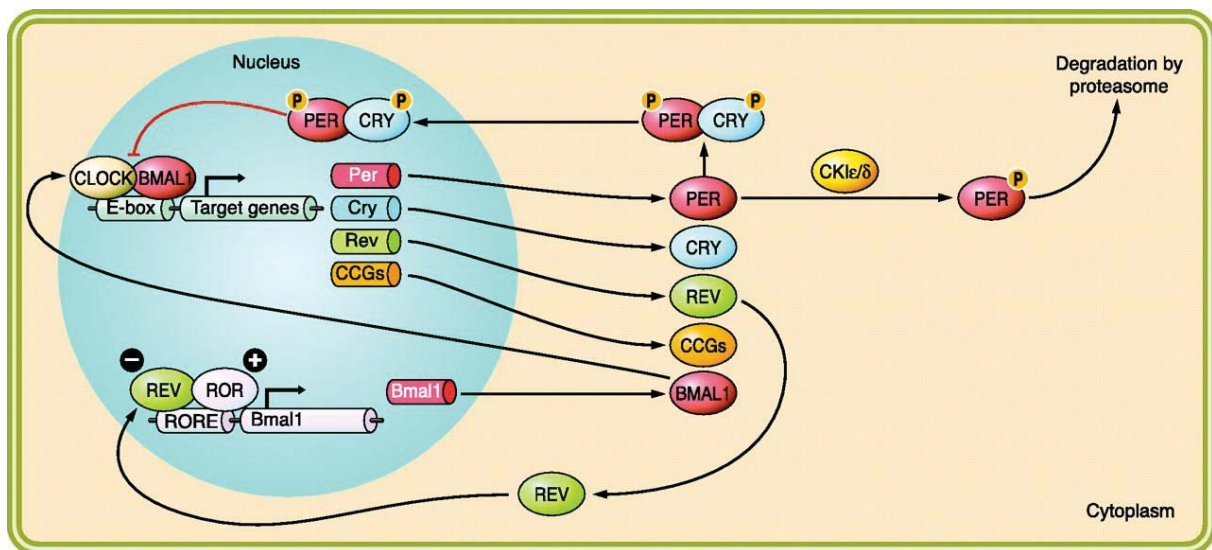
Usínání a periodicita spánku jsou přesně řízené procesy určené třemi hlavními faktory:

- a) Cirkadiálními rytmy (v literatuře uváděný jako C-System) – jedná se o endogenní rytmy, které jsou poháněny vnitřními hodinami, tzv. centrálním oscilátorem. Tento oscilátor nemá přesnou 24h periodu, ale udržuje ji jen zhruba (circa-diánní). Tyto rytmy mohou přetrvávat i ve zcela neperiodických prostředích, bez jakéhokoliv signálu o vnějším času a prostředí, např. v úplné tmě. S 24h dnem je cirkadiánní oscilátor synchronizován střídáním světla a tmy, kde určující roli hraje hlavně světlá část dne.
- b) Homeostatickými vstupy (v literatuře uváděný jako S-System) – Systém řídící se hlavně GABAergními mechanismy. Ospalost je tím výraznější, čím delší dobu je člověk vzhůru. S pokračujícím dnem je tedy stále silnější. Únava je výsledkem obsazení příslušných receptorů adenosinem. Částečnou ospalost lze redukovat včasným obsazením receptoru jiným jeho agonistou, a to např. kofeinem. Spánek přes den zeslabuje účinnost homeostatického mechanismu a posunuje jeho nástup do pozdějších hodin. Další útlumové procesy jsou pak regulovány GABA, melatoninem a galaninem a propojují se s cirkadiánním systémem
- c) Externími faktory - Přímý či nepřímý vliv na cyklus spánek-bdění mohou mít také některé externí faktory, např. jídlo, léky, teplota okolí, stres, cvičení apod.

Jak bylo řečeno výše, cirkadiánní rytmus je zajištěn hlavním „spouštěčem“ a nachází se v hypothalamu v tzv. suprachiasmatickém jádře (SCN) s přesahem do různých oblastí v mozku, které se účastní regulace spánku a dále pak regulace behaviorálních a endokrinních procesů, příjmu potravy, fyzické aktivity a metabolismu. Vnitřní rytmus těchto buněk je nezávislý na

exogenních podnětech a je zprostředkován buněčnými, autonomními periodickými změnami v genové expresi, tzv. hodinových genů: CLOCK/BMAL1. Základem oscilace centrálních hodin na molekulární úrovni jsou transkripčně-translační mechanismy genů CLOCK/BMAL1. V buněčném jádru dochází k aktivaci transkripce pomocí proteinového komplexu CLOCK/BMAL 1 (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput Protein/Brain and Muscle ARNT-like Protein 1). Tento proteinový komplex se váže na specifické místo (E-box) mnoha genů, včetně proteinů PER a CRY (Period a Cryptochrom). Tyto proteiny jsou poté translokovány do cytoplazmy a dochází k vytvoření komplexu PER/CRY. Komplex PER/CRY je poté fosforylován pomocí CK 1 (Casein Kinase 1) a GSK 3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ). Fosforylace umožňuje vstup komplexu PER/CRY do jádra, kde dochází k zablokování, a tím i další aktivaci jeho transkripce, stimulovanou komplexem CLOCK/ BMAL 1. Ve tmě pak dochází k degradaci komplexu Per/CRY, tím se znovu aktivuje transkripce a celý cyklus se opakuje. (Obr. 2).

**Obrázek 2:** Zjednodušené schéma transkripčně-translačních cyklů genů CLOCK/BMAL1



Zdroj: Physiology of Circadian Entrainment (2010)

Vlastní fyziologická potřeba spánku se může značně lišit mezi jednotlivci a je závislá na různých faktorech, jako například věk. Epidemiologické studie u dospělých obvykle berou v úvahu 7-8 hodin spánku, jako "normální" dobu spánku. Naopak definice "krátkého spánku" je v různých studiích poměrně heterogenní a je omezena na spánek trvající 5, 6 nebo 7 hodin

## **Vliv spánku na metabolismus**

Moderní společnost se vyznačuje rozšířeným používáním elektřiny, poptávkou po vysokém výkonu při práci, práci na směny, prodlouženou dobou dojíždění do zaměstnání a velké množství volnočasových aktivit se významně podepsaly na průměrné době lidského spánku. Průměrně hlášená doba spánku se snížila u 20-30 % obyvatel středního věku z více než 8 hodin v roce 1960 k 6 hodinám v roce 2012. V USA je hlášena průměrná doba spánku nižší než 6 hodin. Podobný vývoj byl zjištěn i v jiných populacích (Agil et al. 2012) a byl potvrzen ve studiích používajících aktigrafii jako objektivní kvantifikaci trvání spánku (Ahren 2000; Al-Disi et al. 2010). Během posledních deseti let se nahromadily podstatné důkazy o tom, že poruchy spánku, jako např. syndrom obstrukční spánkové apnoe (OSA), spánková deprivace, insomnie, ovlivňují nejen kognitivní funkce a výkon (Stickgold a Walker 2007; Walker 2009), ale jsou negativně spojeny s rozvojem obezity a metabolického syndromu a mají tím zásadní vliv na kardiovaskulární morbiditu a mortalitu (Cappuccio et al. 2010b; Chien et al. 2010; Ikehara et al. 2009; Punjabi et al. 2009). V poslední době bylo zjištěno, že spánek je v příčinné souvislosti s regulací homeostázy glukózy a kontrolou chuti k jídlu, a tudíž mohou poruchy spánku a krátká doba spánku přispívat k rostoucímu výskytu obezity a diabetes mellitus 2. typu (DM2T) po celém světě.

Škodlivý vliv spánkové deprivace na lidské zdraví byl prokázán v mnoha průřezových, epidemiologických a experimentálních studiích využívajících akutní model krátkého trvání spánku u lidských dobrovolníků.

## **Vliv krátké doby spánku na rozvoj diabetes mellitus 2. typu**

Rozsáhlé epidemiologické studie provedené v různých populacích u lidí různého věku, u pacientů s hypertenzí nebo u těhotných žen přesvědčivě a opakovaně prokázaly, že krátké trvání spánku je spojeno s přibližně dvojnásobným rizikem rozvoje DM2T nebo zhoršenou glukózovou tolerancí, a to zejména u žen (Buxton et al. 2012; Chaput et al. 2007; Darukhanavala et al. 2011; Fiorentini et al. 2007; Gottlieb et al. 2005; Knutson et al. 2011; Najafian et al. 2013; Ohkuma et al. 2013; Tuomilehto et al. 2008). Důležité je, že zvýšené riziko rozvoje DM2T je u subjektů se spánkovou deprivací nezávislé na jiných tradičních rizikových faktorech pro diabetes mellitus 2. typu, jako jsou obezita a metabolický syndrom. Subjektivně vnímaný nedostatečný, špatný nebo krátký spánek je spojen s několika pre-diabetickými souvislostmi, jako je lačná hyperglykémie, zvýšená postprandiální hladina glukózy a inzulínu se známkami inzulínové rezistence (Chaput et al. 2007; Flint et al. 2007; Hall et al. 2008; Hung et al. 2013; Jennings et al. 2007; Knutson et al. 2011; Matthews et al.

2012; Nakajima et al. 2008). Nedostatečný spánek byl prokázán jako škodlivý u pacientů, kteří již trpěli rozvinutým diabetem. Kompenzace diabetu se významně zhoršila právě u lidí trpících diabetem a zároveň krátkou dobou spánku (Knutson et al. 2006; Ohkuma et al. 2013). Interpretace průřezových studií je bohužel omezená. Některé studie naznačují, že hyperglykémie, hyperinsulinémie a endokrinní změny spojené s DM2T mohou významně ovlivnit kvalitu spánku a jeho délku (Nakanishi-Minami et al. 2012; Pallayova et al. 2010a; Song et al. 2013). Pro lepší pochopení možného dopadu délky spánku na metabolickou homeostázu bylo velmi poučné pozorování na základě některých prospektivních studií. V těchto studiích byli pacienti s variabilními spánkovými návyky, ale bez diabetu, sledováni po delší dobu, zatímco byly postupně zaznamenány nově diagnostikované případy DM2T. Výsledky těchto studií zahrnovaly od 661 do 70026 dospělých po dobu 4-32 let (Ayas et al. 2003; Beihl et al. 2009; Bjorkelund et al. 2005; Gangwisch et al. 2007; Hayashino et al. 2007; Kawakami et al. 2004; Kita et al. 2012; Mallon et al. 2005; Meisinger et al. 2005; Nilsson et al. 2004; Ohkuma et al. 2013; von et al. 2012). Plus meta-analýzu (Cappuccio et al. 2010a). Po úpravách známých rizikových faktorů, pacienti s krátkým trváním spánku měli vyšší relativní riziko (RR = 1,28 [1,03-1,60]) k rozvoji DM2T v porovnání se subjekty s normální dobou spánku.

Další podpora pro epidemiologické důkazy byla poskytnuta v rámci některých experimentálních studií, které prokazují, že u zdravých dobrovolníků, kteří byli vystaveni poměrně těžkému spánkovému deficitu v délce od jednoho do pěti dnů, došlo k rozvoji inzulínové rezistence (Cappuccio et al. 2010a; Gonzalez-Ortiz et al. 2000; VanHelder et al. 1993), a také k rozvoji  $\beta$ -pankreatické dysfunkce (Benedict et al. 2011; Broussard et al. 2012).

Jako důsledek inzulínové rezistence v kombinaci s defekty sekrece inzulínu, byly z důvodu krátkého trvání spánku zvýšené hladiny lačné i postprandiální hladiny glukózy (Benedict et al. 2011; Kuhn et al. 1969; Reynolds et al. 2012; Vondra et al. 1981; Wehrens et al. 2010). Přestože podobné studie založené na experimentální krátké době spánku přinesly důležité informace ohledně role spánku v metabolických procesech, studie pomocí mírnějšího spánkového omezení, redukujícího spánek na 4-5 hodin za noc po dobu několika po sobě jdoucích nocí, lépe napodobují chronickou spánkovou deprivaci, přítomnou v rámci dnešního životního stylu. I přes různorodost studií, vykazovaly částečně spánkově omezené subjekty také postižení v mnoha parametrech glukózové tolerance a inzulínové sensitivity (Buxton a Marcelli 2010; Buxton et al. 2010; Nedeltcheva et al. 2009a; Robertson et al. 2013; Schmid et al. 2011; Spiegel et al. 2004a; van Leeuwen et al. 2010). Zajímavé je, že metabolický profil



pozorovaný po spánkovém omezení sdílí několik podobností s DM2T, včetně sníženého vychytávání glukózy kosterním svalstvem, zvýšeného výdeje jaterní glukózy a dysfunkce pankreatických  $\beta$ -buněk (Buxton et al. 2012, 2010; Donga et al. 2010).

### **Endokrinní mechanismy vlivu krátké doby spánku na metabolismus**

Přes epidemiologickou souvislost mezi krátkou dobou spánku a metabolickými abnormalitami, nejsou prozatím endokrinní a molekulární mechanismy zcela uspokojivě vysvětleny. Mezi navrhovanými mechanismy hrají kauzální roli osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny a aktivace sympatiku. Tyto mechanismy jsou také podporovány většinou odborné literatury. V rámci některých experimentů byl kladen důraz na hladiny cirkulujícího kortizolu. Ten byl hodnocen buď v rámci 24h profilu nebo měřením jeho hladiny ve večerních hodinách. Hladiny kortizolu byly významně zvýšené po úplném nebo částečném spánkovém omezení (Buxton et al. 2010; Kumari et al. 2009; Leproult et al. 1997; Omisade et al. 2010; Reynolds et al. 2012; Spiegel et al. 2004a) a tento jev může být považován za marker aktivace sympatiku (Nedeltcheva et al. 2009a).

Některé studie ale uvádějí, že postižení glukózové homeostázy u subjektů s krátkou dobou spánku může rezultovat v nezměněné hladiny kortizolu a katecholaminů (Schmid et al. 2011; Donga et al. 2010). Patrně jsou dále některé endokrinní změny, které rezultují ve zvýšené hladiny pro-zánětlivých cytokinů, nižší cirkulující testosteron, snížené hladiny hormon-stimulující štítnou žlázu, narušení pulzatility růstového hormonu (Leproult a Van 2011; Spiegel et al. 2000, 2004a) nebo změny v adipokinech secernovaných z tukové tkáně (Al-Disi et al. 2010; Broussard et al. 2012; Hayes et al. 2011).

### **Rozvoj obezity u spánkových poruch**

Prospektivní a průřezové studie zjistily, že krátké trvání spánku (méně než 8 hodin) může být nezávislý rizikový faktor pro zvýšení tělesné hmotnosti s hromaděním tuku v břišní oblasti (Knutson 2010; Morselli et al. 2012). Experimentální důkazy tuto asociaci také podporují, protože spánkem omezené subjekty preferují potraviny bohaté na tuky a sacharidy (Weiss et al. 2010; St-Onge et al. 2012; Santana et al. 2012), čímž zvyšují svůj denní kalorický příjem až o 20 % (St-Onge et al. 2011; Nedeltcheva et al. 2009b; Chapman et al. 2012; Calvin et al. 2013; Bopsy-Westphal et al. 2008). Lze tedy říci, že nedostatečný spánek může přispívat k rozvoji obezity a metabolického syndromu. Krátké trvání spánku také snížilo u subjektů s nadváhou úbytek tuku, ztraceného v rámci kalorického omezení (Nedeltcheva et al. 2009b). V rámci komplexní sítě faktorů regulujících příjem potravy (Suzuki et al. 2012), zvýšenou

chuť k jídlu u osob vystavených nedostatku spánku (St-Onge et al. 2012; Spiegel et al. 2004b, 2004a; Schmid et al. 2008; Nedeltcheva et al. 2010; Guilleminault et al. 2003) nebo u pacientů s krátkou dobou trvání spánku (Chaput et al. 2007), byly zjištěny snížené hladiny leptinu (omezuje příjem potravy, je vylučován z tukové tkáně) a zvýšené hladiny ghrelinu (zvýšuje příjem potravy, je vylučován převážně z žaludku). Naproti tomu byly zveřejněny i rozdílné výsledky (van Leeuwen et al. 2010; Simpson et al. 2010; Schmid et al. 2009; Reynolds et al. 2012; Omisade et al. 2010; Nedeltcheva et al. 2009b, 2010; Bosy-Westphal et al. 2008), upozorňující na roli dalších faktorů, jako je např. snížená hladina anorexigeního peptidu YY (PYY) (Magee et al. 2009).

V souhrnu lze konstatovat, že vývoj obezity v důsledku neuroendokrinních změn vyvolaných nedostatečným spánkem představuje další nezávislý rizikový faktor pro rozvoj metabolických poruch.

### **Cirkadiánní vychýlení**

Netradiční rozložení pracovní doby (včetně práce na směny a práce v nočních hodinách), spolu s častým cestováním napříč časovými pásmy představují typické příklady narušení cirkadiánních rytmů. Na základě těchto okolností jsou vychýleny behaviorální zvyky jako fyzická aktivita, příjem potravy, spánek a probouzení s autonomním časováním centrálního pacemakeru, který se nachází v hypothalamu v suprachiasmatickém jádře (SCN).

Metabolicky aktivní tkáně získávají podněty (např. příjem potravy, tělesná aktivita) v nevhodnou dobu jejich vlastního pacemaker cyklu. Sladění centrálních a periferních pacemakerů je důležité pro přežití a globální potřeby organismu (Buijs et al. 2013), zatímco výsledky desynchronizace mohou skončit vážnými následky, včetně zvýšené kardiovaskulární morbidity a mortality (Ha et al. 2011; Karlsson et al. 2005b; Kawachi et al. 1995b; Knutsson et al. 1986; Tüchsen et al. 2006; Vyas et al. 2012; Wang et al. 2011) příp. vyšším rizikem rakoviny - přehled v Evans a Davidson (2013); Haus a Smolensky (2013).

Buňky periferních orgánů zapojených do metabolické kontroly, včetně jater, tukové tkáně a svalů představují funkční síť pacemakerových genů a vykazují cirkadiánní cykly. V důsledku toho, exprese stovek tkáňově specifických genů také podstupuje cirkadiánní cykly v periferních tkáních (Dallmann et al. 2012; Eckel-Mahan et al. 2012; Ptitsyn et al. 2006; Zvonic et al. 2006). Vzhledem k tomu, že pacemakery v periferních tkáních nedostávají žádné přímé informace o cyklování den / noc, vyvinuly se další mechanismy na zajištění harmonické synchronizace metabolických funkcí v periferních tkáních s SCN (získávání informací o intenzitě světla prostřednictvím přímých retinálních projekcí). Na úrovni

transkripce jsou metabolické funkce v periferních tkáních zprostředkovány hlavně glukokortikoidy. Plazmatické hladiny kortizolu (nebo kortikosteronu u myši) vykazují přísnou cirkadiánní variabilitu, přetrvávající i za podmínek experimentální nucené desynchronizace (Scheer et al. 2009). Syntéza glukokortikoidů a jejich uvolňování je řízena pomocí periferního oscilátoru (Son et al. 2008) a je ovlivněna SCN prostřednictvím přímé sympatické inervace nadledvin (Ishida et al. 2005; Otsuka et al. 2012; Wotus et al. 2013). Výsledné cirkadiánní oscilace v plazmatických hladinách glukokortikoidů vyvolávají oscilace genové exprese v cílových tkáních (např. játra) skrze vazby na oblast promotoru Per genu, což představuje klíčovou součást sítě periferních pacemakerů v játrech, tukové tkáni a v kosterním svalstvu (Gomez-Abellan et al. 2012; Oishi et al. 2005; Pezuk et al. 2012; So et al. 2009; Zambon et al. 2003; Almon et al. 2008). Zvláštností periferních oscilátorů je, že mohou být výrazně ovlivněny pomocí vnějších podnětů. Příkladem je příjem potravy, který byl identifikován jako silný „zeitgeber“ pro periferní pacemakery, i když byly geny odstraněny nebo došlo k poškození SCN (Sheward et al. 2007; Storch a Weitz 2009; Zhang et al. 2009). Zeitgeber můžeme označit jako podnět pro synchronizaci cirkadiánního rytmu v SCN. Primárním zeitgeberem je světlo. Podobně také fyzická aktivita a cvičení ovlivňují periferní oscilátory, a to zejména v kosterním svalstvu (Zambon et al. 2003)

Spolu s regulací transkripce genů, které se účastní aktivity v periferních pacemakerech, lze metabolismus v periferních tkáních synchronizovat s SCN v rámci některých endokrinních mechanismů. Například, metabolické reakce na kolísání plazmatických hladin melatoninu (hormonu, který je produkován epifýzou pod přímou kontrolou SCN) byly pozorovány v tukové tkáni (onso-Vale et al. 2008), svalech (Contreras-Alcantara et al. 2010; Ha et al. 2006; Sartori et al. 2009), játrech (Shieh et al. 2009; Faria et al. 2013) a ve slinivce břišní (Bahr et al. 2012). Studie ukázala, že melatonin je schopen zlepšit glukózovou homeostázu prostřednictvím různých mechanismů, které zahrnují větší vychytávání glukózy, zvýšenou sekreci inzulínu, zlepšení inzulínové senzitivity nebo sníženou jaterní glukoneogenezi v různých zvířecích modelech (Agil et al. 2012; Bertuglia a Reiter 2009; Contreras-Alcantara et al. 2010; Cuesta et al. 2013; de Oliveira et al. 2012; Faria et al. 2013; Kitagawa et al. 2012; Korkmaz et al. 2012; Nishida et al. 2002; Nogueira et al. 2011; Park et al. 2013; Sartori et al. 2009; Shieh et al. 2009; Zanuto et al. 2013). Melatonin také zvýšil hladinu glykogenu v hepatocytech (Shieh et al. 2009), omezil hromadění tuku v tukových buňkách (Wang et al. 2013b), a zaznamenán byl dokonce pokles hromadění tuku u lidí (Borba et al. 2011) a potkanů (She et al. 2009). Růstový hormon (Surya et al. 2006) a thyreotropní hormon (Patel et al. 1972) spolu s přímou sympatickou inervací periferních tkání

(Cailotto et al. 2009) také vykazují silný cirkadiánní rytmus a mohly by přispět k ovlivnění periferních pacemakerů a metabolických potřeb celého organismu.

### **Mechanismy cirkadiánního vychýlení**

Studie provedené na myších modelech se selektivní mutací v pacemaker genech prokázaly zásadní úlohu centrálního a periferního pacemakeru v regulaci hladiny glukózy, glukózové tolerance, inzulínové senzitivity, sekrece inzulínu a příjmu potravy (Doi et al. 2010; Kennaway et al. 2013; Lee et al. 2013; Marcheua et al. 2010; Rudic et al. 2004; Sadacca et al. 2011; Turek et al. 2005). Například, specifická ztráta BMAL genu v játrech indukuje hypoglykémii a změněné exprese genů podílejících se na metabolismu glukózy (Sadacca et al. 2011), přičemž delece BMAL genu specifického pro  $\beta$ -buňky pankreatu rezultuje v hyperglykémii a snížení hodnoty glukózy vyvolané sekrecí inzulínu (Marcheua et al. 2010). Tyto procesy jsou ovlivněny nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku (Lee et al. 2013). Další studie naznačují že, myši krmené v podmínkách vychýlení centrálního a periferního pacemakeru získaly větší přírůstek hmotnosti s rozvinutou inzulínovou rezistencí (Sherman et al. 2012). Identické regulace byly pozorovány u subjektů pracujících na směny, kde reakce glukózy v plazmě a inzulínu na testovací potravu byly významně vyšší, pokud bylo jídlo podáváno v průběhu noci (Lund et al. 2001). Souběžně byla pozorována inzulínová rezistence a hyperinzulinémie (Lund et al. 2001). Prodloužení přirozeného 24 hodinového denního cyklu na 28 hodin (nebo více) po několik po sobě jdoucích dnů poskytuje dobrý experimentální nástroj pro zjištění metabolického dopadu cirkadiánního vychýlení nezávisle na možném vlivu denních oscilací v metabolických a endokrinních dráhách. Nucená desynchronizace u lidských dobrovolníků měla za následek zvýšené hladiny glukózy a inzulínu spolu s poruchou glukózové tolerance a dysfunkce  $\beta$ -buněk pankreatu (Buxton et al. 2012; Scheer et al. 2009). Cirkadiánní vychýlení navíc zrychlilo vývoj diabetu u krys v důsledku apoptózy inzulín-secernujících beta-buněk (Gale et al. 2011). Nedávné studie identifikovaly zvýšené hladiny mastných kyselin, snížené hladiny leptinu a narušený metabolismus kortizolu jako jedny z možných endokrinních mechanismů, které přispívají k rozvoji inzulínové rezistence a dysfunkce  $\beta$ -buněk u subjektů vystavených cirkadiánnímu vychýlení. Zvýšená sekrece pro-zánětlivých cytokinů byla zjištěna po cirkadiánním vychýlení u myších modelů (Castanon-Cervantes et al. 2010; Lee et al. 2013), což naznačuje předpokládaný mechanismus pro celkovou pro-zánětlivou aktivaci, která je typická pro DM2T (Calle a Fernandez 2012).

