

Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Nikola Havlíková

Vliv obstrukční spánkové apnoe na oxidaci a transport mastných kyselin v kosterním svalu pacientů s diabetes mellitus 2. typu

Effect of obstructive sleep apnea on oxidation and transport of fatty acids in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes mellitus

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. MUDr. Jan Polák, Ph.D.

Praha, 2019

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. MUDr. Janu Polákovi, Ph.D. za ochotu a cenné rady při vedení mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Kamile Balušíkové, Ph.D. za odbornou pomoc a velmi užitečné rady v oblasti metodiky. V neposlední řadě bych ráda poděkovala kolegům z laboratoře MUDr. Minh Duc Trinh a Šárce Fleischerové za příjemné pracovní prostředí a vřelý přístup.

Projekt FAMOSA byl podpořen grantem Ministerstva zdravotnictví ČR (AZV 15-30155A) a grantem Univerzity Karlovy Progres Q36 a SVV 260387/2017.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 4. 2019

Podpis:

Seznam zkratek

AHI – apnoe/hypopnoe index

Akt – proteinkináza B, serin/threoninová kináza

BAT – hnědá tuková tkáň

CD36 – destičkový glykoprotein 4, translokáza mastných kyselin

CPAP – continuous positive airway pressure, nepřetržitý pozitivní tlak v dýchacích cestách

CPT1 – karnitin palmitoyltransferáza I

DM2T – diabetes mellitus 2. typu

ERK – kináza regulovaná extracelulárním signálem

FABP – protein vázající mastné kyseliny

FATP4 – transportní protein mastných kyselin s dlouhým řetězcem 4

FFA – volné mastné kyseliny

GLUT – glukózový transportér

GUSB - beta-glukuronidáza

HDL – vysokodenzitní lipoprotein

HIF-1 – faktor indukovatelný hypoxií 1

IH – intermitentní hypoxie

IR – inzulínový receptor

LCFA – mastné kyseliny s dlouhým řetězcem

MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkináza

MK – mastné kyseliny

MS – metabolický syndrom

OSA – obstrukční spánková apnoe

OSAS – syndrom obstrukční spánkové apnoe

oxLDL – oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě

PH – plicní hypertenze

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza

PPAR γ – peroxizomovým proliferátorem aktivovaný receptor gama

PPAR- β/δ – peroxizomální proliferátorem aktivovaný receptor beta nebo delta

ROS – reaktivní formy kyslíku

SCL27A4 – gen kodující transportní protein mastných kyselin s dlouhým řetězcem 4

T2DM – diabetes mellitus 2. typu

TBP - TATA vazebný protein

Abstrakt

Syndrom spánkové apnoe neboli spánkový apnoický syndrom je závažné onemocnění, které ohrožuje pacienty vysokým rizikem rozvoje kardiovaskulárních chorob. Jedná se o onemocnění charakterizované poruchou dýchání projevující se zástavou dechu a spadá mezi onemocnění, které doprovází poruchy spánku. Syndrom obstrukční spánkové apnoe (OSAS) postihuje 5-15 % populace a 50-80 % pacientů s diabetes mellitus 2. typu (T2DM) či těžkou obezitou. OSA kauzálně přispívá k rozvoji poruch v metabolismu glukózy a T2DM. Diabetes mellitus 2. typu je komplexní metabolická porucha, při níž organismus není schopen zpracovávat glukózu jako za běžných fyziologických podmínek v důsledku relativního nedostatku inzulínu a současné periferní inzulínové rezistence. Inzulínová rezistence je posléze kompenzována zvýšenou sekrecí inzulínu, což vede k rozvoji hyperglykémie po selhání této kompenzace. T2DM je velmi často spojen s přítomností obezity, arteriální hypertenze, dyslipidémie a hyperurikémie. Cílem práce bylo zjistit, zda přítomnost OSA u nediabetických subjektů a pacientů s diabetes mellitus 2. typu vede k poruchám metabolismu mastných kyselin v kosterním svalu. Výsledky studie přispějí k pochopení molekulárních mechanismů rozvoje diabetes mellitus 2. typu při OSA a mohou být využity k navržení inovativních terapeutických přístupů.

Klíčová slova: spánková apnoe, oxidace, mastné kyseliny, diabetes mellitus, obezita, svalová biopsie

Abstract

Sleep apnea syndrome, or sleep apneic syndrome, is a serious illness that causes a high risk of cardiovascular disease development in patients. This disease is characterized by a breathless breathing disorder and falls into a class of disorder that accompanies sleep disturbances. Sleep apnea syndrome (SAS) affects 5-15% of the population, and 50-80% of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) or severe obesity. SAS has a causal contribution to the development of disorders in glucose metabolism and T2DM. Diabetes mellitus type 2 is a complex metabolic disorder in which the organism is unable to process glucose as under normal physiological conditions due to a relative insulin deficiency and simultaneous peripheral insulin resistance. Insulin resistance is eventually compensated for by increased insulin secretion, which leads to the development of hyperglycemia after failure of this compensation. T2DM is very often associated with the presence of obesity, arterial hypertension, dyslipidemia and hyperuricemia. The aim of this study is to determine if the presence of SAS in non-diabetic subjects and patients with type 2 diabetes mellitus leads to disorders in the metabolism of fatty acids in the skeletal muscle. The results of the study contribute to the understanding of the molecular mechanisms of the development of type 2 diabetes mellitus in SAS and can be used to design innovative therapeutic approaches.

Keywords: sleep apnea, oxidation, fatty acids, diabetes mellitus, obesity, muscle biopsy

Obsah

Úvod.....	1
1 Diabetes mellitus 2. typu	2
1.1 Inzulínová rezistence	3
1.2 Glukózová homeostáze.....	5
2 Syndrom obstrukční spánkové apnoe	7
2.1 Oxidace volných mastných kyselin	9
2.2 Svalová hypoxie	10
2.3 Souvislost mezi T2DM a OSA	11
3 Transportéry mastných kyselin.....	13
3.1 CD36.....	13
3.2 CPT1	15
3.3 FATP4	16
4 Cíle diplomové práce.....	18
5 Materiál a metody.....	19
5.1 Projekt FAMOSA a informace o pacientech	19
5.2 Zpracování svalových biopsií	22
5.3 Izolace svalového lysátu.....	22
5.4 Stanovení množství proteinů	22
5.5 SDS-PAGE elektroforéza a Western Blotting.....	23
5.5.1 Imunodetekce	25
5.5.2 Proteinová detekce	26
5.5.3 Statistické vyhodnocení.....	26
5.6 PCR.....	26
5.6.1 Izolace RNA	27
5.6.2 Reverzní transkripce RNA do cDNA.....	27
5.6.3 qPCR	28
5.6.4 Vyhodnocení	29
5.7 Oxygraf.....	30
Výsledky	31
Diskuze.....	35

Závěr	38
Literatura	39
Přílohy.....	51

Úvod

Diabetes mellitus 2. typu (T2DM) je jedním z nejrozšířenějších onemocnění, které nepříznivě ovlivňuje přibližně 246 milionů lidí na celém světě, přičemž množství pacientů se stále zvyšuje. Charakteristická pro toto onemocnění je inzulinová rezistence v kombinaci s dysfunkcí pankreatických β -buněk. Obézní jedinci, stejně jako pacienti s T2DM, se často vyznačují zvýšenými hladinami plazmatických volných mastných kyselin (FFA). Opakovaně bylo prokázáno, že zvýšení plazmatických FFA představuje nezávislý rizikový faktor pro vznik inzulinové rezistence a rozvoj T2DM. Bylo zjištěno, že hladiny FFA jsou zvýšeny u pacientů s OSA, avšak stále není známo, zda jejich zdroj pochází z tukové tkáně, nebo zda je příčinou snížené vychytávání FFA ve svalech a v játrech. Porucha regulace lipolýzy vede ke zvýšenému uvolňování FFA do krevního oběhu, přičemž se jedná o hlavní zdroj FFA v plazmě u obézních jedinců. Otázkou stále zůstává, zda se na tomto patologickém stavu také podílí změna oxidace FFA v kosterním svalu.

Syndrom obstrukční spánkové apnoe (OSAS) je časté onemocnění u osob středního věku a starších dospělých s odhadem prevalence v rozmezí 5-15 % z celkové populace a výskytem u pacientů s T2DM s prevalencí 50-80 %. Dále se vyskytuje zejména u obézních jedinců. Jedná se o onemocnění způsobující opakované částečné nebo úplné zhroucení horních dýchacích cest během spánku a vede k pravidelným poklesům hladin kyslíku v krvi. Předpokladem této práce je fakt, že OSA nepříznivě ovlivňuje homeostázu glukózy a vede k inzulinové rezistenci, glukózové intoleranci a T2DM.

Diplomová práce je zaměřena na oxidaci volných mastných kyselin v kosterním svalu u pacientů s T2DM a OSA, zejména tedy na tři transportéry FFA a to FATP4, CD36 a CPT1 a jejich expresi. Objasnění mechanismu zvýšeného výskytu FFA na základě lipolýzy tukové tkáně nebo oxidace FFA v kosterních svalech by mohlo sloužit jako vhodný cíl pro určení léčby za použití vhodných inhibitorů či stimulátorů.

1 Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu (T2DM) spadá mezi hojně se vyskytující onemocnění, jehož četnost každým rokem roste. Diabetes se již stal epidemickým zdravotním problémem. V roce 2014 bylo celosvětově diagnostikováno 422 milionů dospělých trpících T2DM (World Health Organization, 2016) a téměř 95 % dospělých s diabetem má diagnózu diabetu 2. typu (Geiss et al. 2014). Hlavním problémem veřejného zdraví zůstává, že přibližně 50% těchto případů zůstává nediodagnostikovaných. T2DM totiž nevyvolává specifické příznaky po mnoho let, přičemž detekce je posléze zpožděna a v pokročilém stádiu jsou často již přítomny vážnější komplikace (Gong et al. 2009; Maureen I. Harris, PHD et al. 1992). Velmi podstatná je kontrola glykémie. Za normální hodnoty se považuje 7,8 – 10,0 mmol/l (ESPEN, 2011), pokud je množství glukózy v krvi vyšší než 10 mmol/l, je tento stav již označován za hyperglykémii.

Jedná se o komplexní metabolickou poruchu, při níž organismus není schopen zpracovávat glukózu jako za běžných fyziologických podmínek, a to v důsledku relativního nedostatku inzulínu a současné periferní inzulínové rezistence, kdy není možné transportovat inzulín do buňky v důsledku desenzitizace receptorů β -buněk pankreatu na inzulín, přestože je ho dostatek. Hyperinzulinémie je vlastně proanabolický stav, který vede ještě k dalšímu tloušťnutí většinou již obezných pacientů. Dochází také ke snížení schopnosti periferních tkání přijímat glukózu (DeFronzo et al. 1989).

Pacienty s T2DM pojí několik společných rizikových faktorů. Mezi nejčastější faktory patří nadváha, nedostatek pohybu, nevhodná dieta, stres nebo genetika. Prvotní příznaky onemocnění se projevují zvýšenou glykemií, únavou, arteriální hypertenzí, dyslipidemií, hyperurikemií nebo hyperlipoproteinemií (American Diabetes 2014). Tyto problémy posléze v dlouhodobějším měřítku vedou k nefropatii, renálnímu selhání, neuropatii či retinopatii a v nejpokročilejších stádiích může docházet až k úplné slepotě nebo nutnosti amputace dolní končetiny (Kahn et al. 2014).

Přestože T2DM je určena především životním stylem a genetickou predispozicí, ke zmírnění či prevenci tohoto onemocnění se dá ve velké míře přispět pravidelnou fyzickou aktivitou a dodržováním správných stravovacích doporučení. Bylo totiž zjištěno, že mastné kyseliny v kombinaci s metabolismem glukózy podporují správnou funkci buněčné membrány, enzymovou aktivitu, inzulínovou signalizaci a genovou expresi (Risérus et al. 2009). Důkazy naznačují, že nahrazení nasycených tuků a trans mastných kyselin nenasycenými tuky vede ke

zvýšení citlivosti na inzulín a je pravděpodobné, že dojde ke snížení rizika vzniku T2DM. Zajímavé je, že polynenasycené mastné kyseliny n-6 zvyšují citlivost na inzulín, což se však nepotvrdilo u n-3 mastných kyselin (Hodson et al. 2008).

Znalost genetiky T2DM se v posledních letech poměrně rozšířila. Méně známá však zůstává genová interakce vedoucí ke ztrátě funkce β -buněk. Je možné, že okolní faktory a hyperglykémie přispívají k epigenetickým změnám DNA i histonů a modifikují genovou expresi v orgánech (Ling & Groop 2009; Keating et al. 2016). Pomocí metabolomiky a lipidomiky bylo prokázáno, že aromatické aminokyseliny jsou spojeny s obezitou a T2DM (Newgard et al. 2009; Würtz et al. 2012). Z dlouhodobého hlediska by tyto nové přístupy měly přispět k identifikaci dalších genů a metabolických markerů, která propojí všechny zatím získané poznatky.

1.1 Inzulínová rezistence

Inzulín je peptidový hormon, který je produkován β -buněkami slinivky břišní, které jsou rozptýleny v pankreatu v malých shlucích známých jako Langerhansovy ostrůvky. Inzulín umožňuje vychytávání glukózy z krve a její přeměnu na glykogen, který může být uložen v játrech či ve svalch. Inzulín může zabránit využití tuků jako zdroje energie. Nejdůležitějším úkolem inzulínu je řízení hladiny cukru v krvi (Roy & Parker 2006).

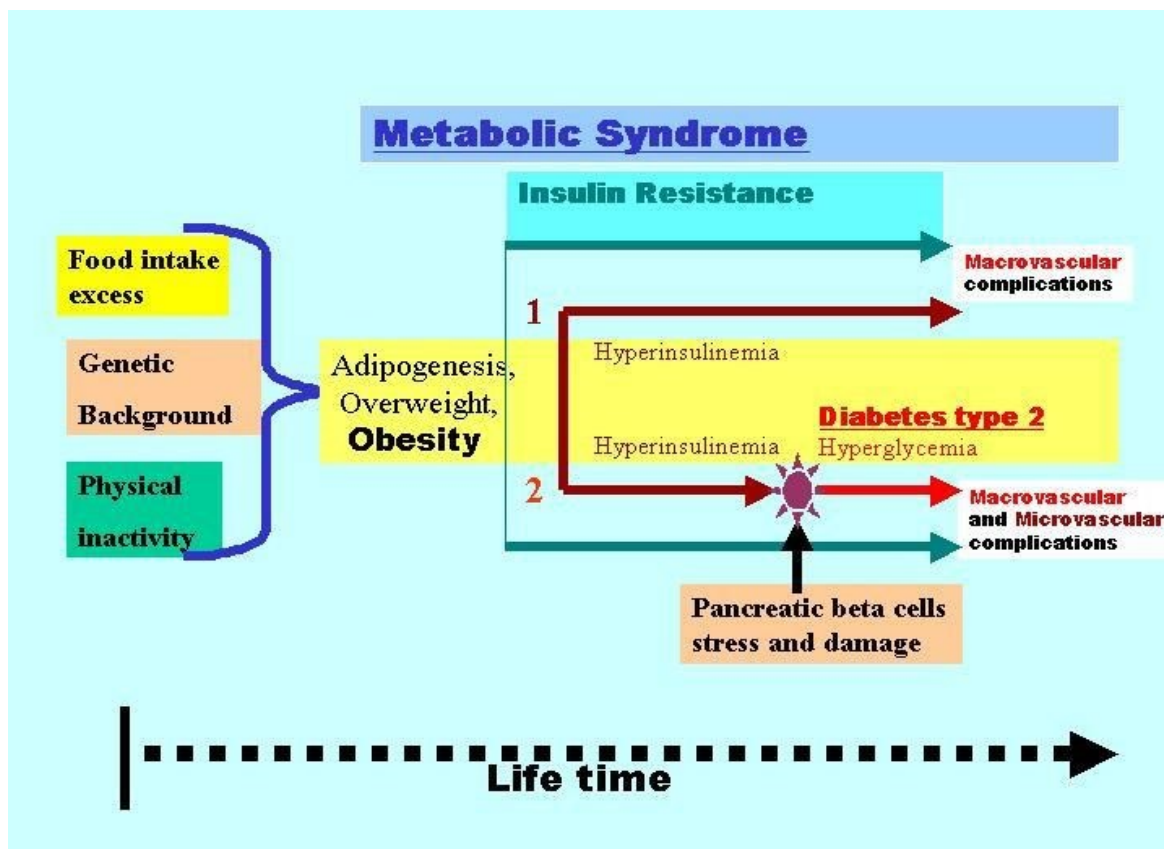
Inzulín tedy hraje klíčovou roli v metabolismu glukózy a lipidů, a to pomocí fosforylovaného inzulínového receptoru (IR), který působí na signální dráhu fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), čímž ovlivňuje další biologické procesy (Saltiel & Kahn 2001). S největší pravděpodobností souvisí periferní či lokální rezistence na inzulín s abnormální signalizací insuline-like growth faktorů, které posléze inhibují signální dráhy PI3K a Akt, což vede k dysregulaci metabolismu a funkce cílové tkáně (Alessi et al. 1997). Výsledky ukazují, že dysregulace IR-regulovaného receptoru pro PI3K, Akt, mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) a ERK signální dráhy je silně spojena s inzulínovou rezistencí (Zhang et al. 2016).

Inzulínovou resistenci klinicky obvykle chápeme jako poruchu IR v metabolismu glukózy, ačkoli rezistence se může týkat i dalších účinků inzulínu, například metabolismu tuků a bílkovin, efektu proliferačního či mitogenního nebo vlivu na sekreci vazoaktivních a trofických faktorů (Li & Shao 2014). Kvantitativně nejvýznamnější část osob s poruchou IR tvoří osoby s metabolickým syndromem (MS). Definice MS představuje soubor klinických,

biochemických a humorálních odchylek, které vznikají v souvislosti s poruchou účinku inzulínu v metabolismu glukózy (viz Obrázek 1) (Iso et al. 2007). Klinický význam MS spočívá ve zvýšení rizika rozvoje aterosklerózy a výskytu kardiovaskulárních komplikací, zvýšení celkové morbidity, mortality a rizika vzniku některých nádorů, například karcinomů tračnicku, prostaty a plic (Hanley A., Williams K., Stern M. 1993).

Inzulínová rezistence je tedy definována jako necitlivost vůči inzulínu, přičemž cílová tkáň vyžaduje zvýšené hladiny inzulínu, aby byla schopna vykonat adekvátní reakci (Musso et al. 2004). V případě T2DM se jedná o nedostatek relativní. Inzulínová rezistence v diabetickém stavu urychluje lipolýzu a uvolňuje volné mastné kyseliny a glycerol do oběhu (Groop et al. 1989). Dále má vliv na tukovou tkáň a metabolismus lipidů, přičemž pacienti s T2DM mají problém s udržení stálé hladiny glukózy, čímž se zvyšuje koncentrace volných mastných kyselin v plazmě kvůli zvýšené hydrolyze triacylglycerolů ve srovnání se zdravými jedinci. Tyto kyseliny působí na metabolismus sacharidů a jejich množství se ve svalové tkáni sníží. Tímto dochází k zvýšení hladiny glukózy v krvi a pankreas produkuje výrazně větší množství inzulínu, než za běžných podmínek (Charles et al. 1997; Reaven et al. 1988).

