

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE

1.LÉKAŘSKÁ FAKULTA

FARMAKOLOGICKÝ ÚSTAV



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Farmakologické modifikace potenciálních
signálních systémů regulujících
metabolismus adipocytů a hepatocytů
a jejich vliv na obezitu.**

Školitel: prof.Dr.Hassan Farghali,DrSc.

Praha 2011

MUDr.Mgr.Jiří Hodis

Příloha č. 1

Universita Karlova V Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Farmakologie a toxikologie



MUDr.Mgr.Jiří Hodis

Farmakologické modifikace potenciálních signálních systémů regulujících metabolismus adipocytů a hepatocytů a jejich vliv na obezitu.

Pharmacological modifications of potential signal systems regulating metabolism of adipocytes and hepatocytes and their influence on obesity.

Typ závěrečné práce

Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Prof.Dr.Hassan Farghali,DrSc.

Praha 2011

Příloha č. 1

Identifikační záznam:

HODIS, Jiří. *Farmakologické modifikace potenciálních signálních systémů regulujících metabolismus adipocytů a hepatocytů a jejich vliv na obezitu*. Praha, 2011. 181 s. včetně příloh.

Disertační práce (PhD) Universita Karlova v Praze, 1.lékařská fakulta, Farmakologický ústav.
Školitel prof.Dr.Farghali Hassan,DrSc.

Příloha č. 1

Prohlášení:

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

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



MUDr. Mgr. Jiří Hodis

V Praze 09.03.2011

Abstrakt teze:

Zdůvodnění a cíle: I když obezita a metabolický syndrom představují ve světě závažný zdravotnický problém, arsenál farmakoterapie je pro léčbu dosud nedostatečný. V naší práci jsme se zaměřili na buňky dvou hlavních orgánů představující riziko těchto nemocí – hepatocyty a viscerální adipocyty a použili je v našem modelu. Zjišťovali jsme 3 hlavní metabolické a signalizační děje v těchto buňkách- v hepatocytech glykogenolýzu, produkci oxidu dusnatého (NO), transkripci indukovatelné NO syntázy (iNOS) v adipocytech lipolýzu, produkci NO a transkripci iNOS. V první části práce jsme se zaměřili na vliv kombinace peroxisome proliferation activator receptor γ (PPAR γ) agonisty, antagonisty a β_3 adrenomimetika na kulturu epididymálních potkaních adipocytů. V druhé části jsme zkoumali vliv β a α adrenergních mimetik, adrenergních blokátorů, NO donorů a NOS blokátorů na kulturu potkaních hepatocytů s vysokým obsahem glykogenu.

Metody: Produkce NO po vlivu účinných látek byla zjišťována pomocí metody detekce NO_2, NO_3 , glykogenolýza byla detekována podle glukózy uvolněné do media z kultury hepatocytů, hladina NOS byla zjišťována jak komparativní polymerázovou řetězovou reakcí s reversní transkripcí (RT-PCR u hepatocytů), tak kvantitativní real time RT PCR u adipocytů. Lipolýza byla hodnocena podle hladiny glycerolu uvolněného do media v kultuře adipocytů.

Výsledky: Trioglitazon jako PPAR γ agonista blokoval částečně β_3 adrenomimetikem BRL-37344 navozenou lipolýzu v potkaních adipocytech stejně jako NO syntézu. Přidáním PPAR γ antagonisty SR-202 však nedošlo k blokádě efektu troglitazonu, což nás vedlo k hypotéze o nonPPAR γ efektu troglitazonu. Blokáda efektu troglitazonu na β_3 adrenergně vyvolanou lipolýzu a NO produkci byla zjištěna až při přidání blokátoru AMPK (adenosin monofosfát protein kinázy) – Compound C. Hladina iNOS zjištěná RT-PCR kopírovala hladinu celkového NO detekovaného v mediu kultury adipocytů. U hepatocytů bohatých na glykogen jak epinephrin, tak phenylephrin vedl k zvýšení glykogenolýzy a NO produkce, ale jen prazosin jako α adrenergní blokátor a nikoliv propranolol jako β blokátor byl schopen zvýšení glykogenolýzy a NO produkce zabránit. Glykogenolýza byla zvýšena i po SNAP jako donoru NO a naopak snížena po L-NAME a po aminoguanidinu jako blokátoru NOS. Podobný efekt na NO produkci a glykogenolýzu byl zjištěn pokud byla α adrenergní mimetika zaměněna za glukagon.

Závěr: Zjištěný pravděpodobný PPAR γ non dependentní- zato AMPK dependentní efekt troglitazonu na lipolýzu viscerálních adipocytů a produkci NO může pomoci v hledání selektivnějších látek ze stejné skupiny glitazonů bez nežádoucího účinku na vzestup tělesné hmotnosti. Zjištění α adrenergního mechanismu adrenergně navozené glykogenolýzy může vést účinnou blokádou k prodloužení antiglykogenolytického efektu některých nově vyvíjených blokátorů receptoru pro glukagon. Poznání signálního významu NO jak v adipocytech tak v hepatocytech může pomoci k objasnění oxidačně redukční signalizace a eventuelně k vývoji vazodilatačních účinků nových léčiv na metabolický syndrom a obezitu.

Thesis abstract:

Background and aims: Both obesity and metabolic syndrome form severe health problems in the whole world. Nevertheless the armament of pharmacotherapy for both diseases remains unsatisfactory. We aimed our work to main organs in risk of the mentioned diseases –liver and visceral fat using hepatocytes and visceral adipocytes as model. We detected 3 main metabolic and signalization activities- glycogenolysis, Nitric oxide (NO) production and transcription of inducible NO synthase (iNOS) in hepatocytes, lipolysis, NO production and iNOS transcription rate in adipocytes. We directed our interest to combination of peroxisome proliferation activator receptor γ (PPAR γ) agonist, antagonist and β_3 adrenergic agonist in the culture of epididymal rat adipocytes in the first part of our work. While in the second part we investigated the influence of β and α adrenergic mimetics, adrenergic blockers in the culture of rat high glycogen content hepatocytes.

Methods: NO production was detected under the active agents treatments by detection of NO oxidative products NO₂ and NO₃ in media. Glycogenolysis was measured as free glucose rise released by hepatocytes into the media. NOS transcription level was extrapolated after comparative polymerase chain reaction with reverse transcription and either after quantitative real time RT-PCR. Lipolysis was calculated after free glycerol released to media in adipocyte culture.

Results: Troglitazone as PPAR γ agonist attenuated partially lipolysis triggered by β_3 agonist BRL-37344 and blocked the triggered NO synthesis in rat isolated adipocytes. Addition of PPAR γ antagonist SR-202 brought no blocking effect on troglitazone activity. That fact offered an alternative hypothesis of nonPPAR γ effect of troglitazone to us. The blockade of troglitazone action on β_3 adrenergic triggered lipolysis and NO production could be seen not earlier than after addition of AMPK (adenosine monophosphate protein kinase) blocker-Compound C. The level of iNOS detected by RT-PCR imitated the NO level measured in adipocyte culture media. Both Epinephrine and Phenylephrine caused increase in rate of glycogenolysis and NO production in the culture of glycogen rich hepatocytes but the effect could be blocked by prazosin – α adrenergic blocker only despite no blockade detected after -propranolol - β adrenergic blocker . Upward trend of glycogenolysis could be seen even after SNAP as NO donor while downward trend was detected after L-NAME or aminoguanidine-known NOS blockers. Similar effect to adrenergically stimulated glycogenolysis and NO production could be seen after stimulation of glycogenolysis and NO production by glucagon.

Conclusion: The supposed non PPAR γ dependent and AMPK dependent effect of troglitazone on lipolysis and NO production in visceral adipocytes ascertained by us could help in invention of more selective compounds from the same group of glitazones without common adverse effect on weight gain in patients. The detected α adrenergic mechanism of catecholamine induced glycogenolysis could help to prolong atiglycogenolytic effect of several newly invented glucagon receptor blockers by effective adrenergic blockade. The investigation of NO signaling effect in both adipocytes and hepatocytes could help to clarify oxidative/reductive signalization and alternatively help in finding out vasodilatation effect of newly invented drugs for treatment obesity and metabolic syndrome.

Obsah

STRANA

1. Úvod.....	9
2. Seznam použitých zkratek.....	10
3. Poděkování.....	13
4. Přehled publikovaných prací se vztahem k tématu.....	13
5. Přehled publikovaných abstraktů ve sborníku vědeckých konferencí v retrospektivním pořadí.....	14
6. Literární přehled	
6.1 Obezita a metabolický syndrom.....	16
6.1.1 Obezita - definice problému.....	16
6.1.2 Regulace energetické rovnováhy organismu.....	17
6.1.3 Současná antiobezitika.....	20
6.1.4 Uvažovaná antiobezitika v budoucnu.....	24
6.1.5 Metabolický syndrom - definice problému.....	25
6.1.6 Adipocyty při obezitě a metabolickém syndromu.....	26
6.1.7 Hepatocyty při obezitě a metabolickém syndromu.....	27
6.1.8 Současné ovlivnění jaterního metabolismu dietou a farmaky.....	28
6.2 Glykogenolýza.....	29
6.2.1 Perspektivy ovlivnění jaterní glykogenolýzy farmaky.....	28
6.3 Lipolýza.....	34
6.3.1 Látky vyvolávající/ tlumící periferní lipolýzu.....	38
6.4 Oxid dusnatý (NO).....	39
6.4.1 Syntéza NO.....	39

6.4.2	Rozklad a přenos NO.....	39
6.4.3	Konstitutivní a indukibilní NO syntézy.....	40
6.4.4	NO, obezita a metabolický syndrom.....	41
6.4.5	NO donory.....	46
6.4.6	Blokátory NOS (blokátory produkce NO).....	46
6.4.7	Ovlivnění exprese iNOS.....	49
6.5	Signální molekuly adipocytů.....	50
6.5.1	Adiponectin.....	51
6.5.2	Tumor necrosis factor- α (TNF α).....	53
6.5.3	Resistin.....	55
6.6	Další specifické signalizační dráhy adipocytů a jejich využití v léčbě obezity a metabolického syndromu.	
6.6.1	PPAR γ receptor.....	58
6.6.1.1	PPAR γ blokátory.....	61
6.6.2	Adenosin monofosfát kináza (AMPK).....	68
6.6.2.1	Aktivátory AMPK.....	73
6.6.2.2	Blokátory AMPK.....	73
6.6.3	β_3 - adrenergní receptor.....	80
6	Cíle práce.....	88
7	Používané metody a experimentální modely	91
7.1	Používané chemikálie coby farmakologicky účinné látky.....	91
7.2	Použitá laboratorní zvířata.....	94
7.3	Metodika izolace a kultivace adipocytů.....	95
7.4	Metodika izolace a kultivace hepatocytů.....	95
7.5	Metodiky detekce	95

8	Statistické metody.....	101
9	Výsledky práce.....	101
10	Diskuse.....	103
11	Závěr.....	105
12	Použitá literatura.....	106-147
13	Přílohy - publikované práce v retrospektivním pořadí.....	148-181
13.1	Publikace 1- β_3 agonist - induced lipolysis and nitric oxide production: relationship to PPARgamma agonist/antagonist and AMPK modulation	
13.2	Publikace 2 - Oxid dusnatý u obezity a metabolického syndromu	
13.3	Publikace 3 - Glucose Release as a Response to Glucagon in Rat Hepatocyte Culture: Involvement of NO Signaling	
13.4	Publikace 4 - The Role of Adrenergic Agonists on Glycogenolysis in Rat Hepatocyte Cultures and Possible Involvement of NO	

1. Úvod: Obezita je v současnosti považována za pandemii rozvinutého světa a má ročně na svědomí mnoho lidských životů. Přesto, že provází lidstvo od nepaměti, nedaří se ji dodnes dostatečně léčit. Moderní způsob života s nedostatkem fyzické aktivity a nadbytkem potravin bude problém obezity stále zhoršovat, neboť statistika ukazuje, že obézních lidí přibývá. Ruku v ruce s obezitou centrálního typu jde i soubor onemocnění, které spadají do čtveřice příznaků metabolického syndromu (zvýšená glykemie nalačno nebo diabetes, obezita, hypertenze, dyslipidemie). U diabetu je hlavním příznakem pro stanovení diagnózy hyperglykemie. Tato je způsobena kromě absolutního nebo relativního nedostatku insulinu i faktory, které jsou schopny glykemie zvyšovat. Mezi nejsilnější takové faktory patří jaterní glykogenolýza. Molekulární podklady vzniku obezity dosud nejsou zcela probádané a proto i arsenál léků, který by účinně obezitu léčil a neměl výrazné nežádoucí účinky, je malý. Přes nepoměrně větší arsenál léčiv na diabetes a hyperglykemie je stále aktuální výzvou hledání nových signálních drah a potažmo léčiv i v této oblasti. Pro farmakologii je obezita i diabetes stále zatím hozenou rukavicí v boji za hledáním nových a účinnějších léčiv. Ve své práci se snažím

alespoň málem přispět k velkým úkolům, které nás v hledání účinných antiobezitik a dalších antidiabetik ještě čekají.

2. Seznam použitých zkratek:

ACS	- acyl-CoA syntáza
ACTH	- adrenokortikotropní hormon
ADP	- adenosin difosfát
AgRP	- Agouti related peptid
AICAR	- 5-Aminoimidazol-4-carboxamid 1- β -D-ribofuranosid
ALBP	- adipocyte lipid binding protein
AMP	- adenosin monofosfát
AMPK	- adenosin monofosfát kináza
AMPKK	- adenosin monofosfát kináza kináza (nadřazená kináza k AMPK)
aP2	- adipocyte fatty acid binding protein
ATGL	- adipose triglycerid lipáza
ATP	- adenosin trifosfát
BMI	- index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
B2m	- beta 2 mikroglobulin
cAMP	- cyklický adenosin monofosfát
CAP	- cbl – associated protein
CART	- Cocaine Amphetamine Regulated Transcript
CE	- estery cholesterolu
C/EBP α	- CCAAT/enhancer binding protein α
cGMP	- cyklický guanosin monofosfát
CNS	- centrální nervový systém
CREB1	- cAMP responsive element binding protein 1
CRH	- hormon uvolňující kortikotropin – kortikoliberin
CRH2R	- receptor kortikoliberinu typu 2
DM II	- diabetes mellitus 2. typu
ESC	- European Society of Cardiology (Evropská kardiologická společnost)
FATP	- Fatty acid transport protein
FPG	- fatigue plazma glucose (glykémie nalačno)
FFAs	- free fatty acids (volné mastné kyseliny)
GC	- guanylát cykláza;

Gi	- inhibiční G protein
GIT	- gastrointestinální trakt
GLUT 2, GLUT 4	- glukozový přenašeč 2 a 4
GP, GPb, GPa	- glykogen fosforyláza (GPb- inaktivní forma, GPa- aktivní forma)
GR	- receptor pro glukagon
GTP	- guanosin trifosfát
HDL-C	- high density podtyp cholesterolu
HMW	- high molecular weight (vysokomolekulární)
HSL	- hormon senzitivní lipáza
IC ₅₀	- inhibiční koncentrace s 50% inhibicí daného receptoru
ICHS	- ischemická choroba srdeční
IGF-1	- insulin like growing factor 1
IGT	- impaired glucose tolerance (porušená glukózová tolerance)
IL-1 β , IL-6	- interleukin 1 β , interleukin 6
IRS	- insulin response substrát (signál produkovaný jako odpověď na stimulaci insulinového receptoru)
JAK	- Janus kináza
JNK	- Janus kináza
L-NAME	- N ^G -nitro-L-arginine-methyl ester
L-NNA	- N ^G -nitro-L-Arginin
LHRH	- hormon uvolňující luteinizační hormon (luteotropin)
LKB1	- AMPK nadřazená kináza ze skupiny Ser/Thr kináz
LLP, LPL	- lipoproteinová lipáza
LPS	- lipopolysacharid
MAPK	- mitogen activated protein kinaza
MGL	- monoglycerid lipáza
MK	- mastné kyseliny
MO25	- armadillo repeat-containing mouse protein 25
MSH	- melanocyty stimulující hormon
MC3R a MC4R	- melanocyt receptor typu 3 a 4
NA	- noradrenalin
NAD/NAD ⁺	- nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná a redukována forma)
NADP/NADPH	- nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (oxid. a redukována forma)
NAM	- nikotinamid

Nampt	- nikotinamid fosforibosyltransferáza
NEFA	- non-esterified fatty acids (volné mastné kyseliny)
NEMK	- neesterifikované (volné) mastné kyseliny
NF- κ B	- nukleární faktor κ B
NO	- oxid dusnatý
NOS	- NO syntáza
NPY	- neuropeptid Y
oGTT	- orální glukózový toleranční test
PAI-1	- plazminogen aktivátor inhibitor typu 1
PGC-1 α	- peroxisome proliferator-activated receptor γ koaktivátor 1- α
PI	- fosfatidylinositol
PI3-K	- fosfatidylinositol 3-fosfo kináza
PKA,B,C,G	- proteinkináza A, B, C, G
POMC	- proopiomelanocortin
PPAR γ	- peroxisome proliferation activator receptor γ
qRT-PCR	- quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase)
RT-PCR	- reverse transcription polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí využívající komparace ke kvantifikaci)
SIRT 1	- silent information regulator T1 (histon/protein deacetyláza)
SSRI	- specifický blokátor reuptaku serotoninu (typ antidepresiva)
STAT	- signal transducer and activator of transcription
SNAP	- S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine
STRAD	- STE20-related adaptor
TAG	- triacylglyceroly
TAK1	- transforming growth factor beta-activated kinase
TNF α	- tumor necrosis faktor α
UCP	- uncoupling proteiny
VEGF	- vascular endothelial growth factor
VIP	- vazoaktivní intestinální peptid
VLDL	- very low denzity lipoproteins(lipoproteiny o o velmi nízké hustotě)
VPAC1	- receptor for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating peptide

WAT - white adipose tissue (bílý tuk)

ZMP - 5-aminoimidazole-4-carboxamide- β -D-ribofuranotid

3. Poděkování: Chtěl bych na tomto místě poděkovat především svému školiteli prof.Dr.Hassanovi Farghalimu,DrSc. za vlídné odborné vedení při prvních krocích mé vědecké práce, dále všem pracovníkům Farmakologického ústavu I.LF UK, za přijetí do kolektivu a všem laborantkám za precizní spolupráci. Mé poděkování patří i spolupracujícím pracovištím za pomoc při mé vědecké práci a za instruktáž metodik, které nebylo toho času na našem pracovišti možné provést – na Ústavu experimentální medicíny ČSAV jmenovitě - vedoucímu pracoviště farmakologie - RNDr.Zdeňku Zídkovi, DrSc. a odborné asistentce Mgr. Janě Křížkové. V neposlední řadě patří poděkování Centru nemocí z povolání SZÚ skupině biotransformací pod vedením RNDr.Pavla Součka, DrSc. jmenovitě pak hlavně RNDr.Radce Václavíkové, PhD, která se v naší práci věnovala qRT-PCR metodice. Má práce by nebyla možná ani bez finální grantové podpory a to : IGA MZ NR/9379-3/2007, VZ MSM 0021620807, GAČR 305/05/2425 a IGA MZ NL/7418-3.

4. Přehled publikovaných prací se vztahem k tématu:

1. **Hodis J, Vaclavíková R and Farghali H:** Beta-3 agonist-induced lipolysis and nitric oxide production: relationship to PPARgamma agonist/antagonist and AMP kinase modulation. *General Physiology and Biophysics* 1(30):90-99, 2011 **IF 0,903**
2. **Hodis J, Gaier N and Farghali H:** Nitric oxide in patients with obesity and metabolic syndrome. *Cas Lek Cesk.* 148(1):34-8, 2009 (publikace bez IF)
3. **Farghali H, Hodis J, Kutinová-Canová N, Potměšil P, Kmoníčková E and Zídek Z:** Glucose release as a response to glucagon in rat hepatocyte culture: Involvement of NO signaling. *Physiol. Res.* 57: 569-575, 2008 **IF 1,739**
4. **Hodis J, Kutinová-Canová N, Potměšil P, Kameníková L, Kmoníčková E, Zídek Z and Farghali H:** The role of adrenergic agonists on glycogenolysis in rat hepatocyte cultures and possible involvement of NO. *Physiol. Res.* 56: 419-425, 2007 **IF 1,739**

5. Přehled publikovaných abstraktů ve sborníku vědeckých konferencí v retrospektivním pořadí:

1. Hodis J. and Farghali H.: Adiponectin time dependence secretion under β_3 agonist, PPAR γ agonist treatments. Endocrine Abstracts. (22):P 335, 2010 ISSN 1470-3947 (2010 12th European Congress of Endocrinology- poster presentation)
2. Hodis J. and Farghali H.: Troglitazone Attenuates Effect of β_3 Adrenergic stimulated NO production through AMPK in primary culture of visceral adipocytes. Journal of Diabetes. 1(s1): A194 2009 ISSN 1753-0393 2009 (2009 Prediabetes and Metabolic syndrome- Nice - poster presentation)
3. Hodis J. and Farghali H.: AMPK blocker P5499 (Compound C) attenuates troglitazone effect on β_3 adrenergic triggered NO production in primary culture of visceral adipocytes indicating that first 24 hours effect of glitazone is mainly AMPK mediated and not PPARgamma mediated. Obesity Facts 2(suppl 2):197, 2009 ISBN 978-3-8055-9196-6 (2009 ECO 2009- Amsterdam- poster presentation)
4. Hodis J., Farghali H: Troglitazone effect on β_3 -adrenergic stimulated NO production in primary culture of visceral adipocytes is mediated through AMPK and modulates possible adipocyte - hepatocyte communication via NO. 10. Studentská vědecká konference-Sborník 2009: strana 33, ISBN 978-80-7262-636-6 (2009 10th Students' scientific conference of 1st Faculty of Medicine-Prague– winning oral presentation)
5. Hodis J. and Farghali H: Vliv oxidu dusnatého (NO) u obezity a metabolického syndromu. Farmakológia 2009, Sborník prací: strana 23, ISBN 978-80-223-2708-4 (2009 59th Pharmacological Days- Bratislava- oral presentation)
6. Hodis J., Lincová D., Farghali H: Adipocytes as Model for Studying Drug Targets: the Example of PPAR(and Certain Post Receptor Signals). Prague Medical Report 2008, 109 (Suppl): 41-43 (2008 58th Pharmacological Days- Prague- oral presentation)

7. Hodis J. and Farghali H: Effect of PPAR gamma agonist, antagonist and β_3 agonist/antagonist on adiponectin, resistin, NO, TNF-alfa and lipolysis in rat adipocytes. International Journal of Obesity 2008, 32(S1): S63
(2008 ECO 2008- Geneve- poster presentation)
8. Hodis J., Farghali H.: Effect of Troglitazone and its blocker (SR-202) on Nitric oxide production and lipolysis in adipocyte culture. Atherosclerosis Supplements 2007, 8(1): 22-23
(2007 EAS- Helsinki- poster presentation)
9. Hodis J. Farghali H: Does The Response to Troglitazone and Its Blocker involve Nitric Oxide Signaling and Influence on Lipolysis? Diabetes and Vascular Disease Research 2007; 4(1): S150, ISSN 1479-1641
(2007 Barcelona- Praedabetes and Metabolic Syndrome -poster presentation)
10. Hodis, J.; Potměšil P.; Kmoníčková E.; Zídek Z. and Farghali H. Does the glycogenolytic response to glucagon and adrenergic agonists involve nitric oxide signaling? Journal of Hepatology, 2006, Vol. 44, Suppl. 2, p S243
(2006 EASL Vienna - poster presentation)
11. Hodis, J.; Kameníková L.; Potměšil P.; Kmoníčková E.; Zídek Z. and Farghali H. The possible involvement of nitric oxide signaling in glycogenolytic response to glucagon and adrenergic agonists in hepatocyte culture. Acta Pharmacologica Sinica, 2006, Vol. 27, Suppl. 1, p 397 2006 (IUPHAR China, Beijing - poster presentation)
12. Hodis, J.; Kameníková L.; Potměšil P.; Kmoníčková E.; Zídek Z. and Farghali H: Glycogenolytic response to glucagon and adrenergic agonists in hepatocyte culture: possible involvement of nitric oxide signaling. European Journal of Clinical Investigation, 2006, Vol. 36, Suppl. 1, p 702006
(ESCI Annual Scientific Meeting Prague- oral presentation)

6. Literární přehled

Poznámka: odkazy na náš vlastní výzkum v literárním přehledu jsou vyznačeny fialovou barvou.

Převzatá schémata a tabulky jsou ponechány v původním znění v angličtině pro zachování autenticity. Pokud byly tabulky zkráceny, je toto uvedeno. U všech přejatých částí jsou vyznačeny odkazy na příslušnou literaturu.

6.1. Obezita a metabolický syndrom

6.1.1 Obezita - definice onemocnění

Obezita je dnes klinicky definována podle snadno dostupného vyšetření výšky a tělesné hmotnosti a tzv. Queteletova indexu, který je dnes celosvětově označován jako Body mass index (BMI- body mass index = váha v kg/ (výška v m)²). Optimální životní prognózu mají lidé s BMI 20-22. Obezita je v našich zemích pak definována jako BMI > 30.

Výrazně se zvyšuje morbidita od BMI 27, proto někteří autoři definují obezitu jako BMI > 27: Obezita (při BMI ≥ 27) vede k zvýšení rizika mnoha chorob oproti normální tělesné hmotnosti (při BMI < 25):

Onemocnění	Relativní riziko	Onemocnění	Relativní Riziko
Hypertenze	2,9	Hyperlipidémie	1,5
Infarkt myokardu	1,9	Cholecystopathie	2,0
Angína pectoris	2,5	Kolorektální karcinom	1,3
Cévní mozková příhoda	3,1	Karcinom prsu	1,2
Žilní trombóza	1,5	Karcinom dělohy	1,6
Diabetes II. typu	2,9	Artróza	1,8
Dna	2,5	Fraktura krčku femuru	0,8

(Hainer et al. 2004)

Obezita centrálního typu podle současných kritérií je definována jako obvod pasu ≥ 94 cm u evropských mužů a ≥ 80cm u evropských žen s etnickými odlišnostmi u národů mimo Evropu (Graham et al. 2007). Obvod pasu se obvykle měří v místě viditelného pasu nebo v polovině vzdálenosti mezi lopatou kosti kyčelní a posledními žebry (Svačina et al. 2001).

Epidemiologie obezity:

Podle údajů International Obesity Task Force z roku 2000 dosahovala prevalence obezity v evropských zemích mezi 10 až 40%. V České republice se v současné době pohybuje prevalence obezity kolem 25% ve věku 25-64 let (Hainer et al. 2004).