## **Cirkadiánní vychýlení a jeho vliv na metabolismus**

Kompletní přenastavení centrálního pacemakeru nočním směnám je u lidí extrémně vzácné, zejména pokud se jednotlivé směny střídají (Folkard 2008; Dumont et al. 2012; Grundy et al. 2009; Roden et al. 1993; Smith a Eastman 2012). Neúplná adaptace na nepravidelný rytmus spánku vede k významnému nesouladu mezi biologickými pacemakery a životním prostředím. Práce na směny a s tím související cirkadiánní vychýlení může hluboce ovlivnit metabolické funkce a glukózovou homeostázu. Průřezové a prospektivní studie naznačují hlavně vyšší výskyt DM2T (Guo et al. 2013; Mikuni et al. 1983a; Monk a Buysse 2013), glukózovou intoleranci (Mikuni et al. 1983b), inzulinovou rezistenci (Karlsson 2001) a výskyt metabolického syndromu (Esquirol et al. 2009). Pracovníci na směny také trpí nadváhou (Niedhammer et al. 1996). Kauzální efekt u pracujících na směny s vývojem metabolických poruch, byl potvrzen v prospektivních studiích prováděných právě u těchto dobrovolníků. Tyto studie prokázaly vyšší riziko vzniku metabolického syndromu (De Bacquer et al. 2009; Kawada a Otsuka 2014; Suwazono et al. 2010) a DM2T (Eriksson et al. 2013; Karlsson et al. 2005a; Kawachi et al. 1995a; Morikawa et al. 2005; Polak et al. 2006), i když některá z těchto zjištění ztratila význam po úpravách na změny v tělesné hmotnosti. Zjištěny byly zvýšené hladiny HbA1c u diabetiků pracujících ve směnném provozu, kompenzace diabetu se zhoršila s přetrvávající prací na směny příp., pokud se zvýšil počet odpracovaných hodin za směnu (Kawachi et al. 1995a; Kawada a Otsuka 2014; Monk a Buysse 2013; Morikawa et al. 2005; Suwazono et al. 2010).

## **Zvýšené hladiny FFA a jejich vliv na metabolismus**

Zvýšené hladiny volných mastných kyselin mohou významně narušit homeostázu glukózy. FFA představují významný zdroj energie pro svaly, ale je také známo, že zprostředkovávají důležité regulační a endokrinní funkce. Zvýšené hladiny FFA jsou považovány za kauzální faktor vyvolávající metabolické poruchy u obézních jedinců a v konečném důsledku významně přispívají k rozvoji diabetu 2. typu. Opakovaně bylo prokázáno, že zvýšení plazmatických hladin FFA představuje nezávislý rizikový faktor progrese inzulinové rezistence a rozvoje DM2T (Reaven et al. 1988; Baldeweg et al. 2000; Jiao et al. 2008; Il'yasova et al. 2010). Obézní jedinci, stejně jako pacienti trpící DM2T, se často vyznačují zvýšenými hladinami FFA v plazmě (Reaven et al. 1988; Baldeweg et al. 2000). Zhoršená regulace lipolýzy tukové tkáně se zvýšeným spontánním uvolňováním FFA do oběhu je hlavním zdrojem plazmatických hladin FFA u obézních jedinců (Lafontan 2008; Langin 2006). Některé studie identifikovaly molekulární dráhy regulované FFA, v příčinné

souvislosti s patogenezí inzulínové rezistence a DM2T (Lewis et al. 2002; Charles et al. 1997; Hoeks et al. 2012). Nadměrné využití FFA (například při zvýšených plazmatických hladinách FFA), vede k hromadění meziproduktů metabolitů - acetyl-CoA a NADH ve svalových buňkách. Tyto metabolity allostericky inhibují aktivitu různých enzymů, které se účastní glykolýzy a Krebsova cyklu. V důsledku toho se zvyšují intracelulární hladiny citrátu, který inhibuje glukokinázu, klíčový enzym regulující absorpci glukózy ve svalech. Tato kaskáda dějů má za následek snížený příjem glukózy. Kromě toho, inzulínem stimulované vychytávání glukózy ve svalech se snižuje a odráží tak rozvoj inzulínové rezistence na buněčné úrovni (RANDLE 1998; Kelley a Mandarino 2000). Kromě substrátové úrovně byly identifikovány významné změny v signalizaci receptorů inzulínu ve svalech právě v důsledku zvýšených hladin FFA. Nadměrná expozice tkání k FFA vede k akumulaci některých molekul na bázi lipidů, které zprostředkovávají některé intracelulární regulační funkce. LCFA-CoA (Long chain fatty acid CoA ligase) je mezi nimi zvláště důležitá, protože tato molekula přímo reguluje aktivitu enzymů podílejících se na glykolýze a syntéze glykogenu (Wititsuwannakul a Kim 1977). LCFA-CoA může být snadno esterifikována na důležitý intracelulární sekundární posel - diacylglycerol (DAG). Zvýšené intracelulární hladiny DAG byly pozorovány u lidí s inzulínovou rezistencí, stejně jako ve zvířecích modelech obezity a inzulínové rezistence (Chibalin et al. 2008; Itani et al. 2002). Negativní vliv DAG na inzulínovou senzitivitu je zprostředkován aktivací C isoform specifické protein-kinázy (izoformy beta,  $\delta$  a  $\theta$ ), které fosforylují klíčový prvek v inzulínových receptorech, jež zprostředkovávají signální transdukce IRS-1 proteinu (Samuel et al. 2010; Danielsen et al. 1995). Fosforylace IRS-1 v poloze Ser-307 značně snižuje jeho schopnost zprostředkovat signalizaci od aktivovaného receptoru inzulínu do buňky, a tím přispívá k rozvoji inzulínové rezistence (Samuel et al. 2010; Boura-Halfon a Zick 2009).

Experimentální zvýšení plazmatických hladin FFA u zdravých dobrovolníků, stejně jako u pacientů s DM2T mělo za následek zvýšenou glukoneogenezi a v důsledku toho čistý jaterní výdej glukózy (Chen et al. 1999; Boden 2001). Glukoneogeneze je pevně regulována endokrinními účinky inzulínu. Podobně jako u výše popsaných drah je aktivace IRS-1 a IRS-2 proteinůčasným krokem v inzulínové signalizaci (Previs et al. 2000; Dong et al. 2008; Kubota et al. 2008). I když nejsou mechanismy, které vedou k jaterní inzulínové rezistenci ve srovnání s kosterním svalstvem prozatím tak důkladně prozkoumány, ukázalo se, že aktivace PKC s následnou fosforylací a inaktivací IRS proteinů je jedním z kritických funkcí vzniku FFA-indukované inzulínové rezistence v játrech (Samuel et al. 2010). Akumulace metabolických meziproduktů oxidace FFA, jako jsou acetyl-CoA a NADH, stimuluje

glukoneogenezi a s tím souvisí i vyšší produkce glukózy v játrech a rozvoj hyperglykémie (Diaz-Guerra et al. 1991). Delší vystavení beta-buněk pankreatu zvýšeným hladinám FFA poškozuje jejich schopnost vylučovat inzulin (Tuo et al. 2011; Giacca et al. 2011) a vyvolává jejich apoptózu (Nemcova-Furstova et al. 2011). Molekulární mechanismy zprostředkovávající účinek volných mastných kyselin na sekreci inzulinu zahrnují modifikaci aktivity GLUT-2 receptoru, indukci oxidačního stresu a zvýšenou intracelulární produkci ceramidu (Lewis et al. 2002) Kromě toho, *in vitro* pozorování prokazující škodlivé účinky volných mastných kyselin na sekreci inzulinu bylo potvrzeno i *in vivo*, kde zvýšené hladiny FFA způsobily dysfunkci  $\beta$ -buněk pankreatu a došlo k zhoršení glukózové homeostázy (Paolisso et al. 1995).

### **Syndrom OSA**

Spánková apnoe je definována jako výskyt zástav dechu ve spánku (apnoických, hypopnoických epizod), které trvají minimálně 10 sekund s opakováním vyšším než 5 epizod za hodinu spánku. Apnoe znamená přerušeni proudění vzduchu nosem nebo ústy. Hypopnoe je přechodné omezení objemu dechu minimálně o 50 %, s poklesem saturace hemoglobinu minimálně o 3 %.

Z hlediska etiologie můžeme apnoické zástavy rozdělit na obstrukční, centrální a smíšené. Při obstrukční spánkové apnoei přetrvává dýchací úsilí a jsou tedy přítomny dýchací pohyby hrudníku a břicha. Při centrální spánkové apnoei není dýchací úsilí přítomno. Spánková apnoe se nazývá smíšenou, jestliže začíná jako centrální (bez dýchacího úsilí), ale dýchací úsilí se během jejího trvání obnoví a končí tedy jako obstrukční. Centrální spánková apnoe se vyskytuje asi v 10 % spánkových apnoei a bývá součástí zejména srdečních, chronických plicních, nervosvalových a skeletárních onemocněních. Centrální spánková apnoe se také vyskytuje při periodickém dýchání ve velké nadmořské výšce. Nejčastější poruchou dýchání ve spánku z hlediska nemocnosti a úmrtnosti je syndrom obstrukční spánkové apnoe (OSA).

Syndrom obstrukční spánkové apnoe (OSA) je relativně často se vyskytující onemocnění, postihující přibližně 5-15 % dospělé populace (Punjabi 2008). Je charakterizován opakovaným uzavřením horních dýchacích cest v průběhu spánku s následným poklesem saturace hemoglobinu v cirkulující krvi i tkáních (intermitentní hypoxie) a fragmentací spánku díky částečnému nebo kompletnímu probuzení ukončující každou apnoickou epizodu.

OSA je široce uznávána jako nezávislý rizikový faktor pro různá kardiovaskulární onemocnění (Baguet et al. 2012; Caples et al. 2007; Lopez-Jimenez et al. 2008).

Stále více důkazů naznačuje, že OSA je také spojována s řadou metabolických změn, jako jsou dyslipidémie, inzulinová rezistence, glukózová intolerance a DM2T. Tyto spojitosti byly značně přezkoumány v posledních několika letech (Punjabi 2009; Pamidi a Tasali 2012; Levy et al. 2009; Drager et al. 2010). Některé průřezové studie ukázaly, že obstrukční spánková apnoe způsobuje sníženou glukózovou toleranci nebo sníženou inzulinovou senzitivitu, a to i po úpravě BMI u zkoumaných subjektů (Ip et al. 2002; Punjabi et al. 2004a). Celkově lze říci, že výskyt prediabetu spojeného s inzulinovou rezistencí a intolerancí glukózy, byl vyšší u pacientů s OSA než u kontrolních subjektů (Pamidi a Tasali 2012). Důležitým zjištěním také je, že závažnost noční hypoxie u neobézních OSA pacientů je spojena s rezistencí na inzulin (Borel et al. 2013), což naznačuje, že střídání hypoxie a reoxygenace související s OSA hraje významnou roli v této metabolické dysfunkci.

Ve velkých longitudinálních studiích, například Wisconsin Cohort Study nebo Busselton Health Study, byli autoři schopni prokázat, že OSA je spojena s vyšší prevalencí DM2T (Reichmuth et al. 2005).

### **Účinky intermitentní hypoxie na metabolismus**

Četné studie zkoumaly vztah mezi intermitentní hypoxií (IH) jako součástí OSA a inzulinovou rezistencí. Většina z nich prokázala, že IH mění homeostázu glukózy s více či méně silnými účinky. Glukózový toleranční test (GTT) ukázal poruchu glukózové tolerance v několika modelech myši spánkové apnoe po dlouhodobé expozici intermitentní hypoxii (Polotsky et al. 2003a; Drager et al. 2013a; Arnaud et al. 2011). Další studie ukázaly, že u potkanů vystavených IH po dobu 1, 3 nebo 7 týdnů postupně došlo ke snižování glukózou-stimulovaného uvolňování inzulinu se zhoršenou "clearance" glukózy (Fenik et al. 2012), a akutní expozice IH u zdravých lidských dobrovolníků měla za následek snížení inzulinové senzitivity (Louis a Punjabi 2009).

Zatímco chronická intermitentní hypoxie se zdá být celkově odpovědná za poruchy regulace sacharidů, mechanismy účastníci se těchto procesů zůstávají nejasné. Intermitentní hypoxie může ovlivnit účinnost inzulinu ovlivněním své cílové tkáně, a to v játrech, kosterním svalstvu, slinivce a v tukové tkáni. V následujících odstavcích budou diskutovány důsledky IH v těchto cílových tkáních, se zvláštním důrazem na molekulární mechanismy, zejména, zánětlivé procesy, oxidativní stres a aktivaci sympatického nervového systému.



## **Vliv intermitentní hypoxie na metabolické procesy v játrech**

IH-indukované poškození jater a metabolické poruchy přitahují velkou pozornost vzhledem k tomu, že játra hrají ústřední roli v regulaci metabolismu glukózy. Nealkoholická steatohepatitida, souhrnně označované onemocnění jater, při kterém dochází k nadměrnému hromadění tukových ložisek souvisí s inzulínovou rezistencí a je zahrnuto v klinických podmínkách metabolického syndromu, je také v poslední době spojováno s výskytem OSA (Sookoian a Pirola 2013). Studie naznačují, že indukovaná intermitentní hypoxie, která je průvodním jevem při OSA, je spojena s jaterní fibrózou a zánětlivými pochody u obézních a neobézních pacientů (Polotsky et al. 2009). Minville et al. (2014) dále poukazuje, že závažná noční hypoxie je nezávisle spojena s jaterní steatózou, a že již existující obezita zhoršuje tento účinek. Tyto výsledky byly potvrzeny i u dětských pacientů trpících OSA (Sundaram et al. 2014).

## **Strukturální poškození jater**

Studie prokázaly, že chronická IH může způsobit poškození jater a zvýšit hladinu a aktivitu klíčových jaterních enzymů AST, ALT a ALP v séru (Savransky et al. 2007c, 2007a; Rosa et al. 2011; Drager et al. 2011). Několik týdnů expozice IH mělo za následek vznik jaterní steatózy, nekrózu hepatocytů a zánět s akumulací neutrofilů (Savransky et al. 2007c; Rosa et al. 2011; Chen et al. 2013). Delší (6 měsíců) expozice měly za následek lobulární záněty a usazeniny kolagenu v důsledku up-regulace kolagen-dependentní genové exprese (Savransky et al. 2007c). Po expozici chronické IH se zvýšil obsah triglyceridů u obézních i neobézních myši (Savransky et al. 2007c; Drager et al. 2011). Expozice IH vedla ke zvýšení klíčových enzymů biosyntézy lipidů v játrech (SREBP-1, SCD-1, HDL) (Savransky et al. 2007b; Li et al. 2005). Tyto efekty byly částečně eliminovány u myši s deficiencí transkripčního faktoru Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1), což naznačuje, že HIF-1 může být zodpovědný za up-regulaci SREBP-1 a SCD-1, a proto ho můžeme považovat za důležitý faktor účastnící se vazby mezi IH a metabolickými změnami (Li et al. 2006). Játra u myši vystavených IH měla vyšší obsah glykogenu, než byl obsah u kontrolních zvířat, což svědčí o stimulaci produkce glukózy (Savransky et al. 2007c, 2007a). Tento fakt je dále podporován tím, že IH expozice zvýšila genové exprese a proteinové hladiny klíčových enzymů účastnících se glukoneogeneze (Polak et al. 2013).

## **Oxidační stres a zánět**

Bylo prokázáno, že po expozici chronické IH došlo ke zvýšení hladin metabolitů oxidu dusného spolu s poškozením DNA a apoptózou hepatocytů (da Rosa et al. 2012; Rosa et al. 2011). Aktivita endogenních antioxidačních jaterních enzymů, jako jsou SOD, GPX a CAT, byla snížena po 5 týdnech expozice IH u myší. Celková hladina jaterního glutathionu, svědčící o snížení antioxidační kapacity, byla po expozici IH také snížena (Rosa et al. 2011). IH dále vedla ke zvýšení peroxidace lipidů a došlo k up-regulaci p47phox (cytosolická podjednotka NADPH oxidázy). Nepříznivý efekt peroxidace lipidů byl částečně eliminován po podání apocyninu (inhibitor NADPH oxidázy) (Jun et al. 2008). Pro-zánětlivé cytokiny, TNF $\alpha$  a exprese makrofágového zánětlivého proteinu 2 (MIP2) nebyla ovlivněna u neobézních myší vystavených IH, naproti tomu byla zvýšena u obézních myší, které byly vystaveny IH po dobu 4 týdnů (Drager et al. 2011). Delší expozice IH zvyšují hladiny pro-zánětlivých cytokinů v játrech (IL-1, IL-6, MIP2), spolu s aktivací prozánětlivého transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (Savransky et al. 2007a). V jiné studii bylo prokázáno, že transkripční faktory HIF-1 $\alpha$  a NF- $\kappa$ B byly po 5 týdnech expozice IH v játrech výrazně up-regulovány (da Rosa et al. 2012).

Celkově lze říci, že experimentální důkazy naznačují, že expozice IH způsobuje poškození jater a zvyšuje produkci glukózy v hepatocytech skrze několik mechanismů. Je třeba poznamenat, že strukturní a funkční léze pozorované v játrech IH-exponovaných jedinců se významně podobají těm u nealkoholické steato-hepatitidy (Nedeltcheva et al. 2010; Minville et al. 2014).

## **Dopad intermitentní hypoxie na metabolismus kosterního svalu**

Expozice intermitentní hypoxii je doprovázena výkyvy hladiny O<sub>2</sub> a parciálního tlaku přímo v kosterním svalu (Holm et al. 1973; Reinke et al. 2011). Jako hlavní orgán citlivý na inzulín je kosterní sval zodpovědný za 80 až 90 % inzulínem indukované vychytávání glukózy. Nicméně, pravděpodobně z důvodu nedostatku shody o časovém průběhu vývoje inzulínové rezistence, bylo jen velmi málo studií zaměřeno na metabolismus kosterního svalu v reakci na expozici IH.

O účincích trvalé hypoxie, vyvolané fyzickým tréninkem ve vysoké nadmořské výšce, střídajících se s normoxickými obdobími však přece jen existují experimentální důkazy. V roce 1973 testoval Holm et al. (1973) vliv různých hladin hypoxie, jednalo se o expozici 3 hodiny denně po dobu 1 až 4 týdnů. Výsledky experimentů naznačují, že metabolismus

glukózy byl nepříznivě ovlivněn v závislosti na délce expozice. V dalších letech bylo navrženo, že IH-indukované změny metabolismu kosterního svalu jsou charakterizovány poklesem hladin kreatin fosfátu, citrátu, alfa-ketoglutarátu, glutamátu a změnami v anaerobní glykolýze (Pastoris et al. 1985). Liyori et al. (2007) pozorovali v rámci myšního modelu chronické IH snížení metabolismu glukózy v soleu. Velmi málo je známo také o účinku chronické IH na signální dráhy inzulínu. Carreras et al. (2012) pozorovali cytosolicko-membránové translokace GLUT-4 receptorů, které by mohly poskytnout vysvětlení pro rozvoj inzulínové rezistence u myší vystavených chronické IH.

### **Vliv intermitentní hypoxie na endokrinní funkci slinivky břišní**

Při pohledu na velmi důležitou úlohu slinivky břišní v metabolismu celého těla, existuje velký zájem o vyhodnocení případného účinku IH na metabolismus glukózy. Ačkoli bylo navrženo mnoho hypotéz, jen málo z nich bylo skutečně potvrzeno (Pallayova et al. 2010a). U lidí trpících nadměrnou obezitou, je OSA spojena se zvýšením bazální funkce  $\beta$ -buněk pankreatu, ikdyž metabolismus glukózy zůstal nezměněn (Pallayova et al. 2010b). Na druhé straně, pankreatická sekrece inzulínu nebyla ovlivněna u zdravých dobrovolníků exponovaných IH, nicméně v těchto experimentech došlo ke snížení inzulínové senzitivity a účinnost glukózy byla také snížena (Louis a Punjabi 2009). V experimentech v rámci myších modelů chronické IH docházelo k apoptóze  $\beta$ -buněk pankreatu, stejně jako byla pozorována i jejich nadměrná proliferace (Yokoe et al. 2008; Xu et al. 2009). To je v souladu se studií Yokoe et al. (2008), kde při sledování docházelo ke zvýšené replikaci beta-buněk pankreatu při vystavení IH. I když Wang et al. (2013a), nepozoroval změny v morfologii beta-buněk, obsah inzulínu v langerhansových ostrůvcích byl významně snížený u myší, které byly vystaveny chronické IH. Tento efekt byl způsoben v důsledku down-regulace enzymu prohormon konvertázy 1, který převádí proinzulín na inzulín. *In vitro* buněčné studie rovněž prokazují, že expozice IH snížila glukózou-indukovanou sekreci inzulínu a to díky down-regulaci CD38 v genové transkripci, která se podílí na mobilizaci  $Ca^{2+}$  a tím na sekreci inzulínu (Ota et al. 2012).

Je dobře známo, že IH přispívá ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a pankreatické buňky jsou velmi citlivé na poškození formou oxidativního stresu. *In vitro*, expozice IH vede k produkci ROS v pankreatických ostrůvcích. V rámci experimentů kde byly myší izolované pankreatické ostrůvky vystaveny IH a ošetřeny anti-oxidantem mito-TEMPOL bylo prokázáno, že je tato změna právě závislá na ROS (Wang et al. 2013a). Stejně tak, pokud byly myší nadměrně exprimující antioxidační protein (superoxiddismutázy) specificky v pankreatických beta-buňkách byly vystaveny IH, byla pozorována snížená

apoptóza  $\beta$ -buněk pankreatu. To opět naznačuje, že se oxidativní stres významně podílí na IH-indukovaném poškození slinivky břišní (Xu et al. 2009).

### **Vliv intermitentní hypoxie na metabolické procesy tukové tkáně**

Tuková tkáň je do značné míry uznávána jako důležitý faktor v rozvoji inzulínové rezistence. Volné mastné kyseliny (FFA) a zvýšená lipolýza tukové tkáně jsou schopny vyvolat inzulínovou rezistenci prostřednictvím jejich účinků na svalovinu, játra a tukovou tkáň (Delarue a Magnan 2007). Intermitentní hypoxie dále down-reguluje adiponektin u 3T3-L1 adipocytů, který je silný insulin-senzibilizační hormon (Magalang et al. 2009), a zvyšuje tvorbu rezistinu v tukové tkáni, která může přispět k rozvoji inzulínové rezistence přes prozánětlivé procesy zahrnující produkci TNF $\alpha$  a IL-6 (Borst et al. 2005).

Kromě škodlivé role tukové tkáně v rozvoji inzulínové rezistence, naznačují některé studie na zvířecích modelech, že IH může způsobit rozvoj dyslipidémie prostřednictvím několika mechanismů:

1) Up-regulace biosyntézy lipidů v játrech – viz kapitola vliv IH na játra;

2) Zvýšená lipolýza - Uvolňování FFA doprovázené zvýšenými hladinami celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triglyceridů (Jun et al. 2010). Studie u pacientů se srdečním selháním ukázaly, že pacienti s těžkou OSA měli více zvýšené hladiny FFA než pacienti bez OSA (Jun et al. 2011), což podporuje hypotézu, že hypoxie by mohla být přímo zodpovědná za uvolňování FFA do běhu. Kromě toho, Poulain et al. (2014), ukázal, že IH vyvolává morfologickou a funkční remodelaci epididymálního tuku u myši. Avšak molekulární mechanismy, z nichž může hrát nadměrná lipolýza významnou roli musí být ještě dále prozkoumány.

3) Snížení vychytávání (clearance) lipoproteinů v důsledku inhibice lipoproteinové lipázy (LPL) (Yao et al. 2013; Poulain et al. 2014; Drager et al. 2013b). Experimentální důkazy u myši s částečně deficitními faktory HIF-1 a Angiopietin-like 4 (Angptl4) naznačují, že snížení exprese LPL je zprostředkováno pomocí HIF-1 a Angptl4 (Drager et al. 2013a; Poulain et al. 2014).