Klíčovým regulátorem lipidového metabolismu je gen Lipin-1, přičemž pokud dojde k jeho mutaci, dochází k rozvoji inzulínové rezistence. Upregulace Lipin-1 v myotubulech siRNA je během transfekce potlačena účinkem inzulínu. V souladu se snížením Lipin-1 exprese byla pozorována i palmitátem vyvolaná inzulínová rezistence v myotubulech, přičemž Lipin-1 by mohl hrát roli v etiologii inzulínové rezistence v kosterním svalu. Lipin-1 snižuje intracelulární množství diacylglycerolů a triacylglycerolů. Snížení inzulínem stimulované fosforylace serin/threoninové kinázy (Akt) a vylučování glukózy způsobené downregulací Lipin-1, by mohlo vést ke kumulaci ceramidu, což také přispívá k rozvoji inzulínové rezistence (Huang et al. 2017).



Obrázek 1: Popis mechanismu vzniku metabolického syndromu a T2DM. (Habor 2010)

1.2 Glukózová homeostáze

Glukóza je důležitým substrátem pro výrobu energie ve všech buňkách savců. Homeostáze glukózy je primárně dosažena pomocí dvou regulačních hormonů, a to inzulínu a glukagonu, které řídí míru využití a produkce glukózy. U zdravého člověka je správná koncentrace glukózy udržována pomocí regulace glukózových transportérů (GLUT) vedoucích substrát do β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. Buňky následně syntetizují glukózu z glukoneogenních prekurzorů a uvolní ji do krevního oběhu prostřednictvím GLUT transportérů v bazolaterální membráně (Amalan et al. 2016). Tuk a sval patří mezi inzulín-senzitivní tkáně, proto zde dochází k transportu glukózy přes GLUT4 transportér, který umožní transport do buňky až po navázání inzulínu na inzulínový receptor. Oxidace pankreatické glukózy stimuluje sekreci inzulínu mechanismem depolarizace membrány a uzavřením draslíkových kanálů, což vede k aktivaci napětově závislých kanálů pro vápník a k exocytóze inzulínu (Hehemann et al. 2010).

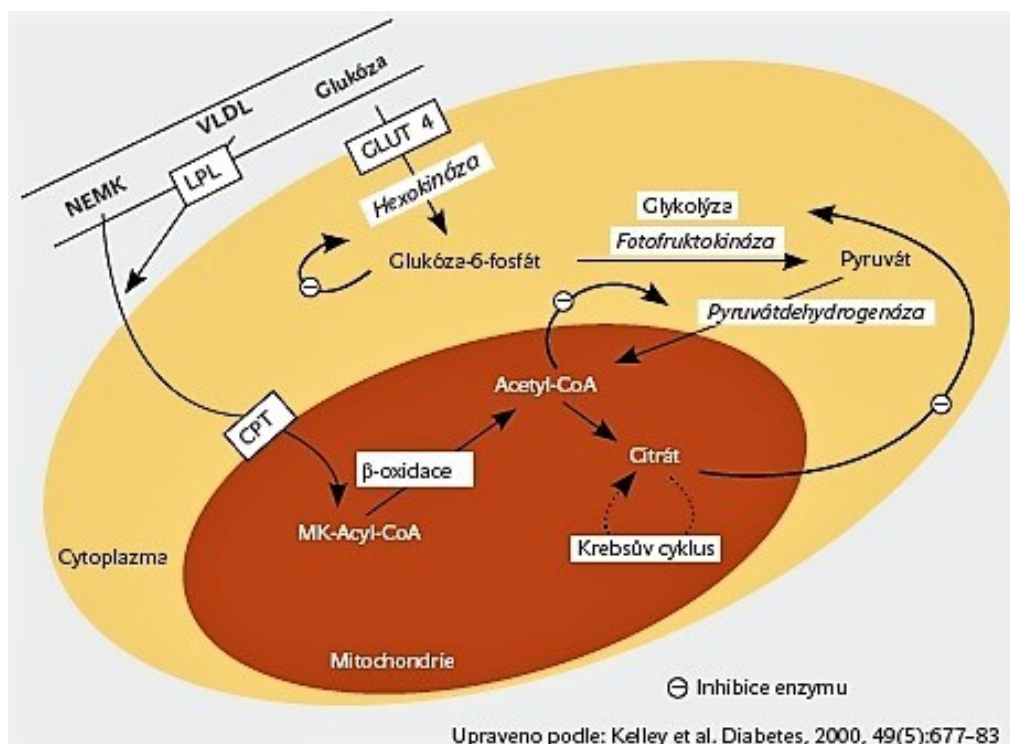
Glukózová homeostáze je udržována rovnováhou mezi dvěma metabolickými procesy a to glykolýzou a glukoneogenezí. Glykolýza je metabolický proces odehrávající se v cytosolu, kdy dochází k přeměně jedné molekuly glukózy na dvě molekuly pyruvátu za čistého výtěžku dvou molekul ATP a dvou molekul NADH. Glukoneogeneze je de novo syntéza glukózy z nonkarbohydrátových prekurzorů, jako je pyruvát, laktát, glycerol a glukoneogenní aminokyseliny (Gerich 1993). Jedná se o souhrn reakcí, při níž dochází k syntéze glukózy v játrech a při hladovění také v ledvinách, pokud dojde k vyčerpání zásob glykogenu (Landau et al. 1996). Právě ledviny mohou významně přispět k hyperglykemii v diabetického stavu.

Zajímavé je, že renální kortikální tkáň přednostně využívá energii z β -oxidace mastných kyselin (Hohenegger et al. 1973). β -oxidační produkty mastných kyselin, tedy acetyl koenzymu A a octan, nejsou sice glukoneogenní prekurzory, ale zvýšený výskyt mitochondriálního acetyl-CoA může alostericky aktivovat pyruvátcarboxylázu, tedy enzym glukoneogenní dráhy v játrech (Krebs et al. 1965; Ballard et al. 1970). Byla prokázána zvýšená exprese glukoneogenních enzymů, zvláště fosfoenolpyrohrozanové karboxykinázy a glukózy-6-fosfatázy a také zrychlené uvolňování glukózy, jak v izolovaných buněk proximálního tubulu, tak v ledvinách diabetických zvířecích modelů a pacientů s diabetem. Bylo totiž zjištěno, že nevhodnou aktivací renin-angiotensinového systému dochází ke zvýšení renální glukoneogeneze v diabetickém prostředí. Některé studie prokázaly, že pokud by se podařilo plně ovlivnit metabolismus glukózy na renální úrovni, mohla by být ovlivněna glykémie u obou typů diabetu, což by mohlo vést k významným terapeutickým a léčebným postupům (Swe et al. 2018).

Metabolismus glukózy dále zahrnuje tzv. Randleův cyklus, což je biochemický mechanismus konkurence mezi glukózou a MK pro jejich oxidaci a příjem ve svalové a tukové tkáni. Cyklus vychází z interakce mezi tukovou tkání a svaem. Hormony regulující lipolýzu tukové tkáně (adrenalin, noradrenalin, glukagon a adrenokortikotropní hormon) ovlivňují koncentraci mastných kyselin, které zase řídí příjem substrátu do svalů (viz. Obrázek 2). Cyklus je přímo ovlivnitelný složením nutrientů ve stravě (Bevilacqua et al. 1990).

Několik studií na zvířatech popsalo význam expozice intermitentní hypoxii, jakožto faktor poškozující homeostázu glukózy v celém těle, snižující citlivost k inzulín, zvyšující vychytávání glukózy ze svalů a současně zvyšující hladinu glukózy v krvi nalačno. V játrech posléze dochází ke snížení senzitivity vůči inzulínu z pankreatických β -buněk, což bylo potvrzeno i u lidí (Polak et al. 2013; Yokoe et al. 2008; Xu et al. 2009; Yester et al. 2012; Louis

& Punjabi 2009). Přestože jsou epidemiologické souvislosti mezi OSA a poškozeným metabolismem glukózy již potvrzeny, molekulární mechanismy spojující OSA s narušenou homeostázou glukózy nejsou dosud příliš známy (Polotsky et al. 2003).



Obrázek 2: Randleův cyklus – cyklus glukózy a MK v kosterním svalu
(<http://www.sanquis.cz/index2.php?linkID=pls79&kat=2>)

2 Syndrom obstrukční spánkové apnoe

Syndrom obstrukční spánkové apnoe (OSAS) je převážně spánková porucha dýchání s prevalencí 5-15% v celkové populaci, která způsobuje opakované částečné nebo úplné zhroucení horních dýchacích cest během spánku a vede k pravidelným poklesům hladin kyslíku v krvi. Literatura popisuje několik příčin choroby. Hlavním důvodem je snížení expanzních sil dilatačních svalů faryngu. Dalšími popsány příčinami jsou poruchy měkké tkáně, jako je makroglosie nebo hypertonie tonsil (Johns 2007). Syndrom je častější u obézních lidí, kde akumulace tuku v oblasti krku způsobuje zúžení dýchacích cest v okolí hltanu, čímž se zmenšuje průchod pro vzduch (Davies et al. 1992).

Cykly poklesu hladiny kyslíku se opakují několikrát za hodinu, což velmi výrazně narušuje spánek (Rosen 1996). Během spánku dochází ke krátkým a intenzivním nádechům a

výdechům, přičemž tento příznak souvisí s vysokým krevním tlakem a zvýšenou srdeční frekvencí (Reinke et al. 2011). Mezi denní příznaky patří ospalost, bolesti hlavy, apatie, deprese, problémy s koncentrací a ztráta paměti (Shekelle et al. 2015; Patil et al. 2007). V době spánku dochází ke kolísání hladiny FFA, glukózy, inzulínu, triglyceridů a kortizolu, v důsledku intermitentní hypoxie, přičemž po probuzení se jednotlivé hladiny opět normalizují. Tento fakt je velmi znepokojivý, když si uvědomíme, že spánkem strávíme přibližně třetinu svého života (Mendelson 1992).

Předchozí výzkum identifikoval OSA jako nezávislý rizikový faktor pro hypertenzi, kardiovaskulární onemocnění a mrtvici (Unruh et al. 2009). Plicní hypertenze je další kardiovaskulární komplikací u pacientů s OSA. Pacienti s OSA prokazují cyklické zvýšení plicního arteriálního tlaku, který se shoduje s apnoickými cykly, což je do značné míry přičítáno akutní hypoxické plicní vazokonstrikci (Sajkov & McEvoy 2009; Schäfer et al. 1998). Nedávné studie naznačují, že obstrukční spánková apnoe je také spojena s nesnášenlivostí glukózy, inzulínovou resistencí a T2DM (Tasali et al. 2008). Endokrinní a metabolické funkce tukové tkáně jsou výrazně modifikovány hladinami kyslíku ve tkáních. Snížení hladiny O₂ ve tkáních zvyšuje lipolýzu, snižuje adipogenezi a indukuje inzulínovou rezistenci v tukové tkáni (Trayhurn & Alomar 2015). Avšak při trvalé hypoxii tukové tkáně u obézních osob s OSA byly zjištěny opakované poklesy hladiny kyslíku v artériích, které dále indukují tkáňově specifické změny okysličení orgánů (Reinke et al. 2011).

OSA se vyskytuje také u dětí, a to s četností 1-3 % celkové populace dětí a u přibližně 50 % dětí s rozštěpem rtu nebo patra (Redline et al. 1999). Nediagnostikovaná nebo neléčená obstrukce dýchacích cest bývá spojována s poruchami učení a behaviorálními problémy jako je hyperaktivita a agrese. Následky zahrnují také vývojové vady, zpomalený růst a kardiovaskulární nemoci (Lehmann et al. 2012).

Při léčbě OSA, je třeba nejprve klást důraz na behaviorální změny ze strany pacientů, včetně přijetí pravidelného režimu spánku a zajištění dobrého prostředí pro přiměřený spánek. Za druhé by se mělo zabránit konzumaci alkoholu a kouření. V tomto kontextu kouření zvyšuje zánět horních cest dýchacích a znamená větší riziko chrápání (Saavedra Santana et al. 2013). Spotřeba alkoholu je totiž spojena s prodloužením trvání apnoe, arteriální desaturací a narušením spánku (Ovchinsky et al. 2002).

Největší úspěch zatím sklídl ventilační režim s názvem continuous positive airway pressure (CPAP). V rámci této léčby má pacient na obličej během spánku masku a je připojený

ke stroji, který nepřetržitě přivádí vzduch do dýchacích cest. To zvyšuje tlak vzduchu v hltanu a vzdušná síla měkkého patra se pohybuje dopředu proti jazyku a horní dýchací cesty tak zůstávají pod tlakem a nedochází k jejich kolapsu. Tato technika sice vyžaduje značné úsilí ze strany pacienta, ale bylo prokázáno, že u většiny pacientů se snížil apnoe/hypopnoe index (AHI) na méně než 5 cyklů zmíněných obtíží za hodinu, což vedlo ke zvýšení kvality spánku a lepším kardiovaskulárním výsledkům.

Bylo ověřeno, že používání CPAP také snižuje denní plicní arteriální tlak a hypertenzi u pacientů s OSA bez významného onemocnění srdce a plic nebo denní hypoxie (García-Río et al. 2006; Sajkov & McEvoy 2009). Přestože je CPAP velmi účinný, problém zůstává v náročnosti zařízení a poměrně malé procento pacientů je schopno přístroj používat celý život (Naughton et al. 2003). V takovém případě je třeba zvážit vážnost onemocnění, a zda by nebyl adekvátní chirurgický zákrok (Aurora et al. 2010).

2.1 Oxidace volných mastných kyselin

V poslední době se zvýšil zájem o pochopení role cirkulujících FFA jako možného mediátoru poškození glukózové homeostázy u pacientů s OSA. Bylo dokázáno, že intermitentní hypoxie vede ke zvýšení hladiny FFA a plasmatické glukózy (Newhouse et al. 2017) a pokud je hypoxie dlouhodobá, dochází v důsledku zvýšené plasmatické hladiny FFA a zhoršené funkce pankreatických β -buněk (Yaney et al. 2000) k inzulinové resistenci ve svalové a jaterní tkáni (Randle et al. 1963). Dodatečně dochází ke snížení inzulinové sekrece, což kauzálně přispívá k rozvoji T2DM (Boden 1969).

Plasmatické množství FFA je určeno rovnováhou mezi FFA uvolňovanými z tukové tkáně (převážně lipolýzou) a vychytávání či oxidací FFA v játrech a ve svalové tkáni (Boden et al. 1994). Ačkoli příčina zvýšení FFA u pacientů s OSA zůstává poněkud neznámá, předchozí pokusy prokázaly, že hypoxie stimuluje lipolýzu adipocytů in vitro, stejně tak u myších modelů (Weiszenstein et al. 2016; Weiszenstein et al. 2016). Dalo by se tedy předpokládat, že snížení oxidace FFA v kosterním svalu během hypoxie může přispět ke zvýšené cirkulaci FFA nebo přímo měnit intracelulární signalizaci inzulinu v myocytech.

Podobně jako se na oxidaci FFA v kosterním svalu podílí aktivace regulátorů genové exprese PPAR- β/δ , i v tomto případě dochází k oxidaci díky výskytu specifických transportérů mastných kyselin (MK) (Yu et al. 2004). Logicky by tedy nižší akumulace intramyocelulárních

lipidů vedla ke snížení exprese transportérů MK v kosterním svalu a v játrech (Dyck et al. 2007; Fulgencio et al. 2002). Ke snížené expresi genů u zvířecích modelů pro zkoumané transportéry MK, tedy pro SCL27A4/FATP4 a CD36, dochází pouze v podmínkách silně hypoxických, nikoli však za mírné hypoxie. Genetická exprese klíčového regulátoru oxidace FFA, tedy CPT1 nebyla hypoxií nijak ovlivněna (Musutova et al. 2018).

2.2 Svalová hypoxie

Kyslík je nezbytný pro fungování aerobního metabolismu savců. V případě, že je organismus vystaven přítomnosti nižšího procenta kyslíku, než je běžné, označujeme tento stav za hypoxický. Mezi příčiny vzniku hypoxie patří hypoxémii (snížení obsahu kyslíku v krvi a změna tlaku) nebo snížený přísun či příjem kyslíku (MacIntyre 2014).

V případě kdy byly hlodavci vystaveni krátké hypoxii, se setkáváme s kardiovaskulárními a metabolickými obtížemi, které jsou podobné obtížím pacientů s OSA (Kanagy 2009; Brooks et al. 1997). OSA je obecně spojována s výskytem hypertenze, onemocnění periferních cév, mrtvicí a infarktem myokardu (Lesske et al. 2012). Bylo zjištěno, že i velmi krátká expozice intermitentní hypoxii (IH) třikrát denně po dobu jednoho měsíce indukuje u krys hypertenzi a dochází ke zvýšení středního arteriálního tlaku. Jedna ze studií prokázala, že arteriální krevní tlak zůstává zvýšený i po ukončení indukce krátkých hypoxických expozic. Několik týdnů po IH expozici dochází k rozvoji arterosklerózy, vaskulárním remodelacím a dyslipidémii (Lesske et al. 2012).

Studie u hlodavců vystavených IH naznačují zvětšení karotidového tělíska ve snaze reagovat na hypoxický stav, což by mohlo přispět k již získaným poznatkům v souvislosti s OSA a vývojem hypertenze (Guillermet et al. 2007). Studie obsahující účinek antioxidantů pojednávají o dopadu reactive oxygen species (ROS) na nervovou aktivitu. Tyto funkční změny způsobené zvýšeným množstvím ROS mohou přispět k přetrvávající reflexní aktivaci sympatických nervů během IH a spánkové apnoe (Rey et al. 2006). Na rozvoji hypertenze během IH se podílejí kromě ROS a centrálního či sympatického nervového systému (Row et al. 2003; Brindeiro 2013) také další faktory, jako například angiotensin II (Fletcher et al. 1999) a endotelin 1 (Kanagy et al. 2012). Právě výskyt ROS by mohl být hlavním indikátorem pro vznik hypertenze a zhoršení stavu OSA během IH. Toto tvrzení se ukazuje jako velmi pravděpodobné vzhledem k tomu, že ROS je zvýšena u hlodavců udržovaných v IH (Peng et al. 2006; Row et al. 2003) a v leukocytech u pacientů s OSA (Dyugovskaya et al. 2002).