6.1.2 Regulace energetické rovnováhy organismu

Normální regulace energetické rovnováhy se v lidském organismu děje:

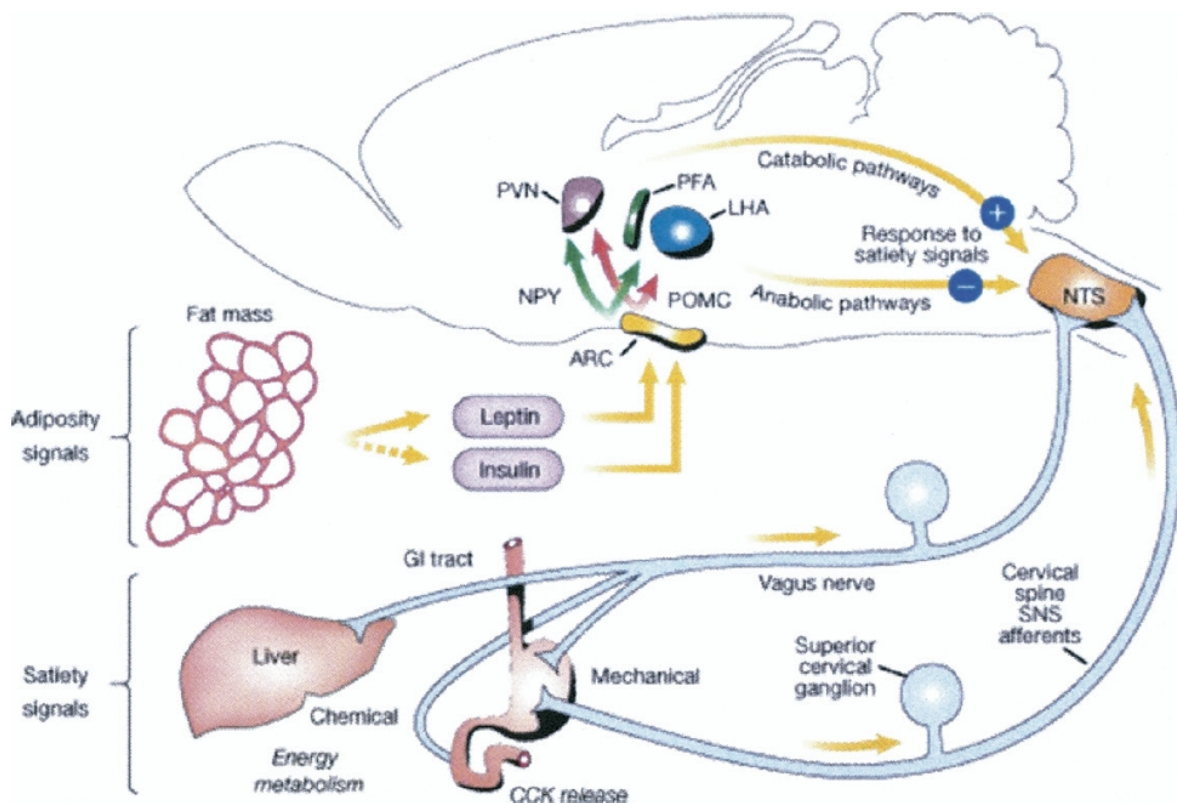
A/ Centrálním mechanismem v CNS:

Ventromediální hypothalamus je centrem pro sytost a laterální pro hlad. Z periferie se dostávají do mozku informace o celkovém množství tuku různými mechanismy. O celkové tukové hmotě mozek nejspíše informuje leptinová signalizace z periferie.

Signály v mozku mají pak efekt **anorexigenní** - ke snížení příjmu a zvýšení výdeje a nebo **orexigenní** - ke zvýšení příjmu a snížení výdeje.

Za **anorexigenní** mediátor je v mozku považován **Leptin a Insulin**- fungují přes aktivaci POMC a CART a inhibici NPY a AgRP v nucleus arcuatus (ARC).

V **orexigenních** hormonech hraje hlavní roli **Ghrelin**. Je to peptidický hormon secernovaný ze zažívacího ústrojí - hlavně v oblasti fundu žaludku, vede ke stimulaci chuti k jídlu, zvyšuje motilitu žaludku, stimuluje žaludeční sekreci, zvyšuje sekreci růstového hormonu a snižuje utilizaci tuku v organismu.



Impulzy regulující množství a velikost jídla přicházejí do mozku cestou stimulace bloudivého nervu - n. X(vagus) a aferentními míšními drahami. Informace se dále soustřeďují v nucleus tr. solitarius (NTS) (nejvýznamnějšími impulzy jsou cholecystikinin - CCK), glucagon-like

peptide-1 (GLP-1), enterostatin a glucagon. Z druhé strany krví jsou přinášeny k mozku mediátory jako leptin a insulin, které ovlivňují ncl. arcuatus hypotalamu (ARC), přenášející pak anorexigenní impulzy (proopiomelanokortin-POMC) přes laterální hypothalamickou oblast (LHA) nebo orexigenní impulzy (neuropeptid Y-NPY) přes paraventriculární jádro (PVN) zpět k nucleus tr.solitarii, kde se obě dráhy kříží (**Schwartz et al. 2000**).

Pocit nasycení lze navodit také bandáží žaludku nebo elektrickou stimulací vagu. Chuťové preference a závislost na jídle se spojují s úlohou dopaminergních neuronů a opioidních receptorů. Dle posledních výzkumů dochází u obézních lidí k většímu metabolickému obratu v parietálních oblastech mozku - tam jsou receptory pro oblast rtů a jazyka a tak se obézní lidé mohou častěji zaobírat vlastnostmi jídla jako odměny.

Leptin je proteohormon o 167 AMK- je kódován *ob* genem. Leptin se váže na receptor v hypothalamu, jak výše uvedeno. Zvyšuje také sekreci LHRH a tím iniciuje pubertu a zajišťuje fertilitu. Mutace receptoru u *ob/ob* myši vede k hyperfágii, obezitě a infertilitě. Mutace receptoru pro leptin *db/db* myši vede ke stejným následkům přes vysokou hladinu leptinu v krvi. Chronické působení leptinu vede ke změně energetického chování v důsledku zvýšené exprese NPY, kortikoliberinu, POMC, orexinu, Cocaine- amfetamin- receptor transkriptu (CART), melanin koncentrujícího hormonu a melanokortinu. Leptin zvyšuje exprese CRH tak, že zvyšuje exprese 2. typu receptoru pro CRH(CRH2R) ve ventromediálním hypothalamu. CRH zajišťuje v CNS tlumení příjmu potravy a aktivaci sympatiku. Z POMC vzniká α -melanocyty stimulující hormon (α -MSH), ACTH a další. α -MSH se váže na 5 typů receptorů a přes typ MC3R a MC4R tlumí chuť k jídlu. Polymorfismus MC4R je poměrně častou příčinou monogeně podmíněné morbidní obezity. Je to asi u 4% morbidně obézních dětí. Leptinové receptory jsou stimulovány prozánětlivými cytokiny např. TNF α , IL1 β , IL6, jak se děje například u maligních nádorů vedoucích ke kachektizaci. Deficit leptinu není u obézních obvyklý, spíše je zde jeho hladina vysoká. Nejspíše se zde jedná o leptinoresistenci (**Hainer et al. 2004**). Efekt Leptinu v „periferních tkáních“ mimo CNS je nejasný, neboť v takových tkáních se prakticky nevyskytuje receptor s dlouhou intracelulární doménou, který je pro jeho funkci a intracelulární signalizaci nutný. Naopak - velmi často se v periferních tkáních objevuje receptor s krátkou doménou, který sice leptin váže, ale nefunguje jako přenašeč signálu. Přestup leptinu přes hematoencephalickou nebo hematoliquorovou bariéru je za fyziologických podmínek minimální a tím se zhoršuje i možnost jeho využití jako léčiva.

B/ Periferním mechanismem pomocí vegetativního nervstva:

Svalová sympatická aktivita se projevuje postprandiální termogenezí a to její fakultativní složkou, kterou lze zablokovat β -blokátory. Postprandiální aktivita sympatická je také indukována Insulinem. Noradrenalinem stimulovaná lipolýza je u obézních lidí porušena. Byl zjištěn vztah mezi sníženou exkrecí NA a vzestupem hmotnosti a dokonce mezi nízkou hladinou adrenalinu a centrálním typem obezity. Sympatikus aktivují hlavně sacharidy v potravě a to je asi příčinou vyššího klidového energetického výdeje u vegetariánů (o 11%). Naopak léčba hypertoniků β -blokátory bývá spojena s nárůstem hmotnosti o 2-5kg. Hladina plazmatického noradrenalinu je považována za marker úspěšné dietetické léčby (**Hainer et al. 2004**).

6.1.3 Současná antiobezitika

Ke zvýšení termogeneze se dnes používají a nebo nedávno používaly látky jako- efedrin, kofein, sibutramin, dexfenfluramin, fenfluramin. Jde o látky inhibující fosfodiesterázu (kofein) nepřímá sympatomimetika (efedrin) nebo blokující zpětné vychytávání serotoninu (dexfenfluramin, fenfluramin) nebo reuptake serotoninu a noradrenalinu (sibutramin).

Vztah centrálně působících látek na obezitu:

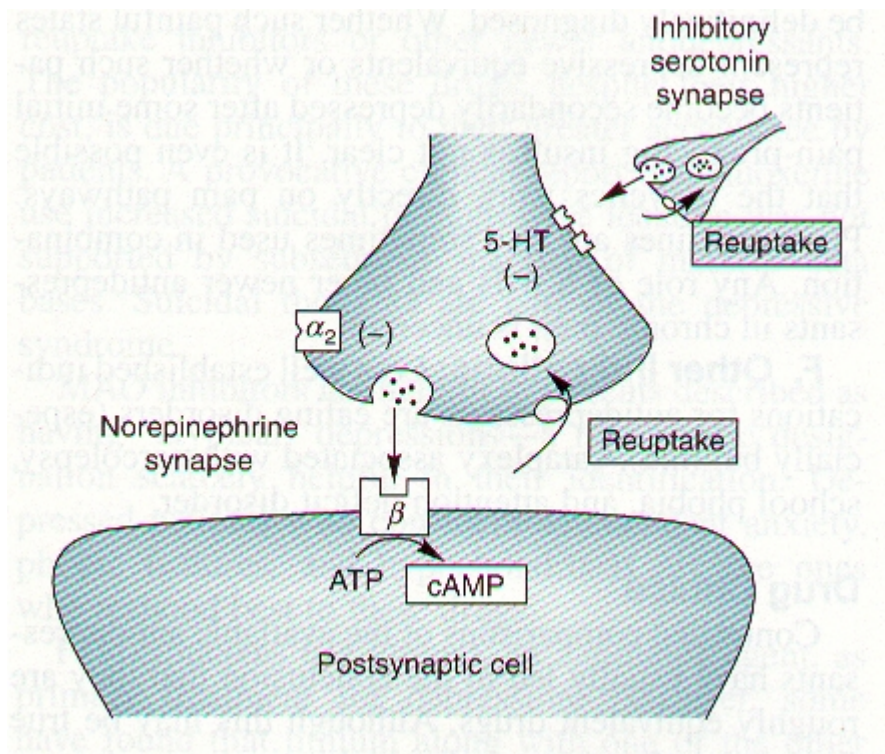
Vztah psychofarmak a změny hmotnosti je znám již dlouho. Léčba u psychiatrických nemocných často vede ke zvýšení hmotnosti. Vzestup váhy v průběhu léčení dosahuje od 2,3-18,2 kg. Mezi léky nejvíce vyvolávající vzestup hmotnosti patří antipsychotika- zvláště chlorpromazin, clozapin and olanzapin (**Russell and Mackell 2001**), mezi antidepresivy pak amitriptylin a mirtazapin (**Fava 2000**). Podobně působí i antimanika (**Corman et al. 1997**). Naopak fluoxetin a další SSRI se užívají při poruchách příjmu potravy a vedou k poklesu hmotnosti v prvních 6 měsících, následně však k hmotnostnímu vzestupu. Otázkou zůstává, zda mechanismus není spojen u fluoxetinu s jeho nejčastějším nežádoucím účinkem, kterým je nauzea až u 24% pacientů.

Centrálně působící antiobezitika používaná v posledních 10 letech- srovnáno podle mechanismu účinku:

Léky zvyšující hladinu intracelulárního cAMP nepřímo nebo blokádou fosfodiesterázy:
Kofein a efedrin - díky 2,2 až 3,6-násobnému zvýšení počtu psychiatrických nemocí, nemocí autonomního nervstva nebo gastrointestinálních symptomů a palpitací se již prakticky neužívají. (Shekele et al. 2003)

Inhibitory zpětného vychytávání noradrenalinu-serotoninu a dopaminu

Většinou se jedná zároveň o částečné blokátory u serotoninu jde o 56% blokádu, u noradrenalinu o 54% a u dopaminu o 16% blokádu.



Zástupce u nás je Sibutramin

Sibutramin byl v dle doporučení EMEA stažen z trhu začátkem roku 2010 pro zvýšenou frekvenci non-fatálních kardiovaskulárních příhod typu cévní mozkové příhody nebo infarktu

myokardu, které se projevily ve studii SCOUT (Sibutramine Cardiovascular Outcome Trial EMEA 2010).

Phentermin/Fenfluramin

Registrace Phenterminu/Fenfluraminu byla toho času zastavena díky nežádoucím účinkům plynoucím ze zvýšeného rizika plicní hypertenze (až 10x po užívání přes 3 měsíce) a poškození aortální a mitrální chlopně mírného až středního stupně (2-3x). Z metanalýzy však vychází riziko o něco menší (2,32x pro aortální regurgitaci a 1,55x pro mitrální regurgitaci) (Loke et al. 2002). Mechanismus tohoto nežádoucího účinku je částečně způsoben vyplavováním endogenního serotoninu (5-HT), dále blokadou jeho vychytávání v plicních cévách a nejspíše i přímým agonistickým efektem phenterminu na 5-HT_{2b} receptor. Rozhodující se zdá být pro vazbu na 5-HT_{2b} konfigurace R(+) na asymetrickém dusíku. (Rothman et al. 2000)

Blokátory vstřebávání živin z GIT:

Orlistat- Tetrahydrolipostatin pochází z plísně *Streptomyces toxytricini* vyskytující se v půdě na Mallorce. Vazbou na Serin inhibuje orlistat lipázy v zažívacím traktu a tak snižuje o 30% vstřebávání tuků z trávicího traktu (Hainer et al. 2004). Orlistat je dosud u nás registrován a to ve volně prodejném léčivu Alli a v preparátu vázaném na předpis- Xenical. Díky svému mechanismu účinku vede často k výrazným nežádoucím účinkům v podobě profúzních průjmů se steatorheou.

Nejnovější centrálně působící antiobezitika- Endokanabinoidní systém

Kanabinoidy jsou známy od roku 1964, kdy tetrahydrokanabinol (THC) byl zjištěn jako hlavní účinná látka marihuany. Signalizace kanabinoidů je zprostředkována 2 typy receptorů- z nichž CB-1 receptor byl klonován až v roce 1990 a v roce 1992 s objevuje první endokanabinoid – Anandamid. U endokanabinoidů se jedná téměř výlučně o polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem tedy o deriváty kyseliny arachidonové. Tam se řadí i druhá nejznámější látka endogenních kanabinoidů- 2-arachidonoylglycerol.

Lokalizace CB1 receptoru je téměř ubikvitní. Nachází se v různých orgánech jak v CNS (hlavně v bazálních gangliích, hippocampu, cerebellu a neocortexu), tak v játrech, svalech,

tukové tkáni a GIT. Na rozdíl od CB1, je CB2 lokalizován téměř výhradně v buňkách imunitního systému. Endokanabinoidy nejsou skladovány v granulech v neuronech, ale na rozdíl od jiných mediátorů, syntetizovány ad hoc. Působí jen lokálně a jsou okamžitě rozkládány všude přítomnými enzymy - hydrolázou amidů mastných kyselin a monoglycerid lipázou. Endokanabinoidní systém v mozku je v relativním klidu, pokud nedojde k jeho aktivaci. Ta vzniká pomocí impulzu přicházejícímu k postsynaptickému neuronu z nejrůznějších příčin (palatální impulz z příjmu příjemného jídla, sociálně příjemné prostředí při jídle apod.). Tyto příčiny vedou k aktivaci interneuronu a ovlivnění postsynaptického neuronu s produkcí endogenního kanabinoиду. Ten po exkreci do presynaptické štěrby a vazbě na CB1 receptor presynaptického neuronu snižují cAMP a Gs dependentní influx vápníkových iontů do presynaptického neuronu a ve svém důsledku sníží vyplavování mediátorů z presynapse- hlavně GABA. Dochází tak k zastavení přechodu impulzu -pocitu nasycení a ve svém důsledku k prodloužení příjmu favorizované potravy ve favorizovaném prostředí (**Woods et al. 2007**).

Jako antiobezitikum byl před několika lety představen selektivní blokátor CB1 receptoru- rimonabant. Nejedná se o neutrálního antagonistu v úzkém slova smyslu, ale o inverzního agonistu. Nepůsobí tedy neutrální blokádu CB1 receptoru, ale působí právě opačně než THC, zvýšení cAMP a inhibuje vazbu na GTP-Gs (**Salamone et al. 2007**). Zavedený rimonabant s centrálním účinkem byl doporučen k podávání v dávce 5-20mg (**Hainer et al. 2004**). Pro pacienty v Evropě byl registrován na European Medicines Agency (EMA) pod jménem Accomplia od června 2006. Vedl však k závažným nežádoucím účinkům a proto byla registrace v Evropě zastavena v říjnu 2008 s požadavkem doložení dalších výsledků klinické studie. Veškeré studie však distribuující firma Sanofi-Aventis 5. listopadu 2008 ukončuje (**Moreira et al. 2009**). Dle metaanalýzy bylo stanoveno relativní riziko dávky 20mg rimonabantu vůči placebo u následujících nežádoucích účinků takto: Nežádoucí psychiatrické účinky celkově 1,9 x vyšší, pokus o sebevraždu a myšlenky na sebevraždu 1,8x vyšší (i když dokonané sebevraždy byly jen 2 na cca 3000 lidí zahrnutých ve studiích) než při podávání placebo. Přesto dle studií zůstává rimonabant nejúčinnějším antiobezitikem se snížením váhy cca o 4,7 kg oproti 4,45 kg u sibutraminu a 2,76 kg za rok u orlistatu (**Christensen et al. 2007**). Snížením dávky z 20mg na 5mg rimonabantu denně se sníží sice frekvence nežádoucích účinků cca na polovinu, ale sníží se tím i požadovaný pokles hmotnosti pod statisticky významnou mez ve srovnání s placebem (**Aronne et al. 2007**). Jako alternativa se ukazuje kombinační léčba opioidních a CB1 antagonistů, která snižuje frekvenci nežádoucích účinků a přitom zachovává efekt na pokles hmotnosti (**Talbot et al. 2008**). Další možností je i

nebo hledání alternativních blokátorů CB1, které budou působit jako kompetitivní inhibitory a nikoliv jako inverzní agonisté, tak jako rimonabant (**Salamone et al. 2007**).

Srovnání některých nedávno používaných antiobezitik v účinnosti:

Summary of findings regarding medications for weight loss

Medication	Source of data	Weight loss assessed at:	Mean weight loss in treated patients compared to placebo (95% CI)
Sibutramine	Existing meta-analysis of 24 RCTs	52 weeks	-4.45 kg (-5.29, -3.62)
Orlistat	Our meta-analysis of 23 RCTs	52 weeks	-2.76 kg (-3.31, -2.20)
Fluoxetine	Our meta-analysis of 9 RCTs	52 weeks	-3.15 kg (-5.82, -0.48)
Phentermine	Existing meta-analysis of 9 RCTs	2 to 24 weeks	-3.6 kg (-6.0, -0.6)
Diethylpropion	Existing meta-analysis of 13 RCTs	6 to 52 weeks	-3.0 kg (-11.5, 1.6)
Bupropion	Our meta-analysis of 3 RCTs	24 to 52 weeks	-2.77 kg (-4.5, -1.0)
Zonisamide	1 RCT	16 weeks	Additional 5% of pre-treatment weight loss
Topiramate	Our meta-analysis of 6 RCTS	24 weeks	Additional 6.5% of pre-treatment weight loss (95% CI 4.8%, 8.2%)

(Shekelle et al. 2004)

Tabulka ukazuje krátký souhrn autorů - porovnání účinků léčby. Nebylo nalezeno přímé srovnání jednotlivých preparátů vůči sobě. Celkový přehled účinku vůči placebo nepodporuje hypotézu, že by jeden preparát byl účinnější než druhý, neboť rozdíl mezi preparáty v době přibližně jednoho roku v korekci na placebo je jen 1-2kg. Dalším zjištěním je, že žádný z preparátů nevyvolává velký pokles hmotnosti - je to méně jak 5 kg/rok v korekci na placebo, pokud vezmeme celkový pokles hmotnosti, pak je to kolem 8 kg/rok.

Antiobezitika u DM 2. typu- mají menší účinnost než u nediabetiků. Pokud se jim však v 6 měsících podaří snížit váhu o 5% hmotnosti, pak dochází k signifikantnímu poklesu glykémie, insulinémie a TAG. U respondérů poklesne HbA1c o 1% a více. Před nasazením nemocnému s věkem do 65 let je vhodné provést ergometrické vyšetření. Efekt sibutraminu na diabetickou polyneuropathii byl obvykle od 20mg denně. Podobně u Orlistatu dojde k poklesu HbA1c o 1%. Od 2001 je orlistat hrazen zdr. pojišťovny u diabetiků nad 35 BMI, spolupracujících v léčbě, léčených pro hyperlipoproteinemii, ICHS či hypertenzi (**Hainer et al. 2004**).

6.1.4 Uvažovaná antiobezitika v budoucnu

Uvažovaná léčiva v léčbě obezity a metabolického syndromu X:

- specifické stimulatory β_3 adrenergických receptorů
- antagonisté neuropeptidu Y
- agonisté cholecystokininu
- deriváty glukagon-like peptidu
- agonisté receptoru melanokortinu 4
- antagonisté gastrického inhibičního peptidu
- inhibitory zpětného vychytávání Noradrenalinu a Dopaminu- bupropion
- antiepileptikum topiramát
- deriváty capsaicinu, látky obsažené v pálivé paprice, která má termogenní vlastnosti
- specifické dopaminergní stimulatory
- blokátory dopaminergních 1 receptorů
- další antagonisté kanabinoidních CB1 receptorů (SR141716)
- analoga leptinu
- analoga růstového hormonu (Advanced Obezity Drug-AOD9604)
- derivát ciliárního neurotrofického faktoru (CNTF) axokin
- inhibitor syntézy MK C-75
- inhibitor karboxypeptidázy (MLN4760)
- G proteiny aktivující uvolňování tubby proteinu
- Látky bílkovinné povahy ovlivňující metabolismus tuků gAcrp 30(g adipocyte Complement Related Protein 30kDa) a Mahogany protein
- Famoxin- insulinový senzitivátor- významně snižuje hepatální výdej glukózy
- Inhibitor cytoplazmatické bílkoviny aP2, která v cytoplazmě váže a transportuje MK (BMS309403)

6.1.5 Metabolický syndrom- definice problému

Poslední definice metabolického syndromu podle Mezinárodní federace pro diabetes je následující:

Obezita centrálního typu (definována jako obvod pasu ≥ 94 cm u evropských mužů a ≥ 80 cm u evropských žen s etnickými odlišnostmi u národů mimo Evropu)

a přítomnost jakýchkoliv dalších dvou znaků z následujících 4:

1. Zvýšená hladina TAG(triacylglycerolu) $\geq 1,7$ mmol/l (150mg/dl) nebo specifická terapie pro tuto poruchu.
2. Snížený HDL- cholesterol $< 1,03$ mmol/l (40mg/dl) u mužů a $< 1,29$ mmol/l (50mg/dl) u žen nebo specifická terapie pro tuto poruchu.
3. Zvýšený krevní tlak: systolický ≥ 130 nebo diastolický ≥ 85 nebo léčba pro předchozí diagnózu hypertenze.
4. Zvýšená glykémie nalačno (FPG) $\geq 5,6$ mmol/l (100mg/dl) nebo předchozí diagnóza diabetu II typu.

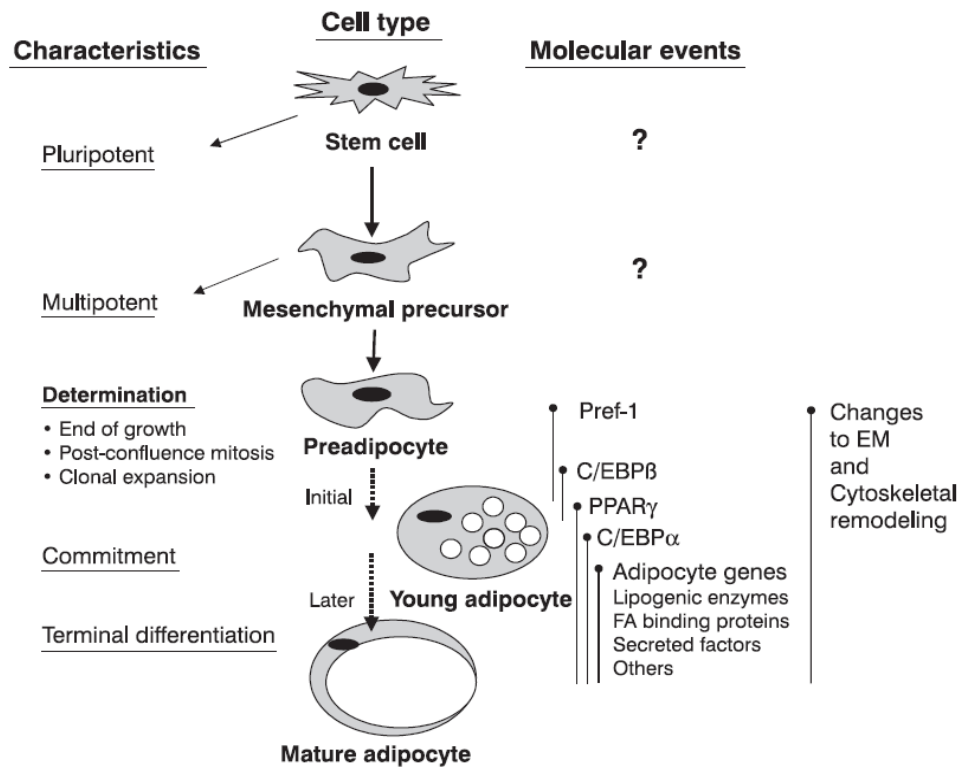
Pokud glykémie nalačno přesahuje 5,6 mmol/l je vřele doporučeno provést perorální glukózový toleranční test (oGTT), ale pro určení metabolického syndromu to není nutné. **(Graham et al. 2007)**

Nebezpečí metabolického syndromu tkví nejen ve zvýšení kardiovaskulárních chorob celkově (při nadváze více jak 20kg riziko ICHS stoupá až 6x) **(Svačina et al. 2001)**, ale hlavně v rozvoji DM II typu. Vztah faktorů metabolického syndromu a rizika vývoje DM II typu v následujících 10 letech nejvíce odráží dotazník FINDRISC dostupný na http://eurheartjsupp.oxfordjournals.org/content/9/suppl_C/C3/F5.expansion **(ESC guidelines, 2007)**. DM II typu pak sám vede ke zvýšené morbiditě a mortalitě (3x častější centrální mozkové příhody s 4x vyšší mortalitou, rozsáhlejší postižení koronárních tepen srdce aterosklerotickými pláty apod.; **Hainer V et al 2004**).