Někteří autoři se snažili zjistit amplitudy parciálního tlaku kyslíku v různých tkáních u IH-exponovaných myši. Tyto experimenty ukázaly, že játra vykazují významné výkyvy v parciálním tlaku kyslíku, zatímco v tukové tkáni byly tyto úrovně téměř konstantní (Reinke et al. 2011). To naznačuje, že adipocyty by měly být v experimentálních modelech vystaveny spíše trvalejšímu hypoxickému stavu spíše než intermitentní hypoxii, tak aby se lépe napodoboval dopad IH *in vivo* na tukovou tkáň. V rámci dalších studií bylo potvrzeno, že

trvalá hypoxie významně mění metabolismus glukózy a lipidů sníženým vychytáváním volných mastných kyselin a vychytáváním inzulinem-indukované glukózy a zvýšením lipolýzy v 3T3-L1 pre-adipocytech (Yin et al. 2009; Regazzetti et al. 2009). Hypoxie také zvyšuje uvolňování prozánětlivých cytokinů, leptinu (Hosogai et al. 2007), TNF $\alpha$  a IL-6 (Wang et al. 2007a) a snižuje sekreci adiponektinu (Hosogai et al. 2007; Fiori et al. 2013; Chen et al. 2006). To v souladu s experimentálními daty naznačuje, že IH indukuje vznik pro-zánětlivých profilů v tukové tkáni (Poulain et al. 2014).

### **Vliv intermitentní hypoxie na aktivaci sympatického nervového systému**

Aktivita sympatického nervového systému (SNS) je u zdravých dospělých nižší během spánku než v průběhu dne. Pacienti trpící OSA vykazují vysokou míru aktivity sympatického nervového systému jak během dne, tak i během spánku, a tento stav je dále doprovázen vysokou hladinou cirkulujících katecholaminů (Somers et al. 1993; Carlson et al. 1993). Tento fenotyp byl potvrzen jak na lidských, tak i zvířecích modelech IH. Bylo prokázáno, že expozice IH zvyšuje aktivitu sympatického nervového systému u zdravých lidí (Prabhakar a Kumar 2010; Tamisier et al. 2009) a u hlodavců (Xing et al. 2014). Oxidační stres, zvýšená exprese HIF-1 $\alpha$ , snížená exprese HIF-2 a endotelin-1 byly navrženy jako klíčové mechanismy hrající roli v IH-indukované aktivaci SNS (Prabhakar et al. 2012).

Zvýšený sympatický tonus má velký vliv na metabolismus lipidů a glukózy, a to prostřednictvím cirkulujících faktorů, jakož i inervace jater, slinivky, kosterního svalstva a bílé tukové tkáně (Youngstrom a Bartness 1995; Shimazu 1996; Ahren 2000). Nadledviny, které uvolňují adrenalin při aktivaci sympatiku, spouští produkci glukózy a snižují sekreci inzulínu, což má za následek vznik inzulínové rezistence (Deibert a DeFronzo 1980). Adrenalin, a v menší míře noradrenalin, působící přes několik  $\beta$ -adrenergických subtypů (Bartness et al. 2010; Lafontan a Berlan 1995) byli uznáni jako rozhodující mediátory lipolýzy tukové tkáně (Prigge a Grande 1971; Goodridge a Ball 1965). Z těchto důvodů je možné se domnívat, že IH indukovaná lipolýza a inzulínová rezistence mohou být zprostředkovány aktivací sympatického nervového systému. Sympatická inervace může být dále zahrnuta do procesu jaterního uvolňování glukózy a vzniku inzulínové rezistence (Yi et al. 2010). Vzhledem k prozatím omezeným znalostem tohoto problému jsou nutné další studie potřebné k objasnění aktivace SNS v regulaci IH-indukovaných metabolických poruchách.

## **Experimentální modely intermitentní hypoxie**

Intermitentní hypoxie je charakteristickým znakem OSA a je spojena s metabolickou dysfunkcí a inzulinovou rezistencí (Polak et al. 2012; Polotsky et al. 2003b). Dopady intermitentní hypoxie na cílové tkáně (játra, slinivka břišní, svaly, tuk) byly do značné míry studovány jak *in vitro*, tak *in vivo*. Pro studium účinků intermitentní hypoxie *in vitro* je nutný speciální systém. Tento systém umožňuje rychlé cykly kyslíku ve vzduchu, nicméně bylo prokázáno, že ekvilibrace tlaku kyslíku v kultivačním médiu je příliš dlouhá pouhou jednoduchou difúzí, a jsou proto nezbytné některé technické úpravy, umožňující rychlou změnu rozpuštěného kyslíku v kultivačním médiu. Tyto úpravy musí být doprovázené přesným řízením teploty a tlaku v hypoxické komoře.

Ve většině studií *in vivo*, se expozice intermitentní hypoxii (IH) děje pomocí speciálně navržených zařízení umožňujících automatické a rychlé cyklování hladiny kyslíku ve vzduchu. Různé modely expozice IH byly navrženy pro hypoxickou hladinu cyklující v rozmezí od 5 do 10 % O<sub>2</sub> s frekvencí od 9 do 60 epizod za hodinu. Byla provedena i expozice IH na lidských dobrovolnících k napodobení desaturačních-reoxygenačních cyklů kyslíku běžně se nacházejících u pacientů trpících OSA (Louis a Punjabi 2009). V rámci těchto studií je důležité vzít v úvahu, že doba trvání expozice se výrazně liší u jednotlivých modelů. Expozice lidských dobrovolníků se pohybovala v rozmezí od několika hodin až po dobu 14 nocí, studie na zvířatech v rozmezí od 1 noci (akutní hypoxie) až po několik týdnů (chronická hypoxie). Tyto varianty by proto měly být vzaty v úvahu při interpretaci výsledků z různých studií.

## **3. Metody**

### **Fyzikální limitace expozice adherentních buněk hypoxii**

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 CO<sub>2</sub> inkubátoru, který zajišťuje stálé životní podmínky: teplotu (37 °C), vlhkost (100%) a koncentraci CO<sub>2</sub> uvnitř inkubátoru (5%). Tento způsob pěstování buněk je však zatížen základní fyzikální limitací.

Na základě některých testování navzájem nezávislými autory i v naší laboratoři bylo zjištěno, že koncentrace  $O_2$  v pericelulárním prostoru, tedy ve vodném kultivačním médiu bezprostředně obklopujícím kultivované buňky, se dramaticky liší od koncentrace  $O_2$  uvnitř inkubátoru, kde koncentrace  $O_2$  činí ~20 %. Klíčovými faktory determinující rychlost transportu  $O_2$  z plynné fáze skrze kultivační médium až do pericelulárního prostoru jsou: difuzní 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  $O_2$  v médiu ukázaly, že ekvibrace hladiny  $O_2$  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  $O_2$  (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  $O_2$ . Bylo zjištěno, že spotřeba  $O_2$  metabolicky aktivními buňkami často přesahuje limit fyzikální difuze  $O_2$  skrze vrstvu kultivačního média. To má za následek, že ačkoli jsou kultivační destičky umístěny v atmosféře inkubátoru se stálou 20% hladinou  $O_2$ , samotné buňky jsou vystaveny různým hladinám hypoxie až kompletní anoxii (Metzen et al. 1995; Allen et al. 2001).

Faktor pericelulární koncentrace  $O_2$  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  $O_2$ ) 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). Ačkoli 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 hypoxii**

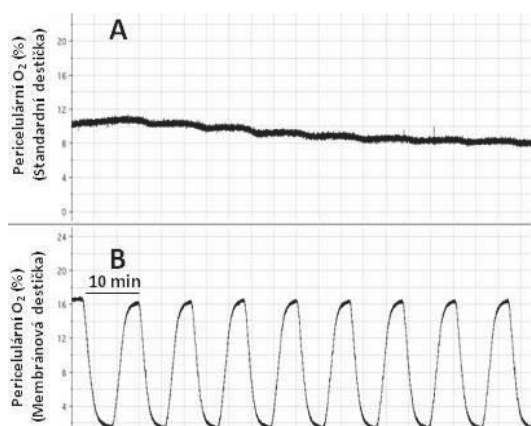
*In vitro* výzkum účinků intermitentní hypoxie na buněčné úrovni vyžaduje spolehlivou a reprodukovatelnou expozici kultivovaných buněk častým a rychlým změnám pericelulární koncentrace O<sub>2</sub>, tak aby bylo možno přesně napodobit situaci *in vivo*. Bohužel, jak bylo popsáno výše, fyzikální zákony difúze plynu v kultivačním médiu značně limitují rychlou změnu pericelulární koncentrace O<sub>2</sub>.

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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> na buněčné úrovni, a to v horizontu 1-2 minut, čímž je umožněna expozice buněk tzv. „intermitentní hypoxii“. 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 O<sub>2</sub> permeabilita > 6300 cm<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup> x d x bar), CO<sub>2</sub> permeabilita > 7000 cm<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup> x d x bar). Tato membrána tvoří dno kultivační jamky - adherující buňky tedy rostou přisedlé na tuto membránu (kontaktní povrch



jamky). Difuze plynů (zejména  $O_2$  a  $CO_2$ ) tak probíhá pouze skrze tuto propustnou membránu namísto řádově pomalejší difúze skrze vrstvu kultivačního média. Tímto mechanismem je jednak zaručena konstantní pericelulární koncentrace  $O_2$ , která odpovídá koncentraci  $O_2$  v atmosféře obklopující spodní stranu kultivační membrány (rozdíl  $< 1\%$   $O_2$ ). Touto klíčovou změnou v paradigmatu kultivace buněk *in vitro* je umožněna druhá unikátní vlastnost - možnost rychlé změny v pericelulární koncentraci  $O_2$  v průběhu 1-2 minut (v závislosti na amplitudě požadované změny v koncentracích  $O_2$ : při změně z  $16\%$   $O_2$  na  $1\%$   $O_2$  dojde k plné změně za 120 sekund, viz. Obr. 3).

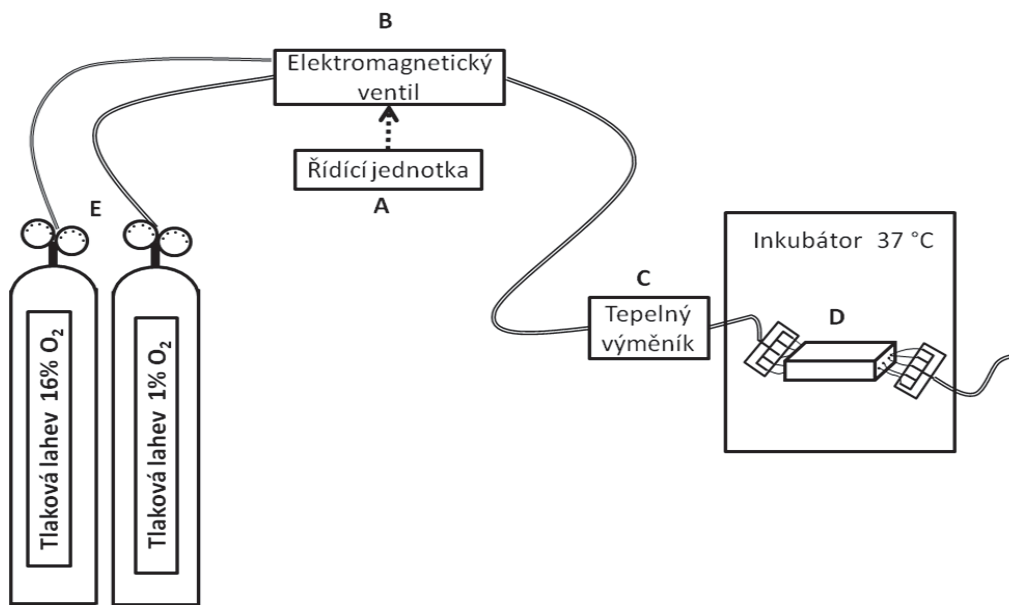


**Obrázek 3:** Změny v pericelulární koncentraci kyslíku v průběhu expozice intermitentní hypoxii při využití standardní kultivační destičky (A) v porovnání s destičkou, kde je dno konstruováno z plyno-propustného materiálu (B). Doba trvání jednoho cyklu = 10 minut

Technické řešení sestává z těchto komponent (Obr. 4)

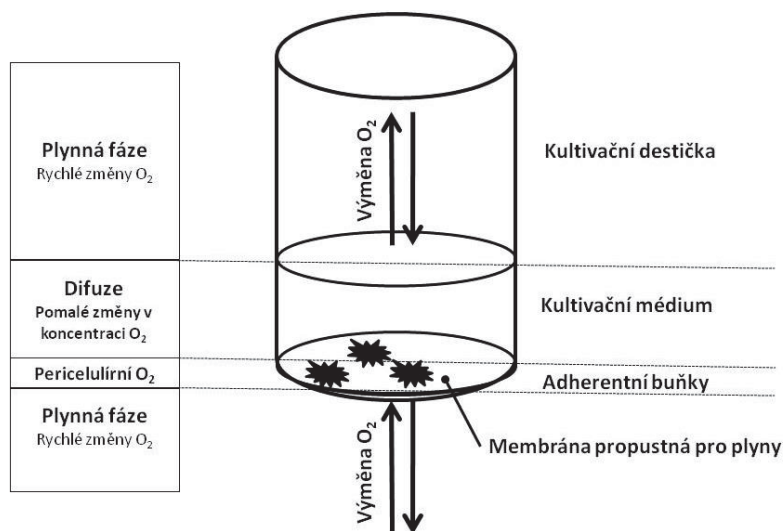
Řídicí jednotka obsahující programovatelný mikroprocesor řídící časování a dávkování směsi plynů do držáku destiček (A), elektromagnetické ventily (B), spojovací hadička určená k předehřátí vzduchu - tepelný výměník (C), držák s kultivační destičkou (D), tlakové lahve (E). Variabilní zapojení jednotlivých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



## 4. 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 diabetes 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<sub>2</sub> (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<sub>2</sub>) a těžké (1% O<sub>2</sub>) 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 myší intermitentní hypoxii a zda-li lze vzniklý diabetický fenotyp ovlivnit farmakologickou inhibicí lipolýzy.

## **5. 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).

### **Materiál a metody**

3T3-L1 preadipocyty (Zen-Bio Inc., NC, USA), byly pěstovány ve standardních polystyrenových destičkách (Corning Life Sciences) a ve speciálních destičkách s polopropustnou fluorokarbonovou membránou (Sarstedt AG&Co). Buňky byly kultivovány dle protokolu dodavatele a po dobu proliferace a diferenciacie umístěny ve standardním CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly nejprve expandovány v buněčné pasáži č. 11 po dobu 4-5 dnů v T75 kultivačních lahvích. Po expanzi byly buňky přesazeny do vlastních kultivačních destiček v denzitě 5000 živých buněk/cm<sup>2</sup>. Po dosažení konfluencce byly kultury dále diferencovány po dobu 14 dnů. Po 14ti dnech diferenciacie byly v intracelulárním prostoru jasně viditelné adipocytární inkluze. V této fázi byly vytvořeny buněčné lyzáty. Některé nezávislé sety buněk byly fixovány po dobu 30 minut ve 2% formaldehydu a postupně barveny pomocí BODIPY 493/501 (Thermo scientific) a Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) po dobu 30 minut. Tyto sety byly dále vizualizovány pomocí konfokálního objektivu (Leica TCS SP5, Leica Microsystems GmbH).

### *Bazální lipolýza*

Před vlastním lipolytickým experimentem byly diferencované buňky po dobu 24h hladověny v bezsérovém bazálním médiu (Zen-Bio Inc.). Dále byly buňky inkubovány v Krebs Ringer Bikarbonátovém pufru (KRBHA) obsahujícím 10 mmol/l HEPES, 2 % FFA free bovinního sérového albuminu a 6 mmol/l glukózy po dobu 4 hodin pro stanovení spontánní (bazální) lipolytické aktivity. Glycerol, který byl uvolněn do pufru byl stanoven kolorimetricky pomocí glycerol reagentu (Sigma-Aldrich). Obsah glycerolu byl dále normalizován na celkový obsah lipidů zjištěný pomocí kvantitativní metody Oil Red O (Sigma-Aldrich) (Ramirez-Zacarias et al. 1992; Nunnari et al. 1989).

### *Stanovení kontaktního úhlu vody*

Kontaktní úhel vody polystyrenové a fluorokarbonové membrány byl stanoven pomocí goniometrické techniky. Kapky Milli-Q vody byly pipetovány na povrch jednotlivých kultivačních destiček. Kapky byly poté vizualizovány za pomoci kamery, která byla v horizontální rovině s povrchem destičky. Kontaktní úhel byl poté softwarově stanoven.

### *Buněčné lyzáty*

Buňky byly lyzovány pomocí 2-D extrakčního pufru (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) po dobu 20ti minut na ledu. Lyzáty byly uloženy do teutého dusíku pro další analýzy.

### *Příprava vzorků pro 2-D elektroforézu*

Všechny vzorky byly purifikovány pomocí 2-D Cleanup Kitu (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) podle protokolu výrobce. Vzhledem k velkému množství lipidů v každém vzorku byly vzorky purifikovány dvakrát. Koncentrace proteinů byly stanoveny pomocí 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

### *2-D elektroforéza: isoelektrická fokusace*

Pro izoelektrickou fokusaci vzorků byla použita jednotka IPGphor (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Vzorky byly loadovány na 7cm Stripy (Immobiline Dry Strips). Stripy byly poté rehydratovány po dobu 24 hodin se 125  $\mu$ l zředěného vzorku, který obsahoval 125  $\mu$ g proteinu, 2,5  $\mu$ l 0.1% bromofenolové modři, 2,5  $\mu$ l IPG pufru (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) a 2.5  $\mu$ l 1M dithiothreitolu (DTT) v extrakčním pufru (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Po rehydrataci byly vzorky fokusovány při 20° C při různém napětí.

### *2-D elektroforéza: ekvibrace*

Po izoelektrické fokusaci byly stripy ekvilibrovány po dobu 20 minut v pufru obsahujícím 6M ureu, 30% glycerol, 4% SDS, 50mM Tris a 2% DTT. Následovala další fokusace s podobným pufrům, kde byl namísto DTT použit iodoacetamide. Stripy byly poté položeny na 0,5% agarózový gel, který obsahoval bromofenolovou modř.

### *2-D elektroforéza: SDS-PAGE*

Obě fáze vertikální gelové elektroforézy proběhly za pomoci Mini-PROTEAN Tetra cell systému (Bio-Rad). Separace probíhala po dobu 3 hodin při konstantním napětí 50V. Gely byly poté promývány po dobu 3x5 minut v destilované vodě a přes noc barveny v 50ml coomassie modři.

### *Analýza gelů*

Po nabarvení byly gely skenovány pomocí kalibrovaného skeneru UMAX PowerLook 1120. Gely byly poté softwarově analyzovány pomocí Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Poté byly analyzovány rozdíly v odpovídajících spotech v každém setu gelů. U spotů s evidentní diferenciací byla provedena analýza pomocí hmotnostní spektrometrie.

### *Enzymatická digesce*

Spoty nabarvené pomocí coomassie modři byly vystřiženy z gelu a odbarveny pomocí 50mM 4-ethylmorpholine acetate v 50% acetonitrilu. Kousky gelu byly poté promyty ve vodě a dehydrovány pomocí MeCN a poté rekonstituovány ve vodě. Po odstranění supernatantu byly kousky gelu částečně vysušeny pomocí SpeedVac koncentrátoru a poté inkubovány v pufru s obsahem 25mM 4-ethylmorpholine acetate, 5% MeCN a 100 ng trypsinu. Peptidy byly poté extrahovány za pomoci 40% MeCN/0.1% TFA.

### *MALDI hmotnostní spektrometrie a identifikace proteinů*

Vodný roztok 50% MeCN / 0,1% TFA byl použit jako MALDI matrix. 1  $\mu$ l peptidové směsi byl nanesen na MALDI desku a nechal se sušit na vzduchu při pokojové teplotě překrytý 0,4  $\mu$ l MALDI matrix. Poté byla měřena hmotnostní spektra za použití Ultraflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics) s hmotnostním rozsahem 700-4000 Da. Přístroj byl kalibrován za použití monoizotopických iontů  $[M + H]^+$  trypsin auto-proteolytických fragmentů (842.5 a 2211.1 DA). Seznam peaků, vytvořený pomocí flex Analysis software 3.3, byl vyhledáván pomocí MASCOT in-house vyhledávače s databází

podmnožiny myších proteinů SwissProt 2014\_11. Proteiny s MOWSE skóre větším než 56 (vypočteno pro použité nastavení) byly považovány za identifikované. V případě, že výsledek byl nižší, nebo jen o málo vyšší, než je prahová hodnota, totožnost proteinu byla potvrzena pomocí MS / MS analýzy.

### *Statistická analýza*

Statistická signifikance změněné exprese individuálních spotů byla stanovena pomocí Studentova t-testu. Pathway analýza identifikovaných proteinů byla provedena pomocí softwaru Ingenuity Pathway Analysis. Statistická signifikance byla stanovena pro  $p < 0.05$ .

## **Výsledky**

### *2-D elektroforéza a MALDI spektrometrie*

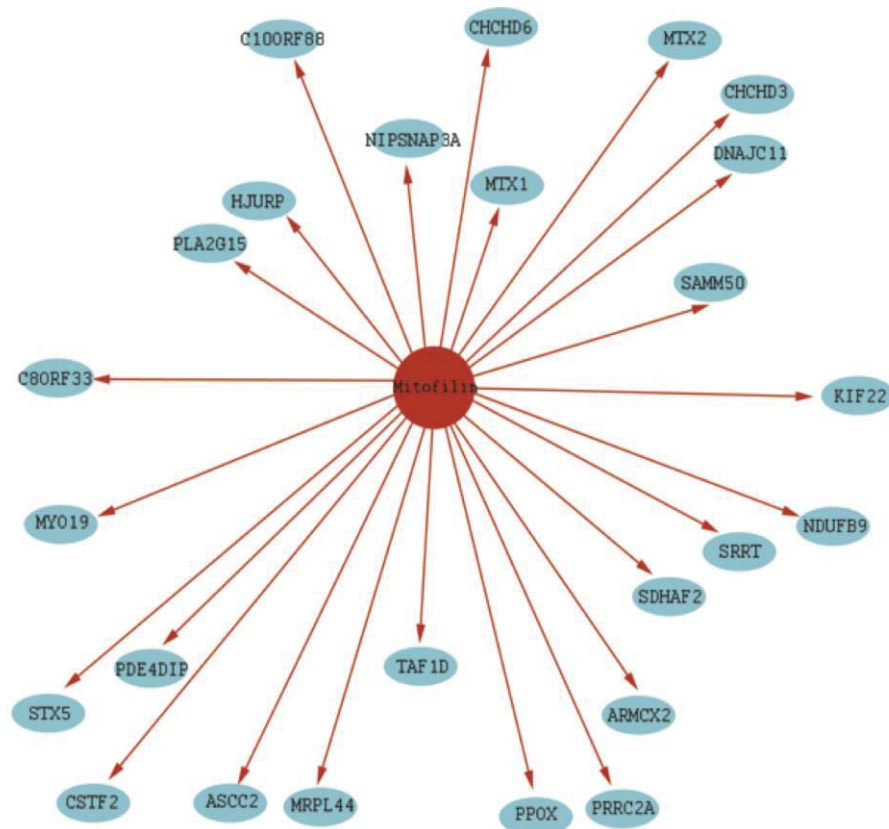
Výsledky profilů exprese proteinů s izoelektrickými body v rámci rozmezí pH 4,0 až 7,0 a s molekulovou hmotností mezi 20 a 150 kDa byly vysoce reprodukovatelné jak pro adipocyty kultivované na polystyrenových destičkách, tak i na destičkách s povrchem z fluorokarbonu. V rámci experimentálních setů byla 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,

kteře jsou významně asociovány s oxidačním stresem a metabolickými drahami. 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.