Předmětem zkoumání působení hypoxie na organismus se stal také hypoxií indukovatelný faktor (HIF-1). HIF-1 je heterodimerní transkripční faktor, jehož podjednotka obsahuje ubikvitin degradační proteazomální doménu (Wang & Semenza 1992; Semenza et al. 2007). HIF-1 je hlavním regulátorem kyslíkové homeostáze uvnitř buněk a zprostředkovává zvýšení glykolýzy a anaerobního metabolismu za hypoxického stavu přes downregulaci mitochondriální spotřeby kyslíku (Denko et al. 2006). Během normoxie způsobuje Von Hippel-Lindau tumorový supresor rychlou degradaci HIF-1. Při hypoxii je však zabráněno degradaci proteinu HIF-1 v důsledku inhibice a jeho hladina se zvyšuje (Huang et al. 1996; Kallio et al. 1997), přičemž dochází k vazbě na regulační oblasti genů jako je erythropoetin nebo vaskulární endoteliální růstový faktor a k regulaci jejich exprese (Yang et al. 2002).

2.3 Souvislost mezi T2DM a OSA

Celková prevalence OSA u pacientů s T2DM je velmi vysoká. Celkově studie prokázali, že u pacientů s T2DM je výskyt OSA mnohem častější než u pacientů, kteří diabetem netrpí, přičemž vždy závisí na studované populaci a závažnosti OSA (Meslier et al. 2003; Reinke et al. 2011). Zdá se, že dalším kritériem je také pohlaví, protože bylo zjištěno, že T2DM se s vysokou prevalencí vyskytuje zejména u žen trpících OSA (Celen et al. 2010). Jiná studie prokázala, že pravděpodobnost vzniku T2DM se zvyšuje v případě, že pacienti trpí vážnou formou OSA a silnou nespavostí (Heitman et al. 2009). Intermitentní hypoxie je spojována se zvýšeným rizikem vzniku T2DM stejně jako obezita, nedostatek pohybu či špatný způsob stravování (Muraki et al. 2010). Hypoxické podmínky a fragmentace spánku vedou k metabolickým změnám a v důsledku toho právě až k T2DM a glukózové intoleranci (viz Obrázek 3).

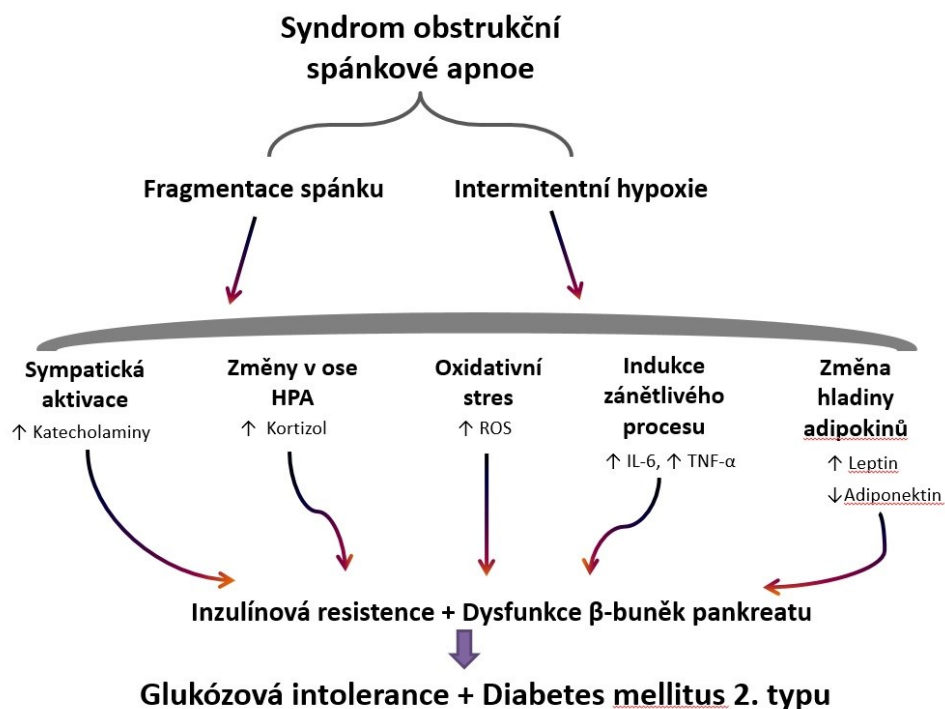
Jako další otázka se nabízí fakt, zda neléčená OSA nepříznivě ovlivňuje glykémii u pacientů s T2DM. Bylo ověřeno, že noční glykémie u obézních jedinců s T2DM a OSA je o 38% vyšší než u pacientů bez OSA. OSA se tedy podílí na vysokých glykemických hodnotách u pacientů s diabetes, přičemž tento fakt vzbuzuje v poslední době vysoký zájem o nové přístupy léčby OSA na základě regulace hladiny glukózy v krvi (Fendri et al. 2011).

OSA také souvisí s inzulínovou resistencí a intolerancí glukózy. Celkově jsou poruchy glukózové tolerance vyšší u pacientů, kteří trpí T2DM i OSA, než u pacientů pouze s T2DM přibližně o 50% (Tamura et al. 2008). Ve studii, kde bylo k dispozici téměř 600 mužských subjektů, intolerance glukózy a inzulínová rezistence exponenciálně rostly se závažností OSA

(Meslier et al. 2003). Velmi podobné výsledky posléze přinesla studie, ve které bylo naopak k dispozici 400 ženských subjektů (Young et al. 2002). Citlivost na inzulín byla také testována pomocí intravenózního glukózového tolerančního testu a bylo zjištěno, že pacienti s OSA vykazovali výraznější snížení citlivosti na inzulín v závislosti na závažnosti OSA oproti zdravým jedincům (Punjabi & Beamer 2009).

Závěrem stojí za zmínku také fakt, že OSA nepostihuje pouze osoby trpící obezitou nebo starší jedince. Přítomnost OSA ovlivňuje také metabolismus zdravých, štíhlých a mladých osob. Byly porovnávány dvě skupiny mužů bez potíží se zvýšeným krevním tlakem. První skupina byli muži trpící OSA a druhá skupina byli muži bez přítomnosti OSA. Skupina mužů s OSA vykazovala o 27% nižší citlivost k inzulínu a o 37% vyšší celkovou sekreci inzulínu, než skupina bez OSA i přes srovnatelné hladiny glukózy (Pamidi et al. 2012).

Celkově je tedy již ověřeno, že OSA má souvislost s rozvojem T2DM právě kvůli vyvolávání resistance vůči inzulínu a také kvůli neschopnosti trvale udržet normální hladinu glukózové homeostáze. OSA může být rizikovým faktorem pro vznik T2DM i u jedinců štíhlých, mladých a zdravých, nikoli pouze u osob starších, obézních a špatně se stravujících, přičemž faktem stále zůstává, že právě centrální typ obezity, tedy osoby se zvýšeným podílem procenta tuku v oblasti břicha jsou skupinou zřejmě nejvíce ohroženou.



Obrázek 3 – Mechanismus OSAS vedoucí ke vzniku T2DM a glukózové intoleranci

3 Transportéry mastných kyselin

Transportní proteiny mastných kyselin jsou rodina proteinů sloužících k absorpci a aktivaci mastných kyselin. Nadměrné vychytávání mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCFA) vede k jejich akumulaci v buňkách, což přispívá k lipotoxicitě a sekundárně k rozvoji metabolických onemocnění, jako je obezita, ateroskleróza nebo diabetes a může posléze vést až k rozvoji srdečních onemocnění a ischemické mrtvice (Kuliczowska-Płaksej et al. 2006).

Po vstupu do buňky jsou LCFA vychytávány pomocí proteinů vázajících mastné kyseliny (FABP), které jsou pak v závislosti na potřebě buňky roz distribuovány do místa určení, ať už za účelem oxidace v mitochondriích a peroxizomech nebo skladování (hlavně esterifikovaných) mastných kyselin v endoplazmatické retikulu a cytoplazmě (Harasim et al. 2008). Mastné kyseliny jsou po rozpoznání pomocí FABP přijímány do buněk, kde dále katalyzují tvorbu koenzymu A, dalších mastných kyselin s dlouhým řetězcem nebo žlučových kyselin. K příjmu mastných kyselin i enzymatické aktivitě přispívá také fenotyp daného transportéru.

Transportéry MK usnadňují translokaci LCFA v adipocytech, hepatocytech, v srdečních a kosterních myocytech, kde jsou LCFA důležitým substrátem pro výrobu energie (Febbraio et al. 2001). Delece transportérů CD36 a CPT1 způsobují funkční defekty v tukové či svalové tkáni, játrech, kůži nebo ve střevě (Schwenk et al. 2010). Nedávné experimenty jasně stanovily FATP4 jako regulační transportér mastných kyselin jak v tukové tkáni, tak ve svalovině a určily důležitost jejich role v udržení energetické homeostáze, termogeneze a rezistence na inzulín (Lenz et al. 2011).

3.1 CD36

Translokáza mastných kyselin, destičkový glykoprotein 4 neboli cluster of differentiation 36 (CD36) je plazmatický membránový glykoprotein o hmotnosti 78 až 88 kDa kotvený k membráně přes dva hydrofobní segmenty umístěné na obou N- a C-koncových oblastech (Pioltine et al. 2017; Ramos-Lopez et al. 2016). Protein má dvě transmembránové domény s velkou extracelulární oblastí, která obsahuje úsek vázající ligand a dvě krátké cytoplazmatické úseky na N-konci a C-konci (Armesilla & Vega 1994; Vega et al. 1991). Extracelulární smyčka obsahuje oblasti, které vážou hydrofobní ligandy jako například cholesterol a mastné kyseliny (Neculai et al. 2013).

Je exprimován v monocytech, na makrofázích, krevních destičkách, mikrovaskulárních endoteliálních buňkách, erythroblastech, adipocytech a epitelu mléčných žláz (Choquet et al. 2011; Heni et al. 2011; Pioltine et al. 2017). CD36 je dále přítomen na povrchu dendritických buněk a také buněk srdečního, kosterního a hladkého svalstva. V buňce se nejvíce vyskytuje v Golgiho aparátu a v plasmatické membráně. Jedná se o membránový receptor exprimovaný na široké škále lidských buněk.

Polymorfismy CD36 jsou údajně spojovány s vnímáním tuků v ústech, příjmem potravy a metabolickými poruchami (Fujii et al. 2019). CD36 obsahuje multifunkční receptor s nezávislou schopností vazby tří hlavních tříd ligandů, a to modifikovaných fosfolipidů, LCFA a proteinů obsahujících strukturní domény homologů trombospondinu (Li et al. 2010; Febbraio et al. 2001; Kuliczowska-Płaksej et al. 2006). Má schopnost vázat oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě (oxLDL) po rozpoznání pomocí lipidových složek, zejména negativně nabitých fosfolipidů. Nedostatek lipidové složky oxLDL inhibuje jejich vychytávání receptorem CD36 a v důsledku toho snižuje akumulaci lipoproteinů v makrofázích (Kuliczowska-Płaksej et al. 2006). CD36 dále působí jako receptor pro kolageny typu I (Tandon et al. 1989) a IV (Stein et al. 1993), mastné kyseliny (Abumrad et al. 1993), polyanionové fosfolipidy (Febbraio et al. 2001) a apoptotické buňky (Ren et al. 1995; Savill et al. 1992).

Mutace v CD36 genu jsou spojovány s poruchami transportu plasmatických mastných kyselin a triglyceridů, což jsou rizikové faktory pro metabolické poruchy zahrnující inzulinovou rezistenci (Ma et al. 2004).

Exprese genu CD36 je převážně kontrolována lipogenním transkripčním faktorem PPAR γ , jaterním X receptorem (LXR), nukleárním receptorem pro těhotné X (PXR) a testikulárním sirotčím jaderným receptorem 4 (TR4) (Xie et al. 2009; Febbraio et al. 2001). PPAR γ a CD36 mezi sebou mají pozitivní zpětnou vazbu, tudíž zvýšená aktivita PPAR γ vede ke zvýšené expresi CD36 v makrofázích (Han et al. 1999). Studie z posledních let navíc ukazují, že PPAR γ přímo ovlivňuje expresi CD36 a zprostředkovává vychytávání oxLDL v monocytech (Han & Sidell 2002). Dalším faktorem regulující expresi receptoru CD36 jsou lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL). Při vyšších koncentracích HDL dochází ke snížení exprese CD36 zvýšením fosforylace PPAR γ . Exprese CD36 je dále zvýšena prozánětlivým účinkem cytokinů, což vede k akumulaci oxLDL (Huang et al. 1999; Han et al. 1999). Exprese CD36 může být naopak snížena pomocí transformace růstového faktoru beta, prostřednictvím fosforylace MAPK nebo fosforylací PPAR γ (Han et al. 2000).

U pacientů s chronickým onemocněním ledvin je CD36 exprese stimulována hyperlipidemií a hyperglykemií. Jedná se zejména o pacienty s diabetickou nefropatií (Herman-Edelstein et al. 2013; Wculek & Malanchi 2015). CD36 se zároveň podílí na regulaci hladiny energie přes mitochondriální β -oxidaci mastných kyselin, která je hlavním zdrojem renální produkce ATP (Pein & Oskarsson 2015).

CD36 je v posledních letech také výrazněji zkoumána z hlediska vývoje rakoviny. Bylo zjištěno, že CD36 způsobuje téměř úplnou inhibici metastáz v imunodeficientních myších modelech lidského karcinomu, bez vedlejších účinků. Inhibice CD36 zhoršuje metastázy především, co se týče melanomu a karcinomu prsu. Naprosto opačný efekt má CD36 v oblasti lymfatických uzlin, kdy se po jeho delecii výrazně zmenšila velikost metastáz ve všech nádorových liniích. Zvýšený metastatický potenciál se vyskytoval u myši s vysokým obsahem tuků ve výživě, což naznačuje, že exprese CD36 je citlivá na zvýšenou koncentraci mastných kyselin (Pascual et al. 2017).

3.2 CPT1

Karnitin palmitoyltransferáza 1 (CPT1) je transportér mastných kyselin s dlouhým řetězcem o hmotnosti 88 kDa, který je klíčový při transportu karnitinu přes vnitřní membránu mitochondrií. Acyl-CoA je mastná kyselina s dlouhým řetězcem vyžadující CPT1 pro vstup do mitochondrií a následnou β -oxidaci. β -oxidace vyžaduje speciální proteinovou asociaci, karnitin palmitoyltransferázový systém, který reverzibilně katalyzuje vznik palmitoylkarnitinu a CoA-SH z palmitoyl-CoA a karnitinu. Malonyl-CoA je meziproduktem prvního kroku při syntéze FA, který je obvykle odvozený od glukózy a CPT1 je jím pevně regulován jakožto svým fyziologickým inhibítorem (Thampyz 1989). CPT1 obsahuje N- a C-terminálních doménu, které jsou klíčové pro aktivitu a citlivost malonyl-CoA na cytosolické straně vnější mitochondriální membrány (Woldegiorgis et al. 2005).

Genová rodina CPT zahrnuje více subtypů tohoto genu. Například CPT1A je exprimován zejména ve svalech, jaterní tkáni, ledvinách, plicích, slezině, střevech a v mozku, přičemž CPT1B je exprimován zejména v srdci, hnědé tukové tkáni a ve svalech (Mcgarry et al. 1983). V játrech kontroluje CPT1 tok mastných kyselin prostřednictvím esterifikace (Louet et al. 2005). CPT1 ovlivňuje metabolismus v srdci, játrech a pankreatických β -buňkách, které se jeví jako potenciální cíl pro léčbu metabolických poruch jako je právě diabetes mellitus nebo koronární srdeční onemocnění (Rufer et al. 2006).

Geny CPT výrazně podléhají dietní a hormonální regulaci ve tkáních s vysokým využitím mastných kyselin jako je právě srdce, sval a játra. V dospělých játrech je kapacita oxidace mastných kyselin v mitochondriích převážně regulována na úrovni exprese genu CPT1 v odezvě na různé fyziologické nebo patologické podněty jako je půst, vysoké množství tuků ve stravě, indukce diabetes nebo léčba peroxizomálními či mitochondriálními proliferujícími činidly, přičemž všechny tyto podněty vedou ke zvýšení transkripce CPT1 mRNA (Louet et al. 2005). Během hladovění klesá hladina malonyl-CoA, nedochází k účinné inhibici CPT1, což vede ke zvýšení oxidace LCFA a následně ke ketogenezi. Některé inhibitory CPT1 by mohly být použity jako potenciální antidiabetická činidla (Cutrona et al. 2018; Rufer et al. 2006).

CPT1 má také význam v termogenezi hnědé tukové tkáně (BAT). Bylo zjištěno, že při inhibici CPT1 receptoru dochází k zastavení leptinem indukované BAT a testovaná zvířata zvyšují svou tělesnou hmotnost. Tyto poznatky by mohly být posléze využity pro léčbu obezity (Perpinyà et al. 2018).

3.3 FATP4

Transportní protein 4 pro mastné kyseliny FATP4 (SLC27A4) o hmotnosti 72 kDa je členem rodiny transportních proteinů mastných kyselin (FATP), tedy skupiny evolučně konzervovaných proteinů, které se podílí na buněčné absorpci a metabolismu mastných kyselin s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem (Kuo et al. 2018). FATP4 byl poprvé nalezen na apikální straně zralých enterocytů, přičemž bylo prokázáno, že se jedná o důležitý transportér mastných kyselin s dlouhým řetězcem napříč plazmatickou membránou (Stahl et al. 1999). Metabolismus mastných kyselin zahrnuje několik drah včetně transportu mastných kyselin, syntézy de novo a oxidace mastných kyselin (Wu et al. 2013). FABP je skupinou proteinů, které vážou mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a podílejí se na usnadnění transportu a příjmu lipidů (Liu et al. 2011).

FATP4 mRNA je nejvíce exprimována v tenkém střevě, mozku, kosterních svalech, ledvinách, játrech, kůži a srdci. Aktivita proteinu FATP4 je lokalizována v organelách jako jsou mitochondrie, peroxizomy, endoplazmatické retikulum nebo také v plasmatické membráně. FATP4 má potenciální význam zejména v kůži, přičemž jeho defekty zde přispívají k rozvoji kožních onemocnění (Lenz et al. 2011; Stahl et al. 1999).

Transfekce FATP4 cDNA do buňky vedla k dvojnásobnému zvýšení syntetázy palmitoyl-CoA a pětinasobnému zvýšení syntetázy lignoceroyl-CoA, což ukazuje, že gen FATP4 kóduje acyl-CoA syntetázu se substrátem specifickým pro biaty mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (Herrmann et al. 2001).

Byla pozorována relativně vysoká exprese FATP4 v tkáních karcinomu prsu ve srovnání s normálními prsními tkáněmi (Zhao et al. 2017; Pascual et al. 2017).

4 Cíle diplomové práce

Cílem práce bylo zjistit, zda přítomnost OSA u nediabetických subjektů a pacientů s diabetes mellitus 2. typu vede k poruchám v metabolismu volných mastných kyselin a lipidů v kosterním svalu. Experimenty mají dokázat, že pacienti s OSA a T2DM mají zvýšené množství intramyocelulárních triglyceridů v kosterních svalech ve srovnání s pacienty trpící pouze OSA nebo se zdravými kontrolami. Dalším cílem je prokázat, že genová exprese klíčových regulačních enzymů, transportérů MK, řídících příjem a využití volných mastných kyselin bude nejnižší u pacientů s OSA a T2DM ve srovnání s pacienty s OSA a se zdravými kontrolami.