Současná farmakoterapie metabolického syndromu se skládá z terapie jednotlivých jeho součástí- antiobezitik, hypolipidemik (nejvíce statinů a fibrátů), terapie insulinoresistence- (nejvíce metformin a glitazony). Nedílnou součástí celkové terapie je i dietoterapie, psychoterapie a pohybová cvičení.

6.1.6 Adipocyty při obezitě a metabolickém syndromu

Během zvyšování váhy dochází k poslednímu kroku vývoje adipocytů (terminální diferenciaci)- přeměně malých adipocytů ve velké adipocyty s velkým množstvím TAG. Molekulárně biologický výzkum ukazuje, že se s diferenciací a stárnutím adipocytů snižuje exprese C/EBP α . Tato změna s věkem postihuje hlavně některé typy adipocytů- periepididymální, inguinalní a perirenální.



(Fonseca-Alaniz et al. 2007).

Během vývoje obezity a metabolického syndromu dochází nejen ke zvětšování adipocytů, ale i k rozdílné transkripci různých genů (Moraes et al. 2003). Je známo, že vznik metabolického syndromu je vázán na viscerální adipocyty na rozdíl od subkutánních (Poirier and Despres 2003). Ačkoliv jak subkutánní, tak viscerální adipocyty nesou s sebou určité metabolické riziko, jen viscerální adipocyty jsou ve vztahu s hlavními riziky vzniku metabolického syndromu a to i při přepočtu rizika na antropometrické ukazatele (Fox et al. 2007).

Mechanismus vazby viscerálního tuku na vznik metabolického syndromu se dá vysvětlit částečně i tím, že s vyšším poměrem obvodu pas/boky (waist/hip ratio), což znamená vyšší podíl viscerálního tuku v celkovém množství tuku, klesá výrazně hladina adiponectinu- jako markeru insulinosenzitivity (Gavrila et al. 2003). Nelze však vyloučit možnost, že adiponectin není původcem, nýbrž je markerem insulinosenzitivity.

Odlíšnosti viscerálních a podkožních adipocytů ukazuje následující tabulka:

Characteristics of visceral vs subcutaneous adipose tissue

	Visceral adipose tissue	Subcutaneous adipose tissue
Lipogenesis		
Basal rate of glucose uptake	++	+
Insulin-stimulated glucose uptake	++	+
Fatty acid and triacylglycerol uptake	++	+
Lipid synthesis	++	+
Lipolysis		
Basal rate of lipolysis	+	++
	Obesity ++	Obesity ++
ATGL	++	+
	Obesity ++	Obesity ++
HSL content	++	+
HSL activity	+	++
Catecholamine-induced lipolysis	+++	+
β -Adrenoceptor-dependent lipolysis	++++	+
α_2 -Adrenoceptor-dependent anti-lipolysis	+	++
Anti-lipolytic effect of insulin	+	+++
Adipocytokine secretion		
Adiponectin secretion	++	+
Leptin secretion	+	++++
TNF α secretion	+	+
Angiotensinogen	++	+
Cell development		
Proliferation in vitro	+	++
Differentiation in vitro	+	++
PPAR γ production	+	++
	Obesity ++	Obesity +

(upraveno a zkráceno podle Yang and Smith 2007)

Oběcně lze říci, že viscerální tuk produkuje mnohem více sekretorických proteinů než tuk podkožní (Nishida et al. 2007). V neposlední řadě se jako mechanismus vzniku metabolického syndromu uvádí vznik systémového zánětu, který v sobě skrývá jak podklad rozvoje insulinoresistence, tak podklad pro vznik dyslipidémie a aterosklerózy (Han et al. 2007).

6.1.7 Hepatocyty při obezitě a metabolickém syndromu

-při obezitě játra reagují komplexně na zvýšenou nabídku mastných kyselin z tuku a to následujícím způsobem:

1. stoupá glukoneogeneze, klesá glykogenolýza a zvyšuje se tak obsah glykogenu
2. zvyšuje se lipogeneze
3. zvyšuje se vyplavování glukózy a lipoproteinů (VLDL)
4. snižuje se vychytávání VLDL (pro nižší aktivitu LPL)
5. snižuje se vazba insulinu na hepatocyty a jeho degradace
6. je narušen metabolismus cholesterolu.

Všechny tyto změny akcentují rozvoj syndromu X- metabolického syndromu. Leptin, který je z hypertrofované tukové tkáně vyplavován zvýšenou měrou, zvyšuje oxidaci MK v hepatocytech a chrání tím játra před přílišnou akumulací TAG. Problémem však zůstává, že produkce leptinu je dominantní v subkutánním tuku, tedy do jater se ho dostává velmi málo pouze dolní dutou žilou. Vstřebávání látek z malé plochy kontaktu jater a dolní duté žíly je však minimální ve srovnání s v. portae (3:7). Podobně jako ve svalech, tak i v játrech leptin brání hromadění toxických metabolitů TAG a zabraňuje insulinové resistenci. Zároveň leptin aktivuje v hepatocyty glykogenolýzu a brzdí tak nadměrnou akumulaci jaterního glykogenu. Přesto i přes hyperleptinemii obézních lidí probíhá mobilizace jaterního glykogenu pomalu nespíše díky „leptinoresistenci“. Analogická situace byla popsána u obézních potkanů s defektním leptinovým receptorem- tato zvířata nedokáží mobilizovat veškeré zásoby glykogenu v játrech (**Hainer et al. 2004**).

Při vzniku metabolického syndromu jsou důležité aspekty jaterního metabolismu následující:

1. postavení jater v intermediálním metabolismu
2. specifická signalizace o příjmu glukózy játry, což není závislé na insulinu
3. existence intracelulárního senzoru koncentrace glukózy, který se nachází v hepatocytech a dalších buňkách.

Portální žilou se do jater dostávají dvě skupiny signálních látek:

1/ MK v portálním oběhu zvyšují hladinu noradrenalinu a kortikoidů, což prohlubuje insulinovou resistenci.

2/ Glukóza je vychytávána játry o 70% více, než ze systémové cirkulace. Portální infuze glukózy vyvolává hypoglykémii a zvyšuje utilizaci glukózy v srdci, kosterním svalu a hnědé tukové tkáni, bez toho, aby se měnila hladina insulinu v krvi. Efekt je závislý na glukózovém přenašeči GLUT2 v játrech a je jej možné zablokovat somatostatinem. Tímto způsobem játra signalizují organismu zprávu o množství cukru absorbovaném z potravy kosternímu svalu a dalším tkáním procesem nezávislým na insulinu. Mechanismus výše uvedeného děje je zatím nejasný.

Fruktóza-6-fosfát, intermediální produkt glykolýzy, může být degradován za vzniku ATP, přeměněn zpět na glukózu nebo použit pro tvorbu hexosaminů podle aktuálního stavu ATP v hepatocyty.

Hexosaminy, na které se přeměňuje 1-3% glukózy přijaté potravou, ovlivňují lokálně glycidový metabolismus- snižují glykogenolýzu, vyplavování glukózy do krve a podporují

syntézu glykogenu v buňkách. Syntéza hexosaminů simuluje efekt zvýšené hladiny glukózy v buňce a slouží na úrovni jednotlivých buněk jako senzor sytosti. Zvýšená tvorba hexosaminů by také mohla přispívat k toxickému efektu MK a TAG akumulovaných v játrech a ve svalu a vysvětlovat toxicitu glukózy (např. v β buňkách pankreatu). Akumulace MK v buňkách totiž inhibuje glykolýzu a zvyšuje tak nabídku fruktózy-6-P pro syntézu hexosaminů. Příkladem negativního působení hexosaminů jsou transgenní myši s nadprodukcí hexosaminu v játrech, kde u starších myší se objevuje obezita, glukózová intolerance a insulinová resistance. Tento experimentální model pak ilustruje vliv stárnutí na rozvoj metabolického syndromu, podobně jako je tomu u lidských pacientů (**Hainer et al. 2004**).

6.1.8 Současné ovlivnění jaterního metabolismu dietou a farmaky

Mastné kyseliny přijímané potravou silně ovlivňují metabolismus lipidů v játrech - prostřednictvím transkripčních faktorů PPAR α (stimulace oxidace MK v mitochondriích a peroxisomech) a inhibicí syntézy MK. Nejvýraznější efekt mají omega-3 MK. Prostřednictvím vazby na PPAR α působí léčiva ze skupiny fibrátů- indukují aktivitu LPL a zvyšují příjem VLDL hepatocytem. Fibráty snižují produkci VLDL v játrech a aktivují syntézu HDL tím, že snižují syntézu apolipoproteinů, snižují množství malých denzních LDL částic. Také aktivují transport MK do mitochondrií a stimulují oxidaci MK v játrech a ve svalech, tlumí zánětlivou reakci cévní stěny při ateroskleróze vlivem na endoteliální buňky, monocyty a makrofágy. Další široce používanou skupinou léčiv s vlivem na jaterní buňky jsou biguanidy. Mechanismus působení jejich jedinného zástupce metforminu je nejasný. Částečně hraje roli inhibice respiračního řetězce a tvorba ATP v mitochondriích, což má za následek aktivaci AMPK, inhibici lipogeneze, glukoneogenezi a vyplavování glukózy z jater, zatímco utilizace glukózy v periférii stoupá. Častým nežádoucím účinkem léčby metforminem je acidóza z hromadění kyseliny mléčné. Produkci cholesterolu v játrech brzdí statiny, které působí jako inhibitory 3-OH-3-MethylglutarylCoA reduktázy. Jako hypolipidemikum je užíván také niacin, který brzdí syntézu VLDL, cholesterolu a TAG v játrech, pouze ve vyšších dávkách působí niacin i na další tkáň a potlačuje lipolýzu v adipocytech.

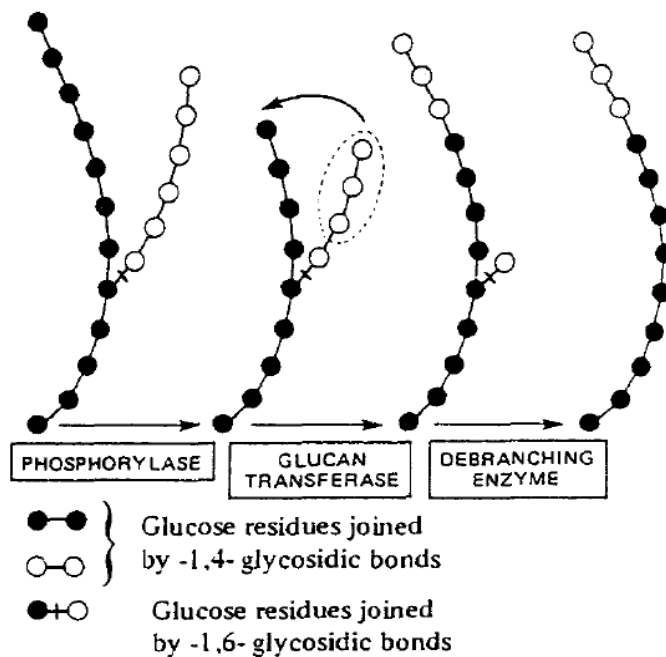
6.2 Glykogenolýza

Játra a ledviny jsou jediné dva orgány, jejichž tkáň obsahuje dostatečné množství enzymu glukóza-6-fosfatázy. Jsou to jediné dva orgány, které mohou uvolňovat glukózu do krevního oběhu z glykogenolýzy. V zásadě jsou hlavním zdrojem glukózy játra, což neplatí jen ve dvou případech:

- 1) za dlouhodobého hladovění, kdy ledviny mohou zajišťovat asi 10% uvolněné glukózy do oběhu (Owen et al. 1969) a
- 2) po jídle nebo po podání umělé výživy intravenózně.

Játra zajišťují glukózu pro krevní oběh dvěma způsoby -A/glykogenolýzou, tedy štěpením glykogenu a B/ glukoneogenezí, tvorbou molekul glukózy z jiného substrátu. Glykogenolýza zajišťuje 50-70% celkové glukózy tvořené v játrech.

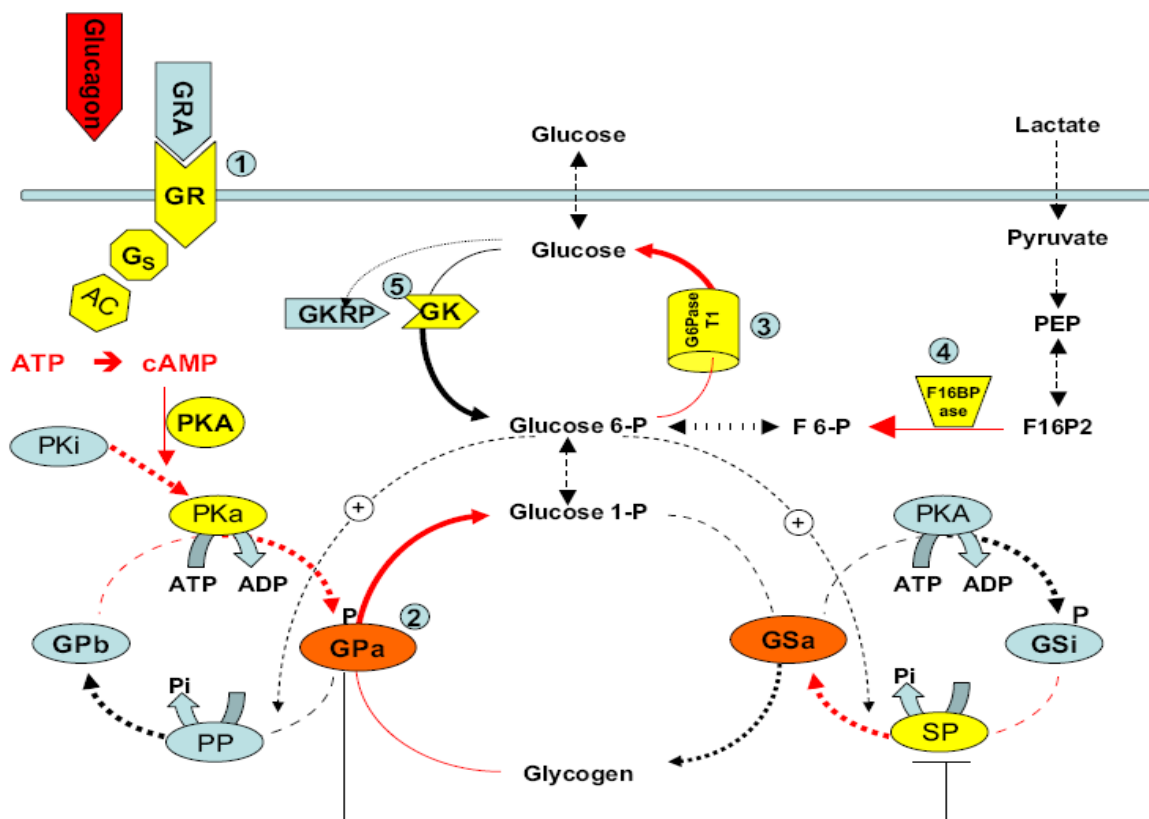
Štěpení glykogenu se děje jako součet aktivity několika enzymů: fosforylázy, která katalyzuje



hydrolyzu 1,4 glykosidických vazeb; glucan-transferázy, které přenáší poslední 3 glycosylové jednotky na další sousední řetězec a tím umožňuje funkci fosforylázy a odvětovacího enzymu, který hydrolyzuje 1,6 glykosidické větve glykogenu a taktéž tím umožňuje funkci fosforylázy. Metabolismus glykogenu je především regulován aktivitou glykogen syntházy a fosforylázy, které

jsou zas regulovány množstvím substrátu a některými hormony.

Fosforyláza a (GP_a) je aktivována díky fosforylaci fosforylázy b (GP_b) pomocí aktivní fosforyláza kinázy (P_{ka}). Ta je naopak aktivována prostřednictvím cAMP dependentní protein kinázy (PKA) z PK_i inaktivní na P_{ka} aktivní. Naopak defosforylace (fosfatase) fosforylázy a (GP_a) pomocí hormon-senzitivní protein fosfatázy (PP) mění aktivní fosforylázu a (GP_a) na inaktivní fosforylázu b (GP_b) (zobrazeno v levé části níže uvedeného schématu).



Aktivní glykogen syntáza (GSa) není ničím jiným než defosforylovaná forma glykogen syntázy (GSi), což se děje pomocí glykogen syntázy fosfatázy (SP), která je však významně tlumena pomocí GPa (pravá část schématu). Desaktivace glykogen syntázy z GSa na GSi je zas dílem cAMP-dependentní protein kinázy (PKA). Tak hormony, jako je glukagon a adrenalin, které vedou ke zvýšení intrahepatální hladiny cAMP, aktivují fosforylázu, inaktivují glykogen syntázu a stimulují štěpení glykogenu. Insulin má opačný efekt a to jak na hladinu jaterní cAMP, tak na štěpení glykogenu. Glukóza-1-fosfát vzniklý z glykogenolýzy se mění na glukóza-6-fosfát a dále na glukózu a to prostřednictvím glukóza-6-fosfátázy (G6Pázy). Glukoneogeneze z laktátu a dalších 3-uhlíkatých prekurzorů je alternativním zdrojem glukóza-6-fosfátu. Fruktóza-1,6-bisfosfatáza (F16BPase) katalyzuje předposlední reakci glukoneogeneze na glukóza-6-fosfát. Při vysokých hladinách glukózy tato aktivuje glukokinázu (GK) a to jejím odštěpením z inhibičního proteinu (GKRIP). GK katalyzuje pak fosforylaci glukózy na glukóza-6-fosfát. Ta je již prekurzor pro syntézu glykogenu a aktivuje glykogen syntázu a zároveň inaktivuje GPa přes defosforylaci (neboli fosfataci) GSi na GSa a GPa na GPb. Glukóza samotná má pak přímý inhibiční efekt na fosforylázu a (GPa) (Agius 2007).

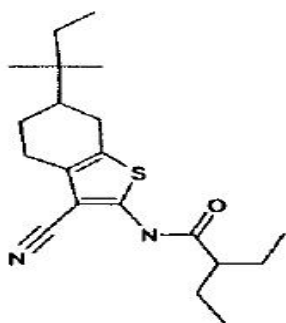
Hladina fosforylázy a (GPa) je považována za hlavní faktor kontrolující metabolismus glykogenu neboť inhibuje glykogen syntáza fosfatázu, tedy enzym aktivující glykogen syntázu (**Gerich 1993**).

Dalším klíčovým enzymem je fruktóza-1,6-bisfosfatáza (F16BPase), která katalyzuje defosforylaci (fosfataci) fruktóza 1,6-bisfosfátu (F16P2) na fruktóza 6-fosfát. Enzym je inhibován fruktóza 2,6-bisfosfátem, který také aktivuje fosfofruktokinázu, enzym katalyzující zpětnou reakci (není již na obrázku). Fruktóza 2,6-bisfosfát tak kontroluje jak glykolýzu, tak glukoneogenezi. Vznik fruktóza 2,6-bisfosfátu je inhibován jak cAMP-dependentní proteinkinázou (PKA), tak stimulován glukagonem a adrenalinem. Intrahepatický pokles fruktóza 2,6-bisfosfátu inhibuje glykolýzu a zvyšuje glukoneogenezi. Insulin má pak opačný efekt. Hladina fruktóza 2,6-bisfosfátu stoupá po jídle a naopak je snížena u experimentálních modelů diabetu a při hladovění (**Pilkis et al. 1990**).

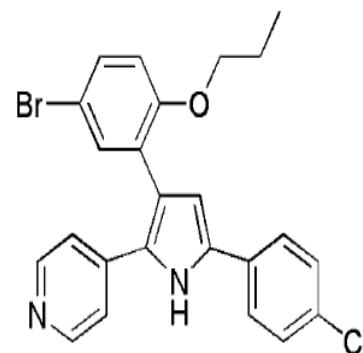
6.2.1 Perspektivy ovlivnění jaterní glykogenolýzy farmaky

Díky myšlence ovlivňování glykogenolýzy jsou vytipovány cíle (ve výše uvedeném diagramu vyznačeny čísly) farmakologické intervence v jaterní buňce následovně:

(1) **receptor pro glukagon (GR)** – výzkum blokátorů receptoru pro glukagon trvá přes 25



let. Ze tří hlavních skupin zabývajících se touto problematikou lze jmenovat výzkumnou skupinu spojenou s farmaceutickou firmou Merck s nálezem kompetitivního Cpd1 antagonisty receptoru pro glukagon s $IC_{50} = 181 \text{ nM}$;



vzorec vlevo (**Qureshi et al. 2004**) a kompetitivního antagonistu s vyšší účinností $IC_{50} = 14 \text{ nM}$ -obrázek vpravo (**Cohen et al. 2006**).

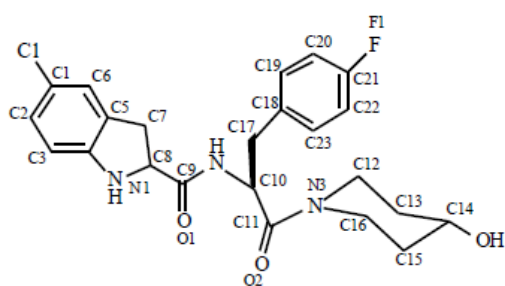
Dále se hledáním inhibitorů glukagonu na receptoru zabývala skupina kolem firmy Novo-Nordisk, kde v pokusech na psech, došlo k inhibici vazby glukagonu látkou NNC 25-0926 s $IC_{50} = 75 \text{ nM}$ (**Riviera et al. 2007**). A poslední jmenovanou je skupina kolem firmy Bayer s látkou BAY-279955 s $IC_{50} = 110 \text{ nM}$ (**Petersen and Sullivan 2001**).

Blokáda receptoru pro glukagon se dle provedených pokusů nezdá být ohrožující z důvodu vyvolání závažné hypoglykemie, protože s blokádou receptoru pro glukagon současně dochází k upregulaci adrenergních receptorů a následné glykogenolýze touto cestou.

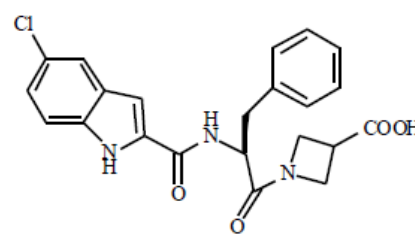
(2) glykogen fosforyláza (GPa)

Zatímco aktivátorem glykogen fosforylázy a (GPa) je katecholaminová signalizace (cAMP s PKA) a dále allostericky AMP, tak za nejnadějnější skupinu blokátoru GPa jsou nyní považovány látky vyvíjené v laboratořích firmy Pfizer Global Research and Development, které vstoupily do II fáze klinických zkoušek; indol-2-karboxamidy:

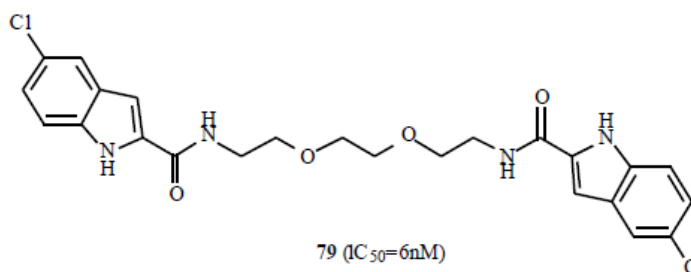
Indole-2-carboxamides



77 ($IC_{50}=178nM$)



78 ($IC_{50}=45nM$)



79 ($IC_{50}=6nM$)

Pokud by dostatečně blokovaly glykogen fosforylázu (látka 79 má $IC_{50}=6nM$) a tím bránily glykogenolýze, byly by přinejmenším vhodným doplňkem do arsenálu antidiabetik (**Oiokonomas 2002**). Podle posledních výsledků jejich efekt však klesá již po 4 týdnech podávání nejspíše zvýšenou aktivací glykogenolýzy adrenergní cestou.

(3) **glukoza-6-fosfatáza (G6Pase)** zatímco GPa je regulována hlavně allostericky a substrátem, regulace G-6-P probíhá nejvíce na úrovni její exprese nebo blokádou translokátoru, který zásobuje G6Pázu nacházející se v endoplazmatickém retikulu glukozou-6-fosfátem přenášeným z cytoplazmy. Expres G6Pase je snížena jak AMPK, tak blokádou respiračního komplexu I, ale jak se ukazuje, není toto jedinná cesta k její blokádě.

Metformin, který aktivuje obě výše uvedené signální dráhy, je schopen zablokovat expresi G6Pase i v buňkách s defektní AMPK signalizací a rotenon necitlivou NADH-quinone oxidoreduktázou 1 vnesenou do buněk z respiračního komplexu kvasinek (**Ota et al. 2009**). V hledání blokátorů G6Pase jsou dva hlavní problémy: 1. silně účinný blokátor by vedl blokádou obou drah jak glykogenolýzy, tak glukoneogeneze k těžké hypoglykémii (**Agius 2007**) a 2. nízké účinný blokátor vede při krátkodobém i dlouhodobém užívání k hromadění glykogenu a steatotickému poškození jater z indukce lipogenních enzymů (**Bandsma et al. 2001**).

(4) **fruktóza 1,6-bisfosfatáza** (F16BPase)- antagonisté tohoto enzymu zajišťujícího glukogenogenezi jsou většinou založeny na kompetici s AMP na inhibičním allosterickém místě enzymu a nikoliv na katalytickém místě pro Fruktózu-1,6-bisfosfát. Tak se postupně vyvinuly látky s $IC_{50} = 8,1 \mu M$ srovnatelné s $IC_{50} AMP = 9,8 \mu M$ (**Heng et al. 2010**). Další výzkumné týmy však získaly látku MB-06322 s ještě větším účinkem ($IC_{50} = 16 nM$; **Erion et al. 2005**).