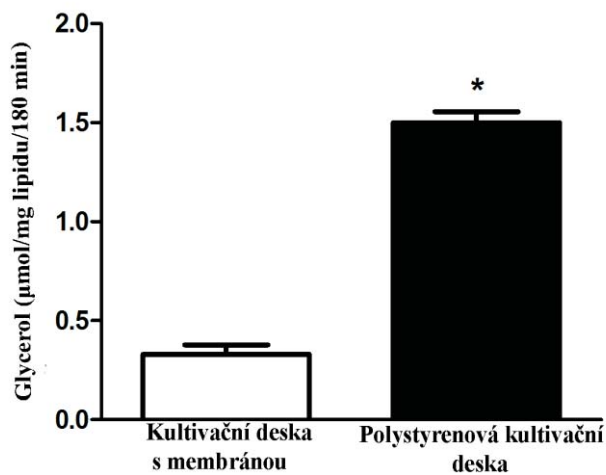


Fluorokarbonové destičky vykazovaly vyšší materiálovou hydrofobnost než standardní polystyrénové desky (kontaktní úhel vody  $66,9 \pm 1,2^\circ$  oproti  $48,1 \pm 1,0^\circ$  C). Preadipocyty diferencované na polystyrénových destičkách vykazovaly 3,6krát vyšší bazální (nestimulovanou) lipolýzu ve srovnání s buňkami pěstovanými na fluorokarbonové



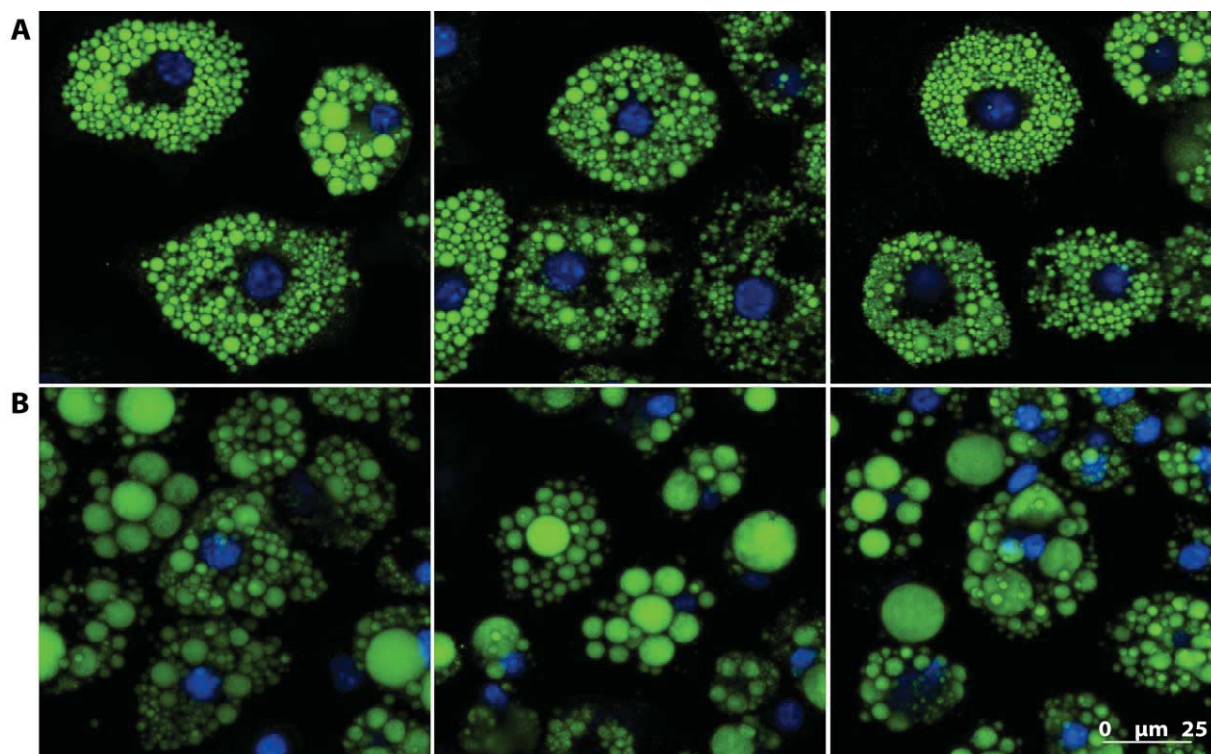
membráně ( $0,33 \pm 0,05$  vs.  $1,50 \pm 0,06$  pmol glycerol / mg lipidu / 180 min,  $p < 0,05$ ; Obr. 7).  
Tvar buněk a mikroskopická morfologie lipidových inkluzí jsou znázorněny na Obr. 8.

**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 polystyrenové 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

## Diskuze

Tato studie odhalila významné účinky materiálu kultivačních destiček na proteomický profil 3T3-L1 diferencovaných preadipocytů. Celkově bylo vlivem povrchu kultivačních destiček rozdílně exprimováno 43 % vizualizovaných intracelulárních proteinů. Analýza ukázala, že mezi nejvíce ovlivněné dráhy, patřily proteiny, které se podílí na mitochondriální morfologii a cytoskeletární organizaci, což může vyvolat mnoho otázek a důsledků pro navrhování a interpretaci *in vitro* experimentů. *In vitro* technika v pěstování buněčných kultur byla vyvinuta na počátku 20. století, a později bylo potvrzeno, že různé povrchy mohou hrát důležitou roli v buněčné proliferaci, tvaru buňky a organizaci cytoskeletu (Webb et al. 1998). Například, hydrofilní povrchy mají lepší adhezi buněk ve srovnání s hydrofobními povrchy (Ruardy et al. 1995; Seo et al. 2004), a zvýšené množství hydroxylových skupin na povrchu polystyrenového povrchu může rezultovat ve zvýšený růst buněk a lepší adhezi (Amstein a Hartman 1975; Curtis et al. 1983).

*In vitro* experimenty jsou široce používané ke zkoumání strukturálních, funkčních a metabolických odpovědí kultivovaných buněk, ale dopad kultivačního povrchu na tyto

proměnné, je prozatím nejasný. Naše studie prokázala velké rozdíly v expresi proteinů v důsledku vlivu materiálu. Tyto rozdíly jsou významně spojeny s buněčnou strukturou, stavem redoxního potenciálu a metabolismem.

## **6. 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 O<sub>2</sub>. Cílem této studie bylo zkoumat přímý účinek různých úrovní O<sub>2</sub> (1%, 4% a 20%) na proteomický profil a akumulaci triglyceridů v 3T3-L1 diferencovaných preadipocytech.

### **Materiál a metody**

Myši 3T3-L1 fibroblasty (Zen-Bio Inc., NC, USA) byly kultivovány na deskách s fluorokarbonovým kontaktním povrchem (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Německo). Buňky byly nejprve expandovány v buněčné pasáži č. 11 po dobu 4-5 dnů v T75 kultivačních lahvích (Nunc). Po expanzi byly buňky přesazeny do vlastních kultivačních destiček v denzitě 5000 živých buněk/cm<sup>2</sup>. Na počátku diferenciační fáze byly buňky umístěny do hermeticky uzavřených plastových komor - modulárních inkubátorů (Billups-Rothenberg, CA, USA) a pro dosažení požadovaného hypoxického prostředí uvnitř komory byly dále diferencovány při hladinách 4% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> nebo 1% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> (Linde Gas a.s., Praha, Česká republika). Hladiny kyslíku uvnitř modulárních inkubátorů byly nepřetržitě monitorovány pomocí ručního oxymetru (GOX 100, Greisinger GHM Messtechnik GmbH, Regenstauf, Německo). Hypoxické komory byly umístěny v inkubátoru pro udržování stálé teploty 37 ° C. Zvláštní soubor buněk (kontrolní expozice) byl umístěn do standardního CO<sub>2</sub> inkubátoru (5% CO<sub>2</sub> + 20% O<sub>2</sub>). Buňky byly použity pro analýzu 14 dnů po indukci diferenciaci. Po 14ti dnech diferenciaci byly v intracelulárním prostoru jasně viditelné lipidové inkluze.

#### *Kvantifikace akumulace lipidových inkluzí*

Nezávislé sady buněk byly fixovány po dobu 30 minut v 2% formaldehydu a následně barveny po dobu 2 hodin s Oil Red O (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), jak bylo

popsáno dříve (Ramirez-Zacarias et al. 1992; Nunnari et al. 1989). Následně byly buňky dvakrát promyty fyziologickým roztokem s PBS, nahromaděný Oil Red O se poté extrahoval s 500  $\mu$ l isopropanolu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a byl kvantifikován spektrofotometricky při 510 nm. Množství buněk bylo stanoveno za použití total DNA kitu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### *Buněčné lyzáty*

Buňky byly lyzovány pomocí 2-D extrakčního pufru (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) po dobu 20ti minut na ledu. Lyzáty byly uloženy do teutého dusíku pro další analýzy.

#### *Příprava vzorků pro 2-D elektroforézu*

Všechny vzorky byly purifikovány pomocí 2-D Cleanup Kitu (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) podle protokolu výrobce. Vzhledem k velkému množství lipidů v každém vzorku byly vzorky purifikovány dvakrát. Koncentrace proteinů byly stanoveny pomocí 2-D Quant Kit (GE Healthcare).

#### *2-D elektroforéza: isoelektrická fokusace*

Pro izoelektrickou fokusaci vzorků byla použita jednotka IPGphor (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Vzorky byly loadovány na 7cm Stripy (Immobiline Dry Strips). Stripy byly poté rehydratovány po dobu 24 hodin se 125  $\mu$ l zředěného vzorku, který obsahoval 125  $\mu$ g proteinu, 2,5  $\mu$ l 0.1% bromofenolové modři, 2,5  $\mu$ l IPG pufru (GE Healthcare) a 2.5  $\mu$ l 1M dithiothreitolu (DTT) v extrakčním pufru (GE Healthcare). Po rehydrataci byly vzorky fokusovány při 20° C při různém napětí.

#### *2-D elektroforéza: ekvilibrace*

Po izoelektrické fokusaci byly stripy ekvilibrovány po dobu 20 minut v pufru obsahujícím 6M ureu, 30% glycerol, 4% SDS, 50mM Tris a 2% DTT. Následovala další fokusace s podobným puftrem, kde byl namísto DTT použit iodoacetamide. Stripy byly poté položeny na 0,5% agarózový gel, který obsahoval bromofenolovou modř.

#### *2-D elektroforéza: SDS-PAGE*

Obě fáze vertikální gelové elektroforézy proběhly za pomoci Mini-PROTEAN Tetra cell systému (Bio-Rad). Separace probíhala po dobu 3 hodin při konstantním napětí 50V. Gely byly poté promývány po dobu 3x5 minut v destilované vodě a přes noc barveny v 50ml coomassie modři.

### *Analýza gelů*

Po nabarvení byly gely skenovány pomocí kalibrovaného skeneru UMAX PowerLook 1120. Gely byly poté softwarově analyzovány pomocí Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare). Poté byly analyzovány rozdíly v odpovídajících spotech v každém setu gelů. U spotů s evidentní diferenciální expresí byla provedena analýza pomocí hmotnostní spektrometrie.

### *Enzymatická digesce*

Spoty nabarvené pomocí coomassie modři byly vystřiženy z gelu a odbarveny pomocí 50mM 4-ethylmorpholine acetate v 50% acetonitrilu. Kousky gelu byly poté promyty ve vodě a dehydrovány pomocí MeCN a poté rekonstituovány ve vodě. Po odstranění supernatantu byly kousky gelu částečně vysušeny pomocí SpeedVac koncentrátoru a poté inkubovány v pufru s obsahem 25mM 4-ethylmorpholine acetate, 5% MeCN a 100ng trypsinu. Peptidy byly poté extrahovány za pomoci 40% MeCN/0.1% TFA.

### *MALDI hmotnostní spektrometrie a identifikace proteinů*

Vodný roztok 50% MeCN / 0,1% TFA byl použit jako MALDI matrix. 1  $\mu$ l peptidové směsi byl nanesen na MALDI desku a nechal se sušit na vzduchu při pokojové teplotě překrytý 0,4  $\mu$ l MALDI matrix. Poté byly měřeny hmotnostní spektra za použití Ultraflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics) s hmotnostním rozsahem 700-4000 Da. Přístroj byl kalibrován za použití monoizotopických iontů  $[M + H]^+$  trypsin auto-proteolytických fragmentů (842.5 a 2211.1 DA). Seznam peaků, vytvořený pomocí flex Analysis software 3.3, byl vyhledáván pomocí MASCOT in-house vyhledávače s databází podmnožiny myších proteinů SwissProt 2014\_11. Proteiny s MOWSE skóre větším než 56 (vypočteno pro použité nastavení) byly považovány za identifikované. V případě, že výsledek byl nižší, nebo jen o málo vyšší, než je prahová hodnota, totožnost proteinu byla potvrzena pomocí MS / MS analýzy.

### *Statistická analýza*

Statistická signifikance změněné exprese individuálních spotů byla stanovena pomocí Studentova t-testu. Pathway analýza identifikovaných proteinů byla provedena pomocí softwaru Ingenuity Pathway Analysis. Statistická signifikance byla stanovena pro p-0.05.

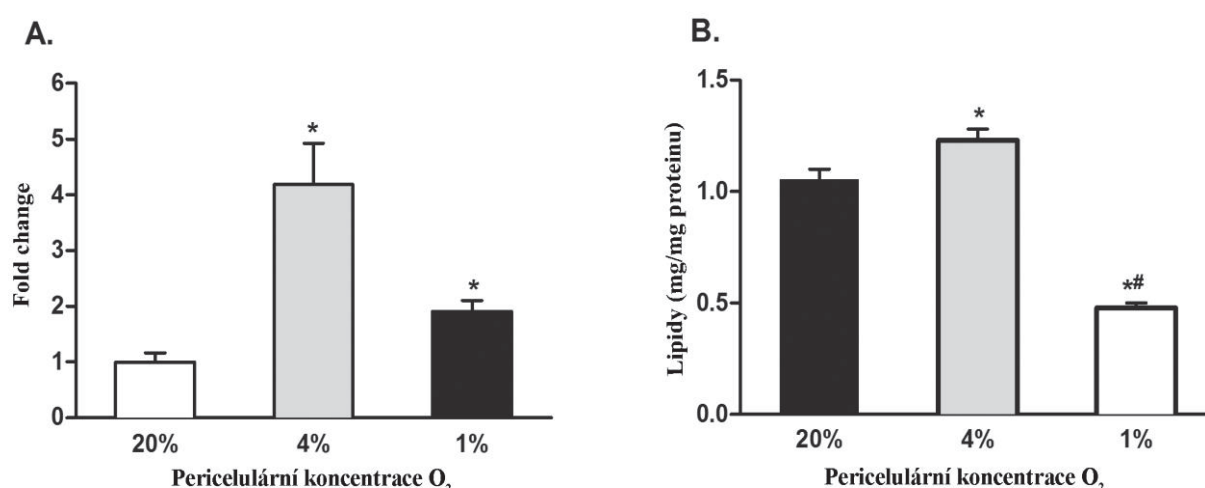
## Výsledky

### Syntéza lipidů

Bylo zjištěno, že adipocyty pěstované a diferencované v rámci 4% hladiny O<sub>2</sub> akumulovaly 4,2 ± 0,8 resp. 2,2 ± 0,2 krát více lipidů než byl obsah lipidů v buňkách vystavených 20% O<sub>2</sub>, nebo 1% O<sub>2</sub>, (Obr. 9A). V rámci působení 1% hladiny O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub>, v uvedeném pořadí, vše p < 0,05), (Obr. 9B).

Ve srovnání s buňkami kultivovanými v 20% a 1% O<sub>2</sub>, byla v rámci 4% hladiny O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub>.



3T3-L1 buňky byly kultivovány v rámci požadované pericelulární koncentrace O<sub>2</sub> po dobu 14 dnů. Akumulace lipidů byla hodnocena pomocí barvení Oil Red O. **A)** Údaje jsou vyjádřeny jako změna vzhledem ke kontrolní skupině (20% O<sub>2</sub>), **B)** Údaje jsou normalizovány na celkový obsah proteinů. \* P < 0,05 pro srovnání s 20% O<sub>2</sub>

### 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% O<sub>2</sub> oproti 1% O<sub>2</sub> a 20% O<sub>2</sub> oproti 4% O<sub>2</sub>). Spoty s 2-násobně vyšší nebo 2-násobně nižší

intenzitou, byly identifikovány jako rozdílně exprimované proteiny. Analyzované profily exprese proteinů s izoelektrickým bodem v rozmezí pH 4.0-7.0 a molekulové hmotnosti adipocytů kultivovaných při různých úrovních pericelulární koncentrace O<sub>2</sub> vykazovaly vysokou reprodukovatelnost. Byly pozorovány významné rozdíly v exprimovaných profilech mezi adipocyty vystavených hypoxickým podmínkám (1% O<sub>2</sub>, nebo 4% O<sub>2</sub>) nebo kontrolním podmínkám (20% O<sub>2</sub>).

Celkově jsme zjistili, že 26 spotů bylo ovlivněno v úrovních 4% a 1% O<sub>2</sub> (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.

## **Diskuze**

Použití kultivační destičky se dnem potaženým plyno-prostupnou membránou umožnilo dlouhodobou a reprodukcibilní expozici buněk při požadovaných úrovních pericelulárního O<sub>2</sub>. Tato studie prokázala přímé účinky variabilní dostupnosti kyslíku na proteomický profil v 3T3-L1 diferencovaných preadipocytech. Pomocí analýzy signálních drah, jsme zjistili, že jsou významně postiženy dráhy podílející se na regulaci energetického metabolismu, včetně mnoha enzymů TCA cyklu, glykolýzy, a syntézy triglyceridů. Na funkční úrovni, jsme potvrdili pozorované ovlivnění signálních drah tím, že přímo poukazují na hypoxií-stimulovanou akumulaci triglyceridů.

Při přímém měření hladiny kyslíku tukové tkáně u obézních myší a u lidských dobrovolníků byly zaznamenány minimální úrovně hladin O<sub>2</sub> v rozmezí 2-7 % (Reinke et al. 2011). To významně podporuje potřebu experimentálních nástrojů, které umožňují modelování takového prostředí. Jedinečné vlastnosti kultivačních destiček s kontaktním povrchem pro pěstování buněk vyrobených z polopropustné membrány umožnilo vystavení adherentních buněk při požadované úrovni pericelulárních koncentrací O<sub>2</sub> po dobu 14 dnů.



## **7. 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 inzulinové 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 inzulinovou rezistenci v adipocytech (He et al. 2011; Trayhurn 2013; Wang et al. 2007b), 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% O<sub>2</sub>) a těžké (1% O<sub>2</sub>) 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.

### **Materiál a metody**

Myši 3T3-L1 fibroblasty byly získány ze Zen-Bio (Zen-Bio Inc., NC, USA). Buňky byly kultivovány na deskách vyrobených z fluorokarbonové membrány (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Německo). Buňky byly kultivovány v souladu s pokyny výrobce se a udržovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru při teplotě 37° C a 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly nejprve expandovány v buněčné pasáži č. 11 po dobu 4-5 dnů v T75 kultivačních lahvích. (Nunc, Roskilde, Dánsko.) Po expanzi byly buňky přesazeny do vlastních kultivačních destiček v denzitě 5000 živých buněk/cm<sup>2</sup>. Po dosažení konfluence byly kultury dále diferencovány po dobu 14 dnů. Na počátku diferenciační fáze byly buňky umístěny do hermeticky uzavřených plastových komor - modulárních inkubátorů (Billups-Rothenberg, CA, USA) a pro dosažení požadovaného hypoxického prostředí byly dále diferencovány při hladinách 4% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> nebo 1% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> (Linde Gas as, Praha, česká republika) Kontrolní expozice byly provedeny ve standardním inkubátoru CO<sub>2</sub> s ~ 20% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>. Hladiny kyslíku uvnitř modulárních inkubátorů byly monitorovány za použití ručního oxymetr (GOX 100, Greisinger GHM

Messtechnik GmbH, Regenstauf, Německo). Čtrnáct dnů po zahájení diferenciaci byly buňky plně diferencované a byly provedeny experimenty.

#### *Bazální lipolýza*

Před vlastním lipolytickým experimentem byly diferencované buňky po dobu 24h hladověny v bezsérovém bazálním médiu ((Zen-Bio Inc., NC, USA).). Dále byly buňky inkubovány v Krebs Ringer Bikarbonátovém pufru (KRBHA) obsahujícím 10 mmol/l HEPES, 2% FFA free bovinního sérového albuminu a 6 mmol/l glukózy po dobu 4 hodin pro stanovení spontánní (bazální) lipolytické aktivity. Glycerol uvolněný do pufru byl stanoven kolorimetricky pomocí free glycerol reagentu (Sigma-Aldrich). Obsah glycerolu byl dále normalizován na celkový obsah lipidů zjištěný pomocí kvantitativní metody Oil Red O (Ramirez-Zacarias et al. 1992).

#### *Test aktivity HIF a aktivátory / inhibitory lipogeneze*

Stabilní buněčné linie se zabudovaným HIF Luciferase Reporterem (Signosis Inc., Santa Clara, CA, USA) byla použita k vyhodnocení změn v indukci (HIF) po podávání dimethyloxaloylglycinu (DMOG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) Buňky byly pěstovány podle instrukcí dodavatele. Po expozici byly buňky lyzovány a vzorky skladovány při -80° C až do doby analýzy. Aktivita luciferázy byla změřena dle protokolu výrobce s pomocí Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) a prostřednictvím spektrofotometru (Infinity M200, Tecan Trading AG, Švýcarsko). Transkripční aktivita HIF byla normalizována na množství proteinu. K posouzení vlivu vybraných drah regulujících lipogenezi, byly buňky inkubovány s následujícími chemickými látkami, které byly součástí příslušného kultivačního média po celou dobu diferenciaci (14 dní): a) aktivátor pyruvát dehydrogenázy - 5 mM dichloracetát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), b) ATP-citrát lyase inhibitor: SB204990 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) a c), 1 mM a 2 mM dimethyloxaloylglycine (DMOG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### *Akumulace triglyceridů a distribuce velikosti lipidových dropletů*

Buňky byly fixovány v 10% formaldehydu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) po dobu 1 hodiny, dvakrát promyty fyziologickým roztokem (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a obarveny roztokem Oil Red o (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) po dobu 1,5 hodiny. Následně byly buňky dvakrát promyty 1,5 ml PBS, vysušeny na vzduchu a akumulovaný Oil Red O, byl extrahován pomocí 0,5 ml isopropanolu. Celkový obsah lipidů byl stanoven kvantitativně, dle dříve popsané metodiky (Ramirez-Zacarias et al. 1992). Samostatné sady

buněk byly použity pro stanovení distribuce velikosti dropletů pomocí digitálních fotografií získaných fluorescenčním mikroskopem (Leica DMLB 100T, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Pro každou experimentální podmínku, byly použity tři nezávislé sady buněk. V každé sadě byly pořízeny tři mikroskopické snímky v náhodně vybraných polích (dno destičky bylo rozděleno do 100 číslovaných čtverců. 3 čísla byla vybrána pomocí generátoru náhodných čísel).

### *Analýza fotografií*

Lipidové droplety z digitálních fotografií byly počítány za použití Matlab 7.12.0 (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) algoritmus byl založený na matematicko-morfologické operaci "otvory ve stupních šedi". Po základním předzpracování obrazu (výběr barevných kanálů, nastavení kontrastu, konverze ve stupních šedi), byl úvodní obrázek otevřen ve čtyřech cyklech s různým průměrem strukturálních elementů (> 50, 50, 40, 30, 20, 10 a 6  $\mu\text{m}$ ). V každém kroku byl zjištěn počet lipidových dropletů v rámci jednotlivých velikostních kategorií.

### *Izolace RNA*

Celková RNA byla izolována za použití Tripure reagentu (TriPure Isolation Reagent, Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) a následně vyčištěna a pomocí DNase High Pure isolation RNA kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Genové exprese DGAT (diacylglycerol O-acyltransferázy 2), FABP4, FASN, HSL, PLIN1, ACLY) a TBP byly hodnoceny pomocí reverzní transkripce kvantitativní PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) s použitím Taq Manson (ID produktu: Mm00499536\_m1, Mm00445878\_m1, Mm00662319\_m1, Mm01197698\_m1, Mm00495359\_m1, Mm00558672\_m1, Mm01302282\_m1, Mm00446971\_m1). TBP byla použita jako vnitřní kontrola a výsledky byly vyjádřeny jako  $\Delta\Delta\text{Ct}$ .