Testovali jsme následující hypotézy:

- 1) Přítomnost OSA nevede k rozdílné genové expresi
- 2) Přítomnost OSA nevede k rozdílné proteinové kvantitě
- 3) Přítomnost OSA nevede k rozdílné oxidaci palmitátu

5 Materiál a metody

5.1 Projekt FAMOSA a informace o pacientech

Subjekty byly přijímány prostřednictvím doporučení od spolupracujících lékařů a prostřednictvím místní mediální reklamy. Pacienti byli rekrutováni do čtyř skupin takto: pacienti s T2DM a mírnou nebo žádnou obstrukční spánkovou apnoe (T2DM), pacienti s T2DM a těžkou obstrukční spánkovou apnoe (T2DM+OSA), pacienti trpící obstrukční spánkovou apnoe (OSA) a zdravé kontroly bez OSA nebo T2DM. Kritéria zahrnutí byla stanovena na 18 až 85 let věku a index tělesné hmotnosti (BMI) na 22 až 40 kg/m². Závažnost OSA byla stanovena limitovanou spánkovou polygrafií, která byla provedena jako domácí spánková studie. T2DM byl diagnostikován na základě kritérií Evropské asociace pro studium diabetu (EASD). Důležité je, že ze studie byli vyřazeni všichni pacienti s akutním onemocněním, dekompenzovaným chronickým onemocněním, srdeční nebo renální insuficiencí či pacienti, kteří užívali léky ovlivňující lipolýzu. Zároveň nesměla být u pacientů změna tělesné hmotnosti větší než 5 kg za poslední 3 měsíce. Všichni účastníci dali písemný informovaný souhlas před účastí ve studii. Studie byla zaregistrována v ClinicalTrials.gov (číslo NCT02683616) a schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze.

Byla provedena studie spánku. Záznamy spánku byly prováděny za použití zařízení typu III, které zaznamenalo saturaci hemoglobinu, tepovou frekvenci, elektrokardiogram (EKG), nosní proudění vzduchu, hrudní a abdominální dýchací úsilí (Nox T3, Nox Medical, Reykjavík, Island) v domácím prostředí. Získaná data byla vyhodnocena lékařem se spánkovým certifikátem podle kritérií American Academy of Sleep Medicine (apnoe definovaná jako $\geq 90\%$ snížení průtoku vzduchu po dobu nejméně 10 sekund a hypopnoe definovaná jako snížení průtoku vzduchu o $\geq 30\%$ po dobu nejméně 10 sekund spolu s $>4\%$ desaturací).

Následná mikrodialýza byla provedena v 8:00 hodin nalačno. Do subkutánní břišní tukové tkáně byly po lokální epidermální anestezii (1% Mesocaine, Zentiva a.s., Praha, Česká republika) vloženy tři 20 kDa mikrodialyzační katétry (63 Microdialysis katetr 40/30, CMA Microdialysis AB, Kista, Švédsko). Pro účely stanovení lipolýzy byla jako marker lipolýzy použita koncentrace glycerolu v dialyzátu. Koncentrace glycerolu byla měřena použitím komerčně dostupného kolorimetrického testu (volné glycerolové činidlo F6428, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). FFA v séru byly měřeny komerčně dostupným kolorimetrickým testem (NEFA-HR2, Wako Chemical Inc., Richmond, VA, USA). Vzorky dialyzátu byly

posléze uloženy do mrazicího boxu (-80°C). Dále byl výše zmíněným pacientům pod místním znecitlivěním odebrán kus kosterního femorálního svalu (70-100 mg). Byl proveden malý řez na boční straně stehenní oblasti a svalová biopsie byla získána pomocí speciální bioptické jehly (Bard Magnum). Vzorky svalové tkáně byly zváženy a separátně uloženy do mrazicího boxu (-80°C).

Do dvou týdnů po mikrodialyzačním experimentu navštívili pacienti centrum pro metabolická a antropometrická hodnocení. Měření zahrnovala biochemickou analýzu krevního obrazu, koagulace, analýzu moči, měření vícefrekvenční bioimpedance (analyzátor Body Impedance NUTRIGUARD-M, Data Input GmbH, Frankfurt, Německo), údaje o tělesném složení a záznam individuální tělesné hmotnosti, výšky a obvod pasu. Následně byl proveden odběr vzorků nitrožilního glukózového tolerančního testu (IVGTT) v časech -15, -10, -5 a -1 min, následované intravenózním podáním 0,32 g/kg glukózy v čase 0 min. Dvacet minut po dávce glukózy bylo intravenózně podáno 0,03 U/kg inzulínu (Humulin R, Lilly France S.A.S, Fegersheim, Francie). Vzorky krve byly odebírány v časech 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 19, 22, 24, 25, 27, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160 a 180 minut. Byly stanoveny hladiny glukózy a inzulínu v odebraných vzorcích.

	T2DM	T2DM+OSA
Počet (Ž/M)	10 (7/3)	12 (6/6)
Věk (roky)	63.95 ± 2.07	63.37 ± 1.92
Tuk (kg)	27.59 ± 2.56	29.85 ± 2.33
AHI	5.89 ± 0.92	47.76 ± 4.89*
ODI	6.80 ± 1.21	46.33 ± 5.06*
SpO2 < 90%	10.06 ± 4.06	34.62 ± 9.20*
HbA1c (mmol/mol)	52.70 ± 3.54	51.67 ± 3.43
Insulin (mU/l)	14.40 ± 1.36	16.87 ± 2.66
Inzulínová rezistence	4.44 ± 0.45	5.24 ± 0.93*
ALT (μkat/l)	0.45 ± 0.05	0.63 ± 0.06*
AST (μkat/l)	0.37 ± 0.02	0.45 ± 0.03*

BMI = body mass index, WHR = waist hip ratio, AHI = apnea hypopnea index, ODI = oxygen desaturation index, SpO2 < 90% = percentage of total sleep time with oxygen saturation less than 90%, HDL = high density lipoprotein, LDL = low density lipoprotein, TAG = triacylglycerol, FFA = free fatty acids, HbA1c = glycated hemoglobin, ALT = alanine transaminase, AST = aspartate transaminase
Data represent mean ± SEM.

* Significant difference (P<0.05) with control group.

Significant difference (P<0.05) with DM group.

Tabulka 1 – Antropometrická data pacientů pro projekt FAMOSA

K výzkumu byly použity svalové biopsie celkem ze 44 pacientů. Pacienti byli rozděleni do 4 skupin podle subjektivní diagnostiky.

- Pacienti s onemocněním diabetes mellitus 2. typu (T2DM)
- Pacienti s onemocněním diabetes mellitus 2. typu a se syndromem obstrukční spánkové apnoe (T2DM+OSA)
- Pacienti se syndromem obstrukční spánkové apnoe (OSA)
- Zdraví, kontrolní pacienti (KONT)

Diagnóza	Počet pacientů
T2DM+OSA	11
T2DM	10
OSA	9
KONT	14
Celkem	44

Tabulka 2 – seznam pacientů pro proteinovou detekci

Diagnóza	Počet pacientů
T2DM+OSA	12
T2DM	10
OSA	9
KONT	13
Celkem	44

Tabulka 3 – seznam pacientů pro metodu qPCR

5.2 Zpracování svalových biopsií

V den zpracování byly vzorky svalové tkáně vyjmuty z mrazícího boxu a uchovávány na suchém ledu. Každý vzorek byl přemístěn do 5ml tuby a homogenizován pomocí homogenizátoru (ULTRA – TURRAX, T 25 basic, IKA - WERKE) společně s TPERem v poměru na 100mg vzorku 1ml TPERu. TPER obsahoval cOmplete ULTRA Tablets (EDTA-free, glass vials, REF 05892953001), aby bylo co nejvíce zamezeno případné proteolytické aktivitě. Homogenizace byla provedena třikrát po dobu 10 sekund a mezi jednotlivými kroky byl vzorek vždy ponechán 1 minutu v klidu na ledu. Homogenizace probíhala na level 3 (odpovídající 13500 otáčkám za minutu). Posléze byl vzorek dále homogenizován pomocí skleněného homogenizátoru s tyčinkou značky PYREX® (3411E25) stejným způsobem jako probíhala homogenizace předchozí, akorát v tomto případě byl použit level II./5. V posledním kroku byly vzorky sonikovány pomocí sonikátoru Ultrasonic Processor (UP200S, hielscher-Ultrasound Technology). Sonikace probíhala vždy po dobu 5 vtěrin, třikrát za sebou s tím, že mezi jednotlivými kroky byl vzorek vždy 1 minutu na ledu v klidu. Nastavení sonikátoru – síla: stupeň 5, amplituda: 65%. Takto připravené vzorky byly posléze přelity do mikrozkušavek eppendorf a umístěny na kývačku BenchRocker 2D značky Benchmark po dobu dvou hodin do lednice. Nakonec byly vzorky opět uloženy do mrazícího boxu (-80°C) a použity až v den samotného pokusu.

5.3 Izolace svalového lyzátu

V den pokusu byly vzorky vyjmuty z mrazícího boxu a centrifugovány v Centrifuge 5804R značky Eppendorf. Centrifugace probíhala po dobu 15 minut s gravitačním zrychlením 14000g. Ze vzorků byl odebrán supernatant, a ten byl posléze rozdělen po 100 μ l do mikrozkušavek Eppendorf.

5.4 Stanovení množství proteinů

Ke stanovení množství proteinu byla využita Bradfordova metoda, stanovení dle BCA protokolu. Byla použita 96 jamková destička NUNC (Lot. 2442517) a zhotovena kalibrační řada za použití hovězího sérového albuminu (BSA, 9048-46-8, Sigma-Aldrich). Koncentrační

řada byla připravena pomocí ředící řady albuminu s TPERem o známých koncentracích pro každou jamku (20 µg/µl 10 µg/µl 5 µg/µl 2,5 µg/µl 1,25 µg/µl 0,625 µg/µl 0,3125 µg/µl 0,15625 µg/µl 0,078125 µg/µl 0,039063 µg/µl 0,019531 µg/µl), kdy pipetovaný objem byl 10µl na jamku a měření probíhalo vždy v dubletech. Poté bylo do každé jamky přidáno 200µl Bradfordova činidla a destička byla inkubována při 37°C po dobu 30 minut. Měření proteinů bylo provedeno pomocí VERSA max tunable microplate reader značky Molecular Devices při 570nm. Změřená koncentrace byla pomocí počítačového programu Excel přepočtena na množství proteinu ve vzorku. Vzorky byly neustále udržovány na suchém ledu a v ten stejný den použity pro metodu Western Blot.

5.5 SDS-PAGE elektroforéza a Western Blotting

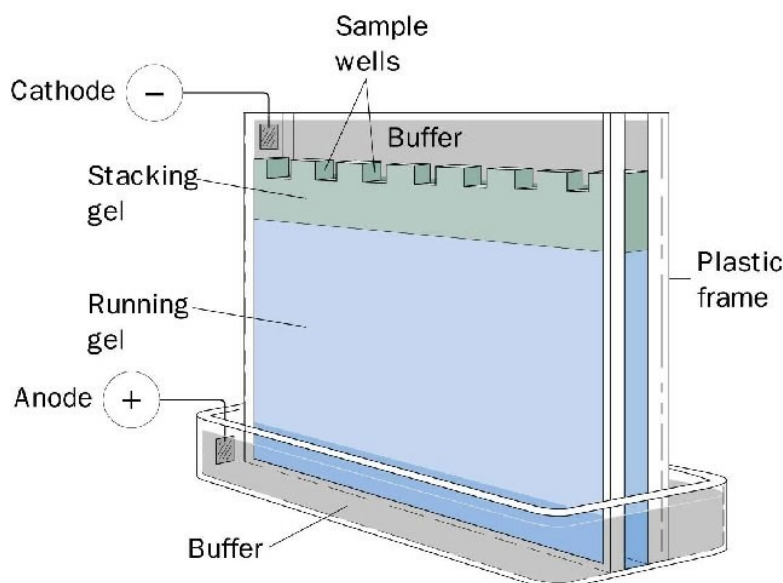
Pro detekci proteinů byla použita metoda SDS-PAGE elektroforézy a následného Western Blottingu. Western blotting neboli imunoblotting je metoda umožňující separaci proteinů pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) založené na odlišné velikosti daných proteinů, přičemž jejich následný přenos na membránu způsobí jejich selektivní detekci za použití vybraných protilátek (Yang & Mahmood 2012). Tato technika se rutinně používá ke kvalitativní identifikaci specifického proteinu z komplexního biologického vzorku a poskytuje informace o jeho molekulové hmotnosti (Weiss & Görg 2008).

Připravené vzorky se zahřejí po dobu 5 až 10 minut mezi 70 a 100°C. Během tohoto procesu dochází ke ztrátě sekundární konformace proteinů a obklopení jednotlivých molekul SDS, který poskytuje negativní náboj, přičemž všechny proteiny posléze migrují směrem ke kladnému pólu během samotné elektroforézy. Přidáním chemického redukčního činidla, jako například β-merkaptoethanolu, dojde k rozrušení disulfidických vazeb mezi řetězci, což způsobí rozklad komplexní sekundární a terciální proteinové struktury.

Hustota polyakrylamidového gelu ovlivňuje mobilitu a schopnost migrace proteinů. Pro velké proteiny je nutné zvolit gel řidší než pro proteiny malé a naopak. Připravené vzorky proteinů jsou nanášeny do jamek gelu a po zpuštění aparatury dochází díky elektrickému napětí k migraci proteinů (viz Obrázek 4). Zhotovené gely s proteiny se přenesou a imobilizují na PVDF nebo nitrocelulóзовou membránu. Membrány se promyjí, zablokují a inkubují se specifickou primární protilátkou, což způsobí primární značení protilátek (Lee 2007; Fowler

1995). Poté se membrány inkubují se sekundární protilátkou proti hostitelskému druhu látky primární, čímž získáme značení sekundární (Dubitsky et al. 2002).

Vzorky o známé koncentraci proteinů byly ředěny SLB a BME (viz tabulka) v poměru 1:1. Finální koncentrace proteinů pro každou jamku byla určena jako 15 (pro FATP4 a CD36) a 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (pro CPT1), přičemž pro každého pacienta bylo celkové ředění různé, dle konkrétního množství proteinů. Připravené vzorky byly povařeny po dobu 5 minut a posléze ponechány 10 minut na ledu. Pro separaci proteinů byl použit 8% separační gel (viz tabulka) a 4% zaostřovací gel (viz tabulka). Byla sestavena aparatura pro elektroforézu, gely byly zality vnitřním elektrodovým pufrem, vloženy do nádoby pro elektroforézu a vzorky byly nanесeny na gel. Byl použit marker Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa) vždy v množství 5 μl . Jako kontrolní vzorek byl použit jeden z pacientů, konkrétně pacient číslo F23. Poté byla nádoba zalita vnějším elektrodovým pufrem (viz tabulka). Elektroforéza vždy probíhala za konstantního elektrického napětí 100V po dobu 2 hodin.

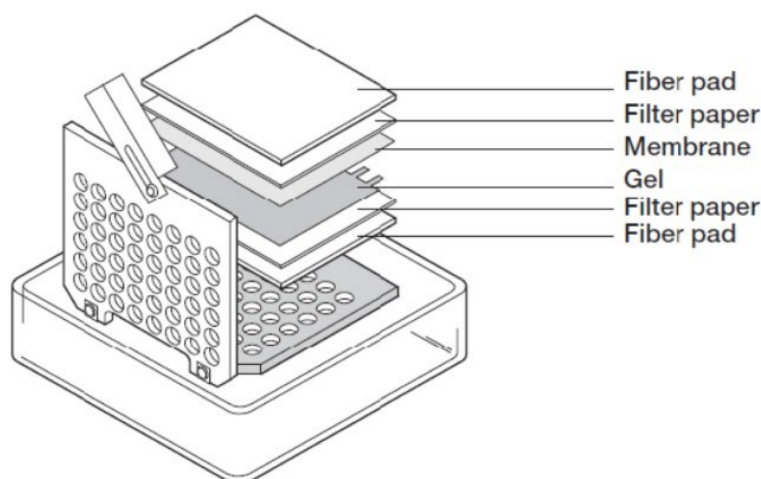


Obrázek 4: Schéma principu elektroforézy

(<http://lab-journal.blogspot.com/2006/05/post-cientfico-cultural-ensayos-de.html>).

Po dokončení elektroforézy byly gely vyjmuty z aparatury. Gely byly podpipetovány Transfer bufferem a rovnou přeneseny na filtrační papír, který byl předtím inkubován v použitém Transfer bufferu (viz tabulka) po dobu 10 minut společně s blotovacími polštářky, dalšími filtračními papíry, kazetami a membránou. Byla použita PVDF membrána, která byla před celým procesem ponechána po dobu 1 minuty v methanolu k její aktivaci. Posléze byla

kazeta sestavena (viz Obrázek 5) a vložena do aparatury a následně do blotovací nádoby. Nádoba byla zalita zcela ledovým transfer bufferem, bylo do ní vloženo magnetické míchátko a ledový blok. Dále byla aparatura vložena do krabice s ledem a umístěna na magnetickou míchačku značky IKA (C-MAG HS 4 DIGITAL, TOPTION-244). Western blotting probíhal za konstantního elektrického napětí 100V po dobu 2 hodin.



Obrázek 5: Schéma sestavení blotovací kazety (Qin et al. 2016).

5.5.1 Imunodetekce

Po dokončení Western Blottingu byly membrány inkubovány v promývacím roztoku TBST (viz tabulka) po dobu 10 min. Pro kontrolu kvality přenosu proteinů na membránu bylo použito barvení Ponceau S značky Abcam (ab146313) ředěné destilovanou vodou. Poté bylo Ponceau z membrán odmyto pomocí TBST 3x5 minut a membrány byly opět vloženy do methanolu po dobu jedné minuty a poté znovu krátce promyty v TBST. Proteiny na membráně byly poté zablokovány zpravidla 5% nízkotučným sušeným mlékem rozpuštěným v TBST po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Poté byly membrány promyty opět v TBST do dobu 10 minut.

Následně probíhala inkubace na agitátoru v 2,5% nízkotučném sušeném mléce s primární protilátkou po dobu 1 hodiny. Membrány byly vložena do lednice přes noc. Druhý den byly membrány s primární protilátkou opět vloženy na kývačku a ponechány inkubaci po dobu 1 hodiny. Poté byly membrány 3x15 minut promyty v TBST. Na membrány byla aplikována sekundární protilátka Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) ab97051 (viz příloha

tabulka) v 2,5 % nízkotučném sušeném mléce. Poté byly membrány promyty 3x5 minut v TBST.