(5) **glukokináza** (GK) s jejím inhibičním proteinem (GKRP). K antidiabetickému efektu je třeba nalézt aktivátory a nikoliv blokátory GK, které by vedly ke glykogenezi na úkor intravaskulární hyperglykémie. Glukokináza je uvolňována z jádra z vazby na GKRP při postprandiálním vzestupu glykémie a fruktoza-1-fosfátu. Enzym existuje ve variantě zavřené s vyšší afinitou pro glukózu a otevřené s nižší aktivitou. Byly nalezeny nízkomolekulární látky, které dokážou udržet GK ve výše afinitní uzavřené formě. Problémem je, že aby GK zůstala stále velmi citlivým regulátorem syntézy glykogenu reagujícím na kolísání glukózy, tyto aktivátory by pokud možno neměly měnit ani fyziologicky sigmoidální tvar křivky afinity ke glukóze ani rychlost přeměny glukózy na glukóza-6-fosfát. Na objevení vhodných aktivátorů GK pracují firmy Hoffman La Roche, Astra-Zeneca, Banyu Pharmaceuticals, Eli Lilly, OSI Prosidion, NovoNordisk, Sanofi-Aventis a Novartis. To odráží význam, jaký přikládají firmy potenciálním agonistům GK (**Agius L 2007**).

Předpokládaným místem působení adrenergních agonistů na glykogenolýzu je první krok vedoucí k zvýšení cAMP (společná cesta se signalizací od receptoru pro glukagon). Vliv NO na glykogenolýzu je nejspíše komplexní a není zatím zcela jasný. Byl prokázán vliv NO na hladinu AMP, což může následně aktivovat AMPK a dále ovlivnit fosforylační děje, stejně

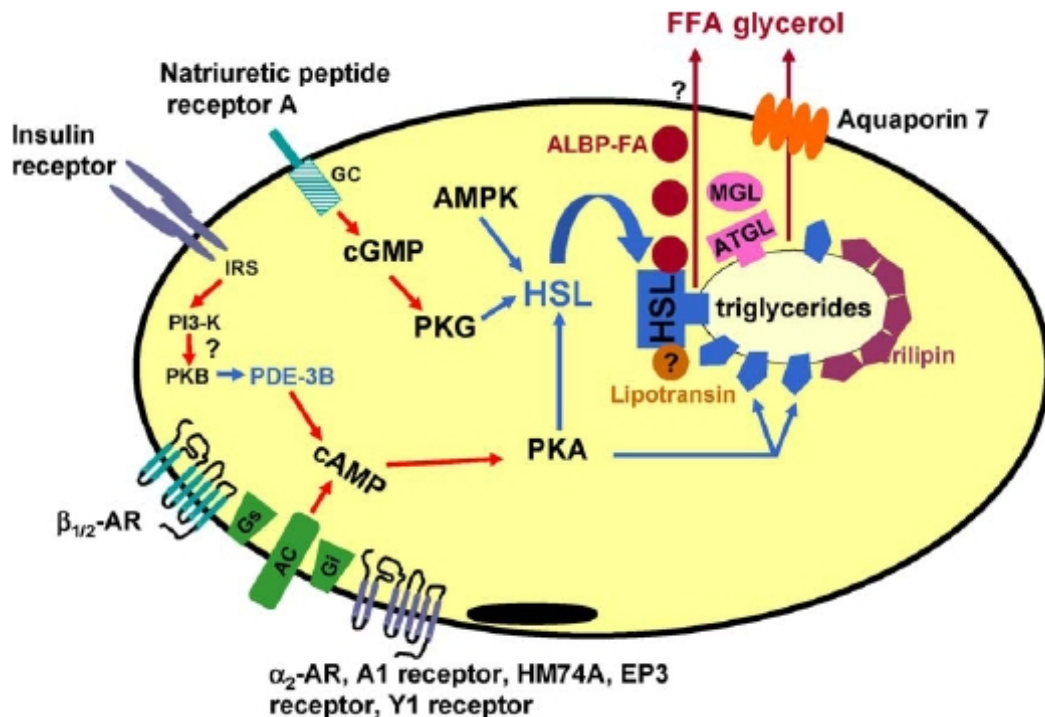
jako přes AMP přímo alostericky ovlivnit enzymy glykogenolýzy (GPa a G6Pase) a glukoneogeneze (F16BPase).

V naší práci jsme sice nepoužívali blokátory jednotlivých enzymů glykogenolýzy a glukoneogeneze, ale použili jsme aktivační molekuly- adrenergní agonisty a jako referenční látku glukagon a dále pro blokádu adrenergních účinků na glykogenolýzu jsme použili α (prazocin) a β (propranolol) adrenergní blokátory- viz publikace 3 a 4.

6.3 Lipolýza

Hormon senzitivní lipáza

Lipolýza je kontrolována různými hormony a cytokiny adipocytů. Lipolytické hormony jako jsou katecholaminy a ACTH stimulují cAMP-dependentní protein kinázu (PKA), která následně fosforyluje hormon-senzitivní lipázu (HSL; **Stralfors et al 1987, Holm et al. 1988**) a perilipin (**Greenberg et al. 1991**) adipocytů. Po lipolytické stimulaci se HSL přesouvá z cytosolu do tukových kapének (**Egan et al. 1992, Clifford et al. 2000, Brasaemle et al. 2000**) a naopak perilipin se přesouvá z tukových kapének do cytosolu (**Clifford et al. 2000, Souza et al. 1998**). HSL katalyzuje hydrolýzu tri- a diacylglycerolů a to jak v adipocytech, tak v srdci, příčně pruhovaných svalech a pankreatických β -buňkách (**Yeaman 1990, Holm et al. 2000**). Takto vznikají monoacylglyceroly, které jsou následně hydrolyzovány monoglycerid lipázou (**Karlsson et al. 1997**).



Na diagramu je popsán signalizační přenos z katecholaminů přes adrenoreceptor (AR), natriuretických peptidů přes receptor typu A, insulinu a dalších lipolytických agens (prostaglandinů E2 přes EP3 receptory, adenosinu přes A1 receptory, nikotinové kyseliny přes HM74A a NPY/PYY přes receptory Y1). Proteiny fosforylované protein kinázami (PKA, protein kinázou A; PKB, protein kinázou B; PKG, protein kinázou G; AMPK-AMP-aktivovanou protein kinázou) jsou zobrazeny modře. Fosforylace hormon-senzitivní lipázy (HSL) umožňuje její translokaci z cytosolu na povrch tukových kapének. Fosforylace perilipinu pak umožňuje narušení povrchu tukové kapénky, což dále umožní funkci HSL a tedy lipolýzu. Přiblížení adipocyte lipid binding proteinu (ALBP) k HSL umožňuje uvolnění mastných kyselin (FA) vzniklých hydrolyzou triglyceridů. Otazníky označují signální dráhy, které jsou stále jen hypotetické nebo jejich souvislost s lipolýzou není zcela objasněna. (Langin et al. 2006).

Jiné lipázy

HSL hydrolyzuje navíc cholesterol-estery (CE) jak v testikulární tkáni, ovariích, nadledvinách, tak v makrofázích. Na rozdíl od lipolytických hormonů, cytokiny jako je TNF- α stimulují lipolýzu pomaleji (Kawakami et al. 1987, Hauner et al.1995). TNF- α snižuje kromě Gi proteinu také perilipin (Souza et al.1998), což obojí vede k aktivaci lipolýzy. Všechny tyto nálezy podporují hypotézu, že lipolýza je primárně zajištěna nejen HSL.

Troglitazon navíc kompletně suprimuje TNF- α –stimulovanou lipolýzu nezávisle na přítomnosti HSL, což znamená, že troglitazon inhibuje jak na HSL závislou, tak na HSL nezávislou lipolýzu TG lipázou. TNF- α je nejspíše částečně zodpovědný za insulinovou resistenci a porušenou glukozovou toleranci (**Hotamisligil et al. 1993**). Thiazolidindiony snižují insulinovou resistenci mimo jiné snížením exprese TNF- α (**Hofmann et al.1994**) stejně jako inhibují efekt TNF- α na insulinovou signalizaci (**Peraldi et al.1997**). V adipocytech, TNF- α způsobuje snížení aktivity lipoproteinové lipázy a stimulaci lipolýzy jinou cestou (**Kawakami et al. 1987**) a tuto jeho vlastnost je možné blokovat glitazony (**Souza et al.1998**). Stimulace lipolýzy probíhá nejspíše přes intracelulární TG lipázu, která je odlišná od HSL lipázy a specificky hydrolyzuje triacylglyceroly. Její aktivace, tak jako u HSL, je podle všeho spojena s její translokací z cytosolu do tukové kapénky. TNF- α stimuluje lipolýzu i u HSL $-/-$ MEF adipocytů (**Okazaki et al. 2002**). Lipáza ovlivňovaná TNF α je některými autory nazývána adipose triglyceride lipase (ATGL) (**Zimmermann et al.2004, Jenkins et al. 2004, Villena et al. 2004**). Při použití protilátek proti ATGL, někteří autoři zjistili, že ATGL je zodpovědná za 75% acylhydrolázové aktivity v cytosolu v tuku myši s defektní HSL (**Zimmermann et al.2004**). Vliv ATGL na lipolýzu potvrzují i další autoři (**Langin et al.2005**). I když jak ATGL tak HSL jsou schopné hydrolyzy triglyceridů in vitro (**Zimmermann et al.2004, Fredrikson et al.1981**), tak pouze HSL má schopnost hydrolyzy diglyceridů a monoglyceridů (**Haemmerle et al.2002**). Ke kompletní lipolýze monoglyceridů nezávislé na hormonech in vivo je nutný příspěvek monoglyceridové lipázy (**Fredrikson et al. 1986**). Triglyceridy se hydrolyzují pomaleji než další stupně hydrolyzy (di a monoglyceridy), což znamená, že první stupeň lipolýzy určuje její celkovou rychlost (**Belfrage et al. 1984**).

6.3.1 Látky vyvolávající/ tlumící periferní lipolýzu

Regulace lipolýzy je uskutečňována několika signálními drahami. Jako hlavní lipolytika působí:

A/ katecholaminy(skrze lipolytické β - receptory a antilipolytické α_2 - receptory).

B/ natriuretické peptidy- efekt na lipolýzu byl objeven v roce 2000 (**Sengenés et al.2000**).

Tato dráha je specifická pro primáty a jejich tukové buňky (**Sengenés et al.2002**). Druhým

poslem signalizace natriuretického peptidu je na receptor navazující tvorba cGMP guanylát cyklázou a aktivace proteinkinázy G , která fosforyluje a aktivuje hormon- senzitivní lipázu **(Sengen et al.2003)**.

Mezi další lipolytické látky patří růstový hormon **(Gravholt 1999)** a TNF- α **(Hauner et al. 1995)** fungující částečně asi prostřednictvím snížení hladiny perilipinu na povrchu tukových kapének **(Souza et al.1998)**. Lipolýzu taktéž podporují - odblokovávají látky snižující Gi protein **(Gasic et al. 1999)**. Předpokládá se také, že TNF α , který funguje přes druhého posla- C2-ceramid, snižuje aktivitu fosfodiesterázy 3B. Tento enzym katalyzuje degradaci cAMP a její blokádu je tedy TNF α schopen stimulovat lipolýzu **(Rahn Landstrom et al.2000, Mei et al. 2002)**. V lidských tukových buňkách TNF α aktivuje tři savčí mitogen activated protein kinázy a to v různých časových odstupech a přímo úměrně koncentraci. TNF α indukovaná lipolýza je zprostředkována p44/42 a Jun kinázou, ale ne p38 kinázou **(Ryden et al.2002)**. Je zajímavé, že mnoho lipolyticky aktivních peptidů popsanych u hlodavců (adrenokortikotropní hormon, alpha-melanocyte stimulating hormone, lipotropin a další) nefunguje u člověka. Nedlouho po narození má lipolytickou aktivitu thyrotropin nebo také thyroid-stimulating hormon ve svých fyziologických hodnotách hladin, ale postupně klesá v dalším dětském období **(Marcus et al.1988)**. Jako hormon stimulující lipolýzu u člověka byl popsán i parathormon **(Sinha et al.1976)**. Glukagon a glucagon-like peptide-1 se nejspíše ve fyziologických hladinách jako lipolytické působky neuplatňují, zatímco určitý efekt by mohl mít hypofyzární adenylát cykláza-aktivační polypeptid a vasoaktivní intestinální peptid (VIP) **(Akesson et al. 2003, 2005)**. Tyto molekuly účinkují skrze Gs-protein vázaný receptor VPAC1. Ten váže jak VIP, tak adenylátcykláza aktivační polypeptid stejnou měrou. Dodnes nevíme, zda tento neuropeptid a hormon fungují i v lidských adipocytech. Nádory vyvolávající kachexii produkují lipid-mobilizační faktor, který také stimuluje lipolýzu. Jako možná molekula s tímto účinkem se ukazuje Zinc-alpha2-glycoprotein. Jeho produkce u některých lidských maligních tumorů je vysoká a ukazuje se, že je produkován i vlastními adipocyty **(Bing C et al. 2004)**. Nakonec i oxid dusnatý a odvozené radikály mohou být výraznými regulátory lipolýzy jak u hlodavců, tak v lidských adipocytech **(Gaudiot et al. 1998, Andersson et al. 1999)**. Význam oxidu dusnatého (NO) se zdá být zatím komplexní a jeho význam u lipolýzy není zcela objasněn **(Langin 2006)**.

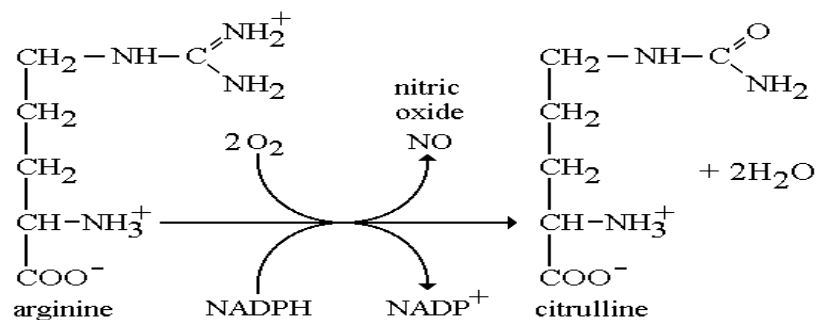
6.4 Oxid dusnatý (NO)

NO jako volný radikálový plyn je velmi nestabilní molekula. V přírodě vzniká při výboji blesku v atmosféře během bouře. V organismu však vzniká během enzymatické reakce mezi argininem a molekulárním kyslíkem.

Mechanismus účinku: prvním objeveným mechanismem účinku byla relaxace cév, kdy byla zjištěna shoda mezi původně popsaným endotel derived relaxing factor a NO. Nezávisle na tom bylo zjištěno, že NO je endogenní aktivátor rozpustné guanylátacyklázy, tvořící cGMP, které pak působí jako sekundární messenger v mnoha buňkách včetně nervů, hladkých svalů, monocytů a krevních destiček.

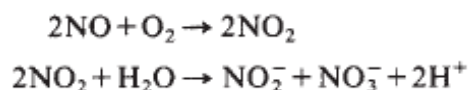
6.4.1 Syntéza NO

Zatímco v atmosféře je NO produkce spíše vzácností, byla v organismu nalezena biochemická syntéza založená na arginin závislé přeměně na citrulin. Jako kofaktor v reakci se objevuje NADPH.



6.4.2 Rozklad a přenos NO

Oxid dusnatý reaguje s kyslíkem za tvorby N₂O₄, který se dále spojuje s vodou za vzniku směsi dusitanových a dusičnanových anionů. Dusitanové aniony jsou oxidovány na dusičnanové oxyhemoglobinem. Uvedené reakce vedou ke vzniku různých oxidů dusíku.



Oxid dusnatý je inaktivován hemem a volným radikálem -superoxidem. Zhášeci- scavengery superoxidu, jako například superoxid dismutáza, chrání NO, zvyšují intenzitu jeho účinku a prodlužují jeho trvání. Naopak interakce oxidu dusnatého se superoxidem vede k tvorbě peroxynitritu a následnému poškození tkání. Účinek peroxynitritu je regulován obsahem glutathionu v buňce. Za fyziologických podmínek reaguje glutathion s NO za vzniku S-

nitrosoglutathionu, mnohem stabilnější formy NO. Nitrosoglutathion může sloužit jako přenašeč NO s dlouhodobou životností (**Lincová et Farghali 2005**).

6.4.3 Konstitutivní a indukibilní NO syntázy

Syntázy oxidu dusnatého (NOS; EC 1.14.13.39) je skupina enzymů, které katalyzují tvorbu oxidu dusnatého (NO) z L-argininu, O₂ a NADPH přes tvorbu citrulinu a NADP⁺. Rodina těchto enzymů se skládá ze dvou kalcium-calmodulin-dependentních, konstitutivních isoform, neuronální NOS (nNOS, NOS-I) a endoteliální NOS (eNOS, NOS-III), a kalcium-independentní, indukibilní NOS (iNOS, NOS-II) (**Knowles and Moncada 1994; Alderton et al. 2001**).

Nomenklatura	Endoteliální NOS	Inducibilní NOS	Neuronální NOS
Doporučené zkratky	Enos	iNOS	nNOS
Další jména	NOSIII, NOS-3, ecNOS	NOS II, NOS-2	NOS I, NOS-1, bNOS, Ca ²⁺ /CaM
Selektivní inhibitory	-	1400W, 2- amino-4- methylpyridin(7,4),PIBTU (7,3), aminoguanidin	3-Br-7NI, 7 NI
Gen/Chromosom	NOS3/7q36	NOS2/17q11,2-12	NOS1/12q24.2-24.3 1
Lokalizace	Na membráně	V cytosolu	V cytosolu

Aktivitu NO syntázy (NOS) lze nalézt jak v cytosolové, tak membránové frakci adipocytárních homogenátů u kontrolních potkanů. Po podání LPS se její aktivita zvyšuje asi 10x a to v obou frakcích, není ovlivněna předléčením (předchozím podáním) dexamethazonem, je jen částečně závislá na hladině kalcia a calmodulinu. Tato aktivita NOS v homogenátu a u izolovaných adipocytů je prakticky shodná. Pomocí Western blotu lze ověřit, že část isoformy eNOS se nachází hlavně v membránové frakci, kdežto isoforma iNOS jak v rozpustné, tak v membránové frakci. Po LPS se imunitně aktivní iNOS výrazně zvyšuje, což vede k myšlence, že tuková tkáň hraje významnou roli při produkci NO během endotoxinového šoku (**Ribiere C et al. 1996**).

Regulace jednotlivých NOS probíhá v mnoha stupních a to tak, že u eNOS se zdá rozhodující deaktivace fosforylací Thr-495 a defosforylací Ser-1177 například pomocí PKC. Aktivita enzymu naopak stoupá po PKA zprostředkované fosforylací Ser-1177 s defosforylací

Thr-495. Fosforylační regulační místa eNOS jsou citlivá i pro fosfatázy PP1 a PP2A a to tak, že PP1 defosforyluje Thr-495 a tím eNOS aktivuje, kdežto PP2A defosforyluje Ser-1177 a tím eNOS deaktivuje (**Korkmaz et al. 2007, Mehebi et al. 2005**).

Aktivace a deaktivace iNOS pomocí fosforylace nebo defosforylace iNOS regulačních míst zatím nebyla jednoznačně prokázána (i když někteří autoři připouštějí i tuto možnost- **Pan et al. 1996**) a za hlavní regulaci iNOS se dosud považuje zvýšení nebo snížení její transkripce.

6.4.4 NO, obezita a metabolický syndrom

Přehled vzájemného vlivu NO, obezity a metabolického syndromu byl popsán v naší publikaci (**viz příloha publikace č. 2**) a přednesen v rámci prezentace Farmakologických dní 2009 v Bratislavě (**viz abstrakt**).

NO a obezita

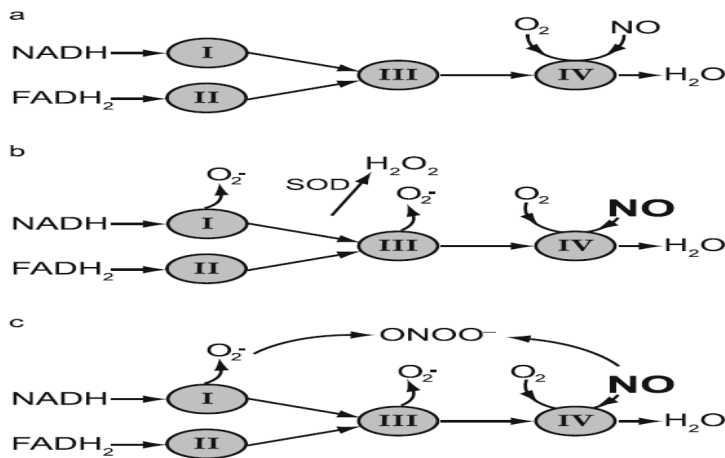
Mnoho výzkumných týmů předpokládá, že NO hraje významnou roli v regulaci energetické rovnováhy i morfologii vlastních adipocytů.

Vliv NO na morfologii adipocytů a obsahu tuku v těle- podání nespecifického inhibitoru NO syntázy- N-nitro-L-arginine-methyl esteru (L-NAME) vede k poklesu váhy a snižuje příjem potravy u myši (**Morley and Flood 1994**). Tento efekt je vyšší u myši na tučné dietě. Tam dochází i ke snížení velikosti adipocytů po L-NAME stejně jako snížení akumulace TAG v adipocytu. V souvislosti s tím L-NAME blokuje efekt vysokotučné diety na obsah TAG v játrech, zvyšuje glukozovou toleranci a in vivo i insulinovou senzitivitu (**Tsuchiya et al. 2007**).

Vliv NO na mitochondrie a buněčnou respiraci- někteří autoři zjistili, že NO vede k zvýšení mitochondriální biogeneze v hnědých tukových buňkách a to zprostředkovaně přes aktivaci cGMP. Lze tedy předpokládat, že množství mitochondrií se zvyšuje, i když jejich oxidační schopnost je nízká a toto všechno vede ke zvýšení spotřeby potravy in vivo (**Nisoli et al. 2007**). V jiných publikacích lze nalézt u eNOS knock-outovaných myši nižší počet mitochondrií v hnědé tukové tkáni (BAT). Nalézáme zde i defektní výdej energie, zvýšení hmotnosti, insulinovou resistenci a hypertenzi (**Bossy-Wetzel and Lipton 2003**).

Vliv NO na buněčnou respiraci a vnik peroxynitritu. Tvorba NO v mitochondrii pomocí mitochondriální syntázy redukuje vnitřní dýchání a tím i spotřebu kyslíku (**Giulivi et al. 2006**). Toto se děje inhibicí mitochondriální respirace skrze přímou vazbu NO na cytochrom

C oxidázu (cGMP-independentní) (Cleeter et al. 1994). Mechanismus je popsán v publikacích prof. Moncada:



a) Oxid dusnatý (NO) soutěží s kyslíkem na vazebném místě pro kyslík na cytochrome c oxidaze. To se děje za normálních podmínek

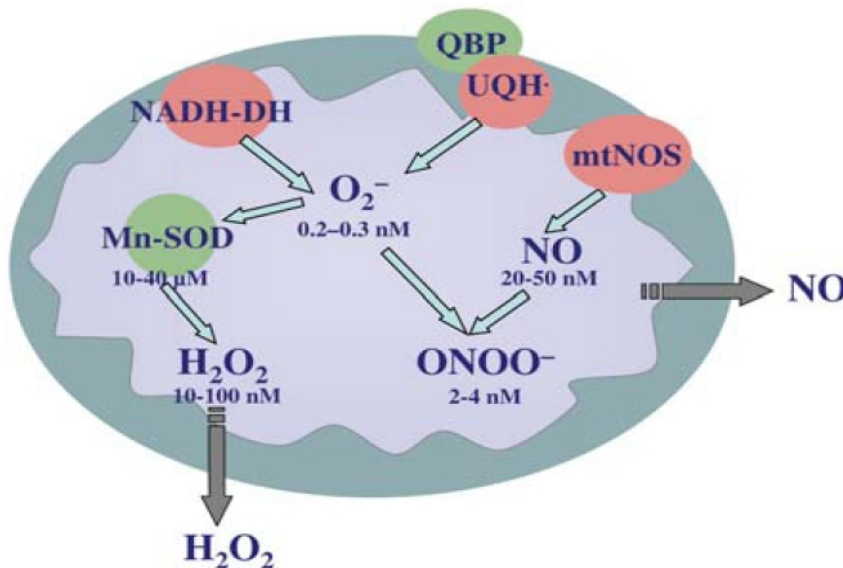
b) rovnováha je posunuta ve prospěch NO, NO inhibuje cytochrome c oxidázu, vede

k redukci elektronového přenosu. Tím je umožněn vznik superoxidových aniontů (O_2^-) a ty se dále přeměňují v peroxid vodíku (H_2O_2) pomocí superoxid dismutázy (SOD). To slouží i jako obrana buňky. Asi 0,5% O_2 se spotřebuje na H_2O_2

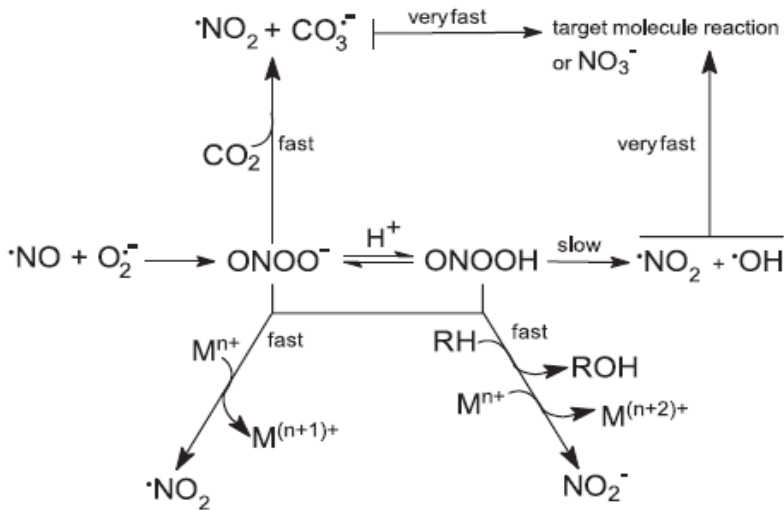
c) dlouhodobá produkce O_2^- radikálů spolu s pokračující tvorbou NO vede k tvorbě peroxynitritu ($ONOO^-$) a smrti buňky (Moncada and Higgs 2006).