### **Statistická analýza**

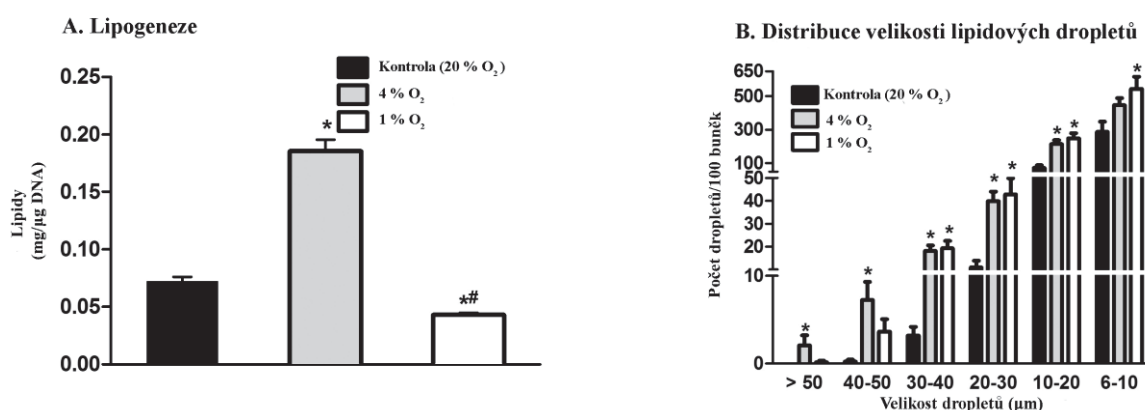
Vliv mírné a těžké hypoxie expozice na výsledných proměnných byl analyzován s použitím ANOVA testu s Tukey`s post-hoc analýzou a za použití softwaru GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Vliv farmakologických látek na výsledné proměnné v různých úrovních  $\text{O}_2$  byl analyzován s použitím 2-cestné ANOVY a byla stanovena interakce mezi farmakologickou léčbou a expozicí  $\text{O}_2$ . Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM. Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za statisticky významnou.

## Výsledky

### Lipogeneze a distribuce velikosti lipidových dropletů

Vystavení mírné hypoxii výrazně stimulovalo lipogenezi a to o 375 %, zatímco těžká hypoxie měla opačný účinek, inhibice o 43 % ( $0,07 \pm 0,004$  vs  $0,19 \pm 0,01$  vs  $0,04 \pm 0,002$  mg lipidů /  $\mu\text{g}$  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  $30 \mu\text{m}$ ) o 540 % větší ve srovnání s kontrolními podmínkami ( $25,6 \pm 1,12$  vs.  $4,0 \pm 0,4$  droplety / 100 buněk,  $p < 0,05$ ). Důležité je, že vystavení těžší hypoxii 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% O<sub>2</sub>, # $p < 0,05$  pro srovnání s expozicí 4% O<sub>2</sub> (ANOVA).  $N = 6$  pro A,  $N = 9$  pro B.

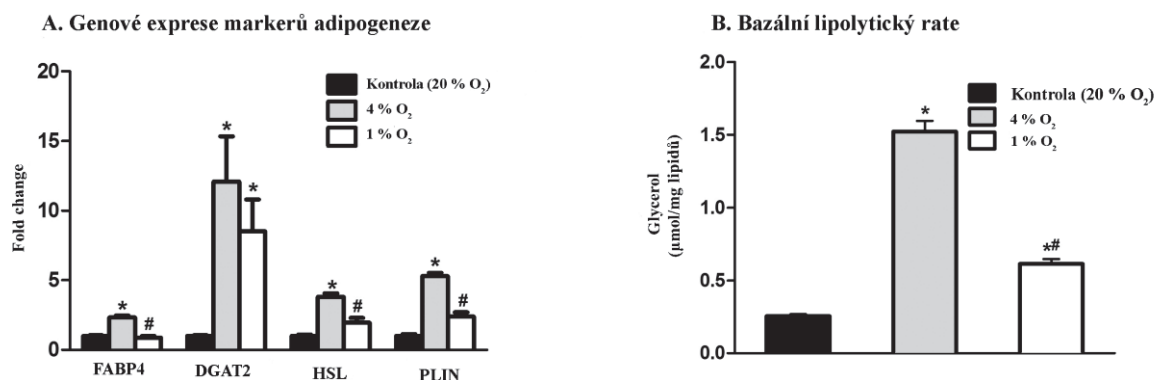
### Markery diferenciacie adipocytů

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

## Bazální lipolýza

Expozice mírné hypoxii (4% O<sub>2</sub>) 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% O<sub>2</sub>) 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 zralé adipocyty (A). Stimulace bazální lipolýzy při expozici mírné hypoxii (B). \* P <0,05 pro srovnání s expozicí 20% O<sub>2</sub>, #p <0,05 pro srovnání s expozicí 4% O<sub>2</sub> (ANOVA). N = 6 pro A, B.

## Diskuze

Tato studie prokázala, že adipocyty reagují na chronicky sníženou dostupnost O<sub>2</sub> různě a to v závislosti na závažnosti hypoxie. Mírná hypoxie, s pericelulární koncentrací O<sub>2</sub> ekvivalentní spodní hranici úrovní O<sub>2</sub>, které byly naměřeny v tukové tkáni v rámci *in vivo* experimentů u většiny obézních myši a lidí stimulovala adipogenezi, lipogenezi a zvýšila spontánní lipolýzu. Toto zjištění podporuje negativní roli hypoxie v rozvoji adipocytárních poruch, stejně jako poruch v rámci celkového metabolismu. Závažnější hypoxická expozice je charakterizována nižší stimulací diferenciací adipocytů a snižuje stimulaci lipolýzy. K identifikaci potenciálních farmakologických cílů pro léčbu hypoxií indukovanou expanzí adipocytů a zvýšenou lipolýzu, jsme se snažili identifikovat mechanismy, které hrají hlavní roli při zvýšené syntéze triglyceridů v rámci expozice mírné hypoxie. Zaměřili jsme se na intracelulární zdroj acetyl-CoA představující klíčový zdroj *de novo* syntézy mastných kyselin s následnou syntézou triglyceridů (Postic a Girard 2008). Za použití selektivního inhibitoru, jsme zjistili, že aktivita ATP-dependentní citrát lyázy je nezbytná pro hypoxii-indukovanou lipogenezi. To naznačuje, že hlavním zdrojem acetyl-CoA v hypoxických adipocytech je cyklus trikarboxylové kyseliny, jak bylo již potvrzeno u jiných buněčných linií, včetně

nádorových buněk (Filipp et al. 2012; Wise et al. 2011). Nicméně i v podmínkách plně inhibované ACLY, byla lipogeneze ještě vyšší v obou hypoxických podmínkách než v kontrolní expozici a ukázala tak zřejmě na další vnitrobuněčné zdroje acetyl-CoA. Z dostupných dat se lze domnívat že glykolytický zdroj acetyl-CoA hraje podřadnou roli jako farmakologická aktivace pyruvát-dehydrogenázy pouze v kontrolních podmínkách, ale inhibuje lipogenezi v rámci expozice těžké hypoxii.

## **8. 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 (Briancón-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  $\beta$ -buněk pankreatu.

### **Materiál a metody**

#### *Expozice myši intermitentní hypoxii*

Myši samci (C57BL6 / J, n = 10 ve skupině) byli vystaveni po dobu 14 dnů intermitentní hypoxii nebo kontrolním podmínkám. Hladiny kyslíku uvnitř klece byly změněny vtháněním N<sub>2</sub> tak, že obsah kyslíku se snížil z 21 % na 6 - 6,5 % v průběhu 30 sekund a následně se vrátil na 21 % za 30 s. Kontrolní pokusy byly provedeny podáním stlačeného vzduchu. Acipimox (0,5 mg / ml, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) byl podáván v pitné vodě.

#### *Intra-peritoneální glukózový test a inzulínový toleranční test*

Hladina glukózy v krvi byla stanovena za použití glukometru (Accu-Check Aviva, Roche, Indianapolis, IN) v časech 0, 10, 20, 30, 60, 90 a 120 minut po intraperitoneální injekci 1 g / kg glukózy (IGTT, n = 10 ve skupině) nebo v časech 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 a 120 minut po intraperitoneální injekci 0,5 IU / kg inzulínu (ITT, n = 10 ve skupině).

### *Stanovení lipolýzy v izolovaných adipocytech*

Epididymální tukové polštáře byly vyoperovány a štěpeny s použitím 1,25 mg / ml kolagenázy (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) v Krebs-Ringerově roztoku (KRBHA) pufru, obsahujícího 10 mmol / l HEPES, 2 bovinního sérového albuminu, 500 nM adenosinu, a 6 mmol / l glukózy při pH 7,4. Katecholamin-stimulovaná lipolýza byla hodnocena po přidání isoprenalinu ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  nebo  $10^{-9}$  mol / l) do KRBHA pufru doplněném 1 U / ml adenosin deaminázy a 100 nM N6- (2-fenyl-isopropyl)-adenosin a po inkubaci po dobu 120 minut (20). Glycerol uvolněný do pufru byl použitý jako marker lipolýzy. Dále byl stanoven celkový obsah lipidů v každé jamce a bylo vypočteno množství adipocytů v každé jamce. Lipolytický rate byl vyjádřen jako glycerol uvolněný během 120 minut na 10000 buněk.

### *Biochemická analýza*

Hladiny inzulínu a leptinu v plazmě byly stanoveny za použití ELISA kitů (EIA Kit, Alpcó, Salem, NH, USA a Leptin Mouse ELISA Kit, Abcam, Cambridge, UK). Dále byly kvantifikovány hladiny glukózy v plazmě (glukózooxidáza Assay Kit, Abcam, Cambridge, UK) a hladiny FFA (NEFA-HR2, Wako Chemicals Inc., Richmond, VA, USA).

### *Western blotting a genové exprese*

Bioptické vzorky stehenního svalu a tukové tkáně nadvarlete byly homogenizovány a proteiny separovány pomocí SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Membrány byly blokovány pomocí 5% albuminu a inkubovány přes noc s protilátkami proti celkové a fosforylované Akt ( Danvers, MA, USA). Genová exprese adenosinu, leptinu a leptinových receptorů byly vyhodnoceny z tukové tkáně nadvarlete pomocí qPCR. Celková RNA byla extrahována za použití Tripure reagentu a celková RNA byla reverzně transkribována s použitím systému SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Byly použity TaqMan sondy Mm00545720, Mm00434759 a Mm00440181. Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza byla použita jako referenční gen.

### *Statistická analýza*

Interakce mezi léčbou acipimoxem a expozicí IH byla hodnocena s použitím 2-cestné ANOVY. Všechny analýzy byly provedeny s použitím softwaru GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Hodnoty  $p < 0,05$  byly považovány za statisticky významné. Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM.

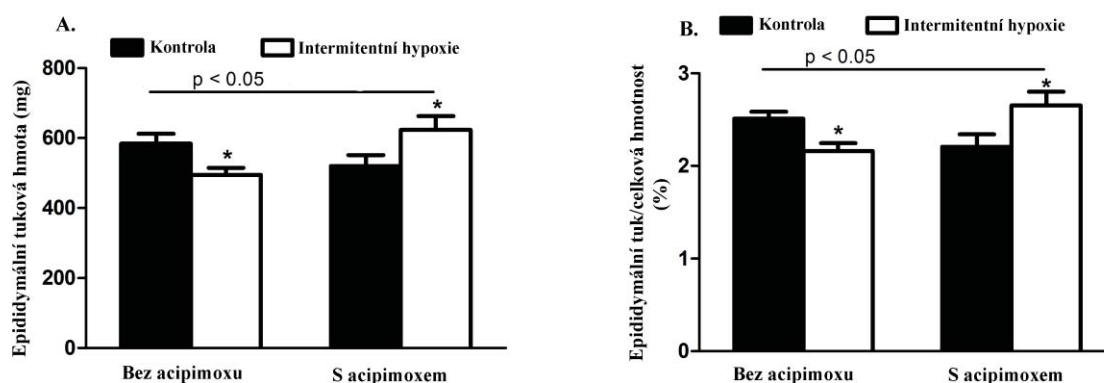


## Výsledky

### Parametry adipocytů

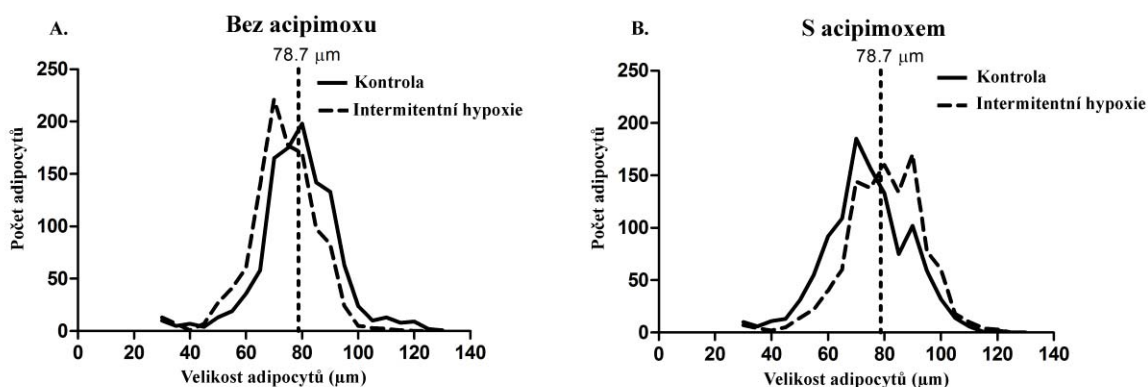
Celková tělesná hmotnost se u IH-exponovaných myší snížila o  $7,9 \pm 0,5$  % ( $24,8 \pm 0,5$  g vs.  $22,6 \pm 0,4$  g,  $p < 0,05$ ), zatímco myši léčené acipimoxem ztratily pouze  $2,2 \pm 1,0$  % ( $23,8 \pm 0,3$  g vs.  $23,3 \pm 0,3$  g,  $p < 0,05$ ). V souladu s tím, došlo u myší vystavených 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.  $72,4 \pm 1,4$   $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ). 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.  $80,2 \pm 1,7$   $\mu\text{m}$ ,  $p > 0,05$ ) 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 myší 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 myší 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 expozicí 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 % ( $AUC_{\text{glucose}} = 18,2 \pm 0,7$  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  $\times 10^3$ ,  $p > 0,05$ ). 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 %,  $p < 0,05$ ).

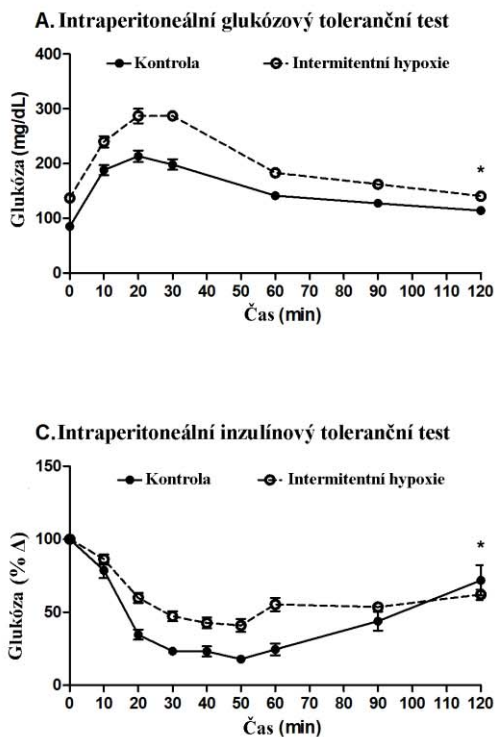
Inzulínová senzitivita v postprandiálním stavu, se u myši exponovaných IH zhoršila o 34 % ( $5,2 \pm 0,5$  vs.  $6,9 \pm 0,3 \times 10^3$  mg / dl / 120 min,  $p < 0,05$ ), ale tento účinek byl zmírněn podáváním acipimoxu během expozice IH ( $10,0 \pm 0,9$  vs.  $8,2 \pm 0,7 \times 10^3$  mg / dl / 120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

Expozice IH narušila funkci  $\beta$ -buněk pankreatu (HOMA-beta), která se s podáváním acipimoxu zlepšila jen částečně. Podávání acipimoxu za fyziologických podmínek nemělo žádný zjistitelný 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

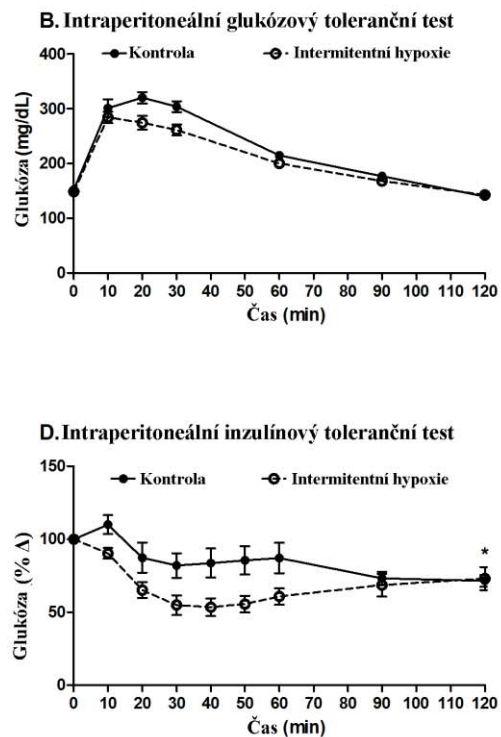
pAKT při expozici IH zvýšila o 96 %, (fold change:  $1,0 \pm 0,12$  vs.  $1,96 \pm 0,09$  pro kontrolní a IH-exponované skupiny,  $p < 0,05$ ), stejně jako ve skupinách léčených acipimoxem (fold change:  $1,42 \pm 0,14$  vs  $2,45 \pm 0,18$ ,  $p < 0,05$ ). Podávání acipimoxu snížilo pAKT ve svalech (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

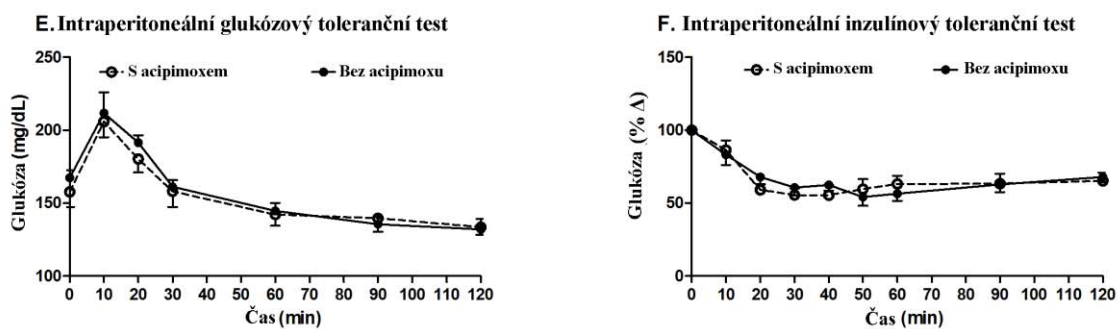
### Bez acipimoxu



### S acipimoxem



### Neexponované myši



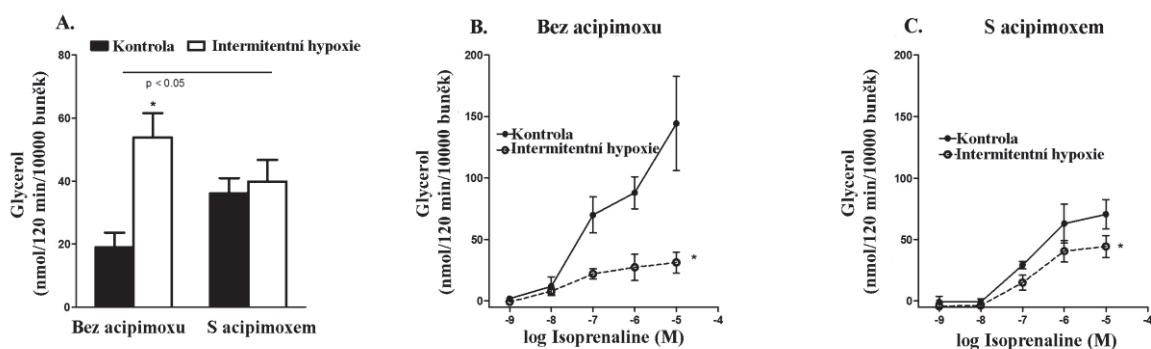
Jednotlivé hodnoty hladiny glukózy v plazmě po intraperitoneálním podání 1 g / kg glukózy u myši vystavených kontrolním podmínkám a intermitentní hypoxii (IH) po dobu 14 dní bez léčby (A) nebo s léčbou acipimoxem (B). Jednotlivé hodnoty hladiny glukózy v plazmě po intraperitoneálním podání 0,5 IU / kg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

### Vliv acipimoxu na lipolýzu a hladiny FFA v plazmě

V izolovaných adipocytech od myši 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.  $306,5 \pm 28,1$   $\mu$ 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 myši vystavených kontrolním podmínkám nebo intermitentní hypoxii po dobu 14 dní, léčených acipimoxem nebo bez léčby, B. Isoprenalinem stimulovaná lipolýza u myši 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  $n = 4$ .

## Diskuze

Tato studie zkoumala, zda zvýšená lipolýza v tukové tkáni představuje mechanismus spojující expozici IH s hyperglykemií, glukózovou intolerancí, inzulinovou rezistencí, a dysfunkcí  $\beta$ -buněk pankreatu. V rámci této studie jsme prokázali, že expozice IH významně zvýšila spontánní lipolýzu adipocytů, hladiny FFA v plazmě a došlo k poruše glukózové homeostázy. Farmakologická inhibice lipolýzy pomocí acipimoxu zabránila IH-indukovanému zvýšení lipolýzy, zvýšení plazmatických hladin FFA, a celkově zmírnila škodlivé účinky expozice IH na metabolismus glukózy. Stimulace lipolýzy v rámci expozice IH snížila množství epididymální tukové hmoty a velikost adipocytů. To vyústilo v celkovou redukci tělesné hmotnosti, tento fakt byl také hlášen v již dříve publikovaných studiích (Iiyori et al. 2007). Podání acipimoxu zabránilo celkovému IH-indukovanému hubnutí a zachovalo množství tukové hmoty, stejně jako velikost adipocytů.

V některých studiích je uvedeno, že samotné podání acipimoxu může zvýšit tělesnou hmotnost a celkově nepříznivě ovlivňovat metabolický profil jedince. Z tohoto důvodu byly oddělené skupiny myší (které nebyly předmětem žádné expozice), léčeny acipimoxem. Výsledky tohoto pokusu ukázaly, že samotné podávání acipimoxu samo o sobě nemá žádný vliv na tělesnou hmotnost, lačné hladiny glukózy, glukózovou toleranci nebo inzulinovou senzitivitu. To podporuje závěr, že acipimoxem zprostředkované potlačení lipolýzy, u myší vystavených IH, je skutečný mechanismus zprostředkovávající zlepšení metabolismu glukózy. Tato studie ukázala, že IH-indukované poškození inzulinové senzitivity, glukózové tolerance a funkce  $\beta$ -buněk pankreatu může být zabráněno, pokud IH vyvolaná zvýšená bazální lipolýza a hladiny FFA v plazmě jsou farmakologicky inhibovány pomocí acipimoxu. Kromě objasnění nového pohledu do mechanismů spojujících IH s poruchou metabolismu glukózy by tato studie ráda otevřela další možnosti zkoumání účinnosti inhibitorů lipolýzy v léčbě metabolických poruch u OSA pacientů, zejména těch, kteří špatně tolerují CPAP terapii

## 9. 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 obejít 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 O<sub>2</sub> různě a to v závislosti na závažnosti hypoxie. Mírná hypoxie (4% O<sub>2</sub>) 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% O<sub>2</sub>) 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 hypoxii, 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 inzulínové 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 myššího 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 randomizované dvojité-slepé randomizované klinické studie.