5.5.2 Proteinová detekce

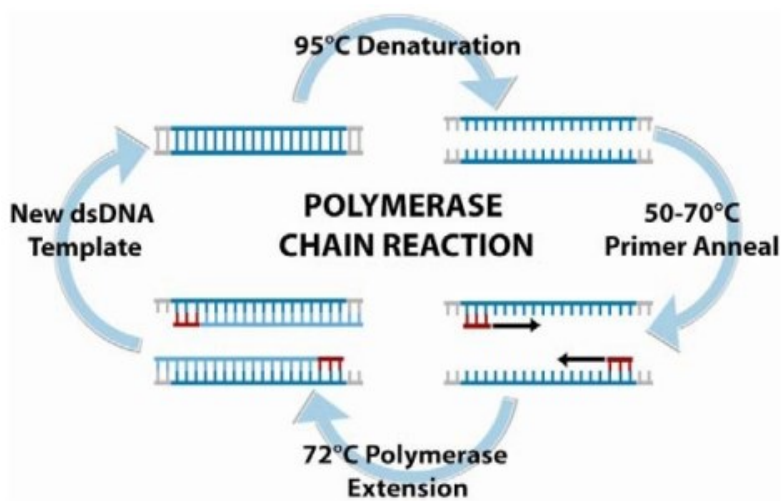
Membrány byly posléze osušeny papírovou utěrkou a byla na ně nanášena směs chemiluminiscenční směs luminolu a peroxidu (1:1) značky Thermo Scientific (34080). Proteiny byly následně detekovány pomocí přístroje LAS-4000 (FujiFilm Life Science USA) a denzitometricky vyhodnoceny programem ImageJ.

5.5.3 Statistické vyhodnocení

Naměřené hodnoty byly statisticky vyhodnoceny programem GraphPad Prism 8. Ke statistickému zhodnocení byl použit One-way ANOVA multiple comparisons test, hladina významnosti $p < 0,05$, $n = 44$.

5.6 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, anglicky Polymerase Chain Reaction) je metoda rychlého zmnožení vybraného úseku DNA ohraničeného primery, které nasedají svou komplementaritou k vybraným úsekům DNA řetězce. Syntéza DNA probíhá díky termostabilní DNA polymeráze. Reakce využívá cyklických změn teplot způsobující denaturaci dvouvláknové DNA, přisednutí primerů a namnožení dalších úseků DNA (viz Obrázek 6). Takto během 32 cyklů vzniká 1 miliarda molekul DNA (Lorenz 2012; Williams 2009).



Obrázek 6: Princip zmnožení DNA úseků pomocí cyklických změn teplot metodou PCR.

(LabGuide.cz, Metody)

5.6.1 Izolace RNA

K metodě byl použit High Pure FFPE RNA Isolation Kit, Roche Life Science. K měření byly opět použity svalové biopsie 44 stejných pacientů jako v případě Western blottingu. Před začátkem práce byla pracovní plocha zbavena nechtěného okolního RNA pomocí RNasy ZAP (Sigma-Aldrich, R2020). Jednotlivé vzorky svalové tkáňe byly vyjmuty z mrazícího boxu (-80°C) a zhomogenizovány společně s 1000 µl TriPure Isolation Reagent (11667157001, Sigma-Aldrich) v 5ml tubě pomocí homogenizátoru (ULTRA – TURRAX, T 25 basic, IKA-WERKE) na výkonnostní level 4 (odpovídající 17500 otáčkám za minutu). Homogenát byl přelit do mikrozkušavky Eppendorf. K homogenátu bylo přidáno 200 µl chloroformu, byl řádně protřepán a posléze ponechán 3 minuty v klidu.

Vzorky byly centrifugovány v Centrifuge 5804R značky Eppendorf. Centrifugace probíhala po dobu 18 minut s gravitačním zrychlením 10000g při 4°C. Následující kroky již probíhali v digestoři značky Captair Smart. Po dokončení centrifugace byl opatrně odsán supernatant do PCR RNase free mikrozkušavky Eppendorf. Ke vzorku bylo přidáno stejné množství ethanolu jako supernatantu a byl řádně propipetován. K samotné izolaci RNA byl vzorek přemístěn do filtru se sběrnou tubou a byl vložen do centrifugy a stočen při 14000 rpm po dobu 30 sekund.

Do každého vzorku byla přimíchána směs z 90µl DNase incubation bufferu a 10µl DNázy. Vzorky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Ke vzorkům bylo posléze přidáno 500µl Wash bufferu I. a byly stočeny při 10000rpm po dobu 15 sekund. Tento krok byl proveden dvakrát. Dále se ke vzorkům přidalo 300µl Wash bufferu II. a byly stočeny na 14000rpm do dobu 2 minut. Filtr byl přemístěn do skladovací eppendorfky a bylo přidáno 100µl Elution bufferu a vzorky byly stočeny na 10000rpm po dobu 1 minuty. Tento krok byl proveden dvakrát. Všechny vzorky byly posléze změřeny na přístroji NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer značky ThermoFisher (ND-2000) pro zjištění množství RNA (ng/µl).

5.6.2 Reverzní transkripce RNA do cDNA

Pro reverzní transkripci bylo použito pro všech 44 vzorků 500 ng RNA a vzorek byl doplněn do celkového objemu 10 µl pomocí Nuclease-free H₂O. Mix pro reverzní transkripci (Thermo Fisher Scientific, 4368814, 00743367, Litva) byl připraven podle tabulky (viz

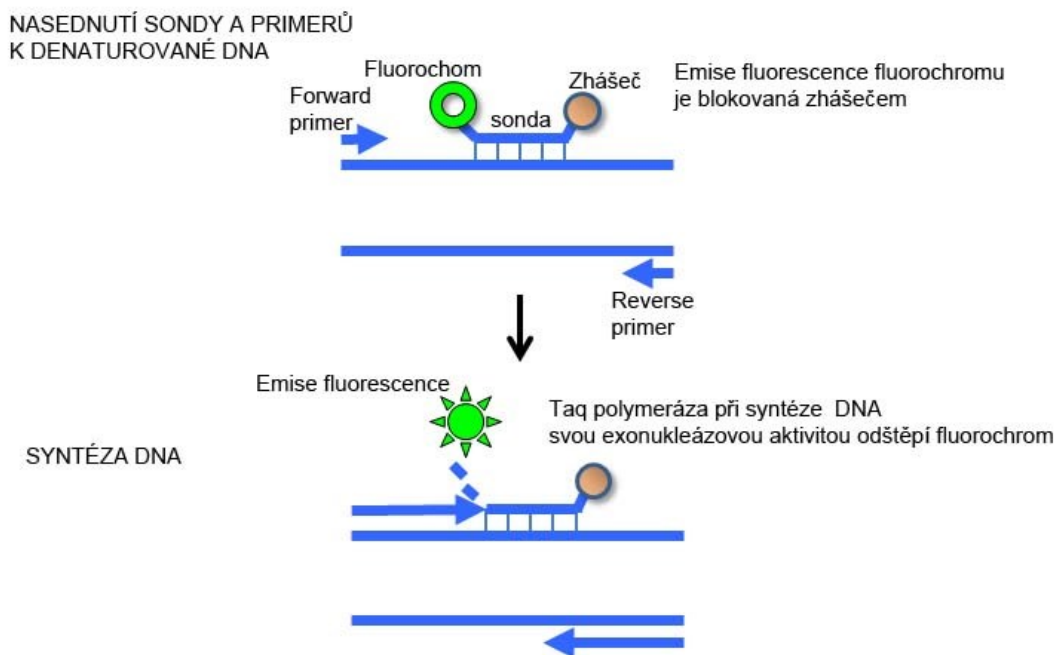
Přílohy). Pro každý vzorek bylo smícháno 10 μ l RNA a 10 μ l TaqMan™ Fast Advanced Master Mixu (ThermoFisher Scientific, 4444556, 00739223, Litva) v 0,2 ml PCR-free zkumavce značky Eppendorf.

Zkumavky byly vloženy do PCR cycleru značky Benchmark Scientific (TC 9639) na RT (reverse transcription) program po dobu 2 hodin a 15 minut. Vzorky byly nejdříve inkubovány v 95°C pro denaturaci DNA templátu, poté při 60°C pro nasednutí primerů a nakonec při 70°C pro prodloužení řetězce pomocí DNA polymerázy. Vzorky byly zamrazeny a použity v den provedení samotného qPCR.

5.6.3 qPCR

K metodě PCR byla použita 96-jamková destička. Z mrazáku byla vyjmuta připravená cDNA a posléze byla naředěna na koncentraci 2,5 ng/ μ l (1:9). Každý vzorek byl smíchán s TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X), TaqMan® Assay (20X) (próba) a Nuclease-Free Water (ThermoFisher Scientific) podle tabulky (viz přílohy). Dříve byla pro měření produktů real-time PCR používána interkalátorová barviva.

Hlavní nevýhodou těchto barviv je, že detekují akumulaci jak specifických, tak nespecifických PCR produktů. Proto jsme v našem případě použili próbu TaqMan® Assay (20X), přičemž tento systém nese spoustu výhod počínaje zavedením fluorogenně značených sond, které využívají 5' nukleázovou aktivitu Taq DNA polymerázy. Dostupnost těchto fluorogenních sond umožnila vývoj metody real-time PCR pro detekci pouze specifických amplifikačních produktů (viz Obrázek 7) (ThermoFisher Scientific).



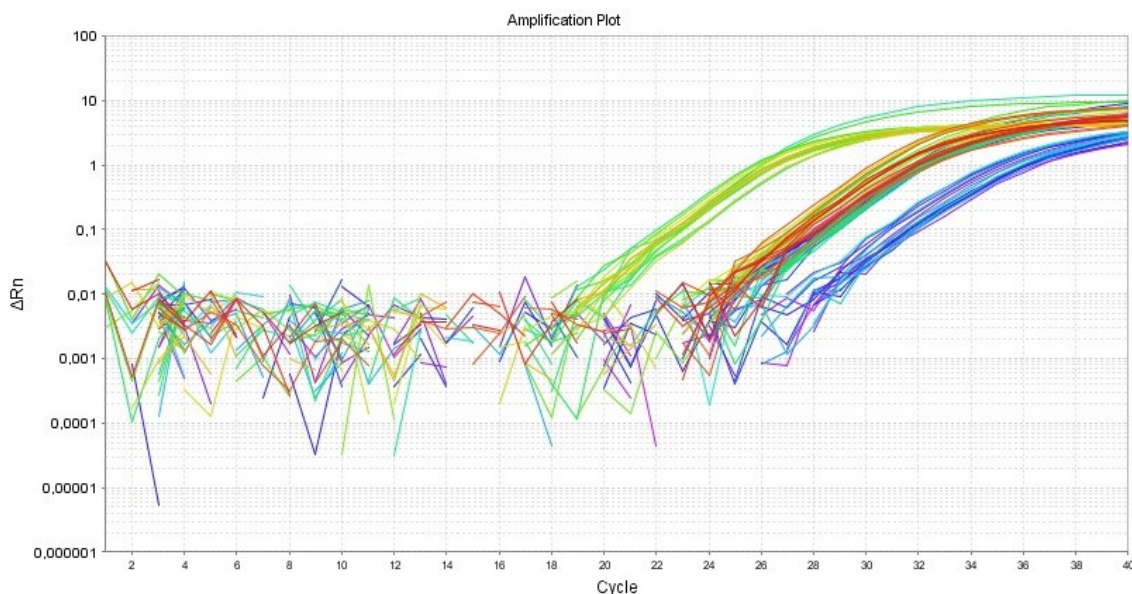
Obrázek 7: Princip fungování TaqMan® sondy. (LabGuide.cz, Metody)

Pro každý vzorek byly použity dva kontrolní geny TBP (TATA vazebný protein) a GUSB (beta-glukuronidáza) a tři geny, které byly určeny k detekci – FATP4, CD36 a CPT1 vždy v tripletu. Kontrolní geny TBP a GUSB byly zvoleny na základě jejich stabilní exprese v podmínkách hypoxie.

Pro každého pacienta byla zavedena i jedna jamka jako NRT (no reverse transcriptase) kontrola, která obsahovala pouze vzorek RNA, všech 5 prób, Nuclease-Free Water a Master Mix. Řazení na destičku viz přílohy. Destička byla uzavřena pomocí stripů a vložena do přístroje 7500 Real-Time PCR System (4351105, ThermoFisher). Měření probíhalo po dobu čtyřiceti minut nejdříve při 95°C a posléze při 60°C.

5.6.4 Vyhodnocení

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu 7500 Software v2.3 (viz Obrázek 8). Geny byly předem specificky označeny dle jednotlivých jamek a pro vyhodnocení byly použity výsledné hodnoty C_T . V programu Excel byly hodnoty zpracovány jako průměrné exprese jednotlivých genů, přepočteny na hodnoty $\Delta\Delta C_T$ a vzájemně porovnány za použití T-testu. Hodnoty byly dále vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism 8.



Obrázek 8: Reprezentativní graf zobrazení amplifikace metodou qPCR.

5.7 Oxygraf

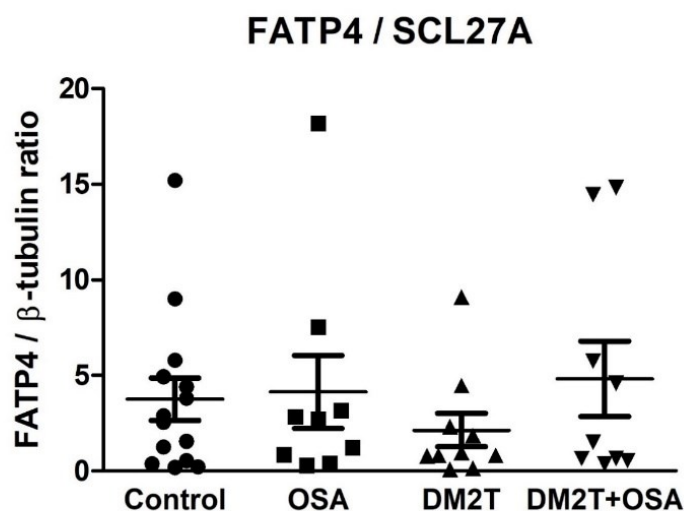
Oxygraf je přístroj umožňující měření množství spotřebovaného kyslíku mitochondriemi v čase. Buňky byly homogenizovány v 10% sacharóze při 800 otáčkách za minutu. Příjem kyslíku v homogenizovaném stavu ve vzorcích byly měřen za použití Oxygraphu-2K s vysokým rozlišením (Oroboros, Innsbruck, Rakousko). Měření byla prováděna při 30°C ve 2 ml inkubačního média obsahujícího 1 mM EDTA, 75 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 3 mM MgCl_2 6 H_2O a 8 mM Tris HCl, při pH 7,4.

Přidávání jednotlivých substrátů do měřicí komory bylo následující: 1 mM malát, 1,5 mM ADP (adenosintrifosfát), 5 μM karnitin palmitoyl, 0,1 mM etomoxir (inhibice mitochondriálního transportu FFA), 1 μM oligomycin (inhibující ATP-syntázu) a jako poslední 4 μM antimycin A (inhibitor přenosu elektronového transportu). V každém kroku byla změřena spotřeba kyslíku, dokud nenastala fáze plató. Rychlost absorpce kyslíku byla vyjádřena jako pmol/s/mg proteinu, což bylo stanoveno pomocí testu BCA (kat. č. 23225 Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

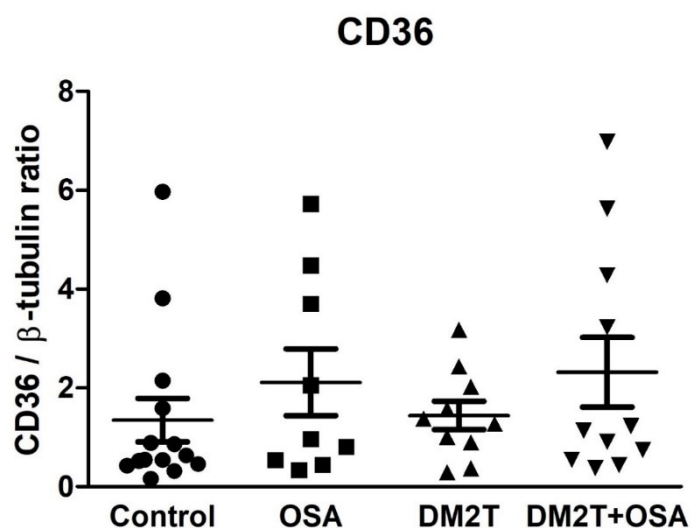
Výsledky

1) Relativní proteinová exprese FATP4, CD36 a CPT1 u čtyřech skupin pacientů stanovená pomocí metody Western Blot

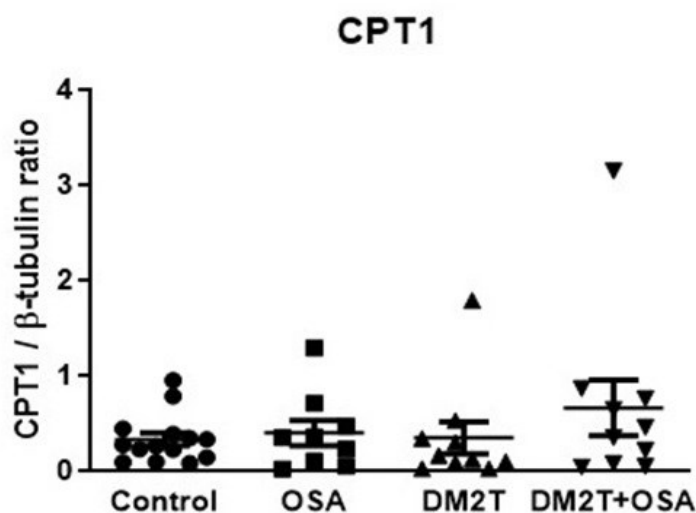
Expres jednotlivých proteinů byla stanovena pro všechny čtyři skupiny pacientů (DM2T+OSA, T2DM, OSA, KONT). Do studie bylo zahrnuto celkem 44 subjektů. Kontrolním genem byl beta Tubulin a jednotlivé geny byly následně vztaženy k jeho průměrné hodnotě (poměru denzity).



Graf 1: Porovnání exprese proteinu FATP4 stanovena ze vzorku kosterního svalu pacientů s diabetes mellitus 2. typu a obstrukční spánkovou apnoe (DM2T+OSA), pacientů s diabetes mellitus 2. typu (DM2T), pacientů s obstrukční spánkovou apnoe (OSA) a subjektů sloužících jako kontrolní skupina bez výše zmíněných obtíží (KONT) dána poměrem ke kontrolnímu genu (beta Tubulinu), * $p < 0,05$, chybové úsečky představují \pm SEM, $n = 44$ (viz Tabulka 2).



Graf 2: Porovnání exprese proteinu CD36 stanovena ze vzorku kosterního svalu pacientů s diabetes mellitus 2. typu a obstrukční spánkovou apnoe (DM2T+OSA), pacientů s diabetes mellitus 2. typu (DM2T), pacientů s obstrukční spánkovou apnoe (OSA) a subjektů sloužících jako kontrolní skupina bez výše zmíněných obtíží (KONT) dána poměrem ke kontrolnímu genu (beta Tubulinu), * $p < 0,05$, chybové úsečky představují \pm SEM, $n = 44$ (viz Tabulka 2).