Rovnovážné koncentrace NO, $ONOO^-$ a O_2^- v mitochondrii je zevrubně popsána v knize

The Handbook of Environmental Chemistry- odkaz viz níže.



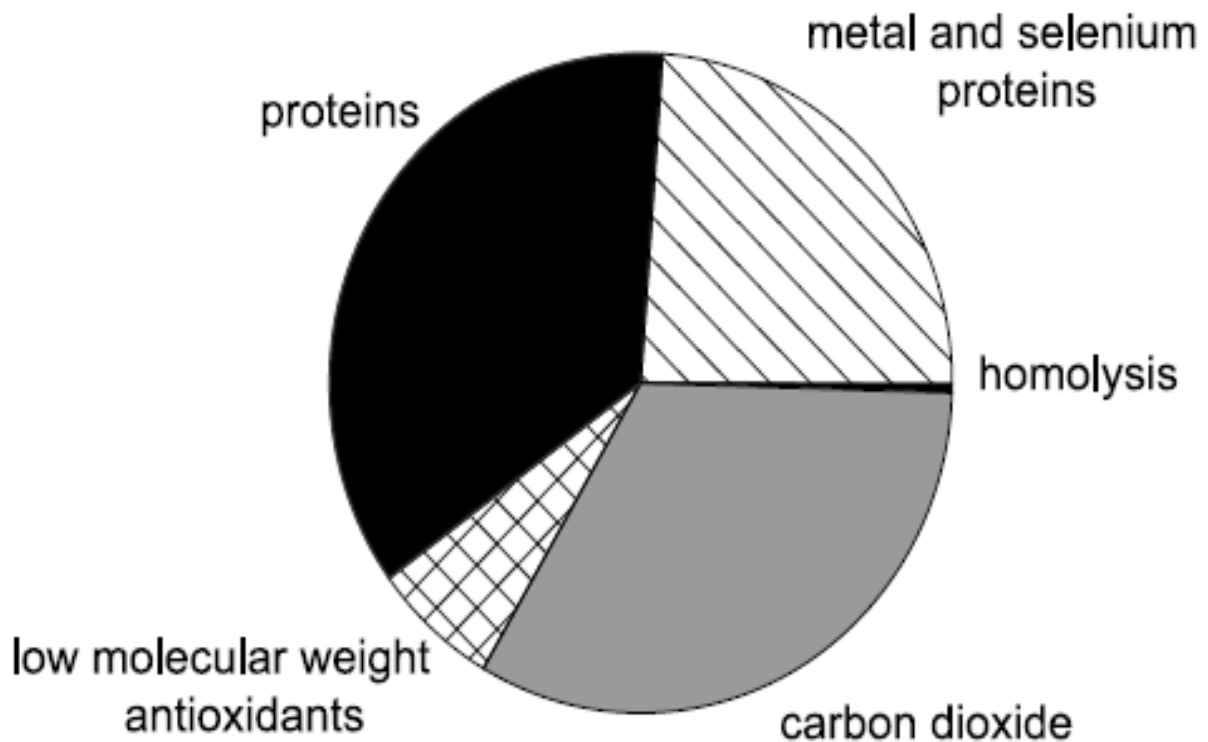
Ze schématu jednoznačně vyplývá, že za normálních podmínek jen 10% NO se přeměňuje na $ONOO^-$ a jen 2-20% celkového dioxygen aniontu je také přeměněno na $ONOO^-$, zatímco většina je zpracována superoxid dismutázou za vzniku peroxidu vodíku (Cadenas E, Boveris A 2005).



Radikálová molekula peroxynitritu (ONOO⁻) je na rozdíl od molekuly NO hydrofilní, proniká membránami jen při přeměně na peroxynitritovou kyselinu, která je velmi nestabilní nebo při vazbě na mastné kyseliny nebo bílkoviny. Část peroxynitritu je však vycytána již

v mitochondrii při reakci s CO₂, alternativní vycytávání vazbou na bílkoviny a to hlavně bílkoviny s vázaným kovem ovlivňuje další funkce těchto bílkovin. Reakční schéma je uvedeno na výše uvedeném obrázku.

Poměrné zastoupení výsledných reakcí vazby peroxynitritu ukazuje koláčový graf:



(Alvarez and Radi 2003)

Ovlivnění exprese proteinů a dalších signalizačních drah pomocí NO

L-NAME zvyšuje hladinu mRNA uncoupling proteinů 1 a 3 (UCP1,3) a to jak ve svalu, tak v hnědé tukové tkáni a zároveň zvyšuje expresi peroxisome proliferator-activated receptor γ ve svalu (**Tsuchiya et al. 2007**). Zajímavé je, že donor NO (NOC18) vede jiným mechanismem k podobnému výsledku jako L-NAME nescifický NOS inhibitor. Dle níže uvedených autorů NOC18 blokuje vazbu PPAR γ na DNA, čímž následně blokuje jak diferenciaci, tak příjem hromadění lipidů v adipocytech (**Kawachi et al. 2007**). Shoda mezi působením L-NAME jako nescifického blokátoru NOS a na druhé straně NOC18, jako donoru NO tkví dle mého názoru v ovlivnění jednotlivých NO syntetáz. Zatímco L-NAME blokuje převážně iNOS s jeho majoritní funkcí jako produktoru peroxynitritu, tak NOC18 dává vznik NO hlavně díky eNOS produkci a tím simuluje postupné uvolňování konstitutivní koncentrace NO z eNOS.

U eNOS knock-outovaných myší dochází ke snížení exprese UCP-1 a PPAR- γ (**Bossy-Wetzel and Lipton 2003**). Snížení jednotlivých složek není vázáno na sebe v řetězci, ale je nezávislé, neboť jiní autoři popsali, že hnědé tukové buňky s poruchou PPAR γ normálně exprimují UCP1 (**Nedergaard et al. 2005**).

Centrální vliv NO na chuť k jídlu.

Existují i názory o centrálním efektu NO na chuť k jídlu. NO samotný uvolněný z eNOS a iNOS nepřímo stimuluje transport insulinu skrze hematoencefalickou bariéru. A podávání insulinu do CNS indukuje hyperglykémii, hypoinsulinémii a anorexii, snižuje v hypothalamu expresi neuropeptidu Y a snižuje tělesnou váhu. Tedy NO by tak nepřímo zvýšeným transportem insulinu do mozku mohl vést ke snížení váhy. Naopak NO uvolněný z nNOS však v buňkách endotelu mozkových cév inhiboval transport insulinu do mozku a měl ve svém důsledku efekt opačný (**Banks et al. 2008**).

NO a metabolický syndrom

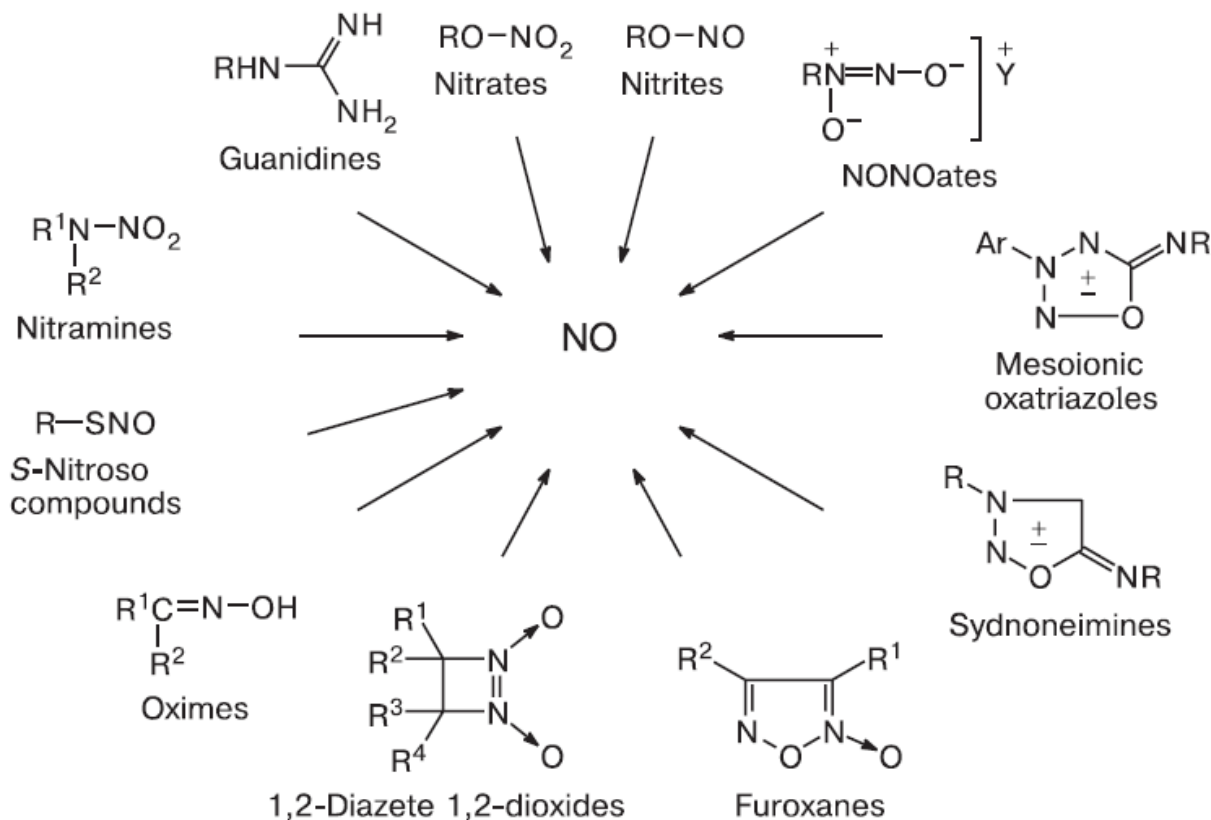
Výskyt metabolického syndromu výrazně stoupá s výskytem abdominální obezity a je charakterizován zánětlivým procesem (např. infiltrací adipocytů makrofágy). Možný mechanismus vzniku chronického zánětu v tukové tkáni je popsán níže. Vzestup příjmu potravy a obezita vede k akumulaci tuku v adipocytech, což dále vede k vzniku buněčného stresu a aktivaci JNK a NF- κ B. Tyto signalizační dráhy zánětu regulují fosforylaci proteinů a transkripci což dále vede k produkci prozánětlivých cytokinů v adipocytech, zahrnující jak

TNF- α , IL 1 tak proatherogenní mediátory (např. PAI-1). Tyto adipokiny redukuje hladinu eNOS, produkci NO se sníženou biogenezi mitochondrií. Následuje redukce β -oxidace, což dále podporuje akumulaci lipidů v buňkách a vzniká bludný kruh. Jak adipocyty stárnou a zhoršuje se obezita, zvyšují se i rizikové metabolické faktory. U mnoha pacientů se následně vyvine diabetes 2. typu. A jak se metabolický syndrom zhoršuje, zhoršují se i rizika kardiovaskulárních příhod a jejich komplikací (Nisoli et al. 2007)

Také vztah NO a metabolického syndromu je uveden v naší přehledné práci z roku 2007– viz publikace 2.

6.4.5 NO donory

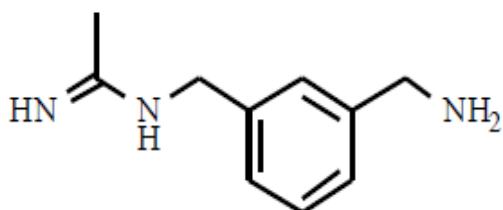
Jako NO donory mohou působit nejrůznější látky s dusíkem ve funkční skupině, jak ukazuje následující schéma:



(Granik VG and Grigor'ev NB 2002)

Nejvíce užívané NO donory v in vitro pokusech jsou SNAP(S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine) z S-nitroso-sloučenin a sydnoniminy. SNAP byl také použit v naší práci jako donor NO (viz publikace 3 a 4)

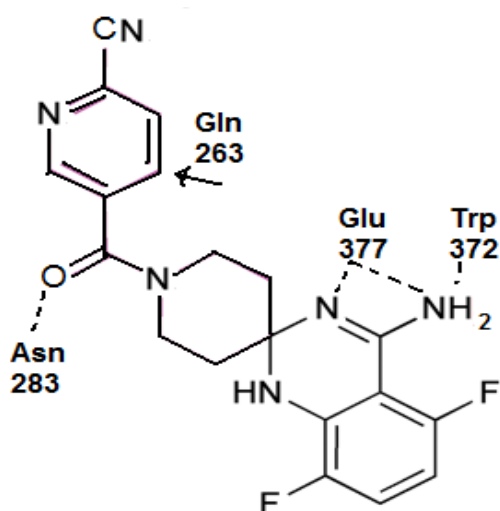
6.4.6 Blokátory NOS (blokátory produkce NO)



Velká snaha mnoha vědeckých týmů se nyní upíná k hledání selektivních NOS blokátorů. Selektivita je hlavně vyžadována pro izofornu iNOS ve snaze snížit její aktivitu vzhledem k endotoxinovému šoku a artritidám a dále

k selektivní inhibici nNOS ve snaze omezit její negativní vliv na neurodegenerativní onemocnění a poškození při centrální ischemické příhodě. Z posledních přehledných prací v oblasti specifických iNOS inhibitorů lze vyčíst, že například látka W1400- N-3-aminomethyl-

benzylacetamidine (vzorec na výše uvedeném obrázku), je v současnosti asi nejspecifičtější inhibitor iNOS. Má 7000 x vyšší specifitu vůči iNOS než eNOS (35x vůči nNOS). Jeho zvláštností je i postupný přechod z reverzibilní na ireverzibilní blokádu iNOS aktivity, zatímco ostatní inhibitory jsou převážně reverzibilní (**Salerno et al. 2002**). Dalším výzkumem korelace struktury a účinku na krystalizovaných iNOS byly nalezeny další specifické látky, z nichž některé látky mají až přes 2500x silnější efekt na iNOS než na eNOS (jak ukazuje níže

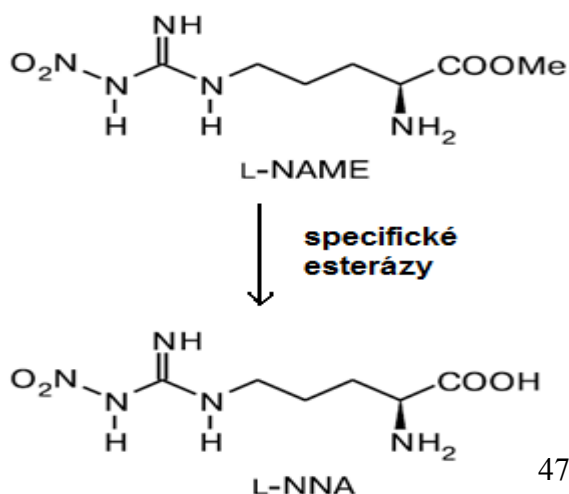


iNOS: 0.035 μ M
eNOS: > 100 μ M
nNOS: 0.79 μ M

uvedený obrázek sloučeniny AR-C102222, čísla koncentrací udávají IC_{50} pro lidské formy NOS). Jako zásadní pro iNOS blokádu se zdá rigidní aromatický kruh, který přiléhá na porfyrinovou část NOS a váže se na Glu377 NOS na dvou elektronegativních místech od sebe vzdálených 2-3 vazby (mutace v tomto místě proteinu vedly až k 250x snížení účinnosti blokátorů). Zesilující efekt na účinnost blokády má vazba ještě na Trp372, což je umožněno u těch molekul, které obsahují primární aminovou skupinu (mutace zde vedla až k 5násobnému poklesu účinnosti). Pro iNOS specifitu blokátorů je pak podmínkou

interakce s Gln 263, která vede ke konformační změně enzymu s odkrytím dalších vazných míst jako Asn283. Tato konformační změna není totiž u eNOS možná, neboť díky jinému složení na pozici 382, kde iNOS má Asp a eNOS Asn, je u eNOS struktura vezebné „kapsy“ rigidnější. (**Garcin et al. 2008**).

Podobnými pokusy s hledáním selektivních nNOS inhibitorů se zabývá skupina kolem prof. Silvermana, kde také vznikly selektivní blokátoři pro nNOS s 2121x vyšší selektivitou než



pro eNOS. Do těchto prací jsou zapojeni i významní čeští vědci např. prof. Martásek (**Silverman 2009**). Hledání eNOS selektivních inhibitorů z pochopitelných důvodů neprobíhá. Látky selektivně blokující eNOS by vedly povětšinou k nebezpečným

hypertenzním reakcím (nejnebezpečnější se zdá v tomto ohledu některé dipeptidy (**Silverman et al. 1997**)).

Z neselektivních blokátorů se nejvíce používá (a použili jsem i my v naší práci) L-arginin zcela neselektivní a částečně nNOS a iNOS selektivní L-NAME (N^G-nitro-L-Arginin methylester)- viz publikace 3 a 4. L-NAME je vlastně prodrug a vyžaduje pro aktivitu přeměnu specifickými esterázami na N^G-nitro-L-Arginin(L-NNA) s IC₅₀ (eNOS/nNOS/iNOS) = 7,6/0,52/0,5 μM. L-NNA zas naopak jsou některé buňky schopny využít na jako substrát k produkci NO (**Olken and Marletta 1993**). Byly publikovány i práce, kde jako inhibitor NO produkce byly zmiňovány glitazony (thiazolidindiony). Mechanismus této inaktivace dle některých autorů spočíval v depleci tetrahydrobiopterinu jako kofaktoru pro tvorbu NO v 3T3-L1 preadipocytech (**Linscheid et al. 2003**), zatímco druzí autoři původ blokady NO vidí v tvorbě radikálů a bloku respirace vazbou ciglitazonu na respirační komplex I v mitochondrii v buňkách potkaních C6 gliómů (**Pérez-Ortiz et al. 2007**).

6.4.7 Ovlivnění exprese iNOS

Láték, které jsou schopny snížit expresi NOS a tím sekundárně snížit i NO produkci je velké množství. Protože však není zatím jasné, jaké různé signální dráhy vedou k snížení exprese NOS, není tento výčet v naší práci uveden. Následující tabulka ukazuje způsob zapojení různých signalizačních drah do ovlivnění iNOS exprese, tak jak byla popsána v různých publikacích.

Pathway/kinase	iNOS expression	Pathway/kinase	iNOS expression
NO	↓ ↑	p42/p44 mitogen-activated kinase (p42/p44 MAPK/ERK)	↑ ↔
Protein kinase A (PKA)	↑ ↓ ↔	(p38 MAPK)	↑
Protein kinase C (PKC)	↑ ↓ ↔	Jun N-terminal kinase (JNK)	↑
Protein kinase G (PKG)	↑ ↔	Phosphatidylinositol 3 kinase (PI-3K)	↑ ↓ ↔
Phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC)	↑	Janus kinase – signal transducer and activator of transcription pathway (JAK-STAT)	↑
Sphingomyelinase (SMase)	↑	Suppressor of cytokine signaling (SOCS)	↓
Ceramide	↓	Serine/threonine protein phosphatases (PSPs)	↑ ↓
Phospholipase A ₂ (PLA ₂)	↑	Protein tyrosine phosphatases (PTPs)	↑ ↓
		Calcineurin	↑
		Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)	↑ ↔
		Rho-family of small G proteins	↓
		Ras-family of small G proteins	↑
		Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)	↑ ↔

↑ = upregulation, ↓ = downregulation, ↔ = no change.

(Kleinert H et al. 2003). Z tabulky vyplývá, že mnohé mechanismy vedoucí k zvýšení iNOS transkripce zatím nejsou jasné, protože jedna signalizační dráha může za různých podmínek vést jak k vzestupu, tak poklesu nebo neovlivnit iNOS transkripci vůbec.

6.5 Signální molekuly adipocytů

Proteinové a ne-proteinové faktory produkované a vylučované bílou tukovou tkání s demonstrací jejich biologické aktivity ukazuje následující tabulka:

· Protein and non-protein factors produced and secreted by white adipose tissue

Substance	Biological effect
Leptin	Signals to the CNS about the body's energy stocks
Adiponectin	Increases sensitivity to insulin, is antiinflammatory and attenuates the progression of atherosclerosis
Resistin	Increases insulin resistance
TNF- α	Lipolytic, increases energy consumption and reduces sensitivity to insulin
Interleukin-6	Proinflammatory, lipolytic, reduces sensitivity to insulin
Adipsin	Activates the alternative complement pathway
ASP	Stimulates triacylglycerol synthesis in WAT
Angiotensinogen	Precursor of angiotensin II, involved in regulating arterial blood pressure
PAI-1	Inhibits plasminogen activation, blocking fibrinolysis
Tissue factor	Initiates the coagulation cascade
VEGF	Stimulates vascular proliferation (angiogenesis) in WAT
Visfatin	Insulinomimetic predominantly produced by visceral fat
Monobutyryn*	Vasodilator and inducer of vascular neoformation
TGF- β	Regulates a series of processes in WAT, including proliferation of preadipocytes and differentiation, development and apoptosis of adipocytes
IGF-1	Stimulates proliferation and differentiation of adipocytes
HGF	Stimulates differentiation and development of adipocytes
MIF	Immunoregulator with paracrine action in WAT
LLP [†]	Hydrolysis stimulating enzyme in the TAG of lipoproteins (chylomicron and VLDL)
CETP [†]	Transfers cholesterol esters between lipoproteins
Apo-E [†]	Protein component of lipoproteins, especially VLDL
Prostaglandins*	Regulators of many cellular processes, active during inflammation, blood coagulation, ovulation and secretion of gastric acid
Estrogens*	Produced by the action of aromatase, this is the principal source of estrogen in men and postmenopausal women
Glucocorticoids*	Generated by the action of 11-hydroxysteroid dehydrogenase, type II, which transforms cortisone into cortisol in WAT
Apelin	Its biological actions are not very clear yet, but are related to control of the body's energy stores

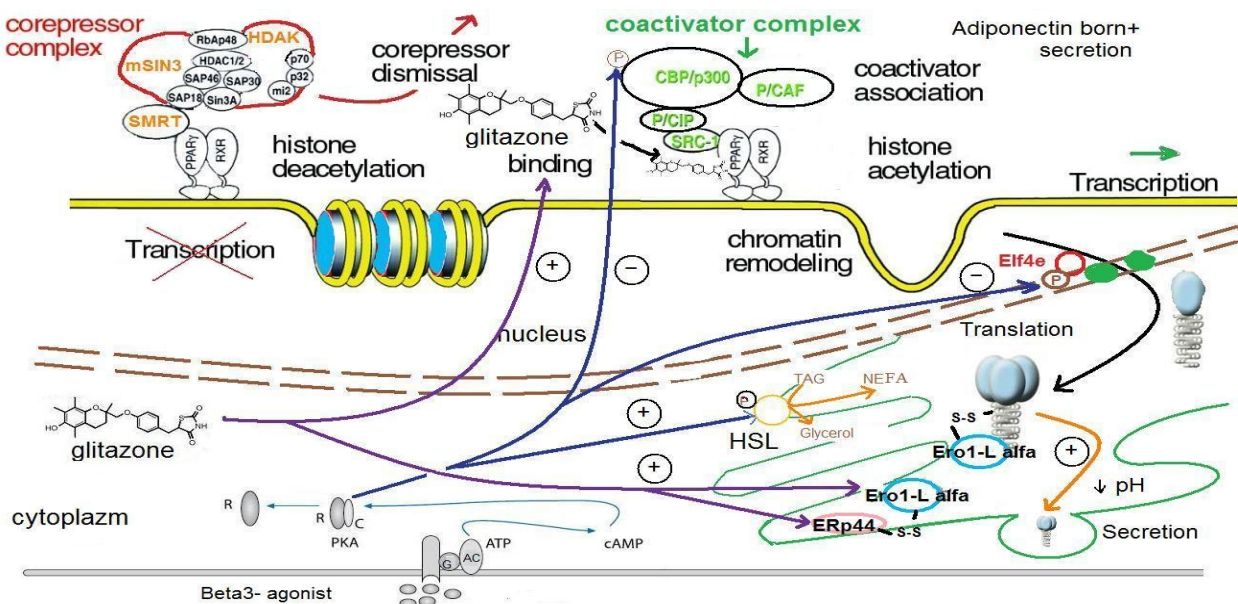
* Ne-proteinové látky. † Proteiny bez hormonální aktivity.

(Fonseca-Alaniz MH et al.2007)

Z výše uvedených adipokinů byly v našem výzkumu zařazeny: Adiponectin, TNF α a resistin. Původně byl zařazen i leptin, ale pro nízkou produkci leptinu v epididymálních adipocytech nebyl v naší adipocytární kultuře detekován (viz abstrakta v příloze).

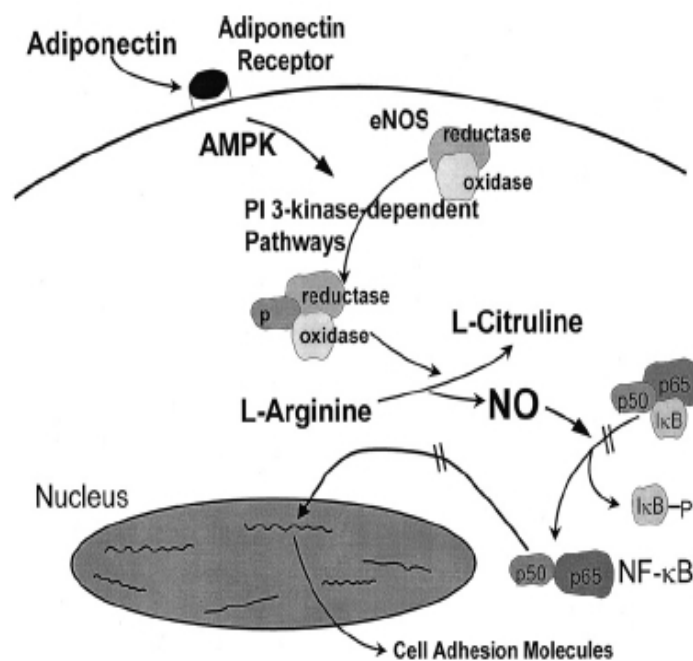
6.5.1 Adiponectin

Gen kódující adiponectin se nachází v oblasti chromozomu 3q27. Současné celogenomové skenování ukázalo, že lokus zvýšené vazby s následným vznikem diabetu je na tomto chromozomu. Adiponectin je protein o 244 aminokyselinách, obsahuje signální sekvenci a doménu podobnou kolagenu na N-konci a C1q-like globulární doménu na C-konci. Globulární doména má homologní sekvence s kolagenem VIII a X a C1q faktorem komplementu. Krystalická struktura je obdobná jako u TNF rodiny cytokinů, které mají podobné trimerické uspořádání (Shapiro and Scherer 1998). Dvě největší oligomerní formy adiponectinu- hexamerická forma a 400-kDa vysokomolekulární komplex (HMW) lze nalézt i v plazmě. Vysokomolekulární forma adiponectinu je přitom průkazně aktivnější než nízkomolekulární formy (Pajvani et al. 2003). Tvorba a vyplavování adiponectinu je řízeno v adipocyty na několika úrovních: 1/transkripce (PPAR γ řízená facilitace vazby koaktivátoru transkripce, β mimetiky řízená blokáda koaktivátoru CBP/p300 fosforylací zprostředkovanou PKA), 2/ translace (blokovanou fosforylací eIF4e elongačního faktoru opět pomocí PKA), 3/ uvolnění z vazby na Ero-1-L- α v endoplazmatickém retikulu (opět facilitováno jak PPAR γ agonisty, tak β_3 a PKA zprostředkovanou lipolýzou vedoucí k 4/ acidifikaci exosomů a uvolnění HMW forem adiponectinu. Námí vytvořené schéma produkce a sekrece adiponectinu bylo v posterové sekci prezentováno na endokrinnologickém kongresu 12th European Congress of Endocrinology v dubnu 2010, abstrakt je uveden v přehledu abstraktů na konci práce.