## 10. Seznam zkratek

- Angptl4 - Angiopoietin-like 4
- BPAP – Bilevel positive airway pressure
- CAT - Chloramphenicol acetyltransferase
- CD38 – Cluster of differentiation 38
- CPAP – Continous positive airway pressure
- FFA – Fatty free acid
- GPX - Glutathione peroxidase
- HDL – High density lipoprotein
- HIF-1 $\alpha$  – Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$
- IL-1 – Interleukin 1
- IL-6 – Interleukin 6
- LPL – Lipoprotein lipase
- MIP2 - Macrophage inflammatory protein 2
- NADPH - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- NF- $\kappa$ B - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- ROS – Reactive oxygen species
- SCD-1 - Stearoyl-CoA desaturase
- SOD - Superoxide dismutase
- SREBP-1 - Sterol regulatory element-binding protein 1

## 11.Literatura

- AGIL, A, I ROSADO, R RUIZ, A FIGUEROA, N ZEN a G FERNANDEZ-VAZQUEZ, 2012. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *J.Pineal Res.* 3., roč. 52, č. 1600-079X (Electronic), s. 203–210.
- AHREN, B, 2000. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia.* 4., roč. 43, č. 4, s. 393–410.
- AL-DISI, D, N AL-DAGHRI, L KHANAM, A AL-OTHMAN, M AL-SAIF, S SABICO a G CHROUSOS, 2010. Subjective sleep duration and quality influence diet composition and circulating adipocytokines and ghrelin levels in teen-age girls 115. *Endocr.J.* roč. 57, č. 1348-4540 (Electronic), s. 915–923.
- ALLEN, C B, B K SCHNEIDER a C W WHITE, 2001. Limitations to oxygen diffusion and equilibration in 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.
- ALMON, R R, E YANG, W LAI, I P ANDROULAKIS, S GHIMBOVSCHI, E P HOFFMAN, W J JUSKO a D C DUBOIS, 2008. Relationships between circadian rhythms and modulation of gene expression by glucocorticoids in skeletal muscle. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol.* 10., roč. 295, č. 0363-6119 (Print), s. R1031–R1047.
- AMSTEIN, C F a P A HARTMAN, 1975. Adaptation of plastic surfaces for tissue culture by glow discharge. *J.Clin.Microbiol.* 7., roč. 2, č. 0095-1137 (Print), s. 46–54.
- 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
- ARNAUD, C, L POULAIN, P LEVY a M DEMATTEIS, 2011. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis.* 12., roč. 219, č. 1879-1484 (Electronic), s. 425–431.
- AYAS, N T, D P WHITE, W K AL-DELAIFY, J E MANSON, M J STAMPFER, F E SPEIZER, S PATEL a F B HU, 2003. A prospective study of self-reported sleep duration and incident diabetes in women. *Diabetes Care.*

BAGUET, Jean-Philippe, Gilles BARONE-ROCHETTE, Renaud TAMISIER, Patrick LEVY a Jean-Louis PÉPIN, 2012. Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nature Reviews Cardiology* [online]. 25. 9., roč. 9, č. 12, s. 679–688. ISSN 1759-5002. Dostupné z: doi:10.1038/nrcardio.2012.141

BAHR, I, E MUHLBAUER, E ALBRECHT a E PESCHKE, 2012. Evidence of the receptor-mediated influence of melatonin on pancreatic glucagon secretion via the Galphaq protein-coupled and PI3K signaling pathways. *J.Pineal Res.*

BALDEWEG, S E, A GOLAY, A NATALI, B BALKAU, S DEL PRATO a S W COPPACK, 2000. Insulin resistance, lipid and fatty acid concentrations in 867 healthy Europeans. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) 1. *Eur.J.Clin.Invest.* 1., roč. 30, č. 0014-2972 (Print), s. 45–52.

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

BARTNESS, T J, Y B SHRESTHA, C H VAUGHAN, G J SCHWARTZ a C K SONG, 2010. Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Mol.Cell Endocrinol.* 29. 4., roč. 318, č. 318, s. 34–43.

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.

BEIHL, D A, A D LIESE a S M HAFFNER, 2009. Sleep duration as a risk factor for incident type 2 diabetes in a multiethnic cohort. *Ann.Epidemiol.* 5., roč. 19, č. 1873-2585 (Electronic), s. 351–357.

BENEDICT, C, M HALLSCHMID, A LASSEN, C MAHNKE, B SCHULTES, H B SCHIOTH, J BORN a T LANGE, 2011. Acute sleep deprivation reduces energy expenditure in healthy men. *Am.J.Clin.Nutr.* 6., roč. 93, č. 1938-3207 (Electronic), s. 1229–1236.

BERTUGLIA, S a R J REITER, 2009. Melatonin reduces microvascular damage and insulin resistance in hamsters due to chronic intermittent hypoxia. *J.Pineal Res.* 4., roč. 46, č. 1600-079X (Electronic), s. 307–313.

BJORKELUND, C, D BONDYR-CARLSSON, L LAPIDUS, L LISSNER, J MANSSON, I SKOOG a C BENGTSSON, 2005. Sleep disturbances in midlife unrelated to 32-year diabetes

incidence: the prospective population study of women in Gothenburg 44. *Diabetes Care*. 11., roč. 28, č. 0149-5992 (Print), s. 2739–2744.

BODEN, G, 2001. Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance 1. *Endocr.Pract.*

BORBA, Christina P C, Xiaoduo FAN, Paul M COPELAND, Alexander PAIVA, Oliver FREUDENREICH a David C HENDERSON, 2011. Placebo-controlled pilot study of ramelteon for adiposity and lipids in patients with schizophrenia. *Journal of clinical psychopharmacology* [online]. 10., roč. 31, č. 5, s. 653–8. ISSN 1533-712X. Dostupné z: doi:10.1097/JCP.0b013e31822bb573

BOREL, Anne-Laure, Denis MONNERET, Renaud TAMISIER, Jean-Philippe BAGUET, Patrice FAURE, Patrick LEVY, Serge HALIMI a Jean-Louis PÉPIN, 2013. The Severity of Nocturnal Hypoxia but Not Abdominal Adiposity Is Associated with Insulin Resistance in Non-Obese Men with Sleep Apnea. *PLoS ONE* [online]. 12. 8., roč. 8, č. 8, s. e71000. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0071000

BORST, S E, C F CONOVER a G J BAGBY, 2005. Association of resistin with visceral fat and muscle insulin resistance. *Cytokine*.

BOSY-WESTPHAL, A, S HINRICHS, K JAUCH-CHARA, B HITZE, W LATER, B WILMS, U SETTLER, A PETERS, D KIOSZ a M J MULLER, 2008. Influence of partial sleep deprivation on energy balance and insulin sensitivity in healthy women 67. *Obes.Facts*.

BOURA-HALFON, S a Y ZICK, 2009. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 4., roč. 296, č. 0193-1849 (Print), s. E581–E591.

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

BROUSSARD, J L, D A EHRMANN, Cauter E VAN, E TASALI a M J BRADY, 2012. Impaired insulin signaling in human adipocytes after experimental sleep restriction: a randomized, crossover study. *Ann.Intern.Med.* 16. 10., roč. 157, č. 1539-3704 (Electronic), s. 549–557.

BUIJS, Ruud M, Carolina ESCOBAR a Dick F SWAAB, 2013. The circadian system and the balance of the autonomic nervous system. *Handbook of clinical neurology* [online]. roč. 117, s. 173–91. ISSN 0072-9752. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53491-0.00015-8

BUXTON, O M, S W CAIN, S P O'CONNOR, J H PORTER, J F DUFFY, W WANG, C A CZEISLER a S A SHEA, 2012. Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption. *Sci Transl. Med.* 11. 4., roč. 4, č. 1946-6242 (Electronic), s. 129ra43.

BUXTON, O M a E MARCELLI, 2010. Short and long sleep are positively associated with obesity, diabetes, hypertension, and cardiovascular disease among adults in the United States 60. *Soc. Sci Med.* 9., roč. 71, č. 1873-5347 (Electronic), s. 1027–1036.

BUXTON, O M, M PAVLOVA, E W REID, W WANG, D C SIMONSON a G K ADLER, 2010. Sleep restriction for 1 week reduces insulin sensitivity in healthy men 58. *Diabetes.* 9., roč. 59, č. 1939-327X (Electronic), s. 2126–2133.

CAILOTTO, Cathy, Jun LEI, Jan VAN DER VLIET, Caroline VAN HEIJNINGEN, Corbert G VAN EDEN, Andries KALSBECK, Paul PÉVET a Ruud M BUIJS, 2009. Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver. *PLoS one* [online]. roč. 4, č. 5, s. e5650. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0005650

CALLE, M C a M L FERNANDEZ, 2012. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.*

CALVIN, A D, R E CARTER, T ADACHI, P G MACEDO, F N ALBUQUERQUE, Walt C VAN DER, J BUKARTYK, D E DAVISON, J A LEVINE a V K SOMERS, 2013. Effects of experimental sleep restriction on caloric intake and activity energy expenditure. *Chest.* 7., roč. 144, č. 1931-3543 (Electronic), s. 79–86.

CAPLES, Sean M, Arturo GARCIA-TOUCHARD a Virend K SOMERS, 2007. Sleep-disordered breathing and cardiovascular risk. *Sleep* [online]. 3., roč. 30, č. 3, s. 291–303. ISSN 0161-8105. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425225>

CAPPUCCIO, F P, L D'ELIA, P STRAZZULLO a M A MILLER, 2010a. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 2., roč. 33, č. 1935-5548 (Electronic), s. 414–420.

CAPPUCCIO, F P, L D'ELIA, P STRAZZULLO a M A MILLER, 2010b. Sleep duration and

all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective studies . *Sleep*. 5., roč. 33, č. 0161-8105 (Print), s. 585–592.

CARLSON, J T, J HEDNER, M ELAM, H EJNELL, J SELLGREN a B G WALLIN, 1993. Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea. *Chest*.

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.

CASTANON-CERVANTES, Oscar, Mingwei WU, J Christopher EHLEN, Ketema PAUL, Karen L GAMBLE, Russell L JOHNSON, Rachel C BESING, Michael MENAKER, Andrew T GEWIRTZ a Alec J DAVIDSON, 2010. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [online]. 15. 11., roč. 185, č. 10, s. 5796–805. ISSN 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1001026

CONTRERAS-ALCANTARA, S, K BABA a G TOSINI, 2010. Removal of melatonin receptor type 1 induces insulin resistance in the mouse. *Obesity.(Silver.Spring)*. 9., roč. 18, č. 1930-739X (Electronic), s. 1861–1863.

CUESTA, S, R KIREEV, C GARCIA, L RANCAN, E VARA a J A TRESGUERRES, 2013. Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Age (Dordr.)*. 6., roč. 35, č. 1574-4647 (Electronic), s. 659–671.

CURTIS, A S, J V FORRESTER, C MCINNES a F LAWRIE, 1983. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J.Cell Biol*. 11., roč. 97, č. 0021-9525 (Print), s. 1500–1506.

DA ROSA, D P, L F FORGIARINI, D BARONIO, C A FEIJO, D MARTINEZ a N P MARRONI, 2012. Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediators Inflamm*. roč. 2012, s. 879419.

DALLMANN, R, A U VIOLA, L TAROKH, C CAJOCHEN a S A BROWN, 2012. The human circadian metabolome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 14. 2., roč. 109, č. 1091-6490 (Electronic), s. 2625–2629.

DANIELSEN, A G, F LIU, Y HOSOMI, K SHII a R A ROTH, 1995. Activation of protein kinase C alpha inhibits signaling by members of the insulin receptor family 1. *Journal of Biological Chemistry*.



DARUKHANAVALA, A, J N BOOTH III, L BROMLEY, H WHITMORE, J IMPERIAL a P D PENEV, 2011. Changes in insulin secretion and action in adults with familial risk for type 2 diabetes who curtail their sleep 71. *Diabetes Care*.

DE BACQUER, D, M VAN RISSEGHEM, E CLAYS, F KITTEL, G DE BACKER a L BRAECKMAN, 2009. Rotating shift work and the metabolic syndrome: a prospective study. *International journal of epidemiology* [online]. 6., roč. 38, č. 3, s. 848–54. ISSN 1464-3685. Dostupné z: doi:10.1093/ije/dyn360

DE OLIVEIRA, A C, S ANDREOTTI, Tda S FARIAS, F L TORRES-LEAL, A R DE PROENCA, A B CAMPANA, A H DE SOUZA, R A SERTIE, A R CARPINELLI, J CIPOLLA-NETO a F B LIMA, 2012. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. *Endocrinology*. 5., roč. 153, č. 1945-7170 (Electronic), s. 2178–2188.

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>

DEIBERT, D C a R A DEFRONZO, 1980. Epinephrine-induced insulin resistance in man. *J Clin Invest*.

DELARUE, J a C MAGNAN, 2007. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care*.

DIAZ-GUERRA, M J, M JUNCO a L BOSCA, 1991. Oleic acid promotes changes in the subcellular distribution of protein kinase C in isolated hepatocytes 1. *Journal of Biological Chemistry*. 15. 12., roč. 266, č. 0021-9258 (Print), s. 23568–23576.

DOI, R, K OISHI a N ISHIDA, 2010. CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2. *Journal of Biological Chemistry*.

DONG, X C, K D COPPS, S GUO, Y LI, R KOLLIPARA, R A DEPINHO a M F WHITE, 2008. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab*. 7., roč. 8, č. 1932-7420 (Electronic), s. 65–76.

DONGA, E, Dijk M VAN, J G VAN DIJK, N R BIERMASZ, G J LAMMERS, K W VAN KRALINGEN, E P CORSSMIT a J A ROMIJN, 2010. A single night of partial sleep deprivation induces insulin resistance in multiple metabolic pathways in healthy subjects 64. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*

DRAGER, L F, J C JUN a V Y POLOTSKY, 2010. Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea. In: *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* s. 843–851.

DRAGER, L F, J LI, C REINKE, S BEVANS-FONTI, J C JUN a V Y POLOTSKY, 2011. Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. In: *Obesity (Silver Spring)*. s. 2167–2174.

DRAGER, L F, Q YAO, K L HERNANDEZ, M K SHIN, S BEVANS-FONTI, J GAY, T E SUSSAN, J C JUN, A C MYERS, G OLIVECRONA, A R SCHWARTZ, N HALBERG, P E SCHERER, G L SEMENZA, D R POWELL a V Y POLOTSKY, 2013a. Chronic Intermittent Hypoxia Induces Atherosclerosis via Activation of Adipose Angiopoietin-like 4. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 15. 7., roč. 188, č. 1535-4970 (Electronic), s. 240–248.

DRAGER, L F, Q YAO, K L HERNANDEZ, M K SHIN, S BEVANS-FONTI, J GAY, T E SUSSAN, J C JUN, A C MYERS, G OLIVECRONA, A R SCHWARTZ, N HALBERG, P E SCHERER, G L SEMENZA, D R POWELL a V Y POLOTSKY, 2013b. Chronic Intermittent Hypoxia Induces Atherosclerosis via Activation of Adipose Angiopoietin-like 4. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*

DUMONT, Marie, Valérie LANCTÔT, Raphaëlle CADIEUX-VIAU a Jean PAQUET, 2012. Melatonin production and light exposure of rotating night workers. *Chronobiology international* [online]. 3., roč. 29, č. 2, s. 203–10. ISSN 1525-6073. Dostupné z: doi:10.3109/07420528.2011.647177

ECKEL-MAHAN, K L, V R PATEL, R P MOHNEY, K S VIGNOLA, P BALDI a P SASSONE-CORSI, 2012. Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*

ERIKSSON, Anna-Karin, Maureen VAN DEN DONK, Agneta HILDING a Claes-Göran ÖSTENSON, 2013. Work stress, sense of coherence, and risk of type 2 diabetes in a prospective study of middle-aged Swedish men and women. *Diabetes care* [online]. 9., roč. 36, č. 9, s. 2683–9. ISSN 1935-5548. Dostupné z: doi:10.2337/dc12-1738

ESQUIROL, Yolande, Vanina BONGARD, Laurence MABILE, Bernard JONNIER, Jean-Marc SOULAT a Bertrand PERRET, 2009. Shift work and metabolic syndrome: respective impacts of job strain, physical activity, and dietary rhythms. *Chronobiology international* [online]. 4., roč. 26, č. 3, s. 544–59. ISSN 1525-6073. Dostupné z: doi:10.1080/07420520902821176

EVANS, Jennifer A a Alec J DAVIDSON, 2013. Health consequences of circadian disruption in humans and animal models. *Progress in molecular biology and translational science* [online]. roč. 119, s. 283–323. ISSN 1878-0814. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-396971-2.00010-5

FARIA, J A, A KINOTE, L M IGNACIO-SOUZA, T M DE ARAUJO, D S RAZOLLI, D L DONEDA, L B PASCHOAL, C LELLIS-SANTOS, G L BERTOLINI, L A VELLOSO, S BORDIN a G F ANHE, 2013. Melatonin acts through MT1/MT2 receptors to activate hypothalamic Akt and suppress hepatic gluconeogenesis in rats. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 15. 7., roč. 305, č. 1522-1555 (Electronic), s. E230–E242.

FENIK, V B, T SINGLETARY, J L BRANCONI, R O DAVIES a L KUBIN, 2012. Glucoregulatory consequences and cardiorespiratory parameters in rats exposed to chronic-intermittent hypoxia: effects of the duration of exposure and losartan 2. *Front Neurol.*

FILIPP, Fabian V., David A. SCOTT, Ze'ev A. RONAI, Andrei L. OSTERMAN a Jeffrey W. SMITH, 2012. Reverse TCA cycle flux through isocitrate dehydrogenases 1 and 2 is required for lipogenesis in hypoxic melanoma cells. *Pigment Cell & Melanoma Research* [online]. 5., roč. 25, č. 3, s. 375–383. ISSN 17551471. Dostupné z: doi:10.1111/j.1755-148X.2012.00989.x

FIORENTINI, A, R VALENTE, A PERCIACCANTE a L TUBANI, 2007. Sleep's quality disorders in patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus 21. *Int.J.Cardiol.* 8. 1., roč. 114, č. 1874-1754 (Electronic), s. E50–E52.

FIORI, C Z, D MARTINEZ, D BARONIO, D P DA ROSA, N A KRETZMANN, L F FORGIARINI, C C MONTANARI, N P MARRONI a A CARISSIMI, 2013. Downregulation of uncoupling protein-1 mRNA expression and hypo adiponectinemia in a mouse model of sleep apnea. *Sleep Breath.* 14. 12., č. 1522-1709 (Electronic).

FLINT, J, S V KOTHARE, M ZIHLIF, E SUAREZ, R ADAMS, A LEGIDO a Luca F DE, 2007. Association between inadequate sleep and insulin resistance in obese children.

*J.Pediatr.*

FOLKARD, S, 2008. Do permanent night workers show circadian adjustment? A review based on the endogenous melatonin rhythm 3. *Chronobiol.Int.*

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

GALE, J E, H I COX, J QIAN, G D BLOCK, C S COLWELL a A V MATVEYENKO, 2011. Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction. *J.Biol.Rhythms.*

GANGWISCH, J E, S B HEYMSFIELD, B BODEN-ALBALA, R M BUIJS, F KREIER, T G PICKERING, A G RUNDLE, G K ZAMMIT a D MALASPINA, 2007. Sleep duration as a risk factor for diabetes incidence in a large U.S. sample 40. *Sleep.* 12., roč. 30, č. 0161-8105 (Print), s. 1667–1673.

GIACCA, A, C XIAO, A I OPRESCU, A C CARPENTIER a G F LEWIS, 2011. Lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction: focus on in vivo studies. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 2., roč. 300, č. 1522-1555 (Electronic), s. E255–E262.

GOMEZ-ABELLAN, P, A EZ-NOGUERA, J A MADRID, J A LUJAN, J M ORDOVAS a M GARAULET, 2012. Glucocorticoids affect 24 h clock genes expression in human adipose tissue explant cultures. *PLoS.ONE.*

GONZALEZ-ORTIZ, M, E MARTINEZ-ABUNDIS, B R BALCAZAR-MUNOZ a S PASCOE-GONZALEZ, 2000. Effect of sleep deprivation on insulin sensitivity and cortisol concentration in healthy subjects. *Diabetes Nutr.Metab.* 4., roč. 13, č. 0394-3402 (Print), s. 80–83.

GOODRIDGE, A G a E G BALL, 1965. Studies on the metabolism of adipose tissue. 18. In vitro effects of insulin, epinephrine and glucagon on lipolysis and glycolysis in pigeon adipose tissue. *Comp Biochem Physiol.* 12., roč. 16, č. 4, s. 367–381.

GOTTLIEB, D J, N M PUNJABI, A B NEWMAN, H E RESNICK, S REDLINE, C M BALDWIN a F J NIETO, 2005. Association of sleep time with diabetes mellitus and

impaired glucose tolerance . *Arch Intern.Med.*

GRUNDY, Anne, Maria SANCHEZ, Harriet RICHARDSON, Joan TRANMER, Marilyn BORUGIAN, Charles H GRAHAM a Kristan J ARONSON, 2009. Light intensity exposure, sleep duration, physical activity, and biomarkers of melatonin among rotating shift nurses. *Chronobiology international* [online]. 10., roč. 26, č. 7, s. 1443–61. ISSN 1525-6073. Dostupné z: doi:10.3109/07420520903399987

GUILLEMINAULT, C, N B POWELL, S MARTINEZ, C KUSHIDA, T RAFFRAY, L PALOMBINI a P PHILIP, 2003. Preliminary observations on the effects of sleep time in a sleep restriction paradigm. *Sleep Med.* 5., roč. 4, č. 1389-9457 (Print), s. 177–184.

GUO, Yanjun, Yuewei LIU, Xiji HUANG, Yi RONG, Meian HE, Youjie WANG, Jing YUAN, Tangchun WU a Weihong CHEN, 2013. The effects of shift work on sleeping quality, hypertension and diabetes in retired workers. *PloS one* [online]. roč. 8, č. 8, s. e71107. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0071107

HA, E, S V YIM, J H CHUNG, K S YOON, I KANG, Y H CHO a H H BAIK, 2006. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J.Pineal Res.* 8., roč. 41, č. 0742-3098 (Print), s. 67–72.

HA, Jaehyeok, Soo-Geun KIM, Domyung PAEK a Jungsun PARK, 2011. The Magnitude of Mortality from Ischemic Heart Disease Attributed to Occupational Factors in Korea - Attributable Fraction Estimation Using Meta-analysis. *Safety and Health at Work* [online]. 3., roč. 2, č. 1, s. 70–82. ISSN 20937911. Dostupné z: doi:10.5491/SHAW.2011.2.1.70

HALL, M H, M F MULDOON, J R JENNINGS, D J BUYSSE, J D FLORY a S B MANUCK, 2008. Self-reported sleep duration is associated with the metabolic syndrome in midlife adults 35. *Sleep.* 5., roč. 31, č. 0161-8105 (Print), s. 635–643.

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.

HAUS, Erhard L a Michael H SMOLENSKY, 2013. Shift work and cancer risk: potential mechanistic roles of circadian disruption, light at night, and sleep deprivation. *Sleep medicine reviews* [online]. 8., roč. 17, č. 4, s. 273–84. ISSN 1532-2955. Dostupné

z: doi:10.1016/j.smr.2012.08.003

HAYASHINO, Y, S FUKUHARA, Y SUZUKAMO, T OKAMURA, T TANAKA a H UESHIMA, 2007. Relation between sleep quality and quantity, quality of life, and risk of developing diabetes in healthy workers in Japan: the High-risk and Population Strategy for Occupational Health Promotion (HIPOP-OHP) Study. *BMC.Public Health*. roč. 7, č. 1471-2458 (Electronic), s. 129.

HAYES, A L, F XU, D BABINEAU a S R PATEL, 2011. Sleep duration and circulating adipokine levels. *Sleep*. 2., roč. 34, č. 1550-9109 (Electronic), s. 147–152.

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

HOEKS, J, M MENSINK, M K HESSELINK, K EKROOS a P SCHRAUWEN, 2012. Long- and medium-chain fatty acids induce insulin resistance to a similar extent in humans despite marked differences in muscle fat accumulation. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 1., roč. 97, č. 1945-7197 (Electronic), s. 208–216.

HOLM, J, P BJORNTORP a T SCHERSTEN, 1973. Metabolic activity in rat skeletal muscle. Effect of intermittent hypoxia. *Eur J Clin Invest*. 7., roč. 3, č. 4, s. 279–283.

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, Shangyou, 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.

HOSOGAI, N, A FUKUHARA, K OSHIMA, Y MIYATA, S TANAKA, K SEGAWA, S FURUKAWA, Y TOCHINO, R KOMURO, M MATSUDA a I SHIMOMURA, 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 4., roč. 56, č. 0012-1797 (Print), s. 901–911.

HUNG, H C, Y C YANG, H Y OU, J S WU, F H LU a C J CHANG, 2013. The relationship between impaired fasting glucose and self-reported sleep quality in a Chinese population. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*. 4., roč. 78, č. 1365-2265 (Electronic), s. 518–524.

CHAPMAN, C D, C BENEDICT, S J BROOKS a H B SCHIOTH, 2012. Lifestyle determinants of the drive to eat: a meta-analysis. *Am.J.Clin.Nutr*. 9., roč. 96, č. 1938-3207 (Electronic), s. 492–497.

CHAPUT, J P, J P DESPRES, C BOUCHARD a A TREMBLAY, 2007. Association of sleep duration with type 2 diabetes and impaired glucose tolerance 18. *Diabetologia*. 11., roč. 50, č. 0012-186X (Print), s. 2298–2304.

CHARLES, M A, E ESCHWEGE, N THIBULT, J R CLAUDE, J M WARNET, G E ROSSELIN, J GIRARD a B BALKAU, 1997. The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study 1. *Diabetologia*. 9., roč. 40, č. 0012-186X (Print), s. 1101–1106.

CHEN, B, K S LAM, Y WANG, D WU, M C LAM, J SHEN, L WONG, R L HOO, J ZHANG a A XU, 2006. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*.

CHEN, X, N IQBAL a G BODEN, 1999. The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects 1. *J.Clin.Invest*. 2., roč. 103, č. 0021-9738 (Print), s. 365–372.