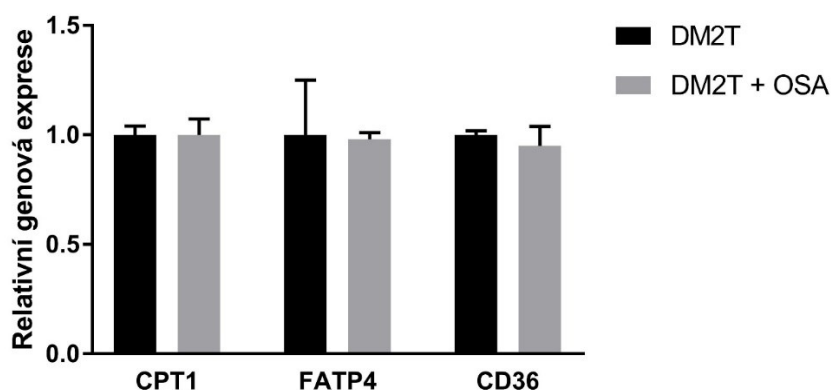


Graf 3: Porovnání exprese proteinu CPT1 stanovena ze vzorku kosterního svalu pacientů s diabetes mellitus 2. typu a obstrukční spánkovou apnoe (DM2T+OSA), pacientů s diabetes mellitus 2. typu (DM2T), pacientů s obstrukční spánkovou apnoe (OSA) a subjektů sloužících jako kontrolní skupina bez výše zmíněných obtíží (KONT) dána poměrem ke kontrolnímu genu (beta Tubulinu), * $p < 0,05$, chybové úsečky představují \pm SEM, $n = 44$ (viz Tabulka 2).

2) Genová exprese FATP4, CD36 a CPT1 u čtyřech skupin pacientů stanovená pomocí metody qPCR

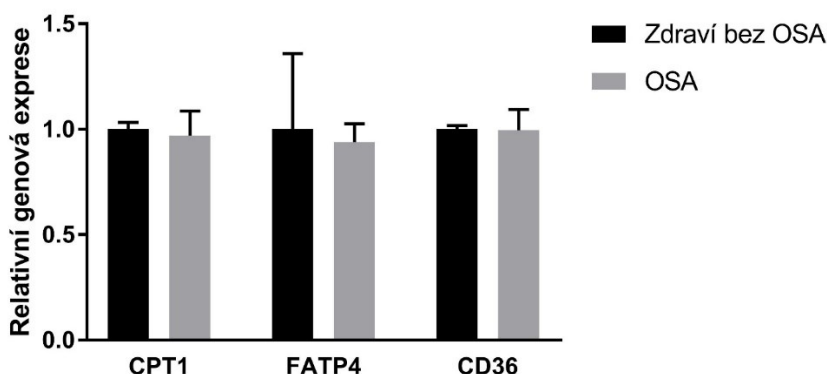
Relativní genová exprese jednotlivých genů byla stanovena pro všechny čtyři skupiny pacientů (DM2T+OSA, T2DM, OSA, KONT). Do studie bylo zahrnuto celkem 44 subjektů.

Genová exprese ve svalové biopsii u diabetiků



Graf 4: Porovnání relativní genové exprese CPT1, FATP4 a CD36 mezi pacienty s diabetes mellitus 2. typu a pacientů s diabetes mellitus 2. typu a obstrukční spánkovou apnoe, * $p < 0,05$, chybové úsečky představují \pm SEM, $n = 44$ (viz Tabulka 3).

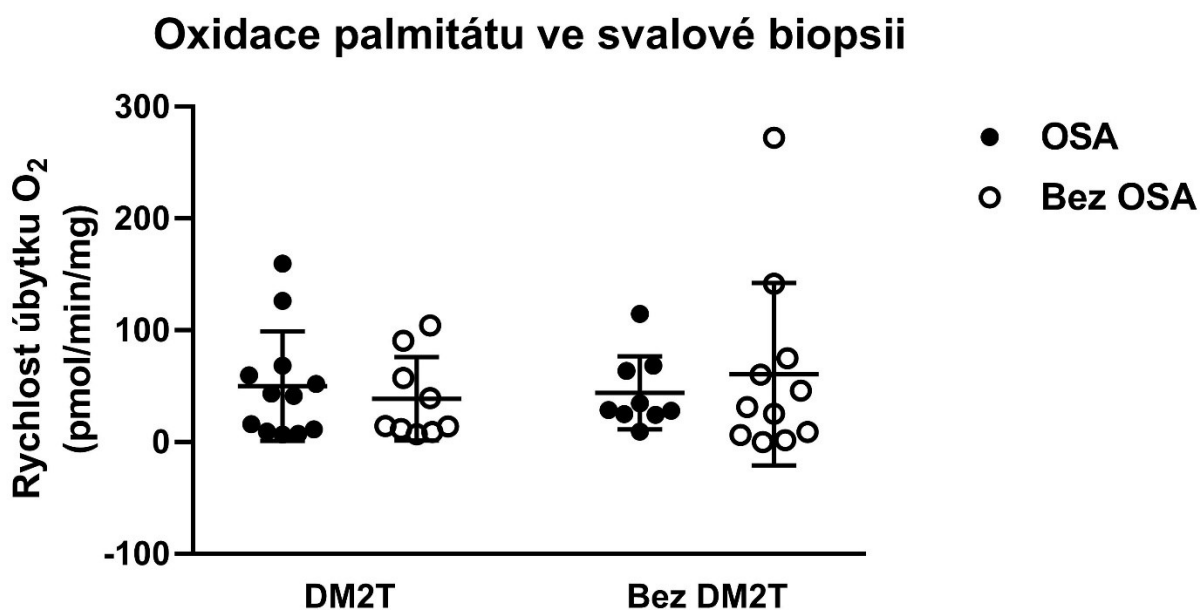
Genová exprese ve svalové biopsii u nediabetiků



Graf 5: Porovnání relativní genové exprese CPT1, FATP4 a CD36 mezi pacienty s obstrukční spánkovou apnoe a pacienty bez obstrukční spánkové apnoe, * $p < 0,05$, chybové úsečky představují \pm SEM, $n = 44$ (viz Tabulka 3)

3) Oxidace palmitátu ve svalových biopsiích u čtyřech skupin pacientů stanovena pomocí Oxygrafu

Oxidace palmitátu byla měřena pro všechny čtyři skupiny pacientů (DM2T+OSA, T2DM, OSA, KONT).



Graf 6: Porovnání rychlosti oxidace palmitátu u pacientů s diabetes mellitus 2. typu a obstrukční spánkovou apnoe (DM2T+OSA), pacientů s diabetes mellitus 2. typu (DM2T), pacientů s obstrukční spánkovou apnoe (OSA) a subjektů sloužících jako kontrolní skupina bez výše zmíněných obtíží (bez DM2T a OSA), * $p < 0,05$, chybové úsečky představují \pm SEM.

(Zdroj: Mgr. Martina Mušutová)

Diskuze

Předpokládáme, že zvýšené hladiny volných mastných kyselin v plasmě hrají důležitou roli v patologii metabolických poruch souvisejících s přerušovanou hypoxií, tedy s OSA (Vogt et al. 2001). Zároveň oxidace FFA ve svalech je výhradně závislá na dostupnosti kyslíku a je tedy pravděpodobné, že FFA oxidace a absorpce by mohly být sníženy v přerušovaném hypoxii, tedy i u pacientů s OSA (Laughlin et al. 2012). Zájem o tento proces je řízen tím, že jak lipolýza, tak oxidace FFA ve svalech představují vhodný cíl léčby za použití klinicky dostupných inhibitorů lipolýzy (acipimox) a stimulatorů využití FFA (metformin) používaných v humánní medicíně, jakožto schválená léčiva. Objasnění mechanismu zvýšeného výskytu FFA na základě lipolýzy tukové tkáně nebo oxidace FFA v kosterních svalech by mohl sloužit jako vhodný cíl pro určení léčby. Avšak to, že hypoxie vede ke zvýšené lipolýze, tedy většímu množství uvolňování FFA, inzulínové resistenci a narušení glukózové homeostáze bylo již popsáno v několika studiích (Polotsky et al. 2003; Weiszenstein et al. 2016; Polak et al. 2013).

Kompletním cílem projektu FAMOSA bylo určit, zda přítomnost OSA modifikuje uvolňování FFA z tukové tkáně u pacientů s T2DM a bez T2DM. Dále zda přítomnost OSA modifikuje ukládání triglyceridů vně a uvnitř myocytů na základě měření exprese proteinů klíčových pro transport FFA. A posledním předmětem zkoumání byla exprese klíčových enzymů zapojených do vychytávání a oxidace FFA v kosterním svalu a zda L6 myotubuly vystaveny přerušované hypoxii modifikují příjem, oxidaci a ukládání FFA.

Předchozí studie se zabývala porovnáním uvolňování FFA u pacientů se srdečním selháním, kteří trpěli těžkou a lehkou formou OSA. Bylo zjištěno, že hladiny FFA během dne jsou u obou skupin velmi podobné. Avšak měření FFA z krevního séra během spánku vykazovalo výrazně zvýšené hodnoty FFA u pacientů s těžkou OSA oproti pacientům, kteří trpěli pouze lehkou formou OSA (Jun et al. 2011). Studie tedy potvrdila, že hypoxie způsobuje zvýšené množství FFA v krevním řečišti.

V rámci této diplomové práce byla měřena exprese třech významných transportérů mastných kyselin FATP4, CD36 a CPT1 a jejich genů s předpokladem, že exprese bude výrazně nižší u pacientů s OSA v důsledku zvýšené hladiny FFA, kdy nedochází k dostatečné oxidaci FFA a ty se postupně hromadí v plasmě, což dále vede k inzulínové resistenci a narušení glukózové homeostáze. Výsledky jsou v případě všech třech přenašečů víceméně podobné, a to tedy bez výraznějších změn v expresi mezi testovanými skupinami (viz Graf 1,2,3). Vzhledem k zanedbatelným rozdílům v expresi proteinů mezi skupinami můžeme prohlásit, že hlavním

důvodem hromadění mastných kyselin vně a uvnitř buněk pravděpodobně není snižená oxidace MK v kosterním svalu.

Dále byla měřena genová exprese FATP4, CD36 a CPT1. Zhotovené grafy ukazují velmi podobné výsledky jako v případě proteinové exprese, což nás utvrzuje ve správnosti našich dat. Opět je třeba zmínit, že v tomto případě intermitentní hypoxie nemění genovou expresi detekovaných genů a zůstává víceméně totožná pro všechny čtyři skupiny (viz Graf 4 a 5). Pro úplné ověření získaných dat bylo provedeno měření oxidace palmitátu ve svalové biopsii pomocí Oxygrafu, tedy spotřeba kyslíku v čase. Výsledky jsou opět srovnatelné mezi jednotlivými skupinami, přičemž odchylky jsou příliš malé, aby mohly být prohlášeny za signifikantní (viz Graf 6).

Část projektu FAMOSA byla zaměřena na oxidaci FFA v L6 myotubulech a případnou léčbu metforminem. Výsledkem této studie bylo, že transportní proteiny pro MK FATP4 a CD36 v mírné hypoxii (4% O₂) nijak nemění svoji expresi, avšak v podmínkách silně hypoxických (1% O₂) ke snížení jejich exprese dochází. U CD36 došlo ke snížení proteinové exprese o 17 % a genová exprese klesla dokonce až o 61 %. Metformin zvýšil expresi proteinu FATP4 za mírné hypoxie o 55 % a genovou expresi o 30 %, kdežto CD36 zvýšilo svoji proteinovou expresi po přidání metforminu pouze za podmínek normoxie, a to o 28 % (Musutova et al. 2018). Vzhledem k tomu, že v této studii byla měřena oxidace a genová i proteinová exprese transportérů pro MK na buněčných liniích in vitro, vznikla zde potřeba realizovat podobnou studii také na lidských subjektech. U lidských subjektů trpících OSA dochází k mírné hypoxii během spánku, která se cyklicky opakuje. Můžeme tedy předpokládat, že intermitentní hypoxie nijak neovlivňuje transport FFA do myocytů. Ke změně exprese proteinů pro transport MK dochází až v podmínkách silně hypoxických. Informace získané na základě studie buněčných linií L6 myocytů tedy korespondují s našimi výsledky.

Dále je třeba zmínit, že přítomné odchylky mohou být způsobeny tím, že osoby zapojené do studie byly v mnoha ohledech poměrně diverzifikovány. Jednalo se o smíšenou skupinu lidí ve věku mezi 50-70 lety, o BMI 26 až téměř 42 kg/m² a o obsahu tuku v těle mezi 12 % až skoro 43 % apod. Stárnutí je spojováno se zvýšením exprese CD36 u lidí i u myši (Sheedfar et al. 2014; Koonen et al. 2007). Výrazným zdrojem diverzifikace je u lidských subjektů také pohybová aktivita. Přestože jsme se snažili, aby byli pacienti v těchto ohledech co nejméně odlišní, není však možné zajistit shodné životní podmínky pro celou sledovanou skupinu.

Bylo dokázáno, že exprese CD36 a FATP4 mohou být modifikovány fyzickou aktivitou. Předchozí studie uvedla, že netréňované ženy podrobeny intenzivnímu fyzickému tréninku po dobu šesti týdnů vykazovaly zvýšení proteinové exprese CD36 o 10 % na úrovni celých svalů a o 51 % v rámci mitochondrií (Talanian et al. 2010). Další studie prokázala, že u lidských subjektů podrobených vytrvalostnímu tréninku ve formě ergometrického tréninku 60 minut denně po dobu 9 dnů se zvýšila oxidace FFA o 24%. Navíc trénink také zvýšil proteinovou expresi CD36 a genovou expresi CPT1 v kosterním svalstvu (Tunstall et al. 2015). Fyzická aktivita dále zvyšuje oxidaci palmitátu v kosterním svalu (Kim & Lim 2016).

Všechny tyto parametry bezpochyby nějakým způsobem alespoň mírně ovlivnily dané výsledky. Výše zmíněné odchylky však také nenesou významnou signifikanci v určených parametrech.

Získané výsledky tedy naznačují, že hypoxický stav u pacientů s OSA přímo neovlivňuje proteinovou ani genovou expresi FATP4, CD36 a CPT1. Mechanismus, který se zdá být hlavním důvodem zvýšeného množství FFA v krvi, proto stále zůstává hypoxií indukovaná lipolýza.

Závěr

Předmětem studie FAMOSA bylo zjistit, zda intermitentní hypoxie přítomna u pacientů s OSA ovlivňuje proteinovou a genovou expresi transportérů volných mastných kyselin FATP4, CD36 a CPT1 či zda ovlivňuje oxidaci palmitátu v biopsiích kosterního svalu. Pro studii bylo použito 44 pacientů s odlišnou diagnostikou. Jednalo se o smíšenou skupinu pacientů ve věkovém rozmezí 50-70 let, s hodnotou BMI 26 až téměř 42 kg/m² a o obsahu tuku v těle mezi 12 % až skoro 43 %. Subjekty byly rozděleny do čtyř skupin (T2DM+OSA, T2DM, OSA, KONT).

V případě proteinové exprese nedošlo k signifikantním změnám u žádného z výše zmíněných transportérů mezi jednotlivými skupinami. Téměř totožné výsledky můžeme pozorovat též u genové exprese. Celkové vědění ještě doplnily výsledky oxidace palmitátu, kde také nenacházíme signifikantní rozdíly ve spotřebě kyslíku mezi skupinami pacientů. Na základě získaných dat lze tvrdit, že snížená oxidace MK v kosterním svalů není důvodem zvýšeného množství FFA v krevním řečišti. Tuková tkáň tedy stále zůstává nejpravděpodobnějším zdrojem zvýšeného množství FFA v krvi.

Vzhledem k tomu, že tato práce popisuje dané přenašeče mastných kyselin z hlediska jejich kvantity, vznikají zde další otázky, zda nedochází k regulaci z hlediska efektivity, což by se dalo ověřit pomocí radioizotopové metody.

Získané poznatky výrazně přispívají k dosavadnímu vědění z hlediska komplikací a souvislostí onemocnění OSA a T2DM a otevřely mnoho dalších otázek týkající se oxidace a transportu MK v rámci myocytů.

Literatura

- Abumrad, N.A., Raafat El-Maghrabis, M., Amrill, E.-Z., Lopez, E. & Grimaldi, P.A., 1993. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Cloning of a Rat Adipocyte Membrane Protein Implicated in Binding or Transport of Long-chain Fatty Acids That Is Induced during Preadipocyte Differentiation. , 268(24), 17665–17668.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B. & Cohen, P., 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B. , 7(4), 261–269.
- Amalan, V., Vijayakumar, N., Indumathi, D. & Ramakrishnan, A., 2016. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: In vivo approach. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 230–236.
- American Diabetes, 2014. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 15(4), S81–S89.
- Armesilla, A.L. & Vega, M.A., 1994. Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 269(29), 18985–18991.
- Aurora, R.N., Casey, K.R., Kristo, D., Auerbach, S., Bista, S.R., Chowdhuri, S., Karippot, A., Lamm, C., Ramar, K., Zak, R., Morgenthaler, T.I. & Tracy, S.L., 2010. Practice parameters for the surgical modifications of the upper airway for obstructive sleep apnea in adults. *Sleep*, 33(10), 1408–1413.
- Ballard, F.J., Hanson, R.W. & Reshef, L., 1970. Immunochemical studies with soluble and mitochondrial pyruvate carboxylase activities from rat tissues. *The Biochemical journal*, 119(4), 735–742.
- Bevilacqua, S., Buzzigoli, G., Bonadonna, R.C., Brandi, L.S., Oleggini, M., Boni, C., Geloni, M. & Ferrannini, E., 1990. Operation of Randle's cycle in patients with NIDDM. *Diabetes*, 39(3), 383–389.
- Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J. V. & Rossetti, L., 1994. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *Journal of Clinical Investigation*, 93(6), 2438–2446.
- Boden, G., 1969. Obesity and Free Fatty Acids (FFA). *Acta medica Scandinavica*, 185(6), 351–356.
- Brindeiro, C.M.T., 2013. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. , 87131(1), 1–14.
- Brooks, D., Horner, R.L., Kozar, L.F., Render-Teixeira, C.L. & Phillipson, E.A., 1997. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *Journal of Clinical Investigation*, 99(1), 106–109.
- Celen, Y.T., Hedner, J., Carlson, J. & Peker, Y., 2010. Impact of gender on incident diabetes mellitus in obstructive sleep apnea: A 16-year follow-up. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 6(3), 244–250.
- Charles, M.A., Eschwège, E., Thibault, N., Claude, J.R., Warnet, J.M., Rosselin, G.E., Girard, J. & Balkau, B., 1997. The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: Results of the Paris Prospective study. *Diabetologia*, 40(9), 1101–1106.