Adiponectin a obezita

Mnoho studií ukázalo vztah plazmatické hladiny adiponectinu k výskytu různých chorob. Na prvním místě bylo prokázáno, že plazmatická hladina adiponectinu se mění nepřímo úměrně s body mass indexem (BMI) a navíc pokles váhy zvyšuje plazmatickou hladinu adiponectinu (Yang et al. 2001). Naopak plazmatická hladina leptinu se s BMI mění v přímé úměře (Takahashi et al. 1996). Nepřímá úměra mezi adiponectinem a viscerální obezitou je ještě ve větší korelaci než nepřímá úměra s podkožním tukem (Cnop et al. 2003, Yatagai et al. 2003). Mechanismus snížení plazmatické hladiny adiponectinu u lidí s nahromaděním viscerálního tuku dodnes není znám. Jedna z teorií předpokládá, že se zvyšuje exprese TNF- α , který je silným inhibítoem translace adiponectinu (Maeda et al. 2001), a to přímo úměrně hromadění viscerálního tuku. Plazmatická hladina adiponectinu se obvykle pohybuje mezi 3 až 30 $\mu\text{g/ml}$ u dospělé osoby (Nishida et al. 2007). Adiponectin má schopnost ovlivňovat cévní systém přímou stimulací produkce oxidu dusnatého (NO) v endoteliálních buňkách prostřednictvím signálu jdoucího přes aktivaci adenosin-monofosfát-protein kinázy (AMPK). Tato dále aktivuje fosfatidylinositol (PI) 3-kinázu a ta konečně fosforyluje endoteliální NOS (eNOS) tvořící NO (Chen 2003). Adiponectin současně redukuje expresi adhesních molekul a snižuje tvorbu cytokinů v makrofázích prostřednictvím inhibice nukleárního transkripčního faktoru kappa B (NF- κB). Signál je závislý na cyklickém adenosinmonofosfátu (Ouchi 1999, 2000).



Upraveno podle Koh et al. 2005, Han et al. 2007.

Adiponectin a metabolický syndrom

Nízká hladina adiponectinu je spojována s metabolickým syndromem u jinak zdravých jedinců (Hulthe et al. 2003). Prospektivní kohortová studie prováděná na starších Korejcích prokázala vztah metabolického syndromu a hladiny adiponectinu (Choi et al. 2004). Ve studii s 661 dospělými Japonci, byla popsána závislost mezi tíží metabolického syndromu a sníženou hladinou adiponectinu (Ryo et al. 2004). Byly také nalezeny 4 bodové mutace, kde mutace I164T byla spojena s významnou hypoadiponectinemií. Autoři studie našli 9 osob s takovou I164T mutací; 8 z nich mělo hypertenzi nebo hyperlipidémii a všech 9 mělo vadu glukózového metabolismu ať už zhoršenou glukózovou toleranci (IGT) nebo diabetes (Ohashi et al. 2004). Tyto výsledky ukazují, že geneticky vázaná hypoadiponectinémie může být částečně podkladem metabolického syndromu a adiponectin je nyní považován za klíčovou molekulu tohoto syndromu. (Nishida et al. 2007). Jako hlavní farmakologické aktivátory sekrece adiponectinu jsou známy glitazony. Jejich působení na sekreci adiponectinu se zdá být podle výsledků našich pokusů však dvoufázové s poklesem v prvních 12 hodinách a postupným vzestupem za 48 hodin. Tyto výsledky byly prezentovány na několika kongresech a jsou součástí abstrakt ve sborníku uvedených na konci práce.

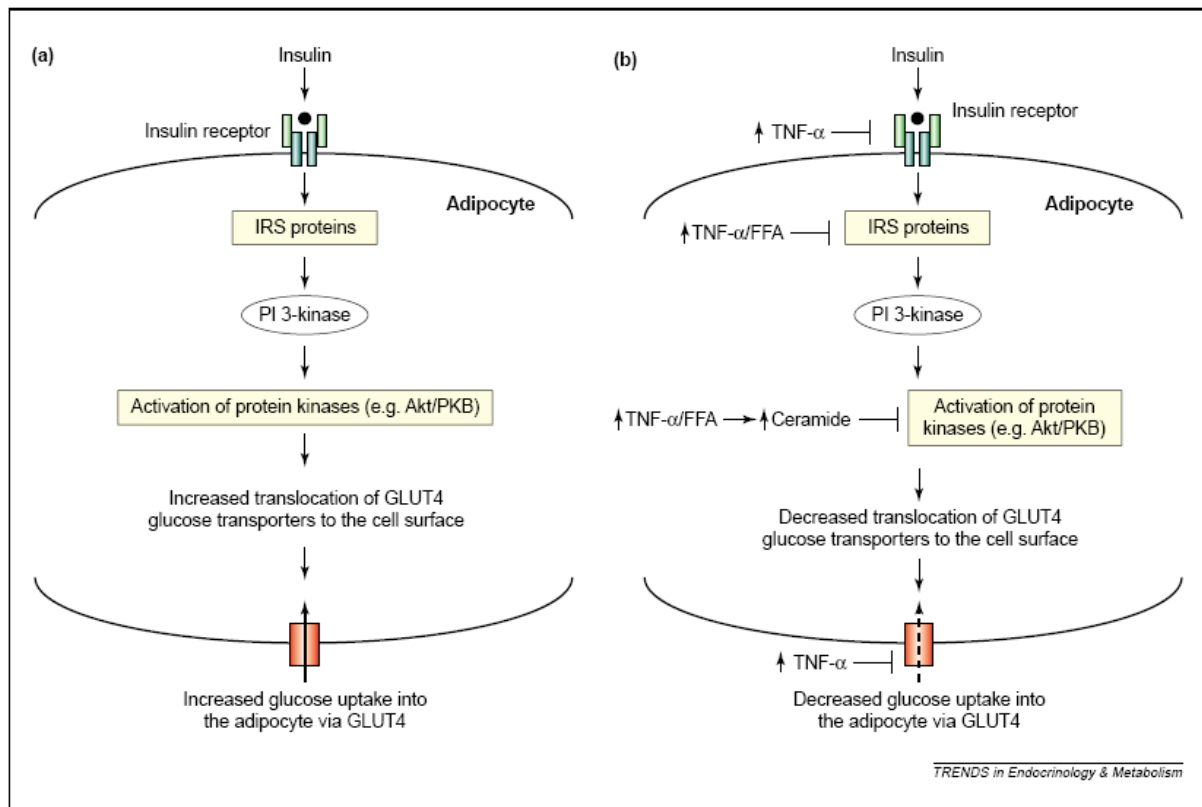
6.5.2 Tumor necrosis factor- α (TNF α)

TNF α je produkován aktivovanými makrofágy a některými dalšími buňkami. Gen pro lidský TNF α je lokalizován na krátkém raménku 6. chromozomu. Zralá forma má 157 AMK. In vivo vede k lokální infiltraci neutrofilů, nekróze nádorů (odtud název), je endogenním pyrogenem, je reagující složkou akutní fáze zánětu, má kachektizující vlastnosti (Stites et Terr

1994). Díky tomuto se také nazývá kachektinem, inhibuje lipoproteinové lipázy a potlačuje diferenciaci adipocytů. Lze u něj nalézt i silné angiogenní účinky (Klener P et al. 1997)

TNF α u obezity a metabolického syndromu

TNF je považován za jeden z klíčových faktorů insulinoresistence jak ukazuje obrázek:



(Arner 2003)

Insulinová signalizace v adipocyty dle schématu:

(a) V insulin-senzitivních adipocytech se insulin váže na receptor a aktivuje tyrosinkinázu s následnou fosforylací insulin receptor substrátu (IRS) a stimulací fosfatidylinositol 3-kinázy (PI 3-kinázy). Ačkoliv je tato aktivace vyžadována pro glukózový transport, uvažuje se i o jiných drahách (Kahn and Flier 2000). PI 3-kináza totiž aktivuje i další protein kinázy (Akt/PKB) (Kahn and Flier 2000, Summers et al. 2000). Na aktivaci PI 3-kinázy navazuje i aktivace protein kinázy C 1 β , p70 S6-kinázy, 4EBP1/PHAS1 a ras-mitogen-activated protein kinázy (Kahn and Flier 2000, Summers et al. 2000). To vše vede následně k zvýšenému, na insulin závislému, transportu glukózy do adipocytů pomocí zvýšení přenosu molekul glukózového transportéru 4 (GLUT4) na buněčnou membránu (Summers et al. 2000). Dále transkripční faktor, adipocytární diferenciací faktor-1 a sterol regulující element-binding protein-1c, hrají klíčovou roli v ovlivňování efektu insulinu na adipocytární diferenciaci. Indukují geny zapojené do lipogeneze a potlačují expresi genů zapojené do

oxidace tuků. To vede k antilipolytickému efektu insulinu (**Summers et al. 2000, Smith et al. 1999**). Stejně signalizační dráhy vedou k aktivaci PI 3-kinázy a tím i stimulaci fosfodiesterázy-3. Tím je metabolizováno více cAMP, snižuje se fosforylace hormon-senzitivní lipázy a snižuje tak její lipolytická aktivita.

(b) V insulin resistantních adipocytech insulinová signalizace vážne v několika krocích- vazbě insulinu na receptor, fosforylaci a tyrosin kinázové aktivitě, fosforylaci IRS proteinu, aktivaci insulin-senzitivní protein kinázy (např. Akt/PKB) pomocí PI 3-kinázy a syntéze/translokaci GLUT4 glukózového transportéru na povrch plasmatické membrány adipocytu (**Kahn and Flier 2000**). Insulinová resistence je zřetelnější, než resistence k lipolytickým faktorům v tukových buňkách člověka, přesto probíhá u metabolického syndromu obojí a ukazuje se, že právě snížení IRS-1 je velmi významné u diabetu druhého typu a obezity (**Carvalho et al. 1999, Björnholm et al. 2002**). Faktory uvolňované do cirkulace z adipocytu [např. tumor necrosis factor (TNF- α) a volné mastné kyseliny (FFAs)] hrají významnou roli v adipocytech navozené insulinové resistenci právě inhibicí insulinové signalizace (**Arner 2003**).

Někteří autoři nacházejí asociaci TNF α s zhoršením glukózové tolerance. Tato korelace se však objevuje jen v plazmatických hladinách TNF α , zatímco v imunohistochemické detekci ve svalu a podkožní tukové tkáni žádná korelace s diabetem ani dalšími znaky metabolického syndromu není, mírné zvýšení detekce TNF α v podkožní tkáni se objevuje až při morbidní obezitě s BMI přes 40 (**Plomgaard et al. 2007**). *V našich výsledcích hladina TNF α nebyla zvýšena ani vlivem β_3 agonisty, ani PPAR γ agonisty troglitazonu nebo antagonisty SR-202. Výsledky práce byly prezentovány na několika kongresech a jsou publikovány ve sborníku abstrakt uvedených na konci práce.*

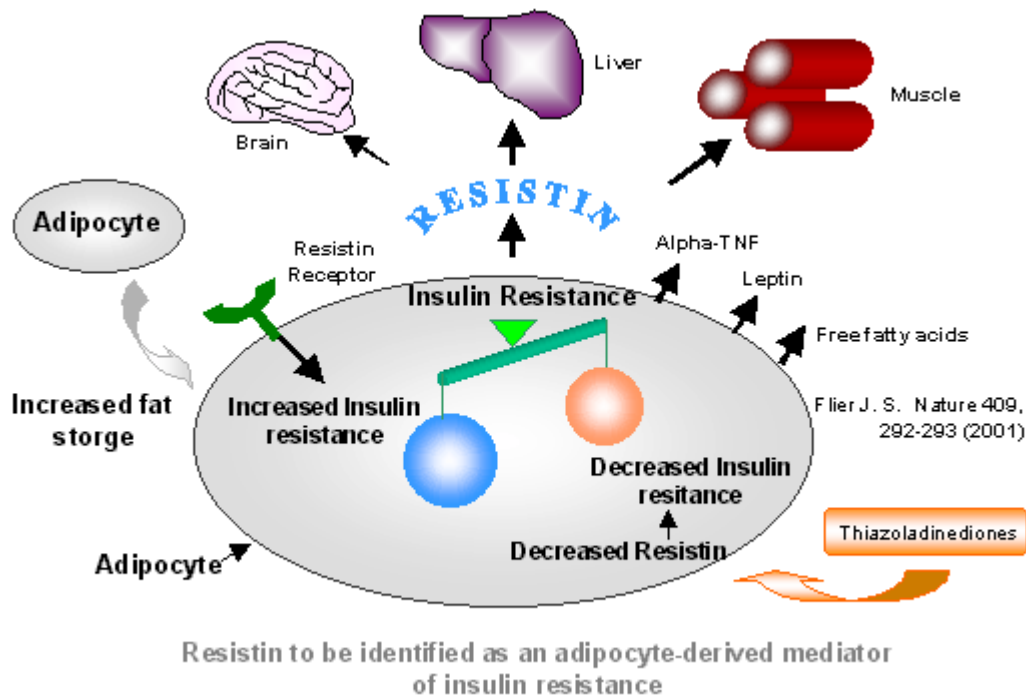
6.5.3 Resistin

Molekula mRNA pro resistin kóduje vznik polypeptidu resistinu o 114 aminokyselinách obsahující signální sekvenci o 20 aminokyselinách. Forma polypeptidu vylučovaná do cirkulace se skládá z 94 aminokyselin a obsahuje 11 Cys zbytků. Resistin je vylučován jako dimér spojený disulfidickým můstkem přes Cys26. Mutace této části molekuly vede k vylučování resistinu jako monomeru. Zbylých 10 Cys molekul se nejspíše váže v intramolekulárních disulfidických můstcích, které jsou známy z podoby monomerních polypeptidů (**Banerjee and Lazar 2001**). *Retn* mRNA a resistin protein se zvýšeně tvoří při diferenciaci adipocytů a 3T3-L1 adipogenezi (**Steppan et al. 2001**). Naopak Kim a

spolupracovníci popsali, že zvýšená exprese resistinu blokuje 3T3-L1 adipogenezi (**Kim et al. 2001**). Ať už u myších nebo potkaních adipocytů se resistin tvoří výhradně v bílé tukové tkáni (**Steppan et al. 2001, Kim et al. 2001, Holcomb et al. 2000**). Nejvyšší exprese byla popsána v tukové tkáni gonadální u samic. U obézních samic myší lze však nalézt sníženou hladinu resistinu (**Way et al. 2001**). Hladina resistinu je zvýšená u dvou různých genetických modelů (*ob/ob* a *db/db*) a i u modelu dietou-indukované obezity (DIO) a diabetu (**Steppan et al. 2001**). *Ob/Ob* myši, které jsou léčeny rosiglitazonem vykazují snížení hladiny resistinu (**Steppan et al. 2001**).

Tyto výsledky výzkumu ukazují, že cirkulující resistin může přispívat k insulinoresistenci. Akutní podání rekombinantního resistinu konvenčním myším vede k mírnému snížení glukózové tolerance. Bylo popsáno i snížení exprese adipocytárního resistinu spojené se zvýšenou insulinovou sensitivitou u myšího modelu insulinové resistance (**Yamauchi et al. 2001a**). Resistin snižuje také pohlcování glukózy v závislosti na insulinu v kulturách 3T3-L1 adipocytů (**Steppan et al. 2001**) a naopak „předlčení“ resistin-produkujících 3T3-L1 adipocytů neutralizační protilátkou proti resistinu zlepšil insulinem-stimulovaný transport glukózy (**Steppan et al. 2001**). Data výzkumu ukazují, že resistin může mít opačný efekt na adipocyty než insulin i když další průběh signální dráhy a resistinový receptor nejsou známy. Gen podobný genu pro resistin byl popsán u člověka na 19 chromozomu (**Steppan et al. 2001**). Aminokyselinové složení se však s myším resistinem shoduje jen v 59%, a jeho exprese je u lidí ve srovnání s expresí myšího resistinu výrazně nižší (**Savage et al. 2001, Nagaev and Smith 2001**).

Resistin a metabolický syndrom



U experimentálních zvířat je jeho exprese indukována diferenciací adipocytů a naopak klesá po aplikaci insulin senzitizerů. Hladina resistinu stoupá jak u genetické- hereditární, tak u navozené obezity. Nebylo však dokázáno, že by resistin byl původcem insulinoreistence u DM II typu u obézních (Hainer 2004). Vzestup hladiny plazmatického resistinu na zánětlivé stimuly (LPS, $TNF\alpha$) je nejspíše způsoben aktivací imunokompetentních buněk typu polymorfonukleárů, kde se resistin tvoří také, než adipocytů. Zvýšení hladiny totiž korelovalo se zvýšením $TNF\alpha$ a $TNFR2$ volným receptorem v živých objektech nebo v izolovaných polymorfonukleárech (Lehrke et al. 2004, Kaser et al. 2003). Avšak v adipocytárních kulturách bez imunokompetentních buněk naopak hladina mRNA pro resistin výrazně se zvýšením hladiny $TNF\alpha$ klesala (Fasshauer et al. 2001, Shojima et al. 2002). U žen někteří autoři nenašli žádnou korelaci zánětlivých markerů nebo zhoršení glukózové tolerance s hladinou resistinu (Janowska et al. 2006, Stejskal et al. 2002, Lee et al. 2003), zatímco ve studiích s převahou mužů 36:9 se asociace diabetu a hladiny resistinu jasně ukazuje, stejně jako blok jeho insulinové indukce rosiglitazonem (Mc Ternan et al. 2003). Jinde lze nalézt

efekt resistinu na snížení transkripce insulinového receptoru v izolovaných β buňkách ostrůvků pankreatu, což by mohlo být důvodem snížení produkce insulinu u nemocných s metabolickým syndromem (**Brown et al. 2007**).

Z našich prací vyplývá, že resistin není ovlivňován troglitazonem ani SR-202 v prvních 24 hodinách. Jediný významný vzestup hladiny oproti kontrole byl pozorován po β_3 agonisticky působícím BRL-37344. Výsledky práce byly prezentovány na několika kongresech a jsou publikovány ve sborníku abstrakt uvedených na konci práce.

6.6 Další specifické signální dráhy adipocytů a jejich využití v léčbě obezity a metabolického syndromu.

6.6.1 PPAR γ receptor

PPAR γ receptor- receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory byl objeven v roce 1992 klonováním receptorů žáby- drápatky vodní -*Xenopus laevis*. I když název vychází z původních pokusů s PPAR α izoformou, pro PPAR γ je zavádějící, protože ani PPAR γ ani PPAR β není spojen s proliferací peroxisomů (**Kliwer et al. 2001**). Zatímco u člověka se PPAR γ gen nachází na chromosomu 3 v pozici 3p25 (**Greene et al. 1995**) u hlodavců se objevuje na 6. chromosomu v pozici E3-F1 (**Jones et al. 1995**). Gen PPAR γ hlodavců však vykazuje vysoký stupeň shody s genem lidským (**Fajas et al. 1997**). Genovou transkripcí vznikají 3 isoformy gama 1, 2 a 3, z nichž exprese gama 2 je dominantní pro bílou tukovou tkáň (**Haluzík and Svačina 2005**). Podobná distribuce je popsána i u hlodavců, jak ukazuje tabulka (PPAR δ je synonymem pro PPAR β):

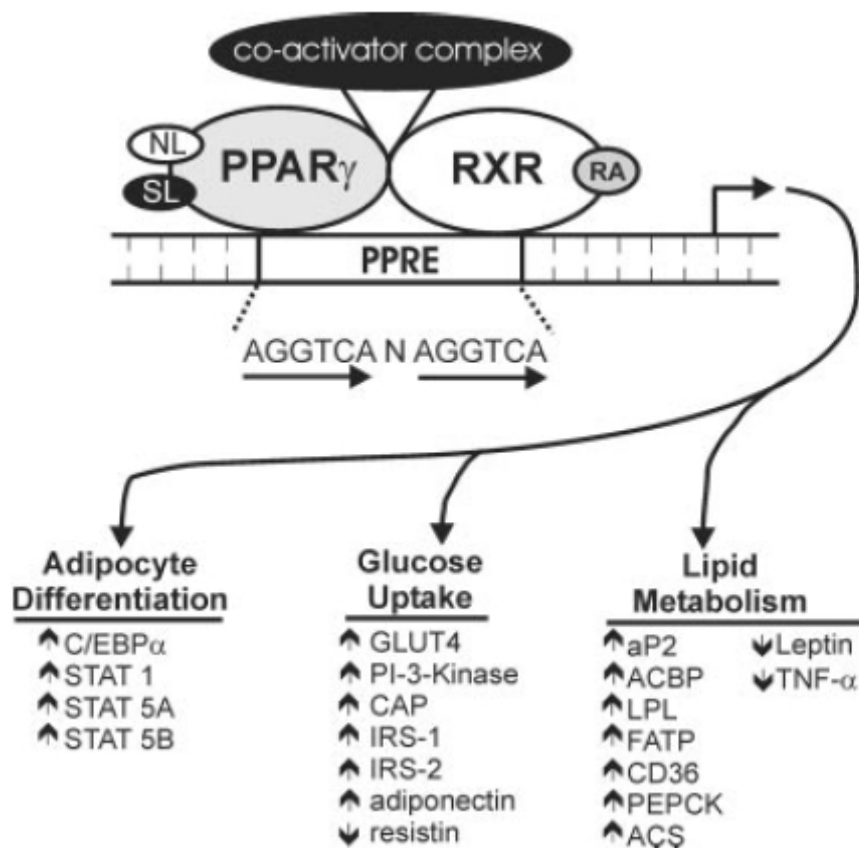
Tissue distribution of the various PPAR subtypes in mouse and rat

Tissue	PPAR type			
	α	δ	γ	
			1	2
Liver	+++	+/-	+++	+/-
Kidney	+++	++	+++	+
Heart	+++	+++	+++	++
White AT		++		++++
Brown AT	+++	++		
Brain		+++	+	+
Intestine	+	+++		
Muscle	+	+++	+	+
Testis	+	+/-	+	
Spleen	-	+++	+/-	++
Thymus	+			
Lung		+++	+	++
Adrenal gland		+++		
Pancreas				-

The level of expression correlates with the level of expression of the various PPAR forms.

(Schoonjans et al. 1996 b)

Již počátkem 80 let minulého století v japonské farmaceutické společnosti Takeda objevili slibnou skupinu nových antidiabetik –thiazolidindiony, také nazývané glitazony, tedy ještě bez přesné znalosti jejich mechanismu účinku (Sohda et al. 1982). V dnešní době je mechanismus účinku těchto PPARgamma agonistů z velké části objasněn, jak ukazuje následující obrázek:



PPAR γ aktivace vede nejen k zvyšování insulinové sensitivity, ale i diferenciaci adipocytů, a akumulaci lipidů v adipocytech. Taková aktivace je uskutečněna jak pomocí endogenních ligandů (NL), jako jsou eikosanoidy, nenasycené mastné kyseliny,

tak pomocí syntetických ligandů jako jsou thiazolidindiony, tyrosinová analoga. To vede k heterodimerizaci PPAR γ receptoru s retinoidním X receptorem (RXR). RXR váže k aktivaci jako ligand 9-*cis* retinovou kyselinu (RA). Vzniká heterodimerický komplex jako nezbytná podmínka k vazbě na peroxisome proliferator-activated receptor response elements (PPRE) v oblasti promoteru cílových genů. Po vazbě na promoter dochází k navázání komplexů koaktivátorů s histon acetyl-transferázovou aktivitou. Dochází ke změně struktury nukleosomu umožňující přístup transkripčních faktorů k promoterům cílových genů.

Výslednými transkripty jsou:

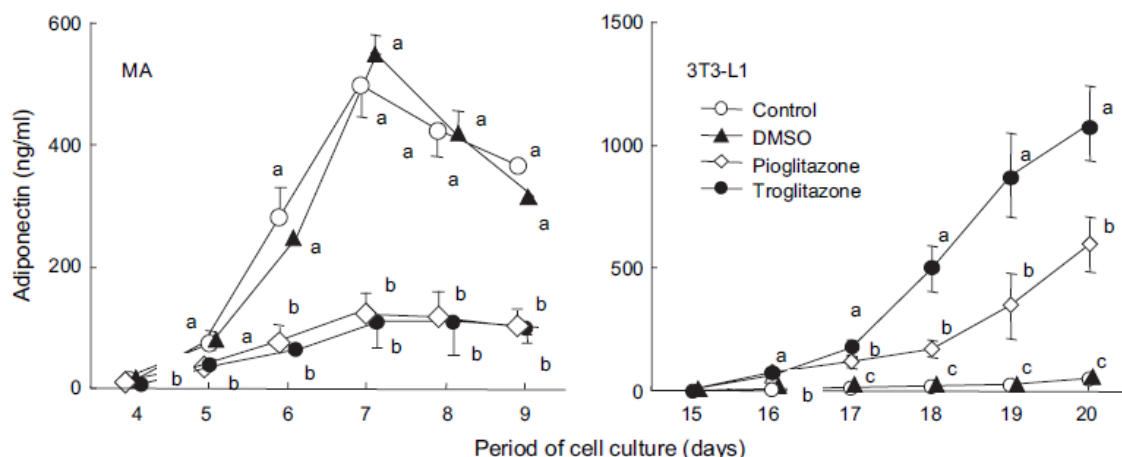
- 1/ signální molekuly adipocytární diferenciace- CAAT/enhancer binding protein- α (C/CEBP α) a signal transducers and activators of transcription (STAT) 1,5A a 5B.
- 2/ molekuly zvyšující insulinem stimulované vychytávání glukózy- insulin-stimulated glucose transporter 4 (GLUT4), phosphatidylinositol 3-kináza (PI-3-Kinase), cbl-associated protein (CAP), insulin receptor substrate (IRS) 1 a 2 a adiponectin, zároveň je blokována exprese resistinu

3/ molekuly umožňující hromadění lipidů v adipocytech- adipocyte fatty acid binding protein (aP2), acyl-CoA binding protein (ACBP), lipoproteinová lipáza (LPL), acyl-CoA syntetáza (ACS), fatty acid transport protein (FATP), fatty acid translokáza (CD36) a phosphoenol pyruvát karboxykináza (PEPCK), zároveň je snížena exprese leptinu a tumor necrosis faktoru- α (TNF α) (**Brown and McIntosh 2003**).