CHEN, X Y, Y M ZENG, Y X ZHANG, W Y WANG a R H WU, 2013. Effect of chronic intermittent hypoxia on theophylline metabolism in mouse liver. *Chin Med J (Engl)*. 1., roč. 126, č. 1, s. 118–123.

CHIBALIN, A V, Y LENG, E VIEIRA, A KROOK, M BJORNHOLM, Y C LONG, O KOTOVA, Z ZHONG, F SAKANE, T STEILER, C NYLEN, J WANG, M LAAKSO, M K TOPHAM, M GILBERT, H WALLBERG-HENRIKSSON a J R ZIERATH, 2008.

Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance. *Cell*. 8. 2., roč. 132, č. 1097-4172 (Electronic), s. 375–386.

CHIEN, K L, P C CHEN, H C HSU, T C SU, F C SUNG, M F CHEN a Y T LEE, 2010. Habitual sleep duration and insomnia and the risk of cardiovascular events and all-cause death: report from a community-based cohort 109. *Sleep*.

IYORI, Nao, Laura C ALONSO, Jianguo LI, Mark H SANDERS, Adolfo GARCIA-OCANA, Robert M O'DOHERTY, Vsevolod Y POLOTSKY a Christopher P O'DONNELL, 2007. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *American journal of respiratory and critical care medicine* [online]. 15. 4., roč. 175, č. 8, s. 851–7. ISSN 1073-449X. Dostupné z: doi:10.1164/rccm.200610-1527OC

IKEHARA, S, H ISO, C DATE, S KIKUCHI, Y WATANABE, Y WADA, Y INABA a A TAMAKOSHI, 2009. Association of sleep duration with mortality from cardiovascular disease and other causes for Japanese men and women: the JACC study. *Sleep*.

IL'YASOVA, D., F. WANG, R. B. D'AGOSTINO, A. HANLEY a L. E. WAGENKNECHT, 2010. Prospective association between fasting NEFA and type 2 diabetes: impact of post-load glucose. *Diabetologia* [online]. 9. 5., roč. 53, č. 5, s. 866–874. ISSN 0012-186X. Dostupné z: doi:10.1007/s00125-010-1657-4

IP, M S, B LAM, M M NG, W K LAM, K W TSANG a K S LAM, 2002. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance 3. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. 1. 3., roč. 165, č. 1073-449X (Print), s. 670–676.

ISHIDA, A, T MUTOH, T UEYAMA, H BANDO, S MASUBUCHI, D NAKAHARA, G TSUJIMOTO a H OKAMURA, 2005. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab*. 11., roč. 2, č. 1550-4131 (Print), s. 297–307.

ITANI, S I, N B RUDERMAN, F SCHMIEDER a G BODEN, 2002. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes*. 7., roč. 51, č. 0012-1797 (Print), s. 2005–2011.

JENNINGS, J R, M F MULDOON, M HALL, D J BUYSSE a S B MANUCK, 2007. Self-reported sleep quality is associated with the metabolic syndrome 20. *Sleep*. 2., roč. 30, č. 0161-8105 (Print), s. 219–223.

JIAO, K, H LIU, J CHEN, D TIAN, J HOU a A D KAYE, 2008. Roles of plasma interleukin-



6 and tumor necrosis factor-alpha and FFA and TG in the development of insulin resistance induced by high-fat diet. *Cytokine*. 5., roč. 42, č. 1096-0023 (Electronic), s. 161–169.

JUN, J C, L F DRAGER, S S NAJJAR, S S GOTTLIEB, C D BROWN, P L SMITH, A R SCHWARTZ a V Y POLOTSKY, 2011. Effects of sleep apnea on nocturnal free fatty acids in subjects with heart failure. *Sleep*. 9., roč. 34, č. 9, s. 1207–1213.

JUN, J, C REINKE, D BEDJA, D BERKOWITZ, S BEVANS-FONTI, J LI, L A BAROUCH, K GABRIELSON a V Y POLOTSKY, 2010. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. In: *Atherosclerosis*. s. 381–386.

JUN, J, V SAVRANSKY, A NANAYAKKARA, S BEVANS, J LI, P L SMITH a V Y POLOTSKY, 2008. Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*.

KARLSSON, B, 2001. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27 485 people. *Occupational and Environmental Medicine* [online]. 1. 11., roč. 58, č. 11, s. 747–752. ISSN 13510711. Dostupné z: doi:10.1136/oem.58.11.747

KARLSSON, B, L ALFREDSSON, A KNUTSSON, E ANDERSSON a K TOREN, 2005a. Total mortality and cause-specific mortality of Swedish shift- and dayworkers in the pulp and paper industry in 1952-2001. *Scand.J.Work Environ.Health*. 2., roč. 31, č. 0355-3140 (Print), s. 30–35.

KARLSSON, Berndt, Lars ALFREDSSON, Anders KNUTSSON, Eva ANDERSSON a Kjell TORÉN, 2005b. Total mortality and cause-specific mortality of Swedish shift- and dayworkers in the pulp and paper industry in 1952-2001. *Scandinavian journal of work, environment & health* [online]. 2., roč. 31, č. 1, s. 30–5. ISSN 0355-3140. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15751616>

KAWADA, Tomoyuki a Toshiaki OTSUKA, 2014. Effect of shift work on the development of metabolic syndrome after 3 years in Japanese male workers. *Archives of environmental & occupational health* [online]. roč. 69, č. 1, s. 55–61. ISSN 1933-8244. Dostupné z: doi:10.1080/19338244.2012.732123

KAWACHI, I, G A COLDITZ, M J STAMPFER, W C WILLETT, J E MANSON, F E SPEIZER a C H HENNEKENS, 1995a. Prospective study of shift work and risk of coronary heart disease in women. *Circulation*. 1. 12., roč. 92, č. 0009-7322 (Print), s. 3178–3182.

- KAWACHI, I, G A COLDITZ, M J STAMPFER, W C WILLETT, J E MANSON, F E SPEIZER a C H HENNEKENS, 1995b. Prospective study of shift work and risk of coronary heart disease in women. *Circulation* [online]. 1. 12., roč. 92, č. 11, s. 3178–82. ISSN 0009-7322. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7586301>
- KAWAKAMI, N, N TAKATSUKA a H SHIMIZU, 2004. Sleep disturbance and onset of type 2 diabetes 47. *Diabetes Care*. 1., roč. 27, č. 0149-5992 (Print), s. 282–283.
- KELLEY, D E a L J MANDARINO, 2000. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*. 5., roč. 49, č. 0012-1797 (Print), s. 677–683.
- KENNAWAY, D J, T J VARCOE, A VOULTSIOS a M J BODEN, 2013. Global loss of bmal1 expression alters adipose tissue hormones, gene expression and glucose metabolism. *PLoS.ONE*.
- KITA, T, E YOSHIOKA, H SATOH, Y SAIJO, M KAWAHARADA, E OKADA a R KISHI, 2012. Short sleep duration and poor sleep quality increase the risk of diabetes in Japanese workers with no family history of diabetes 38. *Diabetes Care*. 2., roč. 35, č. 1935-5548 (Electronic), s. 313–318.
- KITAGAWA, A, Y OHTA a K OHASHI, 2012. Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. *J.Pineal Res*. 5., roč. 52, č. 1600-079X (Electronic), s. 403–413.
- KNUTSON, K L, 2010. Sleep duration and cardiometabolic risk: a review of the epidemiologic evidence. *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab*. 10., roč. 24, č. 1878-1594 (Electronic), s. 731–743.
- KNUTSON, K L, A M RYDEN, B A MANDER a Cauter E VAN, 2006. Role of sleep duration and quality in the risk and severity of type 2 diabetes mellitus 19. *Arch Intern.Med*. 18. 9., roč. 166, č. 0003-9926 (Print), s. 1768–1774.
- KNUTSON, K L, Cauter E VAN, P ZEE, K LIU a D S LAUDERDALE, 2011. Cross-sectional associations between measures of sleep and markers of glucose metabolism among subjects with and without diabetes: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Sleep Study. *Diabetes Care*. 5., roč. 34, č. 1935-5548 (Electronic), s. 1171–1176.
- KNUTSSON, A, T AKERSTEDT, B G JONSSON a K ORTH-GOMER, 1986. Increased risk of ischaemic heart disease in shift workers. *Lancet*. 12. 7., roč. 2, č. 0140-6736 (Print), s. 89–92.

KOCH, C J, 1984. A thin-film culturing technique allowing rapid gas-liquid equilibration (6 sec) with no toxicity to mammalian cells. *Radiat.Res.*

KORKMAZ, G G, H UZUN, U CAKATAY a S AYDIN, 2012. Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury. *Clin.Invest Med.* roč. 35, č. 1488-2353 (Electronic), s. E370–E377.

KUBOTA, N, T KUBOTA, S ITOH, H KUMAGAI, H KOZONO, I TAKAMOTO, T MINEYAMA, H OGATA, K TOKUYAMA, M OHSUGI, T SASAKO, M MOROI, K SUGI, S KAKUTA, Y IWAKURA, T NODA, S OHNISHI, R NAGAI, K TOBE, Y TERAUCHI, K UEKI a T KADOWAKI, 2008. Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab.* 7., roč. 8, č. 1932-7420 (Electronic), s. 49–64.

KUHN, E, V BRODAN, M BRODANOVA a K RYSANEK, 1969. Metabolic reflection of sleep deprivation 52. *Act.Nerv.Super.(Praha).* roč. 11, č. 0001-7604 (Print), s. 165–174.

KUMARI, M, E BADRICK, J FERRIE, A PERSKI, M MARMOT a T CHANDOLA, 2009. Self-reported sleep duration and sleep disturbance are independently associated with cortisol secretion in the Whitehall II study. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 12., roč. 94, č. 1945-7197 (Electronic), s. 4801–4809.

LAFONTAN, M, 2008. Advances in adipose tissue metabolism. *Int.J.Obes.(Lond).*

LAFONTAN, M a M BERLAN, 1995. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis 1. *Endocrine Reviews.* 12., roč. 16, č. 0163-769X (Print), s. 716–738.

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.*

LANGIN, Dominique, 2006. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacological research* [online]. 6., roč. 53, č. 6, s. 482–91. ISSN 1043-6618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2006.03.009

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.

LEE, J, M MOULIK, Z FANG, P SAHA, F ZOU, Y XU, D L NELSON, K MA, D D MOORE a V K YECHOOR, 2013. Bmal1 and beta-cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and their loss of function leads to oxidative stress-induced beta-cell failure in mice. *Mol.Cell Biol*. 6., roč. 33, č. 1098-5549 (Electronic), s. 2327–2338.

LEPROULT, R, G COPINSCHI, O BUXTON a Cauter E VAN, 1997. Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening 72. *Sleep*. 10., roč. 20, č. 0161-8105 (Print), s. 865–870.

LEPROULT, R a Cauter E VAN, 2011. Effect of 1 week of sleep restriction on testosterone levels in young healthy men 69. *JAMA*. 1. 6., roč. 305, č. 1538-3598 (Electronic), s. 2173–2174.

LEVY, P, M R BONSIGNORE a J ECKEL, 2009. Sleep, sleep-disordered breathing and metabolic consequences. *Eur.Respir.J*. 7., roč. 34, č. 1399-3003 (Electronic), s. 243–260.

LEWIS, G F, A CARPENTIER, K ADELI a A GIACCA, 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes 1. *Endocrine Reviews*.

LI, J, M BOSCH-MARCE, A NANAYAKKARA, V SAVRANSKY, S K FRIED, G L SEMENZA a V Y POLOTSKY, 2006. Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Physiol Genomics*. 16. 5., roč. 25, č. 1531-2267 (Electronic), s. 450–457.

LI, J, L N THORNE, N M PUNJABI, C K SUN, A R SCHWARTZ, P L SMITH, R L MARINO, A RODRIGUEZ, W C HUBBARD, C P O'DONNELL a V Y POLOTSKY, 2005. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circulation Research*.

LOPEZ-JIMENEZ, Francisco, Fatima H. SERT KUNIYOSHI, Apoor GAMI a Virend K. SOMERS, 2008. Obstructive Sleep Apnea. *Chest* [online]. 3., roč. 133, č. 3, s. 793–804. ISSN 00123692. Dostupné z: doi:10.1378/chest.07-0800

- LOUIS, M a N M PUNJABI, 2009. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J.Appl.Physiol.* 5., roč. 106, č. 8750-7587 (Print), s. 1538–1544.
- LUND, J, J ARENDT, S M HAMPTON, J ENGLISH a L M MORGAN, 2001. Postprandial hormone and metabolic responses amongst shift workers in Antarctica. *J.Endocrinol.* 12., roč. 171, č. 0022-0795 (Print), s. 557–564.
- MAGALANG, U J, J P CRUFF, R RAJAPPAN, M G HUNTER, T PATEL, C B MARSH, S V RAMAN a N L PARINANDI, 2009. Intermittent hypoxia suppresses adiponectin secretion by adipocytes. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes.*
- MAGEE, Christopher A, Xu-Feng HUANG, Donald C IVERSON a Peter CAPUTI, 2009. Acute sleep restriction alters neuroendocrine hormones and appetite in healthy male adults 95. *Sleep and Biological Rhythms.*
- MALLON, L, J E BROMAN a J HETTA, 2005. High incidence of diabetes in men with sleep complaints or short sleep duration: a 12-year follow-up study of a middle-aged population 43. *Diabetes Care.* 11., roč. 28, č. 0149-5992 (Print), s. 2762–2767.
- MARCHEVA, B, K M RAMSEY, E D BUHR, Y KOBAYASHI, H SU, C H KO, G IVANOVA, C OMURA, S MO, M H VITATERNA, J P LOPEZ, L H PHILIPSON, C A BRADFIELD, S D CROSBY, L JEBAILEY, X WANG, J S TAKAHASHI a J BASS, 2010. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature.*
- 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.
- 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.*
- MATTHEWS, K A, R E DAHL, J F OWENS, L LEE a M HALL, 2012. Sleep duration and insulin resistance in healthy black and white adolescents 26. *Sleep.* roč. 35, č. 1550-9109 (Electronic), s. 1353–1358.
- MEISINGER, C, M HEIER a H LOEWEL, 2005. Sleep disturbance as a predictor of type 2 diabetes mellitus in men and women from the general population 45. *Diabetologia.* 2.,

roč. 48, č. 0012-186X (Print), s. 235–241.

METZEN, E, M WOLFF, J FANDREY a W JELKMANN, 1995. Pericellular PO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> 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

MIKUNI, E, T OHOSHI, K HAYASHI a K MIYAMURA, 1983a. Glucose intolerance in an employed population. *Tohoku J.Exp.Med.* 12., roč. 141 Suppl, č. 0040-8727 (Print), s. 251–256.

MIKUNI, E, T OHOSHI, K HAYASHI a K MIYAMURA, 1983b. Glucose intolerance in an employed population. *Tohoku J.Exp.Med.*

MINVILLE, C, M N HILLERET, R TAMISIER, J RON-WISNEWSKY, K CLEMENT, C TROCME, J C BOREL, P LEVY, J P ZARSKI a J L PEPIN, 2014. Nonalcoholic fatty liver disease, nocturnal hypoxia, and endothelial function in patients with sleep apnea. *Chest.* 1. 3., roč. 145, č. 1931-3543 (Electronic), s. 525–533.

MONK, T H a D J BUYSSE, 2013. Exposure to shift work as a risk factor for diabetes. *J.Biol.Rhythms.*

MORIKAWA, Y, H NAKAGAWA, K MIURA, Y SOYAMA, M ISHIZAKI, T KIDO, Y NARUSE, Y SUWAZONO a K NOGAWA, 2005. Shift work and the risk of diabetes mellitus among Japanese male factory workers. *Scand.J.Work Environ.Health.* 6., roč. 31, č. 0355-3140 (Print), s. 179–183.

MORSELLI, L L, A GUYON a K SPIEGEL, 2012. Sleep and metabolic function 100. *Pflugers Arch.* 1., roč. 463, č. 1432-2013 (Electronic), s. 139–160.

NAJAFIAN, J, N MOHAMADIFARD, Z D SIADAT, G SADRI a M R RAHMATI, 2013. Association between sleep duration and diabetes mellitus: Isfahan Healthy Heart Program 23. *Niger.J.Clin.Pract.*

NAKAJIMA, H, Y KANEITA, E YOKOYAMA, S HARANO, T TAMAKI, E IBUKA, A KANEKO, I TAKAHASHI, T UMEDA, S NAKAJI a T OHIDA, 2008. Association between sleep duration and hemoglobin A1c level 33. *Sleep Med.* 10., roč. 9, č. 1389-9457 (Print), s. 745–752.

NAKANISHI-MINAMI, T, K KISHIDA, T FUNAHASHI a I SHIMOMURA, 2012. Sleep-wake cycle irregularities in type 2 diabetics 31. *Diabetol.Metab Syndr.* roč. 4, č. 1758-5996

(Electronic), s. 18.

NEDELTCHEVA, A V, L KESSLER, J IMPERIAL a P D PENEV, 2009a. Exposure to recurrent sleep restriction in the setting of high caloric intake and physical inactivity results in increased insulin resistance and reduced glucose tolerance. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*

NEDELTCHEVA, A V, J M KILKUS, J IMPERIAL, K KASZA, D A SCHOELLER a P D PENEV, 2009b. Sleep curtailment is accompanied by increased intake of calories from snacks 80. *Am.J.Clin.Nutr.* 1., roč. 89, č. 1938-3207 (Electronic), s. 126–133.

NEDELTCHEVA, A V, J M KILKUS, J IMPERIAL, D A SCHOELLER a P D PENEV, 2010. Insufficient sleep undermines dietary efforts to reduce adiposity 92. *Ann.Intern.Med.*

NEMCOVA-FURSTOVA, V, R F JAMES a J KOVAR, 2011. Inhibitory effect of unsaturated fatty acids on saturated fatty acid-induced apoptosis in human pancreatic beta-cells: activation of caspases and ER stress induction. *Cell Physiol Biochem.*

NIEDHAMMER, I, F LERT a M J MARNE, 1996. Prevalence of overweight and weight gain in relation to night work in a nurses' cohort. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity* [online]. roč. 20, č. 7, s. 625–33. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8817356>

NILSSON, P M, M ROOST, G ENGSTROM, B HEDBLAD a G BERGLUND, 2004. Incidence of diabetes in middle-aged men is related to sleep disturbances 46. *Diabetes Care.* 10., roč. 27, č. 0149-5992 (Print), s. 2464–2469.

NISHIDA, S, T SEGAWA, I MURAI a S NAKAGAWA, 2002. Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. *J.Pineal Res.* 1., roč. 32, č. 0742-3098 (Print), s. 26–33.

NOGUEIRA, T C, C LELLIS-SANTOS, D S JESUS, M TANEDA, S C RODRIGUES, F G AMARAL, A M LOPES, J CIPOLLA-NETO, S BORDIN a G F ANHE, 2011. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. *Endocrinology.*

NORTHCOTT, J M, A YEGANEH, C G TAYLOR, P ZAHRADKA 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.

NUNNARI, J J, T ZAND, I JORIS a G MAJNO, 1989. Quantitation of oil red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats. *Exp.Mol.Pathol.* 8., roč. 51, č. 0014-4800 (Print), s. 1–8.

OHKUMA, T, H FUJII, M IWASE, Y KIKUCHI, S OGATA, Y IDEWAKI, H IDE, Y DOI, Y HIRAKAWA, U NAKAMURA a T KITAZONO, 2013. Impact of sleep duration on obesity and the glycemic level in patients with type 2 diabetes: the Fukuoka Diabetes Registry. *Diabetes Care.* 3., roč. 36, č. 1935-5548 (Electronic), s. 611–617.

OISHI, K, N AMAGAI, H SHIRAI, K KADOTA, N OHKURA a N ISHIDA, 2005. Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res.*

OMISADE, A, O M BUXTON a B RUSAK, 2010. Impact of acute sleep restriction on cortisol and leptin levels in young women 93. *Physiol Behav.* 19. 4., roč. 99, č. 1873-507X (Electronic), s. 651–656.

ONSO-VALE, M I, S ANDREOTTI, P Y MUKAI, Cd BORGES-SILVA, S B PERES, J CIPOLLA-NETO a F B LIMA, 2008. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *J.Pineal Res.* 11., roč. 45, č. 1600-079X (Electronic), s. 422–429.

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.

OTA, H, S TAMAKI, A ITAYA-HIRONAKA, A YAMAUCHI, S SAKURAMOTO-TSUCHIDA, T MORIOKA, S TAKASAWA a H KIMURA, 2012. Attenuation of glucose-induced insulin secretion by intermittent hypoxia via down-regulation of CD38. *Life Sci.*

OTSUKA, T, M GOTO, M KAWAI, Y TOGO, K SATO, K KATOH, M FURUSE a S YASUO, 2012. Photoperiod regulates corticosterone rhythms by altered adrenal sensitivity via melatonin-independent mechanisms in Fischer 344 rats and C57BL/6J mice. *PLoS.ONE.* roč. 7, č. 1932-6203 (Electronic), s. e39090.

OTTO, C M a J E BAUMGARDNER, 2001. Effect of culture PO<sub>2</sub> on macrophage (RAW 264.7) nitric oxide production. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 2., roč. 280, č. 0363-6143 (Print), s. C280–C287.

PALLAYOVA, M, V DONIC, S GRESOVA, I PEREGRIM a Z TOMORI, 2010a. Do



differences in sleep architecture exist between persons with type 2 diabetes and nondiabetic controls? 32. *J.Diabetes Sci Technol*.

PALLAYOVA, M, K E STEELE, T H MAGNUSON, M A SCHWEITZER, N R HILL, S BEVANS-FONTI a A R SCHWARTZ, 2010b. Sleep apnea predicts distinct alterations in glucose homeostasis and biomarkers in obese adults with normal and impaired glucose metabolism. *Cardiovasc.Diabetol*. roč. 9, č. 1475-2840 (Electronic), s. 83.

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

PAOLISSO, G, A GAMBARDELLA, L AMATO, R TORTORIELLO, A D'AMORE, M VARRICCHIO a F D'ONOFRIO, 1995. Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects 2. *Diabetologia*. 11., roč. 38, č. 0012-186X (Print), s. 1295–1299.

PARK, J H, H M SHIM, A Y NA, K C BAE, J H BAE, S S IM, H C CHO a D K SONG, 2013. Melatonin prevents pancreatic beta-cell loss due to glucotoxicity: the relationship between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *J.Pineal Res*. 29. 10., č. 1600-079X (Electronic).

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/ajrcm.160.6.9807074

PASTORIS, O, A GORINI, L VERCESI, M TAGLIETTI a M DOSSENA, 1985. Modification of the skeletal muscle energy metabolism induced by intermittent normobaric hypoxia and treatment with biological pyrimidines. *Farmaco Sci*. 6., roč. 40, č. 0430-0920 (Print), s. 442–453.

PATEL, Y C, F P ALFORD a H G BURGER, 1972. The 24-hour plasma thyrotrophin profile. *Clinical Science*. 7., roč. 43, č. 0009-9287 (Print), s. 71–77.

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.

PEZUK, P, J A MOHAWK, L A WANG a M MENAKER, 2012. Glucocorticoids as entraining signals for peripheral circadian oscillators. *Endocrinology*.

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.

POLAK, J, E KLIMCAKOVA, C MORO, N VIGUERIE, M BERLAN, J HEJNOVA, B RICHTEROVA, I KRAUS, D LANGIN a V STICH, 2006. Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in obese women 1. *Metabolism*. 10., roč. 55, č. 0026-0495 (Print), s. 1375–1381.

POLAK, Jan, Larissa a SHIMODA, Luciano F DRAGER, Clark UNDEM, Holly MCHUGH, Vsevolod Y POLOTSKY a Naresh M PUNJABI, 2013. Intermittent Hypoxia Impairs Glucose Homeostasis in C57BL6/J Mice: Partial Improvement with Cessation of the Exposure. *Sleep* [online]. roč. 36, č. 10, s. 1483–1490. ISSN 0161-8105. Dostupné z: doi:10.5665/sleep.3040

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*.

POLOTSKY, V Y, J LI, N M PUNJABI, A E RUBIN, P L SMITH, A R SCHWARTZ a C P O'DONNELL, 2003a. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J.Physiol*. 1. 10., roč. 552, č. 0022-3751 (Print), s. 253–264.

POLOTSKY, V Y, J LI, N M PUNJABI, A E RUBIN, P L SMITH, A R SCHWARTZ a C P O'DONNELL, 2003b. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J.Physiol*.