- Choquet, H., Labrune, Y., De Graeve, F., Hinney, A., Hebebrand, J., Scherag, A., Lecoer, C., Tauber, M., Balkau, B., Elliot, P., Jarvelin, M.R., Walley, A.J., Besnard, P., Froguel, P. & Meyre, D., 2011. Lack of association of cd36 snps with early onset obesity: A meta-analysis in 9,973 european subjects. *Obesity*, 19(4), 833–839.
- Cutrona, G., Gugiatti, E., Bagnara, D., Darzynkiewicz, Z., Ravera, S., Fabbi, M., Reverberi, D., Mazzarello, A.N., Ciccone, E., Bruno, S., Fais, F., Ghiotto, F., Ibatici, A., Zarcone, D. & Tenca, C., 2018. A reversible carnitine palmitoyltransferase (CPT1) inhibitor offsets the proliferation of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*, 103(11), e531–e536.
- Davies, R.J.O., Ali, N.J. & Stradling, J.R., 1992. Neck circumference and other clinical features in the diagnosis of the obstructive sleep apnoea syndrome. *Thorax*, 47(2), 101–105.
- DeFronzo, R.A., Ferrannini, E. & Simonson, D.C., 1989. Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: Contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism*, 38(4), 387–395.
- Denko, N.C., Lim, A.L., Papandreou, I., Fontana, L. & Cairns, R.A., 2006. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, 3(3), 187–197.
- Dubitsky, A., DeCollibus, D. & Ortolano, G.A., 2002. Sensitive fluorescent detection of protein on nylon membranes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51(1), 47–56.
- Dyck, D.J., Mullen, K.L., Junkin, K.A., Nickerson, J., Smith, A.C., Chabowski, A. & Bonen, A., 2007. Metformin and exercise reduce muscle FAT/CD36 and lipid accumulation and blunt the progression of high-fat diet-induced hyperglycemia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(1), E172–E181.
- Dyugovskaya, L., Lavie, P. & Lavie, L., 2002. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(7), 934–939.
- Febbraio, M., Hajjar, D.P. & Silverstein, R.L., 2001. CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 785–791.
- Fendri, S., Rose, D., Myambu, S., Jeanne, S. & Lalau, J.D., 2011. Nocturnal hyperglycaemia in type 2 diabetes with sleep apnoea syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 91(1), e21–e23.
- Fletcher, E.C., Bao, G. & Li, R., 1999. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension*, 34(2), 309–314.
- Fowler, S.J., 1995. Ch 14: Use of monoclonal antibodies for western blotting with enhanced chemiluminescent detection. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 45, 115–127.
- Fujii, R., Hishida, A., Suzuki, K., Imaeda, N., Goto, C., Hamajima, N., Wakai, K. & Kondo, T., 2019. CD36 gene polymorphism (rs1761667) is associated with dietary monounsaturated fatty acid intake and hypertension in a Japanese population. *British Journal of Nutrition*, 1–37.

- Fulgencio, J.-P., Kohl, C., Girard, J. & Pégrier, J.-P., 2002. Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. Abbreviations: CPT I or II, carnitine palmitoyltransferase I or II; mtHMG-CoA synthase, mitochondrial hydroxy. *Biochemical Pharmacology*, 62(4), 439–446.
- García-Río, F., Martínez, I., Villamor, J., Alonso-Fernández, A. & Arias, M.A., 2006. Pulmonary hypertension in obstructive sleep apnoea: effects of continuous positive airway pressure. *European Heart Journal*, 27(9), 1106–1113.
- Geiss, L.S., Wang, J., Cheng, Y.J., Thompson, T.J., Barker, L., Li, Y., Albright, A.L. & Gregg, E.W., 2014. Prevalence and incidence trends for diagnosed diabetes among adults aged 20 to 79 years, United States, 1980-2012. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 312(12), 1218–1226.
- Gerich, J.E., 1993. Control of glycaemia. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 7(3), 551–586.
- Gong, W., Lu, B., Yang, Z., Ye, W., Du, Y., Wang, M., Li, Q., Zhang, W., Pan, Y., Feng, X., Zhou, W., Zhang, Y., Yang, Z., Yang, Y., Zhu, X. & Hu, R., 2009. Early-stage atherosclerosis in newly diagnosed, untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes and Metabolism*, 35(6), 458–462.
- Groop, L.C., Bonadonna, R.C., DelPrato, S., Ratheiser, K., Zyck, K., Ferrannini, E. & DeFronzo, R.A., 1989. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 84(1), 205–213.
- Guillermet, C., Gozal, E., Lantuejoul, S., Mallaret, M., Sturm, N., Julien, C., Dematteis, M. & Lévy, P., 2007. Intermittent Hypoxia Induces Early Functional Cardiovascular Remodeling in Mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(2), 227–235.
- Habor, A., 2010. Peroxisome proliferator activated receptors. *Farmacía*, 58(1), 13–20.
- Han, J., Hajjar, D.P., Tauras, J.M. & Nicholson, A.C., 1999. Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *Journal of Lipid Research*, 40(0022-2275), 830–838.
- Han, J., Hajjar, D.P., Tauras, J.M., Feng, J., Gotto, A.M. & Nicholson, A.C., 2000. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1241–1246.
- Han, S. & Sidell, N., 2002. Peroxisome-proliferator-activated-receptor gamma (PPAR γ) independent induction of CD36 in THP-1 monocytes by retinoic acid. *Immunology*, 106(1), 53–59.
- Hanley A., Williams K., Stern M., H.S., 1993. Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance in Relation to the Incidence of Cardiovascular Disease. *Journal of Optics*, 24(1), 11–14.

- Harasim, E., Kalinowska, A., Stepek, T. & Chabowski, A., 2008. Udział białek transportujących (FAT / CD36 , FABPpm , FATP) w metabolizmie lipidów w mięśniach szkieletowych The role of fatty-acid transport proteins (FAT / CD36 , FABPpm , FATP) in lipid metabolism in skeletal muscles. *Postepy Hig Med Dosw Online*, 62, 433–441.
- Hehemann, J.H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czjzek, M. & Michel, G., 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464(7290), 908–912.
- Heitman, S.J., Ronksley, P.E., Tsai, W.H., Quan, H., Hanly, P.J., Hemmelgarn, B.R. & Faris, P.D., 2009. Obstructive sleep apnoea is associated with diabetes in sleepy subjects. *Thorax*, 64(10), 834–839.
- Heni, M., Müssig, K., MacHicao, F., MacHann, J., Schick, F., Claussen, C.D., Stefan, N., Fritsche, A., Häring, H.U. & Staiger, H., 2011. Variants in the CD36 gene locus determine whole-body adiposity, but have no independent effect on insulin sensitivity. *Obesity*, 19(5), 1004–1009.
- Herman-Edelstein, M., Scherzer, P., Tobar, A., Levi, M. & Gafter, U., 2013. Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. *Journal of Lipid Research*, 55(3), 561–572.
- Herrmann, T., Buchkremer, F., Gosch, I., Hall, A.M., Bernlohr, D.A. & Stremmel, W., 2001. Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): Characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase. *Gene*, 270(1–2), 31–40.
- Hodson, L., Skeaff, C.M. & Fielding, B.A., 2008. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in Lipid Research*, 47(5), 348–380.
- Hohenegger, M., Wittmann, G. & Dahlheim, H., 1973. Oxidation of fatty acids by different zones of the rat kidney. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 341(2), 105–112.
- Huang, J.T., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T.M., Kelly, C., Witztum, J.L., Funk, C.D., Conrad, D. & Glass, C.K., 1999. Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*, 400(6742), 378–382.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M. & Franklin Bunn, H., 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 32253–32259.
- Huang, S., Huang, S., Wang, X., Zhang, Q., Liu, J. & Leng, Y., 2017. Downregulation of lipin-1 induces insulin resistance by increasing intracellular ceramide accumulation in C2C12 myotubes. *International Journal of Biological Sciences*, 13(1), 1–12.
- Iso, H., Sato, S., Kitamura, A. & Imano, H., 2007. Metabolic Syndrome and the Risk of Ischemic Heart Disease and Stroke Among Japanese Men and Women. , *Stroke*.(1744–1751), 38.
- Johns, M.W., 2007. Daytime Sleepiness, Snoring, and Obstructive Sleep Apnea. *Chest*, 103(1), 30–36.
- Jun, J.C., Drager, L.F., Najjar, S., Gottlieb, S., Brown, C., Smith, P.L., Schwartz, A.R. & Polotsky, V.Y., 2011. Effects of Sleep Apnea on Nocturnal Free Fatty Acids in Subjects with Heart Failure. , 34(9), 1207–1213.

- Kahn, E.S., Cooper, E.M. & Del Prato, S., 2014. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present and future. , 383(9922), 1068–1083.
- Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. & Poellinger, L., 1997. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), 5667–5672.
- Kanagy, N.L., 2009. Vascular effects of intermittent hypoxia. *ILAR Journal*, 50(3), 282–288.
- Kanagy, N.L., Walker, B.R. & Nelin, L.D., 2012. Role of Endothelin in Intermittent Hypoxia-Induced Hypertension. *Hypertension*, 37(2), 511–515.
- Keating, S.T., Plutzky, J. & El-Osta, A., 2016. Epigenetic changes in diabetes and cardiovascular risk. *Circulation Research*, 118(11), 1706–1722.
- Kim, J. & Lim, K., 2016. Relationship between FAT/CD36 Protein in Skeletal Muscle and Whole-body Fat Oxidation in Endurance-trained Mice. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 20(4), 48–52.
- Koonen, D.P.Y., Febbraio, M., Bonnet, S., Nagendran, J., Young, M.E., Michelakis, E.D. & Dyck, J.R.B., 2007. CD36 expression contributes to age-induced cardiomyopathy in mice. *Circulation*, 116(19), 2139–2147.
- Krebs, H.A., Speake, R.N. & Hems, R., 1965. Acceleration of Renal Gluconeogenesis By Ketone Bodies and Fatty Acids. *The Biochemical journal*, 94, 712–720.
- Kuliczowska-Płaksej, J., Bednarek-Tupikowska, G., Płaksej, R. & Filus, A., 2006. [Scavenger receptor CD36: its expression, regulation, and role in the pathogenesis of atherosclerosis. Part I]. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 60, 142–151.
- Kuo, P.-L., Kan, J.-Y., Chou, S.-K., Hou, M.-F., Hsu, Y.-L. & Yen, M.-C., 2018. Solute Carrier Family 27 Member 4 (SLC27A4) Enhances Cell Growth, Migration, and Invasion in Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3434.
- Landau, B.R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schumann, W.C., Ekberg, K. & Kalhan, S.C., 1996. Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *Journal of Clinical Investigation*, 98(2), 378–385.
- Laughlin, H.M., David, M.J., Secher, N.H., Lieshout, J.J. van, Arce-esquivel, A.A., Simmons, G.H., Bender, S.B. & Padilla, J., 2012. Peripheral Circulation. , 2(January), *Compr Physiol* 2:321-447.
- Lee, C., 2007. Western blotting. *Methods in Molecular Biology*, 362, 391–399.
- Lehmann, C., Shiffman, R.N., Brooks, L.J., Schechter, M.S., Spruyt, K., Ward, S.D., Halbower, A.C., Draper, K.A., Jones, J., Sheldon, S., Gozal, D. & Marcus, C.L., 2012. Diagnosis and Management of Childhood Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Pediatrics*, 130(3), e714–e755.
- Lenz, L.S., Marx, J., Chamulitrat, W., Kaiser, I., Gröne, H.J., Liebisch, G., Schmitz, G., Elsing, C., Straub, B.K., Füllekrug, J., Stremmel, W. & Herrmann, T., 2011. Adipocyte-specific inactivation of acyl-CoA synthetase fatty acid transport protein 4 (Fatp4) in mice causes adipose hypertrophy and alterations in metabolism of complex lipids under high fat diet. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35578–35587.

- Lesske, J., Miller, C.C., Fletcher, E.C., Unger, T. & Qian, W., 2012. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension*, 19(6_pt_1), 555–561.
- Li, W., Febbraio, M., Reddy, S.P., Yu, D.Y., Yamamoto, M. & Silverstein, R.L., 2010. CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3996–4006.
- Li, X. & Shao, R., 2014. PCOS and obesity: insulin resistance might be a common etiology for the development of type I endometrial carcinoma. *American journal of cancer research*, 4(1), 73–79.
- Ling, C. & Groop, L., 2009. Epigenetics: A Molecular Link Between Environmental Factors and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 58(12), 2718–2725.
- Liu, R.-Z., Graham, K., Glubrecht, D.D., Germain, D.R., Mackey, J.R. & Godbout, R., 2011. Association of FABP5 Expression With Poor Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 178(3), 997–1008.
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63), 1–15.
- Louet, J.-F., Le May, C., Pégrier, J.-P., Decaux, J.-F. & Girard, J., 2005. Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochemical Society Transactions*, 29(2), 310–316.
- Louis, M. & Punjabi, N.M., 2009. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *Journal of Applied Physiology*, 106(5), 1538–1544.
- Ma, X., Bacci, S., Mlynarski, W., Gottardo, L., Soccio, T., Menzaghi, C., Iori, E., Lager, R.A., Shroff, A.R., Gervino, E. V., Nesto, R.W., Johnstone, M.T., Abumrad, N.A., Avogaro, A., Trischitta, V. & Doria, A., 2004. A common haplotype at the CD36 locus is associated with high free fatty acid levels and increased cardiovascular risk in Caucasians. *Human Molecular Genetics*, 13(19), 2197–2205.
- MacIntyre, N.R., 2014. Tissue Hypoxia: Implications for the Respiratory Clinician. *Respiratory Care*, 59(10), 1590–1596.
- Maureen I. Harris, PHD, M., Ronald Klein, MD, M., Tim A. Welborn, PHD, F., Knuiman, M.W. & , PHD, B., 1992. Onset of NIDDM Occurs at Least 4-7 Yr Before Clinical Diagnosis. *Diabetes Care*, 15(7), 815–819.
- Mcgarry, J.D., Mills, S.E., Long, C.S. & Foster, D.W., 1983. Observations on the affinity for carnitine , and malonyl-CoA sensitivity , of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. , 214, 21–28.
- Mendelson, W.B., 1992. Sleepiness and hypertension in obstructive sleep apnea. *Chest*, 101(4), 903–909.
- Meslier, N., Gagnadoux, F., Giraud, P., Person, C., Ouksel, H., Urban, T. & Racineux, J.L., 2003. Impaired glucose-insulin metabolism in males with obstructive sleep apnoea syndrome. *European Respiratory Journal*, 22(1), 156–160.

- Muraki, I., Tanigawa, T., Yamagishi, K., Sakurai, S., Ohira, T., Imano, H., Kitamura, A., Kiyama, M., Sato, S., Shimamoto, T., Konishi, M. & Iso, H., 2010. Nocturnal intermittent hypoxia and the development of type 2 diabetes: The Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Diabetologia*, 53(3), 481–488.
- Musso, C., Cochran, E., Moran, S.A., Skarulis, M.C., Arioglu Oral, E., Taylor, S. & Gorden, P., 2004. Clinical course of genetic diseases of the insulin receptor (type A and Rabson-Mendenhall syndromes): A 30-year prospective. *Medicine*, 83(4), 209–222.
- Musutova, M., Povysil, S., Koc, M., Balusikova, K., Kalous, M., Rambousek, J., Klubickova, N., Trnka, J., Kovar, J., Trinh, M.D., Volckaert, B., Elkalaf, M., Polak, J. & Duska, F., 2018. The Effect of Hypoxia and Metformin on Fatty Acid Uptake, Storage, and Oxidation in L6 Differentiated Myotubes. *Frontiers in Endocrinology*, 616(9), 1–11.
- Naughton, M.T., Mansfield, D.R., Gollogly, N.C., Richardson, M., Bergin, P. & Kaye, D.M., 2003. Controlled Trial of Continuous Positive Airway Pressure in Obstructive Sleep Apnea and Heart Failure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(3), 361–366.
- Neculai, D., Schwake, M., Ravichandran, M., Zunke, F., Collins, R.F., Peters, J., Neculai, M., Plumb, J., Loppnau, P., Pizarro, J.C., Seitova, A., Trimble, W.S., Saftig, P., Grinstein, S. & Dhe-Paganon, S., 2013. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature*, 504(7478), 172–176.
- Newgard, C.B., An, J., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Stevens, R.D., Lien, L.F., Haqq, A.M., Shah, S.H., Arlotto, M., Slentz, C.A., Rochon, J., Gallup, D., Ilkayeva, O., Wenner, B.R., Yancy, W.S., Eisenson, H., Musante, G., Surwit, R.S., Millington, D.S., et al., 2009. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 9(4), 311–326.
- Newhouse, L.P., Joyner, M.J., Curry, T.B., Laurenti, M.C., Man, C.D., Cobelli, C., Vella, A. & Limberg, J.K., 2017. Three hours of intermittent hypoxia increases circulating glucose levels in healthy adults. *Physiological Reports*, 5(1), 1–8.
- Ovchinsky, A., Rao, M., Lotwin, I. & Goldstein, N.A., 2002. The familial aggregation of pediatric obstructive sleep apnea syndrome. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 128(7), 815–818.
- Pamidi, S., Wroblewski, K., Broussard, J., Day, A., Hanlon, E.C., Abraham, V. & Tasali, E., 2012. Obstructive sleep apnea in young lean men: Impact on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Care*, 35(11), 2384–2389.
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C.S.O., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J.A., Bescós, C., Di Croce, L. & Benitah, S.A., 2017. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*, 541(7635), 41–45.
- Patil, S.P., Schneider, H., Schwartz, A.R. & Smith, P.L., 2007. Adult obstructive sleep apnea: Pathophysiology and diagnosis. *Chest*, 132(1), 325–337.
- Pein, M. & Oskarsson, T., 2015. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 309(10), C627–C638.