Účinkem glitazonu dojde k indukci lipogenních genů a hyperplazii tukové tkáně, ale zároveň se aktivuje glycerolkináza, přemění se glycerol na glycerol-3-fosfát, dochází k reesterifikaci mastných kyselin na triacylglyceroly. Ty se zas lipolyticky mění na mastné kyseliny a glycerol a v tomto krátkém slepém cyklu pak dojde k blokadě oběhu mastných kyselin a snížení jejich vyplavení do krve. Tím glitazony působí proti hypertriglyceridemii, která se podílí na insulinové resistenci. Nejvýznamnější antidiabetika této skupiny jsou troglitazon, rosiglitazon a pioglitazon. Podobným účinkem jako glitazony účinkují deriváty vitamínu A- retinoidy (**Hainer et al. 2004**). Pro glitazony se dle QSAR studií zdá rozhodujícím kriteriem pro afinitu k receptoru a aktivitu molekuly vyšší stupeň sterického uspořádání, hydrofobicita, vyšší počet atomů schopných tvořit vodíkové můstky a celková elektronegativita. Přehledné studie zabývající se popisem PPAR γ receptoru odhalují i postupně farmakoforové skupiny glitazonů a jiných ligandů PPAR (**Sheu et al. 2005**).

Nejvýznamnějším transkriptem vznikajícím působením PPAR γ agonistů- thiazolidindionů je nejspíše adiponectin. Léčba troglitazonem zvyšuje plazmatický adiponectin u lidí s nadváhou a intolerancí glukózy nebo diabetiků asi 3x, léčba rosiglitazonem asi 2x. Pioglitazon vede navíc ke zvýšení poměru vysokomolekulární adiponectin/ celkový adiponectin a toto ještě více zvyšuje insulinosenzitivitu v jaterní tkáni než sekrece nízkomolekulárních forem (**Nishida et al. 2007**).

Reakce na glitazony se liší také podle buněk, které jsou zkoumány. Na následujícím grafu je patrné, že nástup produkce adiponectinu, jeho výsledná hladina i aktivita jednotlivých agonistů se liší u izolovaných primárních mezenterálních adipocytů (MA) od 3T3-L1 preadipocytární linie a to dosti výrazně:



Tak například, zatímco u kultivace 3T3-L1 preadipocytů začíná stoupat hladina adiponectinu v médiu po přidání troglitazonu až 18. den a 20. den dosahuje tisícinásobku bazální hladiny, tak u primárně izolovaných mezenteriálních adipocytů (MA) v prvních 10 dnech glitazony spíše bazální sekreci adiponectinu tlumí (5x ve srovnání s kontrolou) a a vzestup sekrece adiponectinu od bazální počáteční sekrece po glitazonech je sotva stonásobný (Mineo et al. 2007). Podobnou zkušenost s dvoufázovým průběhem sekrece adiponectinu jsme získali u krátkodobé kultivace epididymálních adipocytů potkana i v našich pokusech a výsledky byly publikovány v abstraktech uvedených na konci práce.

Rozílnou odpověď můžeme nalézt i u hypertrofie tukové tkáně na troglitazon u jednotlivých kompartmentů tukové tkáně u potkana při pokusech in vivo:

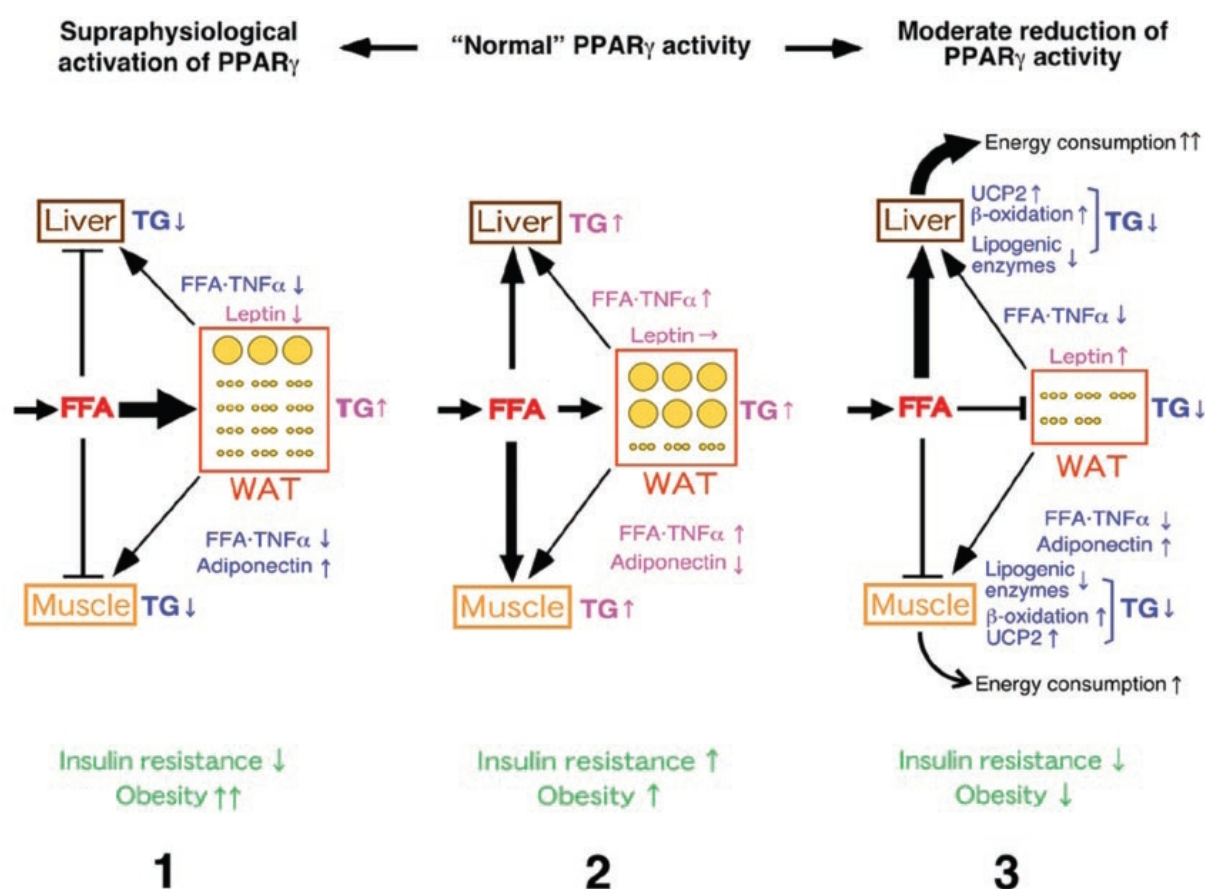
Weight of WATs

Experimental group	Absolute weight (g)			
	Subcutaneous	Retroperitoneal	Epididymal	Mesenteric
Lean				
control	4.35±0.34	2.42±0.27	2.78±0.32	1.80±0.16
troglitazone	3.84±0.30	1.56±0.21	2.35±0.23	1.22±0.12
Obese				
control	25.67±1.23	10.28±0.64	9.02±0.62	6.05±0.21
troglitazone	26.61±1.66	10.79±0.33	11.88±0.54	6.24±0.23
Percent of body weight				
Experimental group	Subcutaneous	Retroperitoneal	Epididymal	Mesenteric
Lean				
control	1.518±0.096	0.843±0.082	0.968±0.100	0.626±0.047
troglitazone	1.408±0.080	0.570±0.067	0.861±0.070	0.447±0.032
Obese				
control	6.079±0.262	2.437±0.147	2.134±0.128	1.436±0.059
troglitazone	5.839±0.235	2.373±0.020	2.610±0.083	1.374±0.045

(upraveno a zkráceno podle Okuno et al. 1998).

Z tabulky jednoznačně vyplývá, že jen tuková tkáň epididymidální obézních potkanů reaguje hypertrofií na přítomnost troglitazonu (statistická významnost $p < 0,05$ označena *), zatímco tuk lokalizovaný jinde, stejně jako všechny tuk u potkanů s normální vahou tyto reakce nevykazuje.

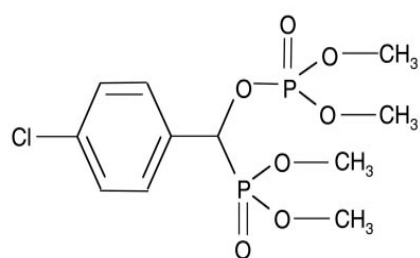
Zajímavá skutečnost je, že jak mírná aktivace (na obrázku číslo 1), tak redukce (na obrázku číslo 3) PPAR γ signální dráhy zlepšuje jak obezitu, tak insulinoresistenci, i když pokaždé jiným mechanismem:



(Yamauchi et al. 2001b)

6.6.1.1 PPAR γ blokátory

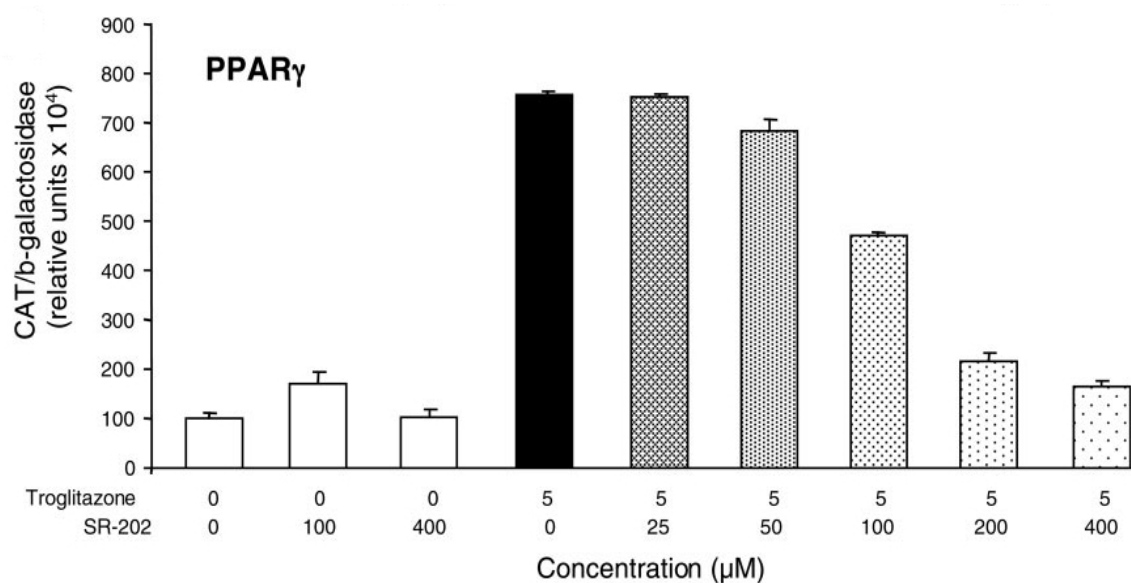
V poslední době jsou intenzivně hledány i látky selektivně blokující PPAR γ receptor.



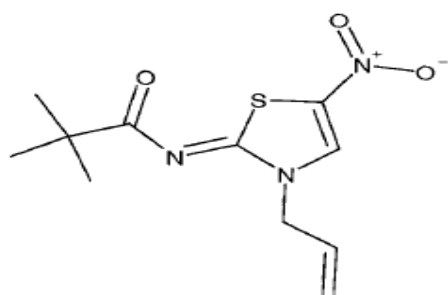
Takovou látkou je například SR-202 s $IC_{50} = 140 \mu M$. Látka neblokuje ani PPAR α ani PPAR β agonisty a není toxická

až do hladiny 400 μM . Navíc studie autorů probíhali in vivo na myších a byla tudíž méně pravděpodobná toxicita dané látky.

Proto byla látka SR-202 použita v naší práci jako selektivní blokátor PPAR γ efektu troglitazonu(viz publikace č 1 v přehledu publikací na konci práce).



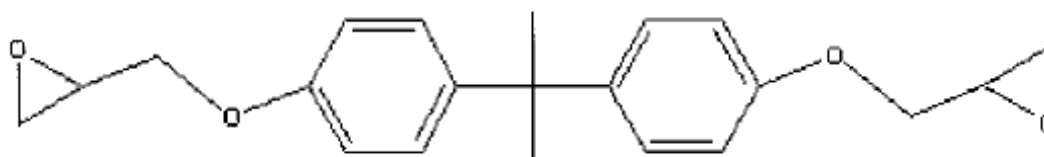
(Rieusset et al. 2002)



PD068235

Existují i další a selektivnější PPAR γ blokátory jako je PD068235 s $\text{IC}_{50} = 0.8 \mu\text{M}$, který však nefunguje na terminálně diferencovaných tukových buňkách, kde není schopen blokovat transkripci vyvolanou rosiglitazonem. Na rozdíl od diferencovaných buněk je schopen ve vyvíjejících se 3T3-L1 preadipocytech působit proti účinku rosiglitazonu (**Camp et al. 2001**).

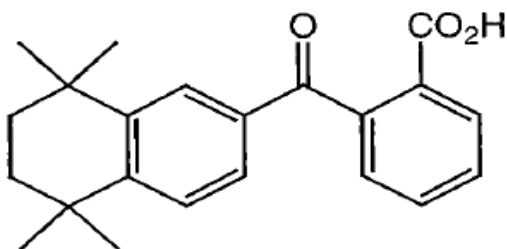
Dále byl syntetizován BADGE PPAR γ antagonist s přibližnou účinností $\text{IC}_{50} = 100 \mu\text{M}$



Látka má dost špatnou rozpustnost a nebyla testována na schopnost blokovat transkripci adiponectinu (**Wright et al. 2000**).

Další látkou s blokádou PPAR γ je LG100641 s $IC_{50} = 25\mu M$, která sice blokuje účinek

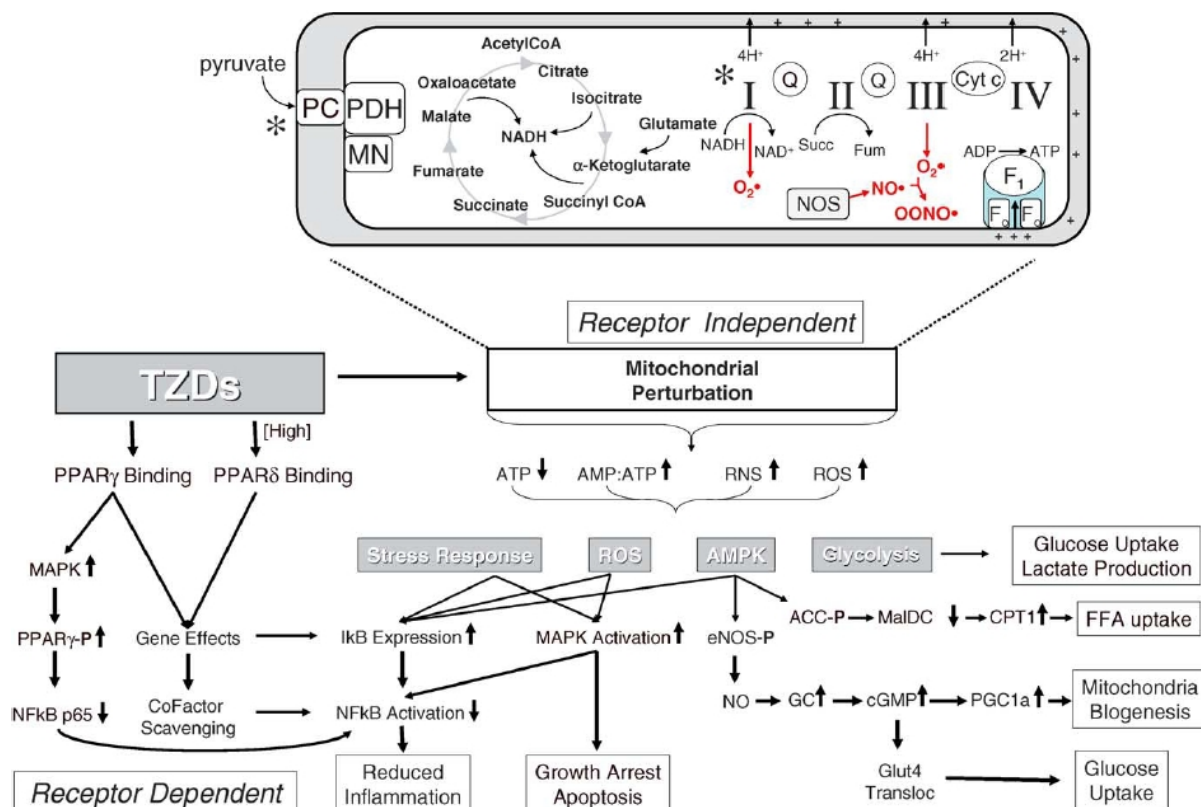
LG100641



rosiglitazonu na vývoj preadipocytů, ale kupodivu neblokuje účinek glitazonů na vychytávání glukózy do adipocytu. I proto jsou někteří autoři přesvědčení, že tato molekula může být perspektivní molekulou při léčbě

diabetu u obézních nemocných s eliminací zvyšování váhy jako po glitazonech a přitom zachovanou schopností zvyšovat insulinosenzitivitu (**Mukherjee et al. 2000**). Poslední přehledná práce zabývající se syntézou selektivnější a účinnějších PPAR γ antagonistů dosahujících až $IC_{50} = 5,4 \mu M$ a mapující vztah struktury a účinku byla publikována v roce 2008 (**Deng et al. 2008**).

Kromě PPAR γ dependentní funkce thiazolidindionů (TZDs) se množí důkazy, že glitazony-PPAR γ agonisté mohou působit i jinými nonPPAR γ mechanismy. Přehled takových signálních drah demonstruje následující schéma (* označuje místa ovlivnitelná NO, PPAR δ je synonymem pro PPAR β):



Byť PPARgamma efekt je závislý na dávce glitazonu, jak ukazuje následná tabulka,

Ligand binding affinities for PPAR γ

Agonist	EC ₅₀ (μ M)
Rosiglitazone	0.076
Pioglitazone	0.55
Troglitazone	0.78
Ciglitazone	3

EC₅₀ values determined using reporter gene chimera genes, for the mouse PPAR γ

mnohé účinky glitazonů vykazují jiný nebo přímo opačný trend než v uvedené tabulce s prakticky nulovou účinností rosiglitazonu a přitom vysokou účinností troglitazonu nebo ciglitazonu. Tak je tomu u účinku na produkci NO, aktivaci a sekreci cytokinů, expresi prozánětlivých a adhezních molekul (**Feinstein et al. 2005**). Byly popsány i účinky glitazonů na sekreci kyseliny arachidonové u PPAR γ deficitních buněk, stejně jako nemožnost blokovat tento účinek PPAR γ antagonisty (**Tsukamoto et al. 2004**). Ve zmíněném ohledu je nejčastěji skloňována alternativní PPAR γ independentní aktivace AMPK pomocí glitazonů.

Takové výsledky jsme zaznamenali i v naší práci, kde β_3 agonistou vyvolaná iNOS aktivace, stejně jako lipolýza byla blokována sice PPAR γ agonistou, ale tento vliv nebylo možné zastavit pomocí specifického PPAR γ antagonisty nýbrž AMPK antagonistou-Compound C (viz publikace 1 v seznamu publikací)

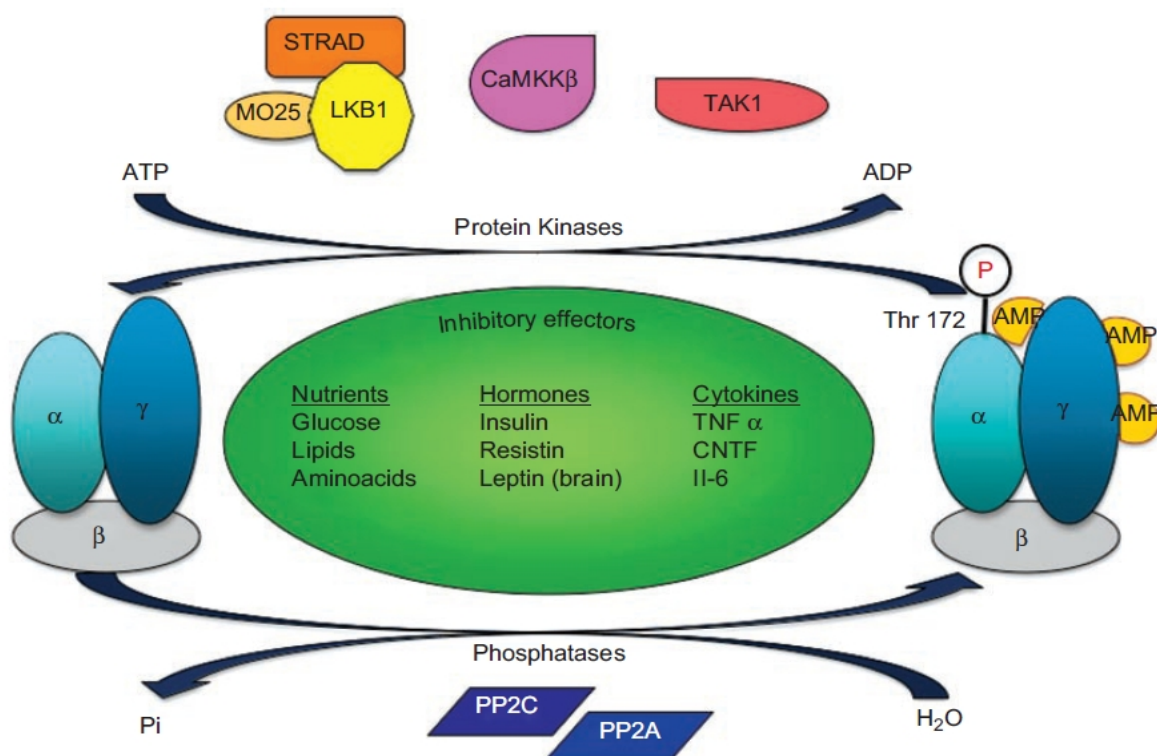
6.6.2 Adenosin monofosfát kináza (AMPK)

Asi 2% savčího genomu kodují geny pro kinázy. Adenosin monofosfát dependentní kináza-AMPK se skládá z heterotrimerického komplexu s obsahem α , β a γ podjednotky. Existují α 1, 2, β 1,2, γ 1,2,3 varianty podjednotek AMPK. Každá podjednotka je kodována jiným genem na jiném chromozomu. Kinázovou aktivitu zajišťuje doména na α podjednotce, naopak podjednotka β zajišťuje vazbu na AMP. Podjednotka β má take vazebné místo pro glykogen a místa pro myristoylizaci. Podjednotka γ se váže na α podjednotku na dvou místech – jedno je v katalytické doméně a jedno poblíž C-konce. Podjednotka γ obsahuje 4 domény pro cystathionine beta-syntházu (CBS) které vždy po dvojicích váží AMP. Na vazebném místě ATP soutěží o vazbu s AMP. ATP má však nižší afinitu než AMP. Navíc vazba molekuly AMP na jednom vazebném místě zvyšuje její afinitu k vazbě na druhém. AMP vznikající z reakcí adenylát kinázy ($ADP + ADP \Rightarrow ATP + AMP$) je vlastně důsledkem zvýšené spotřeby energie buňky se vzestupem ADP jako substrátu pro reakci nebo poklesem ATP při hypoxii apod. (**Winder et Thomson 2007**). Vazba AMP na AMPK γ podjednotce vede ke konformační změně a umožňuje aktivační fosforylaci nadřazeným kinázám-AMPKK, jako je LKB1-STRAD-MO25 nebo CaMKK nebo TAK1. Další nadřazenou kinázou se zdá být katecholaminy regulovaná PKA a ATM aktivovaná pomocí AICAR (**Sun et al. 2007**, **Suzuki et al. 2004**).

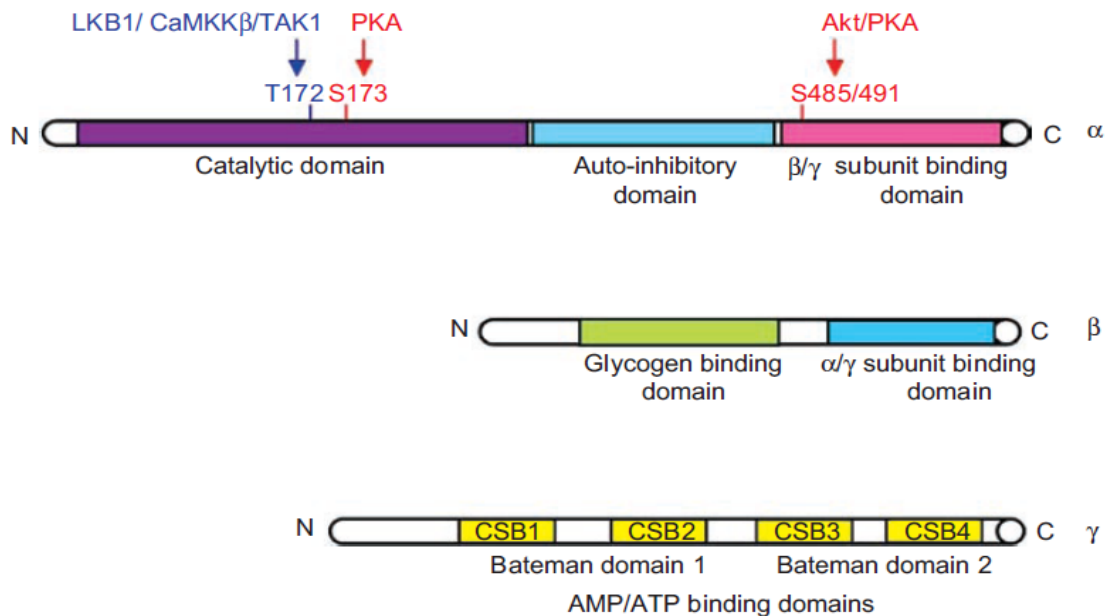
AMPK má mnoho fosforylačních míst, ale pro aktivitu je nutná fosforylace pouze na Thyr 172 místě α podjednotky. Naopak fosforylace na S485 alpha1 podjednotky stejně jako fosforylace na S491 alpha2 podjednotky vede ke snížení aktivity AMPK. Tato místa jsou fosforylována nejen pomocí PKA, jako důsledek katecholaminové aktivace, ale i autofosforylována samotnou AMPK přes PKB/Akt zajišťující tím negativní zpětnou vazbu (**Hurley et al. 2006**). PKB je také prostředníkem insulinem zprostředkovaného snížení aktivity AMPK (**Horman et al. 2006**). Regulace AMPK pomocí nadřazených AMPKK je silnějším stimulem než vliv samotné hladiny AMP v buňce, tím spíše hladiny ATP. Asi poloviční AMPK aktivace nastává při hladině asi 2 μ M AMP, zatímco blokáda AMPK aktivity pomocí ATP se objevuje až u hladiny 4 mM ATP tedy při poměru

AMP/ATP=0,0005 (Stein et al. 2000). Přitom za normálních podmínek je poměr koncentrací AMP/ATP= 0,1-0,3. Na druhou stranu tím, že dojde k vazbě AMP na γ podjednotku AMPK blokuje se současně přístup fosfatáz k inaktivačním místům a zvyšuje se vazba nadřazených kináz jako LKB1. Bylo taktéž prokázáno, že senzorem na hladinu AMP jsou právě spíše nadřazené kinázy, z nichž LKB1-STRAD-MO25 je kromě poklesu ATP a AMP aktivována i fosforylací pomocí PKA a MAPK (v lokusu Ser431) a naopak inaktivována acyl-CoA s mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem, stejně jako ve svalu aktivována fyzickým cvičením (Hutchinson et al. 2005). AMPK je také senzorem pro intracelulární obsah glukózy. Je aktivována při hladině pod 5,5mM glukózy a její aktivita klesá od koncentrace glukózy 5,5 mM po 15 mM (Rutter et al. 2003).