POLOTSKY, V Y, S P PATIL, V SAVRANSKY, A LAFFAN, S FONTI, L A FRAME, K E STEELE, M A SCHWEIZTER, J M CLARK, M S TORBENSON a A R SCHWARTZ, 2009. Obstructive sleep apnea, insulin resistance, and steatohepatitis in severe obesity. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. 1. 2., roč. 179, č. 1535-4970 (Electronic), s. 228–234.

POSTIC, Catherine a Jean GIRARD, 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of clinical investigation* [online]. 3., roč. 118, č. 3, s. 829–38. ISSN 0021-9738.

Dostupné z: doi:10.1172/JCI34275

POULAIN, L, A THOMAS, J RIEUSSET, L CASTEILLA, P LEVY, C ARNAUD a M DEMATTEIS, 2014. Visceral white fat remodelling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Eur.Respir.J.* 2., roč. 43, č. 1399-3003 (Electronic), s. 513–522.

PRABHAKAR, N R a G K KUMAR, 2010. Mechanisms of sympathetic activation and blood pressure elevation by intermittent hypoxia. *Respir.Physiol Neurobiol.* 30. 11., roč. 174, č. 1878-1519 (Electronic), s. 156–161.

PRABHAKAR, N R, G K KUMAR a Y J PENG, 2012. Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J.Appl.Physiol (1985.)*. 15. 10., roč. 113, č. 1522-1601 (Electronic), s. 1304–1310.

PREVIS, S F, D J WITHERS, J M REN, M F WHITE a G I SHULMAN, 2000. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *Journal of Biological Chemistry*.

PRIGGE, W F a F GRANDE, 1971. Effects of glucagon, epinephrine and insulin on in vitro lipolysis of adipose tissue from mammals and birds. *Comp Biochem.Physiol B.* 15. 5., roč. 39, č. 0305-0491 (Print), s. 69–82.

PTITSYN, A A, S ZVONIC, S A CONRAD, L K SCOTT, R L MYNATT a J M GIMBLE, 2006. Circadian clocks are resounding in peripheral tissues. *PLoS.Comput.Biol.*

PUNJABI, N M, 2008. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 15. 2., roč. 5, č. 1546-3222 (Print), s. 136–143.

PUNJABI, N M, 2009. Do sleep disorders and associated treatments impact glucose metabolism? 1. *Drugs*.

PUNJABI, N M, B S CAFFO, J L GOODWIN, D J GOTTLIEB, A B NEWMAN, G T O'CONNOR, D M RAPOPORT, S REDLINE, H E RESNICK, J A ROBBINS, E SHAHAR, M L UNRUH a J M SAMET, 2009. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study 2. *PLoS.Med.* 8., roč. 6, č. 1549-1676 (Electronic), s. e1000132.

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

RAMIREZ-ZACARIAS, J L, F CASTRO-MUNOZLEDO a W KURI-HARCUCH, 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*. 7., roč. 97, č. 0301-5564 (Print), s. 493–497.

RANDLE, P J, 1998. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*. 12., roč. 14, č. 0742-4221 (Print), s. 263–283.

REAVEN, G M, C HOLLENBECK, C Y JENG, M S WU a Y D CHEN, 1988. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM 1. *Diabetes*. 8., roč. 37, č. 0012-1797 (Print), s. 1020–1024.

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

REGAZZETTI, C, P PERALDI, T GREMEAUX, R NAJEM-LENDOM, I BEN-SAHRA, M CORMONT, F BOST, Y LE MARCHAND-BRUSTEL, J F TANTI a S GIORGETTI-PERALDI, 2009. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes*.

REICHMUTH, K J, D AUSTIN, J B SKATRUD a T YOUNG, 2005. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *Am.J.Respir.Crit Care Med*.

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

REYNOLDS, A C, J DORRIAN, P Y LIU, H P VAN DONGEN, G A WITTERT, L J HARMER a S BANKS, 2012. Impact of five nights of sleep restriction on glucose

metabolism, leptin and testosterone in young adult men 75. *PLoS.ONE*. roč. 7, č. 1932-6203 (Electronic), s. e41218.

ROBERTSON, M D, D RUSSELL-JONES, A M UMPLEBY a D J DIJK, 2013. Effects of three weeks of mild sleep restriction implemented in the home environment on multiple metabolic and endocrine markers in healthy young men 76. *Metabolism*. 2., roč. 62, č. 1532-8600 (Electronic), s. 204–211.

RODEN, M, M KOLLER, K PIRICH, H VIERHAPPER a F WALDHAUSER, 1993. The circadian melatonin and cortisol secretion pattern in permanent night shift workers. *The American journal of physiology* [online]. roč. 265, č. 1 Pt 2, s. R261–7. ISSN 0002-9513. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8342696>

ROSA, D P, D MARTINEZ, J N PICADA, J G SEMEDO a N P MARRONI, 2011. Hepatic oxidative stress in an animal model of sleep apnoea: effects of different duration of exposure. *Comp Hepatol*. roč. 10, č. 1476-5926 (Electronic), s. 1.

RUARDY, T G, J M SCHAKENRAAD, H C VAN DER MEI a H J BUSSCHER, 1995. Adhesion and spreading of human skin fibroblasts on physicochemically characterized gradient surfaces. *J.Biomed.Mater.Res*. 11., roč. 29, č. 0021-9304 (Print), s. 1415–1423.

RUDIC, R D, P MCNAMARA, A M CURTIS, R C BOSTON, S PANDA, J B HOGENESCH a G A FITZGERALD, 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS.Biol*. 11., roč. 2, č. 1545-7885 (Electronic), s. e377.

SADACCA, L A, K A LAMIA, A S DELEMOS, B BLUM a C J WEITZ, 2011. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia*. 1., roč. 54, č. 1432-0428 (Electronic), s. 120–124.

SAMUEL, V T, K F PETERSEN a G I SHULMAN, 2010. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 26. 6., roč. 375, č. 1474-547X (Electronic), s. 2267–2277.

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](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(12)70051-6)

SANTANA, A A, G D PIMENTEL, M ROMUALDO, L M OYAMA, R V SANTOS, R A PINHO, C T DE SOUZA, B RODRIGUES, E C CAPERUTO a F S LIRA, 2012. Sleep

duration in elderly obese patients correlated negatively with intake fatty 86. *Lipids Health Dis.* roč. 11, č. 1476-511X (Electronic), s. 99.

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>

SARTORI, C, P DESSEN, C MATHIEU, A MONNEY, J BLOCH, P NICOD, U SCHERRER a H DUPLAIN, 2009. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology.* 12., roč. 150, č. 1945-7170 (Electronic), s. 5311–5317.

SAVRANSKY, V, S BEVANS, A NANAYAKKARA, J LI, P L SMITH, M S TORBENSON a V Y POLOTSKY, 2007a. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.*

SAVRANSKY, V, A NANAYAKKARA, J LI, S BEVANS, P L SMITH, A RODRIGUEZ a V Y POLOTSKY, 2007b. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*

SAVRANSKY, V, A NANAYAKKARA, A VIVERO, J LI, S BEVANS, P L SMITH, M S TORBENSON a V Y POLOTSKY, 2007c. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology.*

SEO, J B, H M MOON, M J NOH, Y S LEE, H W JEONG, E J YOO, W S KIM, J PARK, B S YOUN, J W KIM, S D PARK a J B KIM, 2004. Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein 1c regulates mouse adiponectin expression. *Journal of Biological Chemistry.*

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.

SHE, Meihua, Xiaojian DENG, Zhenyu GUO, Moshe LAUDON, Zhuowei HU, Duanfang LIAO, Xiaobo HU, Yi LUO, Qingyun SHEN, Zehong SU a Weidong YIN, 2009. NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-

fat/high-sucrose-fed rats. *Pharmacological research* [online]. 4., roč. 59, č. 4, s. 248–53. ISSN 1043-6618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2009.01.005

SHERMAN, Hadas, Yoni GENZER, Rotem COHEN, Nava CHAPNIK, Zecharia MADAR a Oren FROY, 2012. Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. 8., roč. 26, č. 8, s. 3493–502. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.12-208868

SHEWARD, W John, Elizabeth S MAYWOOD, Karen L FRENCH, Jacqueline M HORN, Michael H HASTINGS, Jonathan R SECKL, Megan C HOLMES a Anthony J HARMAR, 2007. Entrainment to feeding but not to light: circadian phenotype of VPAC2 receptor-null mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [online]. 18. 4., roč. 27, č. 16, s. 4351–8. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.4843-06.2007

SHIEH, J M, H T WU, K C CHENG a J T CHENG, 2009. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKCzeta-Akt-GSK3beta pathway in hepatic cells. *J.Pineal Res.* 11., roč. 47, č. 1600-079X (Electronic), s. 339–344.

SHIMAZU, T, 1996. Innervation of the liver and glucoregulation: roles of the hypothalamus and autonomic nerves. *Nutrition*.

SCHEER, F A, M F HILTON, C S MANTZOROS a S A SHEA, 2009. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment 2. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.*

SCHMID, S M, M HALLSCHMID, K JAUCH-CHARA, J BORN a B SCHULTES, 2008. A single night of sleep deprivation increases ghrelin levels and feelings of hunger in normal-weight healthy men 94. *J.Sleep Res.* 9., roč. 17, č. 1365-2869 (Electronic), s. 331–334.

SCHMID, S M, M HALLSCHMID, K JAUCH-CHARA, B WILMS, C BENEDICT, H LEHNERT, J BORN a B SCHULTES, 2009. Short-term sleep loss decreases physical activity under free-living conditions but does not increase food intake under time-deprived laboratory conditions in healthy men 90. *Am.J.Clin.Nutr.* 12., roč. 90, č. 1938-3207 (Electronic), s. 1476–1482.

SCHMID, S M, M HALLSCHMID, K JAUCH-CHARA, B WILMS, H LEHNERT, J BORN a B SCHULTES, 2011. Disturbed glucoregulatory response to food intake after moderate sleep restriction. *Sleep*.

SIMPSON, N S, S BANKS a D F DINGES, 2010. Sleep restriction is associated with increased morning plasma leptin concentrations, especially in women 91. *Biol.Res.Nurs.* 7., roč. 12, č. 1552-4175 (Electronic), s. 47–53.

SMITH, Mark R a Charmane I EASTMAN, 2012. Shift work: health, performance and safety problems, traditional countermeasures, and innovative management strategies to reduce circadian misalignment. *Nature and science of sleep* [online]. roč. 4, s. 111–32. ISSN 1179-1608. Dostupné z: doi:10.2147/NSS.S10372

SO, A Y, T U BERNAL, M L PILLSBURY, K R YAMAMOTO a B J FELDMAN, 2009. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*

SOMERS, V K, M E DYKEN, A L MARK a F M ABOUD, 1993. Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *N.Engl.J.Med.* 4. 2., roč. 328, č. 0028-4793 (Print), s. 303–307.

SON, G H, S CHUNG, H K CHOE, H D KIM, S M BAIK, H LEE, H W LEE, S CHOI, W SUN, H KIM, S CHO, K H LEE a K KIM, 2008. Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*

SONG, X, P JOUSILAHTI, C D STEHOUEW, 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).

SONG, Y, X YE, L YE, B LI, L WANG a Y HUA, 2013. Disturbed subjective sleep in chinese females with type 2 diabetes on insulin therapy 30. *PLoS.ONE.*

SOOKOIAN, Silvia a Carlos J. PIROLA, 2013. Obstructive Sleep Apnea Is Associated with Fatty Liver and Abnormal Liver Enzymes: a Meta-analysis. *Obesity Surgery* [online]. 7. 11., roč. 23, č. 11, s. 1815–1825. ISSN 0960-8923. Dostupné z: doi:10.1007/s11695-013-0981-4

SPIEGEL, K, R LEPROULT, E F COLECCHIA, M L'HERMITE-BALERIAUX, Z NIE, G COPINSCHI a Cauter E VAN, 2000. Adaptation of the 24-h growth hormone profile to a state of sleep debt 68. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol.*

SPIEGEL, K, R LEPROULT, M L'HERMITE-BALERIAUX, G COPINSCHI, P D PENEV a Cauter E VAN, 2004a. Leptin levels are dependent on sleep duration: relationships with



sympathovagal balance, carbohydrate regulation, cortisol, and thyrotropin 57. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 11., roč. 89, č. 0021-972X (Print), s. 5762–5771.

SPIEGEL, K, E TASALI, P PENEV a Cauter E VAN, 2004b. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite 77. *Ann.Intern.Med.* 7. 12., roč. 141, č. 1539-3704 (Electronic), s. 846–850.

STICKGOLD, R a M P WALKER, 2007. Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation 113. *Sleep Med.* 6., roč. 8, č. 1389-9457 (Print), s. 331–343.

ST-ONGE, M P, M O'KEEFFE, A L ROBERTS, A ROYCHOUDHURY a B LAFERRERE, 2012. Short sleep duration, glucose dysregulation and hormonal regulation of appetite in men and women 89. *Sleep.* 11., roč. 35, č. 1550-9109 (Electronic), s. 1503–1510.

ST-ONGE, M P, A L ROBERTS, J CHEN, M KELLEMAN, M O'KEEFFE, A ROYCHOUDHURY a P J JONES, 2011. Short sleep duration increases energy intakes but does not change energy expenditure in normal-weight individuals 79. *Am.J.Clin.Nutr.* 8., roč. 94, č. 1938-3207 (Electronic), s. 410–416.

STORCH, Kai-Florian a Charles J WEITZ, 2009. Daily rhythms of food-anticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 21. 4., roč. 106, č. 16, s. 6808–13. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0902063106

SUNDARAM, Shikha S., Ronald J. SOKOL, Kelley E. CAPOCELLI, Zhaoxing PAN, Jillian S. SULLIVAN, Kristen ROBBINS a Ann C. HALBOWER, 2014. Obstructive Sleep Apnea and Hypoxemia Are Associated with Advanced Liver Histology in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of Pediatrics* [online]. 4., roč. 164, č. 4, s. 699–706.e1. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2013.10.072

SURYA, Sowmya, Kathleen SYMONS, Edward ROTHMAN a Ariel L BARKAN, 2006. Complex rhythmicity of growth hormone secretion in humans. *Pituitary* [online]. roč. 9, č. 2, s. 121–5. ISSN 1386-341X. Dostupné z: doi:10.1007/s11102-006-9079-5

SUWAZONO, Y, M UETANI, M OISHI, K TANAKA, H MORIMOTO a K SAKATA, 2010. Calculation of the benchmark duration of shift work associated with the development of impaired glucose metabolism: a 14-year cohort study on 7104 male workers. *Occup.Environ.Med.* 8., roč. 67, č. 1470-7926 (Electronic), s. 532–537.

- SUZUKI, K, C N JAYASENA a S R BLOOM, 2012. Obesity and appetite control 81. *Exp.Diabetes Res.* roč. 2012, č. 1687-5303 (Electronic), s. 824305.
- TAMISIER, R, G S GILMARTIN, S H LAUNOIS, J L PEPIN, H NESPOULET, R THOMAS, P LEVY a J W WEISS, 2009. A new model of chronic intermittent hypoxia in humans: effect on ventilation, sleep, and blood pressure. *J.Appl.Physiol* (1985.).
- TANCREDI, Mauro, Annika ROSENGREN, Ann-Marie SVENSSON, Mikhail KOSIBOROD, Aldina PIVODIC, Soffia GUDBJÖRNSDOTTIR, 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/NEJMoa1504347
- TASALI, E, B MOKHLESI a Cauter 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.*
- TÜCHSEN, F, H HANNERZ a H BURR, 2006. A 12 year prospective study of circulatory disease among Danish shift workers. *Occupational and environmental medicine* [online]. roč. 63, č. 7, s. 451–5. ISSN 1470-7926. Dostupné z: doi:10.1136/oem.2006.026716
- TUO, Y, D WANG, S LI a C CHEN, 2011. Long-term exposure of INS-1 rat insulinoma cells to linoleic acid and glucose in vitro affects cell viability and function through mitochondrial-mediated pathways. *Endocrine.* 4., roč. 39, č. 1559-0100 (Electronic), s. 128–138.
- TUOMILEHTO, H, M PELTONEN, M PARTINEN, J SEPPA, T SAARISTO, E KORPIHYOVALTI, H OKSA, H PUOLIJOKI, J SALTEVO, M VANHALA a J TUOMILEHTO, 2008. Sleep duration is associated with an increased risk for the prevalence of type 2 diabetes in middle-aged women - The FIN-D2D survey 17. *Sleep Med.* 3., roč. 9, č. 1389-9457 (Print), s. 221–227.
- TUREK, F W, C JOSHU, A KOHSAKA, E LIN, G IVANOVA, E MCDEARMON, A LAPOSKY, S LOSEE-OLSON, A EASTON, D R JENSEN, R H ECKEL, J S TAKAHASHI a J BASS, 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science.*

13. 5., roč. 308, č. 1095-9203 (Electronic), s. 1043–1045.

VAN LEEUWEN, W M, C HUBLIN, M SALLINEN, M HARMA, A HIRVONEN a T PORKKA-HEISKANEN, 2010. Prolonged sleep restriction affects glucose metabolism in healthy young men 63. *Int.J.Endocrinol.* roč. 2010, č. 1687-8345 (Electronic), s. 108641.

VANHELDER, T, J D SYMONS a M W RADOMSKI, 1993. Effects of sleep deprivation and exercise on glucose tolerance 51. *Aviat.Space Environ.Med.* 6., roč. 64, č. 0095-6562 (Print), s. 487–492.

VON, Ruesten A, C WEIKERT, I FIETZE a H BOEING, 2012. Association of sleep duration with chronic diseases in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study 37. *PLoS.ONE*.

VONDRA, K, V BRODAN, A BASS, E KUHN, J TEISINGER, M ANDEL a A VESELKOVA, 1981. Effects of sleep deprivation on the activity of selected metabolic enzymes in skeletal muscle 53. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol.* roč. 47, č. 0301-5548 (Print), s. 41–46.

VYAS, M. V., A. X. GARG, A. V. IANSAVICHUS, J. COSTELLA, A. DONNER, L. E. LAUGSAND, I. JANSZKY, M. MRKOBRAHA, G. PARRAGA a D. G. HACKAM, 2012. Shift work and vascular events: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [online]. roč. 345, č. jul26 1, s. e4800–e4800. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.e4800

WALKER, M P, 2009. The role of sleep in cognition and emotion 112. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 3., roč. 1156, č. 1749-6632 (Electronic), s. 168–197.

WANG, B, I S WOOD a P TRAYHURN, 2007a. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch.* 12., roč. 455, č. 0031-6768 (Print), s. 479–492.

WANG, Bohan, I Stuart WOOD a Paul TRAYHURN, 2007b. 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

WANG, Ning, Shakil A KHAN, Nanduri R PRABHAKAR a Jayasri NANDURI, 2013a. Impairment of pancreatic  $\beta$ -cell function by chronic intermittent hypoxia. *Experimental physiology* [online]. 9., roč. 98, č. 9, s. 1376–85. ISSN 1469-445X. Dostupné z: doi:10.1113/expphysiol.2013.072454

- WANG, Ping-Ping, Mei-Hua SHE, Ping-Ping HE, Wu-Jun CHEN, Moshe LAUDON, Xuan-Xuan XU a Wei-Dong YIN, 2013b. Piromelatine decreases triglyceride accumulation in insulin resistant 3T3-L1 adipocytes: role of ATGL and HSL. *Biochimie* [online]. 8., roč. 95, č. 8, s. 1650–4. ISSN 1638-6183. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2013.05.005
- WANG, X-S, M E G ARMSTRONG, B J CAIRNS, T J KEY a R C TRAVIS, 2011. Shift work and chronic disease: the epidemiological evidence. *Occupational medicine (Oxford, England)* [online]. 3., roč. 61, č. 2, s. 78–89. ISSN 1471-8405. Dostupné z: doi:10.1093/occmed/kqr001
- WEBB, K, V HLADY a P A TRESKO, 1998. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *J.Biomed.Mater.Res.* 5. 9., roč. 41, č. 0021-9304 (Print), s. 422–430.
- WEHRENS, S M, S M HAMPTON, R E FINN a D J SKENE, 2010. Effect of total sleep deprivation on postprandial metabolic and insulin responses in shift workers and non-shift workers 54. *J.Endocrinol.* 8., roč. 206, č. 1479-6805 (Electronic), s. 205–215.
- WEISS, A, F XU, A STORFER-ISSER, A THOMAS, C E IEVERS-LANDIS a S REDLINE, 2010. The association of sleep duration with adolescents' fat and carbohydrate consumption 87. *Sleep.* 9., roč. 33, č. 0161-8105 (Print), s. 1201–1209.
- 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. rcmb.2015–0315OC. ISSN 1044-1549. Dostupné z: doi:10.1165/rcmb.2015-0315OC
- WISE, D R, P S WARD, J E SHAY, J R CROSS, J J GRUBER, U M SACHDEVA, J M PLATT, R G DEMATTEO, M C SIMON a C B THOMPSON, 2011. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.*
- WITITSUWANNAKUL, D a K H KIM, 1977. Mechanism of palmityl coenzyme A inhibition of liver glycogen synthase 1. *Journal of Biological Chemistry.* 10. 11., roč. 252, č. 0021-9258 (Print), s. 7812–7817.
- WOTUS, C, T R LILLEY, A S NEAL, N L SULEIMAN, S C SCHMUCK, B L SMARR, B J FISCHER a la DE I, 2013. Forced desynchrony reveals independent contributions of

suprachiasmatic oscillators to the daily plasma corticosterone rhythm in male rats. *PLoS.ONE*.

XING, T, P M PILOWSKY a A Y FONG, 2014. Mechanism of sympathetic activation and blood pressure elevation in humans and animals following acute intermittent hypoxia. *Prog.Brain Res.* roč. 209, č. 1875-7855 (Electronic), s. 131–146.

XU, J, Y S LONG, D GOZAL a P N EPSTEIN, 2009. Beta-cell death and proliferation after intermittent hypoxia: role of oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* 15. 3., roč. 46, č. 1873-4596 (Electronic), s. 783–790.

YAO, Q, M K SHIN, J C JUN, K L HERNANDEZ, N R AGGARWAL, J R MOCK, J GAY, L F DRAGER a V Y POLOTSKY, 2013. Effect of chronic intermittent hypoxia on triglyceride uptake in different tissues. *Journal of Lipid Research.* 4., roč. 54, č. 0022-2275 (Print), s. 1058–1065.

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.

YI, C X, S E LA FLEUR, E FLIERS a A KALSBECK, 2010. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochim.Biophys.Acta.* 4., roč. 1802, č. 0006-3002 (Print), s. 416–431.

YIN, Jun, Zhanguo GAO, Qing HE, Dequan ZHOU, Zengkui GUO a Jianping YE, 2009. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* [online]. 1. 2., roč. 296, č. 2, s. E333–42 [vid. 2015-10-14]. ISSN 0193-1849. Dostupné z: <http://ajpendo.physiology.org/content/296/2/E333>

YOKOE, T, L C ALONSO, L C ROMANO, T C ROSA, R M O'DOHERTY, A GARCIA-OCANA, K MINOGUCHI a C P O'DONNELL, 2008. Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic beta-cell replication in mice. *J.Physiol.*

YOUNGSTROM, T G a T J BARTNESS, 1995. Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am.J.Physiol.*

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.

ZAMBON, A C, E L MCDEARMON, N SALOMONIS, K M VRANIZAN, K L JOHANSEN, D ADEY, J S TAKAHASHI, M SCHAMBELAN a B R CONKLIN, 2003. Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. *Genome Biol.* roč. 4, č. 1465-6914 (Electronic), s. R61.

ZANUTO, R, M A SIQUEIRA-FILHO, L C CAPERUTO, R F BACURAU, E HIRATA, R A PELICIARI-GARCIA, F G DO AMARAL, A C MARCAL, L M RIBEIRO, J P CAMPOREZ, A R CARPINELLI, S BORDIN, J CIPOLLA-NETO a C R CARVALHO, 2013. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. *J.Pineal Res.* 9., roč. 55, č. 1600-079X (Electronic), s. 156–165.

ZHANG, Guoqing, Shin Han KIM, Ruffin E EVANS, Byeong Hyo KIM, J N DEMAS a Cassandra L FRASER, 2009. Luminescent donor-acceptor beta-diketones: modulation of emission by solvent polarity and group II metal binding. *Journal of fluorescence* [online]. 9., roč. 19, č. 5, s. 881–9. ISSN 1573-4994. Dostupné z: doi:10.1007/s10895-009-0487-6

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.

ZVONIC, S, A A PTITSYN, S A CONRAD, L K SCOTT, Z E FLOYD, G KILROY, X WU, B C GOH, R L MYNATT a J M GIMBLE, 2006. Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes*.