- Peng, Y.J., Yuan, G., Ramakrishnan, D., Sharma, S.D., Bosch-Marce, M., Kumar, G.K., Semenza, G.L. & Prabhakar, N.R., 2006. Heterozygous HIF-1 α deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *Journal of Physiology*, 577(2), 705–716.
- Perpinyà, X., Herrero, L., Vellvehí, M., Rodríguez-Rodríguez, R., Miralpeix, C., Casals, N., Serra, D., Pozo, M., Calderón-Domínguez, M., Fosch, A. & López, M., 2018. CPT1C in the ventromedial nucleus of the hypothalamus is necessary for brown fat thermogenesis activation in obesity. *Molecular Metabolism*, 19, 75–85.
- Pioltine, M.B., De Melo, M.E., Santos, A., Machado, A.D., Fernandes, A.E., Fujiwara, C.T., Cercato, C. & Mancini, M.C., 2017. Genetic Variation in CD36 Is Associated with Decreased Fat and Sugar Intake in Obese Children and Adolescents. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 9(5–6), 300–305.
- Polak, J., Drager, L.F., Polotsky, V.Y., Udem, C., McHugh, H., Punjabi, N.M. & Shimoda, L.A., 2013. Intermittent Hypoxia Impairs Glucose Homeostasis in C57BL/6J Mice: Partial Improvement with Cessation of the Exposure. *Sleep*, 36(10), 1483–1490.
- Polotsky, V.Y., Li, J., Punjabi, N.M., Rubin, A.E., Smith, P.L., Schwartz, A.R. & O'Donnell, C.P., 2003. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *Journal of Physiology*, 552(1), 253–264.
- Punjabi, N.M. & Beamer, B.A., 2009. Alterations in glucose disposal in sleep-disordered breathing. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(3), 235–240.
- Qin, Y., Zhang, L., Xu, Z., Zhang, J., Jiang, Y., Cao, Y. & Yan, T., 2016. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence*, 7(5), 512–526.
- Ramos-Lopez, O., Roman, S., Martinez-Lopez, E., Fierro, N.A., Gonzalez-Aldaco, K., Jose-Abrego, A. & Panduro, A., 2016. CD36 genetic variation, fat intake and liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *World Journal of Hepatology*, 8(25), 1067–1074.
- Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N. & Newsholme, E.A., 1963. The Glucose Fatty-Acid Cycle Its Role in Insulin Sensitivity and the Metabolic Disturbances of Diabetes Mellitus. *The Lancet*, 281(7285), 785–789.
- Reaven, G.M., Hollenbeck, C., Jeng, C.Y., Wu, M.S. & Chen, Y.D.I., 1988. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes*, 37(8), 1020–1024.
- Redline, S., Tishler, P. V, Schluchter, M., Aylor, J., Clark, K. & Graham, G., 1999. Risk Factors for Sleep-disordered Breathing in Children Associations with Obesity, Race, and Respiratory Problems African Americans appears to be independent of the effects of obesity or respiratory problems. Red-. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1527–1532, 159(5).
- Reinke, C., Polotsky, V.Y., Drager, L.F., Shin, M.-K. & Bevans-Fonti, S., 2011. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *Journal of Applied Physiology*, 111(3), 881–890.
- Ren, B.Y., Silverstein, R.L., Allen, J. & Savill, J., 1995. CD36 Gene Transfer Confers Capacity for Phagocytosis of Cells Undergoing Apoptosis By Yi Ren, Roy L. Silverstein,* Janet Allen,~ and John Savill. *The Journal of experimental medicine* *Journal of*, 181(May), 1857–1862.

- Rey, S., Del Rio, R. & Iturriaga, R., 2006. Contribution of endothelin-1 to the enhanced carotid body chemosensory responses induced by chronic intermittent hypoxia. *Brain Research*, 1086(1), 152–159.
- Risérus, U., Willett, W.C. & Hu, F.B., 2009. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in Lipid Research*, 48(1), 44–51.
- Rosen, C.L., 1996. Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) in children: diagnostic challenges. *Sleep*, 19(10 Suppl), S274-7.
- Row, B.W., Liu, R., Xu, W., Kheirandish, L. & Gozal, D., 2003. Intermittent Hypoxia Is Associated with Oxidative Stress and Spatial Learning Deficits in the Rat. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(11), 1548–1553.
- Roy, A. & Parker, R.S., 2006. Dynamic modeling of free fatty acid, glucose, and insulin: an extended “minimal model.” *Diabetes Technol Ther*, 8(6), 617–626.
- Rufer, A.C., Thoma, R., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., De Roo, E., Banner, D.W., Mueller, F., Chomienne, O. & Hennig, M., 2006. The Crystal Structure of Carnitine Palmitoyltransferase 2 and Implications for Diabetes Treatment. *Structure*, 14(4), 713–723.
- Saavedra Santana, P., Ribas Barba, L., Peña Quintana, L., Serra Majem, L., Pérez Rodrigo, C. & Aranceta Bartrina, J., 2013. Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000). *Medicina Clínica*, 121(19), 725–732.
- Sajkov, D. & McEvoy, R.D., 2009. Obstructive Sleep Apnea and Pulmonary Hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 51(5), 363–370.
- Saltiel, A.R. & Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799–806.
- Savill, J., Hogg, N., Ren, Y. & Haslett, C., 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *Journal of Clinical Investigation*, 90(4), 1513–1522.
- Schäfer, H., Hasper, E., Ewig, S., Koehler, U., Latzelsberger, J., Tasci, S. & Lüderitz, B., 1998. Pulmonary haemodynamics in obstructive sleep apnoea: Time course and associated factors. *European Respiratory Journal*, 12(3), 679–684.
- Schwenk, R.W., Holloway, G.P., Luiken, J.J.F.P., Bonen, A. & Glatz, J.F.C., 2010. Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 82(4–6), 149–154.
- Semenza, G.L., Yu, A., Wiener, C., Agani, F., Booth, G., Roe, R., Iyer, N., Leung, S., Jiang, B.-H. & Forsythe, J., 2007. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney International*, 51(2), 553–555.
- Sheedfar, F., Sung, M.M.Y., Aparicio-Vergara, M., Kloosterhuis, N.J., Miquilena-Colina, M.E., Vargas-Castrillón, J., Febbraio, M., Jacobs, R.L., de Bruin, A., Vinciguerra, M., García-Monzón, C., Hofker, M.H., Dyck, J.R.B. & Koonen, D.P.Y., 2014. Increased hepatic CD36 expression with age is associated with enhanced susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Aging*, 6(4), 281–295.
- Shekelle, P., Holty, J.-E.C., Denberg, T.D. & Qaseem, A., 2015. Diagnosis of Obstructive Sleep Apnea in Adults. *Annals of Internal Medicine*, 162(6), 456.

- Stahl, A., Hirsch, D.J., Gimeno, R.E., Punreddy, S., Pei, G., Watson, N., Patel, S., Kotler, M., Raimondi, A., Tartaglia, L.A. & Lodish, H.F., 1999. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Molecular Cell*, 4(3), 299–308.
- Stein, J.C., Howlett, B., Boyes, D.C., Asch, A.S., Liu, I., Briccetti, F.M., Barnwell, J.W., Kwakye-berko, F., Dokun, A., Goldberger, J. & Pernambuco, M., 1993. Analysis of CD36 Binding Domains : Ligand Specificity Controlled by Dephosphorylation of an Ectodomain. *Science*, 262(5138), 1436–1440.
- Swe, M.T., Pongchaidecha, A., Chatsudthipong, V., Chattipakorn, N. & Lungkaphin, A., 2018. Molecular signaling mechanisms of renal gluconeogenesis in nondiabetic and diabetic conditions. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8134–8151.
- Talanian, J.L., Holloway, G.P., Snook, L.A., Heigenhauser, G.J.F., Bonen, A. & Spriet, L.L., 2010. Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(2), E180–E188.
- Tamura, A., Kawano, Y., Watanabe, T. & Kadota, J., 2008. Relationship between the severity of obstructive sleep apnea and impaired glucose metabolism in patients with obstructive sleep apnea. *Respiratory Medicine*, 102(10), 1412–1416.
- Tandon, N.N., Kralisz, U. & Jamieson, G.A., 1989. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 264(13), 7576–7583.
- Tasali, E., Mokhlesi, B. & Van Cauter, E., 2008. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: Interacting epidemics. *Chest*, 133(2), 496–506.
- Thampyz, K.G., 1989. Formation of Malonyl Coenzyme A in Rat Heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. , 264(30), 17631–17634.
- Trayhurn, P. & Alomar, S.Y., 2015. Oxygen deprivation and the cellular response to hypoxia in adipocytes - Perspectives on white and brown adipose tissues in obesity. *Frontiers in Endocrinology*, 6(FEB), 1–9.
- Tunstall, R.J., Mehan, K.A., Wadley, G.D., Collier, G.R., Bonen, A., Hargreaves, M. & Cameron-Smith, D., 2015. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(1), E66–E72.
- Unruh, M.L., O'Connor, G.T., Shahar, E., Punjabi, N.M., Robbins, J.A., Goodwin, J.L., Newman, A.B., Samet, J.M., Redline, S., Caffo, B.S., Rapoport, D.M., Resnick, H.E. & Gottlieb, D.J., 2009. Sleep-Disordered Breathing and Mortality: A Prospective Cohort Study. *PLoS Medicine*, 6(8), e1000132.
- Vega, M.A., Segui-Real, B., Garcia, J.A., Cales, C., Rodriguez, F., Vanderkerckhove, J. & Sandoval, I. V., 1991. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), 16818–16824.
- Vogt, M., Puntchart, A., Geiser, J., Zuleger, C., Billeter, R., Hoppeler, H. & Molecular, H.H., 2001. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. , 91(1), 173–182.

- Wang, G. & Semenza, G., 1992. A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. *Molecular and cellular biology*, 12(12), 5447–5454.
- Wculek, S.K. & Malanchi, I., 2015. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*, 528(7582), 413–417.
- Weiss, W. & Görg, A., 2008. Sample Solubilization Buffers for Two-Dimensional Electrophoresis. , 424(1), 35–42.
- Weiszenstein, M., Musutova, M., Plihalova, A., Westlake, K., Elkalaf, M., Koc, M., Prochazka, A., Pala, J., Gulati, S., Trnka, J. & Polak, J., 2016. Adipogenesis, lipogenesis and lipolysis is stimulated by mild but not severe hypoxia in 3T3-L1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(2), 727–732.
- Weiszenstein, M., Shimoda, L.A., Koc, M., Seda, O. & Polak, J., 2016. Inhibition of lipolysis ameliorates diabetic phenotype in a mouse model of obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 55(2), 299–307.
- Williams, M., 2009. Real-time polymerase chain reaction. *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*, 27, 3–11.
- Woldegiorgis, G., Dai, J. & Arvidson, D., 2005. Structure-function studies with the mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II. *Monatshefte für Chemie*, 136(8), 1325–1340.
- Wu, X., Li, Y., Wang, J., Wen, X., Marcus, M.T., Daniels, G., Zhang, D.Y., Ye, F., Wang, L.H., Du, X., Adams, S., Singh, B., Zavadil, J. & Lee, P., 2013. Long Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 Is a Biomarker for and Mediator of Hormone Resistance in Human Breast Cancer. , 8(10), 1–20.
- Würtz, P., Mäkinen, V.P., Soininen, P., Kangas, A.J., Tukiainen, T., Kettunen, J., Savolainen, M.J., Tammelin, T., Viikari, J.S., Rönnemaa, T., Kähönen, M., Lehtimäki, T., Ripatti, S., Raitakari, O.T., Järvelin, M.R. & Ala-Korpela, M., 2012. Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults. *Diabetes*, 61(6), 1372–1380.
- Xie, S., Lee, Y.-F., Kim, E., Chen, L.-M., Ni, J., Fang, L.-Y., Liu, S., Lin, S.-J., Abe, J. -i., Berk, B., Ho, F.-M. & Chang, C., 2009. TR4 nuclear receptor functions as a fatty acid sensor to modulate CD36 expression and foam cell formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13353–13358.
- Xu, J., Long, Y.S., Gozal, D. & Epstein, P.N., 2009. β -cell death and proliferation after intermittent hypoxia: Role of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(6), 783–790.
- Yaney, G.C., Korchak, H.M. & Corkey, B.E., 2000. Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal β -cells. *Endocrinology*, 141(6), 1989–1998.
- Yang, H., Kondo, K., Michelson, K.S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Gunzler, V., Haberberger, T., Ivan, M., Gervasi, D.C., Sorokina, I. & Kaelin, W.G., 2002. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13459–13464.
- Yang, P.-C. & Mahmood, T., 2012. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429.

- Yester, K.A., Strollo, H.C., Lee, E.J., Singamsetty, S., O'Donnell, C.P., Zou, B., Garcia-Ocana, A., Alonso, L.C., Romano, L.C., Stefanovski, D. & McGaffin, K.R., 2012. Time-dependent changes in glucose and insulin regulation during intermittent hypoxia and continuous hypoxia. *European Journal of Applied Physiology*, 113(2), 467–478.
- Yokoe, T., Alonso, L.C., Romano, L.C., Rosa, T.C., O'Doherty, R.M., Garcia-Ocana, A., Minoguchi, K. & O'Donnell, C.P., 2008. Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic β -cell replication in mice. *Journal of Physiology*, 586(3), 899–911.
- Young, T., Peppard, P.E. & Gottlieb, D.J., 2002. Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea A Population Health Perspective. , 165, 1217–1239.
- Yu, R.T., Lee, C.-H., Wang, Y.-X., Tiep, S., Kang, H., Evans, R.M. & Ham, J., 2004. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor δ Activates Fat Metabolism to Prevent Obesity. *Cell*, 113(2), 159–170.
- Zhang, Y., Sun, X., Sun, X., Meng, F., Hu, M., Li, X., Li, W., Wu, X.K., Brännström, M., Shao, R. & Billig, H., 2016. Molecular characterization of insulin resistance and glycolytic metabolism in the rat uterus. *Scientific Reports*, 6, 1–15.
- Zhao, J., Zhi, Z., Wang, C., Xing, H., Song, G., Yu, X., Zhu, Y., Wang, X., Zhang, X. & Di, Y., 2017. Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. *Oncology Reports*, 38(4), 2105–2115.

Webové zdroje (Obrázky):

<https://labguide.cz/taqman-sondy/>

<https://labguide.cz/metody/pcr/>

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html#taqman>

<https://www.espen.org/>

<http://lab-journal.blogspot.com/2006/05/post-cientfico-cultural-ensayos-de.html>

<http://www.sanquis.cz/index2.php?linkID=pls79&kat=2>

Přílohy

1) Western Blot

Tabulka 1 – ředění promývacího roztoku

Roztok	Chemikálie	Množství
TBS 10x (Tris buffered saline)	Tris-HCl	24 g
	Tris base	5,6 g
	NaCl	88 g
	Destilovaná voda	900 ml
TBST (Tris buffered saline with Tween)	TBS 10x	100 ml
	Destilovaná voda	900 ml
	Tween 20	1 ml

Tabulka 2 – příprava gelů pro elektroforézu

Gel	Zaostřovací gel	Dělicí gel
	4%	8%
Distilled water	3,2 ml	5,35 ml
40% Acrylamide/Bis	500 μ l	2 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,26 ml	-----
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-----	2,5 ml
10% SDS	50 μ l	100 μ l
10% APS	25 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l
Total volume	5 ml	10 ml

Tabulka 3 – příprava vzorků na SDS-PAGE

Chemikálie pro vzorky na SDS-PAGE (s lyzátem 1:1)	Množství
BME (beta-merkptoethanol)	50 μ l
SLB (Sample Laemmli Buffer 4x)	950 μ l

Tabulka 4 – Příprava running s transfer bufferu

Roztok	Chemikálie	Komponenty	Množství
Running buffer	10x Tris/Glycine/SDS Electrophoresis	25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3	100 ml
	Destilovaná voda		900 ml
Transfer buffer	10x Tris/Glycine Electrophoresis	25mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3	100 ml
	Methanol		200 ml
	Destilovaná voda		700 ml

Tabulka 5 – Ředění primárních a sekundárních protilátek

Primární protilátka	Katalogové číslo	Molekulová hmotnost	Ředění	Sekundární protilátka	Ředění
Anti-SLC27A4/FATP4	ab200353	72 kDa	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG	1:10000
Anti-CD36	ab133625	78-88 kDa	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG	1:10000
Anti-CPT1A	ab234111	88 kDa	1:500	Goat Anti-Rabbit IgG	1:10000
Anti-beta Tubulin	ab6046	50 kDa	1:3000	Goat Anti-Rabbit IgG	1:10000

Tabulka 6 – Extrakce proteinů ze svalů

Chemikálie	Množství
T-PER	1 ml
Vzorek svalů	100 mg

Tabulka 7 – Řazení nanášených vzorků na gel

Gel 1							
F1 DMOSA	F2 DMOSA	F3 DM	F6 DM	F9 OSA	F13 OSA	F7 KONT	F23 ST
Gel 2							
F16 DMOSA	F28 DMOSA	F8 DM	F11 DM	F14 OSA	F17 OSA	F18 KONT	F23 ST
Gel 3							
F29 DMOSA	F35 DMOSA	F12 DM	F15 DM	F23 OSA	F24 OSA	F20 KONT	F23 ST
Gel 4							
F36 DMOSA	F37 DMOSA	F30 DM	F31 DM	F25 OSA	F21 KONT	F26 KONT	F23 ST
Gel 5							
F38 DMOSA	F39 DMOSA	F32 DM	F33 OSA	F27 KONT	F40 KONT	F23 ST	
Gel 6							
F44 DMOSA	F45 DM	F34 OSA	F42 KONT	F43 KONT	F23 ST		

*řazení vždy totožné v případě všech primárních protilátek

2) Real-time PCR

Tabulka 8 - Mix pro reverzní transkripci (pro jeden vzorek)

Chemikálie	Množství
10X RT Buffer	2,0 µl
20XdNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2,0 µl
Multiscribe RT	1,0 µl
Rnase Inhibitor	1,0 µl
Nuclease-free H2O	3,2 µl
celkem	10,0 µl

Tabulka 9 - Směs reagentů pro jednu reakci (pro jeden vzorek)

Chemikálie	Množství
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µl
TaqMan® Assay (20X)	1 µl
Nuclease-Free Water	7 µl
Vzorek	2 µl
Total volume	20 µl

Tabulka 10 – Seznam prób detekovaných genů

Seznam prób	Katalogové číslo	Assay ID
SLC27A4	4331182	Hs00192700_m1
CD36	4331182	Hs00169627_m1
CPT1B	4331182	Hs03046298_s1
TBP	4331182	Hs00427620_m1
GUSB	4331182	Hs00939627_m1

Tabulka 11 – příklad řazení jednotlivých pacientů na 96-jamkovou destičku

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TBP	FATP4F1	TBP	FATP4F2	TBP	FATP4F5	TBP	FATP4F16	TBP	FATP4F28	TBP	FATP4F29
B	TBP	CD36F1	TBP	CD36F2	TBP	CD36F5	TBP	CD36F16	TBP	CD36F28	TBP	CD36F29
C	TBP	CD36F1	TBP	CD36F2	TBP	CD36F5	TBP	CD36F16	TBP	CD36F28	TBP	CD36F29
D	GUSB	CD36F1	GUSB	CD36F2	GUSB	CD36F5	GUSB	CD36F16	GUSB	CD36F28	GUSB	CD36F29
E	GUSB	CPT1F1	GUSB	CPT1F2	GUSB	CPT1F5	GUSB	CPT1F16	GUSB	CPT1F28	GUSB	CPT1F29
F	GUSB	CPT1F1	GUSB	CPT1F2	GUSB	CPT1F5	GUSB	CPT1F16	GUSB	CPT1F28	GUSB	CPT1F29
G	FATP4F1	CPT1F1	FATP4F2	CPT1F2	FATP4F5	CPT1F5	FATP4F16	CPT1F16	FATP4F28	CPT1F28	FATP4F29	CPT1F29
H	FATP4F1	NRT contro	FATP4F2	NRT contro	FATP4F5	NRT contro	FATP4F16	NRT contro	FATP4F28	NRT contro	FATP4F29	NRT contro