Mechanismus regulace AMPK ukazuje následující schema:



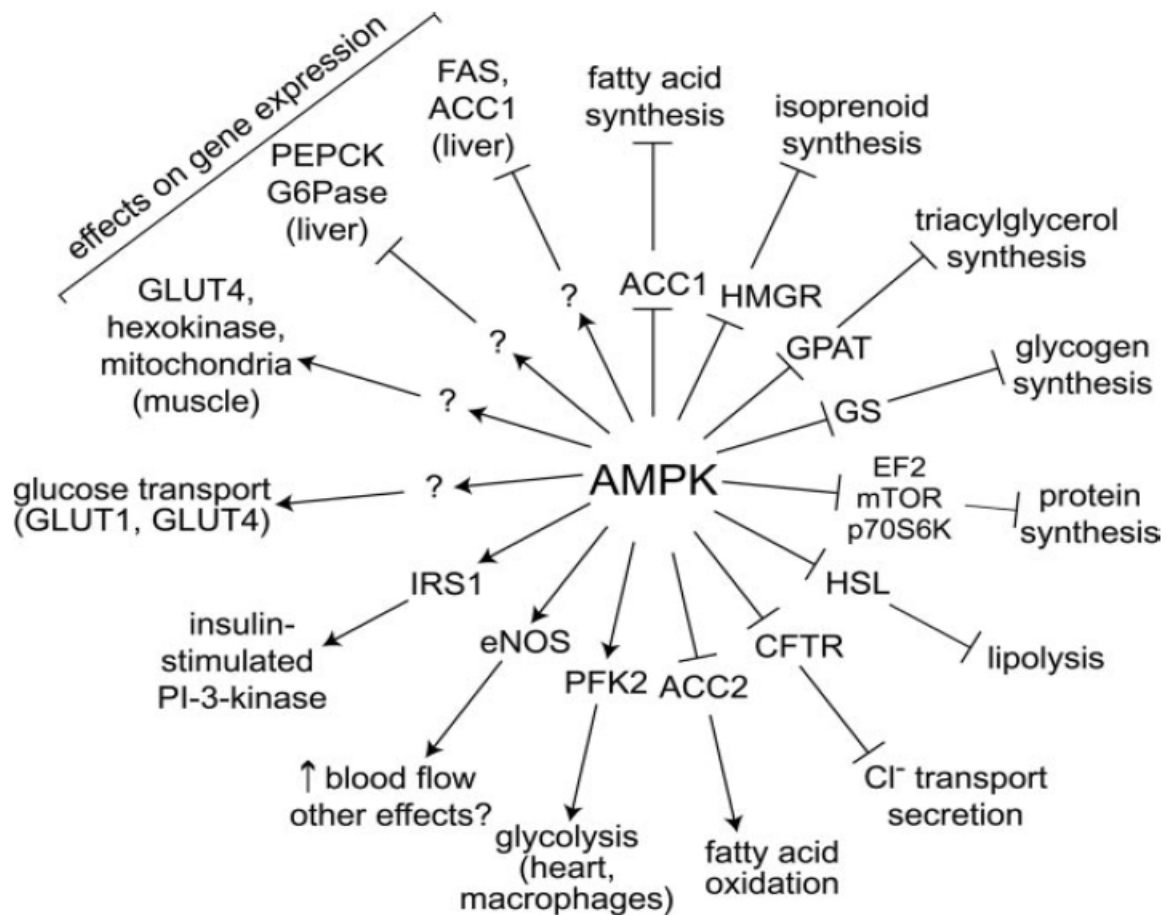
Vazebná místa regulačních nadřazených kináz a dalších regulátorů na AMPK ukazuje následující obrázek:



U člověka se nachází však pouze 3 komplexy podjednotek s následující četností ($\alpha_2\beta_2\gamma_1 \gg \alpha_2\beta_2\gamma_3 = \alpha_1\beta_2\gamma_1$) (Violett et al. 2010)

Podjednotka γ_3 souvisí výrazně s hladinou LDL-cholesterolu a koncentrací apolipoproteinu B100 stejně jako s praediabetickými rysy u metabolického syndromu (Weyrich et al. 2007). Poslední práce z roku 2010 pak nacházejí významnou asociaci mezi podjednotkou α_1 a α_2 s účinností metforminu na léčbu diabetu, stejně jako velmi významnou asociaci diabetu s γ_2 podjednotkou AMPK ($p=0,0001$) (Jablonski et al. 2010). γ_2 podjednotka se zdá být totiž nositelem necitlivosti AMPK na AMP, lze však předpokládat, že její četnost je v populaci velmi nízká. Na fyzické cvičení v rychle se kontrahujících svalových vláknech dochází k aktivaci AMPK hlavně u kombinace $\alpha_2\beta_2\gamma_3$ (Birk and Wojtaszewski 2006). Enzym obsahující α_2 podjednotku se více objevuje v buněčném jádru a tedy nejspíše více ovlivňuje genovou regulaci (Salt et al. 1998).

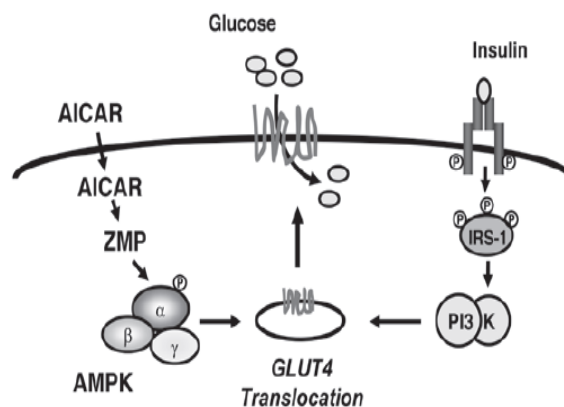
Význam AMPK u obesity a metabolického syndromu: AMPK je zapojena do mnoha metabolických dějů a její význam u metabolického významu je zřejmý z následujícího schématu:



(Hardie 2003)

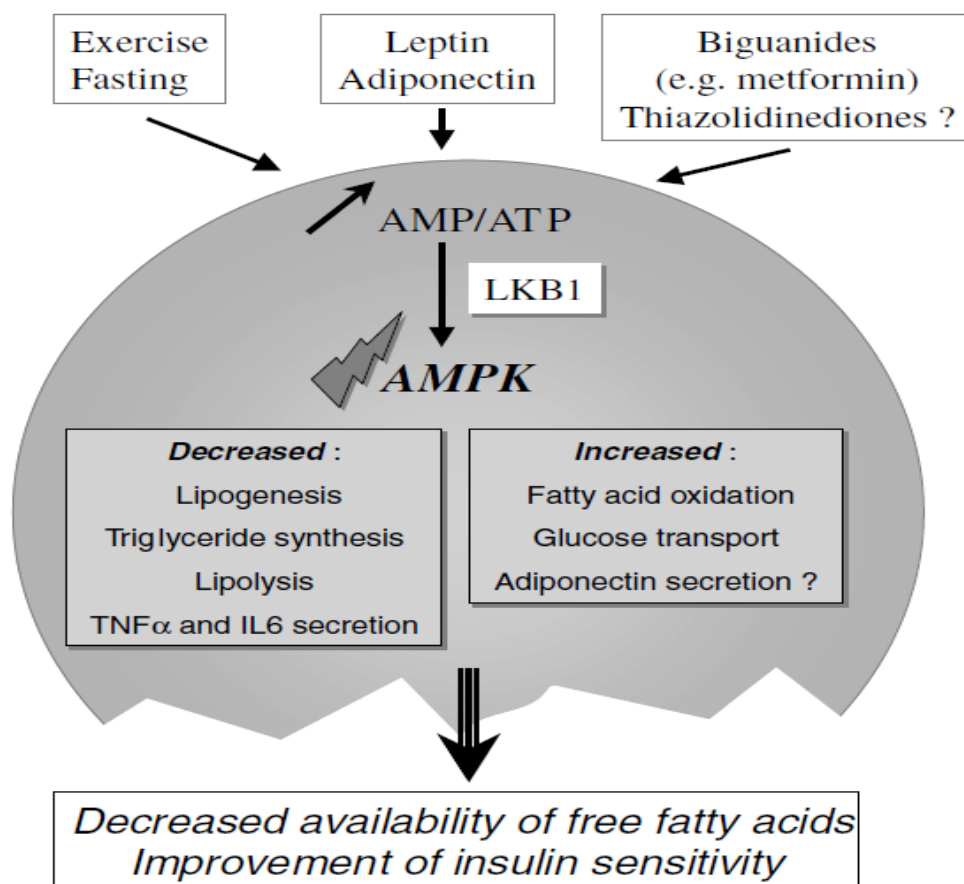
1/ Jedním z předpokládaných mechanismů antidiabetického působení AMPK je zajištění non-insulindependentní translokace

GLUT4 transportéru pro glukozu na povrch svalových buněk, jak ukazuje následující schéma: Zatímco AMPK je aktivováno chemickým ligandem AICAR přeměňujícím se buňce na



ZMP (viz níže) a aktivace AMPK vede k fosforylaci a translokaci GLUT4 transportéru na povrch buňky, tak insulinová signalizační dráha aktivuje IRS-1 a fosforylace GLUT4 je zde zprostředkována PI3-K. (Musí et Goodyear 2006). Katecholaminy jsou ve svalu schopni aktivovat AMPK pomocí α adrenergni mediace (Hutchinson et Bengtsson 2006)

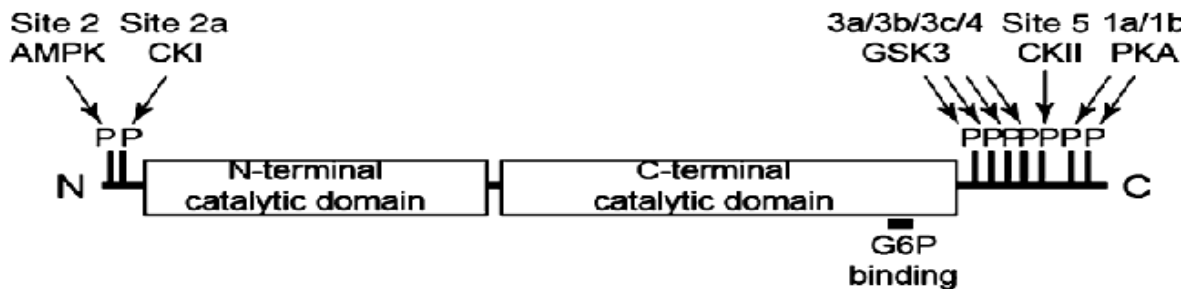
2/ Další mechanismus zlepšení insulinoresistence pomocí aktivace AMPK se předpokládá v tukových buňkách:



Snížením vyplavování volných mastných kyselin z adipocytů se snižuje hlavně insulinoresistence jater. Svou roli hraje i změna exkrece adipokinů, které mají také vliv na insulinoresistenci (Daval et al. 2006). Mechanismus ovlivnění lipolýzy pomocí AMPK je zatím nejasný, jednou z možných variant je AMPK vyvolaná fosforylace eIF2a faktoru ovlivňujícího transkripci genů včetně PPARgamma a HSL (Dagon et al. 2006). Další možností je přímá fosforylační blokáda HSL, což dle některých autorů znemožňuje translokaci HSL do tukové kapénky (Garton et al. 1989).

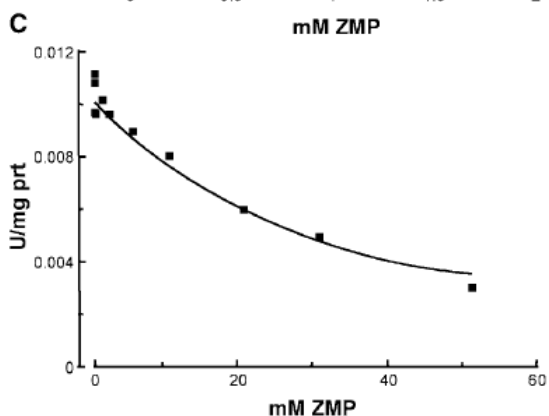
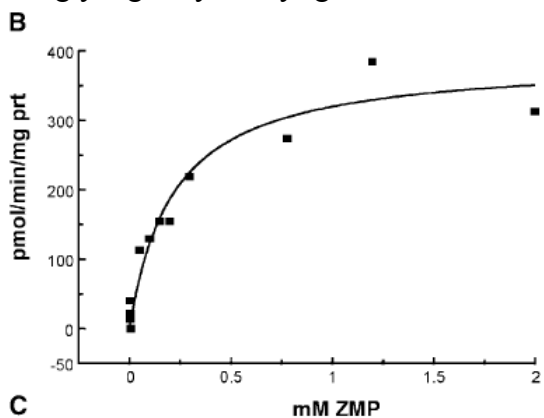
Dále byla prokázána translokace GLUT 4 na povrch 3T3-L1 preadipocytů působením jak AICAR, tak dinitrofenolu- tedy aktivátorů AMPK, která by mohla vést ke zvýšenému příjmu glukózy a v druhé řadě startovat lipogenezi a blokovat lipolýzu (Yamaguchi S et al. 2005).

3/ AMPK v jaterních i svalových buňkách fosforyluje glykogen syntázu a to v N-terminální oblasti (viz schema)

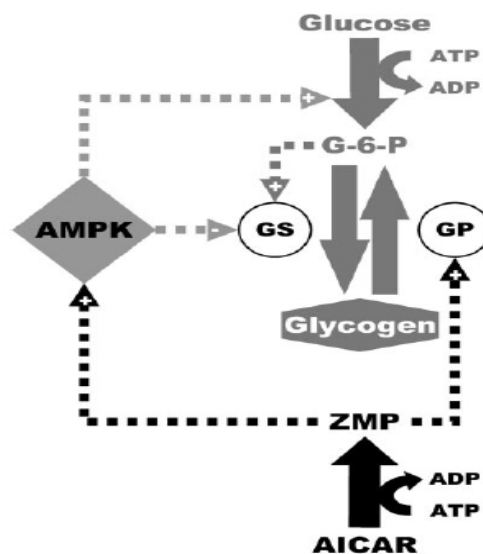


čímž (kromě dalších kináz – CKI, GSK3, CKII a PKA) blokuje tvorbu glykogenu.

Grafy vlevo ukazují, jak AICAR- aktivator AMPK se po přeměně v aktivní metabolit ZMP a po aktivaci AMPK (měřeno v jednotkách pmol/min/mg proteinu)- graf B, sníží aktivitu glykogen syntázy- graf C.



O něco jiná je situace vlivu AICAR na glykogen fosforylázu, kde se předpokládá, že vliv aktivní složky AICAR, tedy ZMP je přímý bez AMPK a aktivace glykogen

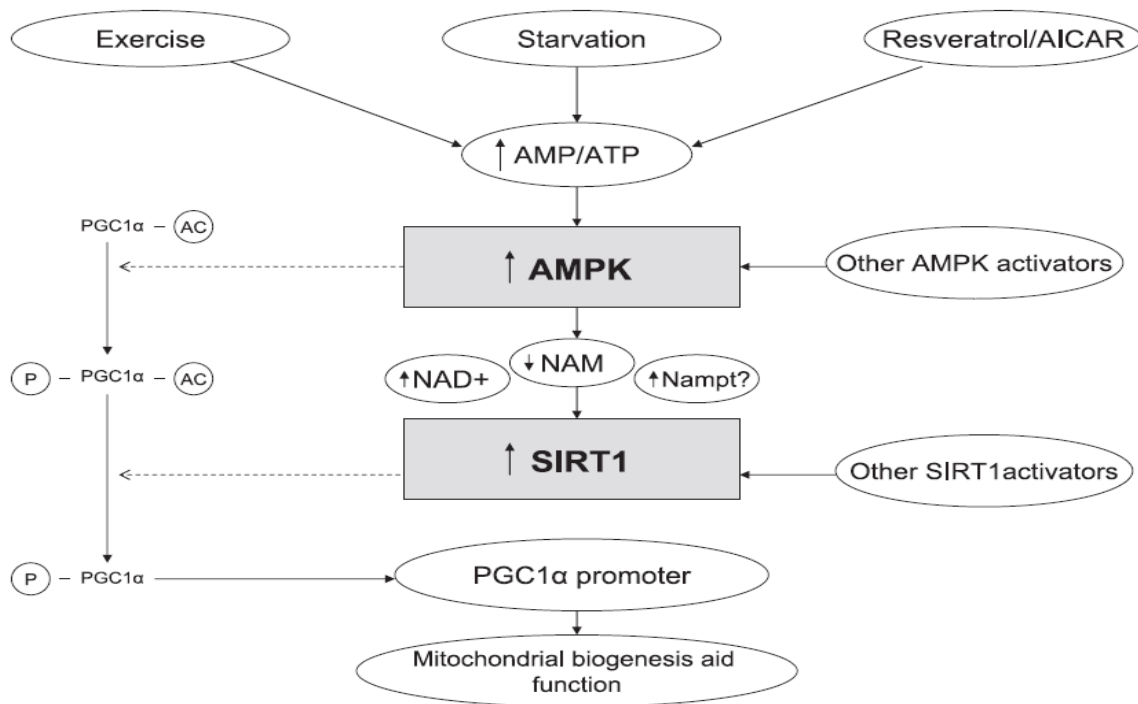


fosforylázy je allosterická a nezávislá na AMPK (viz schéma vpravo uvedené) (Longnus et al. 2003).

Naopak glykogen sám může aktivitu AMPK blokovat a to vazbou na její β podjednotce. A tak v kosterním svalu byla s poklesem glykogenu zaznamenána vyšší aktivace AMPK cvičením, než při normální hladině glykogenu (**Derave et al. 2000, Kawanaka et al. 2000**).

4/ Zatímco AMPK je citlivým monitorem buňky poměru AMP/ATP, detekce oxidačního stavu buňky vyjádřený v NAD/NADH poměru v buňce monitoruje systém silent information regulator T1- SIRT 1. Tyto dva systémy spolu souvisí tak, že AMPK je aktivována pomocí SIRT1 přes aktivaci AMPKK-LKB1(deacetylací pomocí SIRT1, fungující jako

histone/protein deacetyláza, jako např. na LKB1 Lysin K48, dojde k translokaci LKB1 z jádra do cytoplazmy k AMPK) a zas naopak SIRT1 je aktivován AMPK (která aktivační fosforylací nikotinamid phosphoribosyltransferazy (Nampt) zvyšuje hladinu nikotinamidinukleotidu (NAD⁺) přeměnou z nikotinamidu (NAM)). Společnou aktivací tak mohou ovlivňovat výrazně děje závislé na energetickém stavu buňky a přes aktivátor transkripce PGC-1 α , který jsou schopny ve dvou krocích – fosforylace a deacetylace aktivovat, regulovat expresi důležitých genů jak ukazuje následující graf:

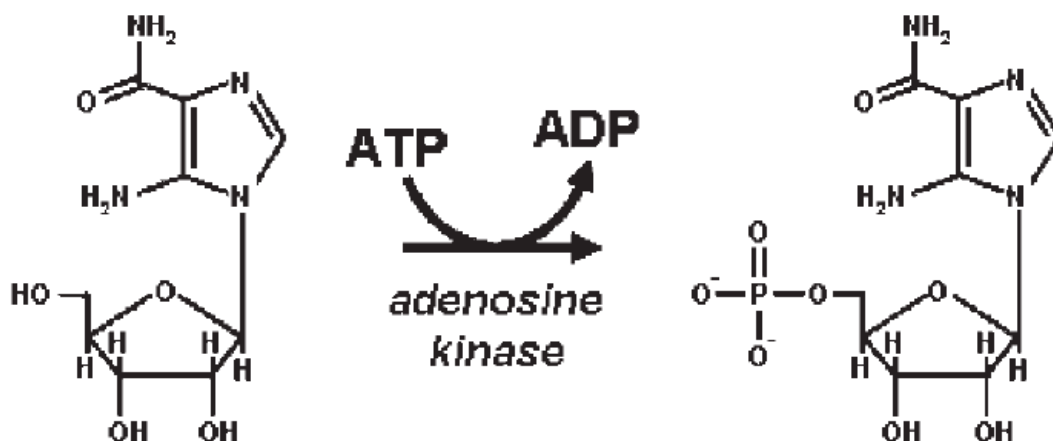


(Ruderman et al. 2010)

6.6.2.1 Aktivátory AMPK

AICAR

Jako nejznámější activator AMPK je znám AICAR. Tato molekula po průniku do buňky je pomocí adenosinkázy přeměněna na ZMP a dale nahrazuje aktivační efekt AMP na jeho vazebném místě na AMPK.



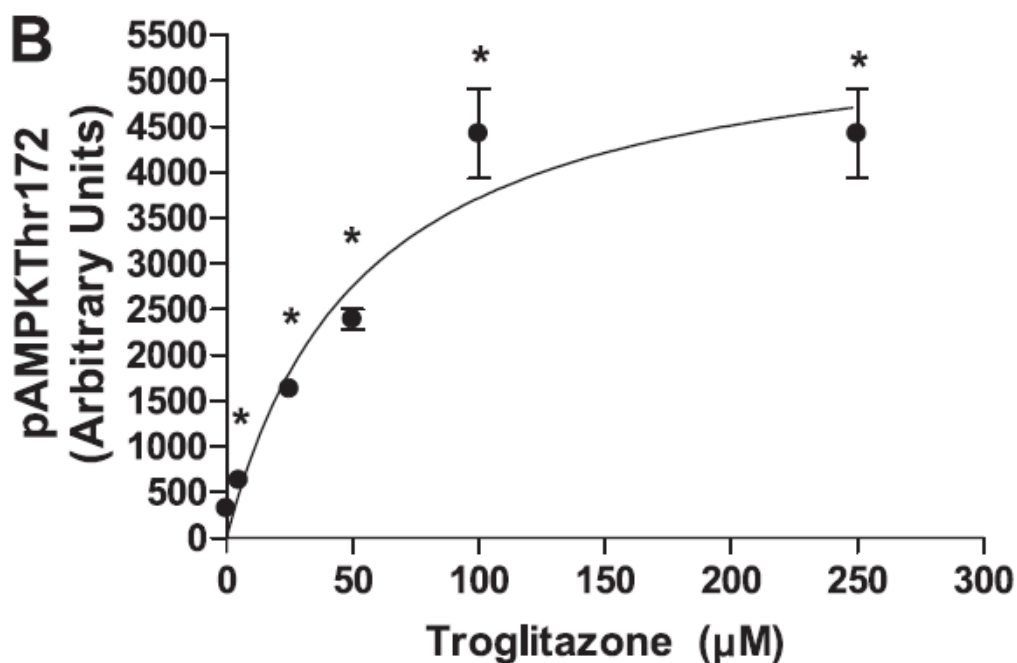
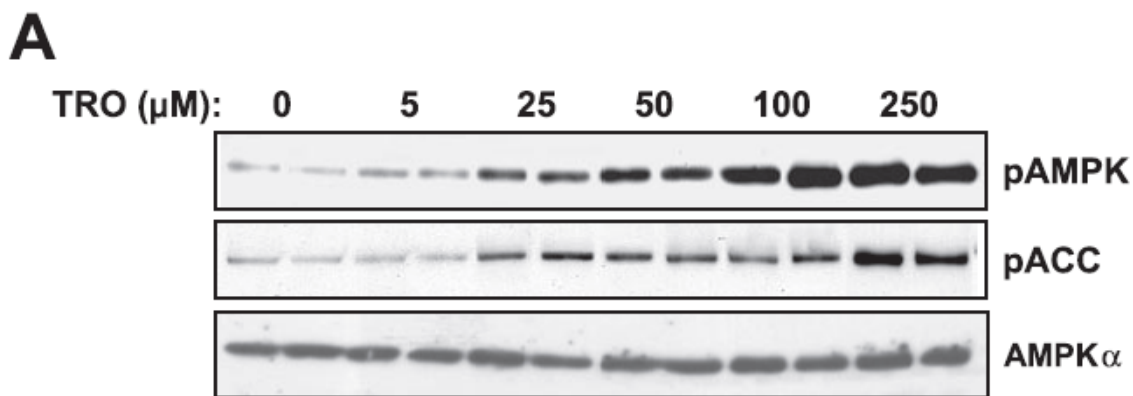
**AICA riboside
(acadesine)**

**AICA ribotide
(ZMP)**

Výsledky působení však částečně mohou jít na vrub vlivu na mitochondriální respiraci, kde AICAR působí snížení respirace a zvýšení AMP. Ačkoliv je AICAR používán jako aktivátor pro studium APMK a je v pokusech na lidech dobře tolerován, je nevhodný pro terapii hlavně v důsledku krátkodobého efektu, nízké biologické dostupnosti a zvýšení hladiny kyseliny mléčné a močové v krvi při jeho užití (Dixon et al. 1991, Leung et al. 1994).

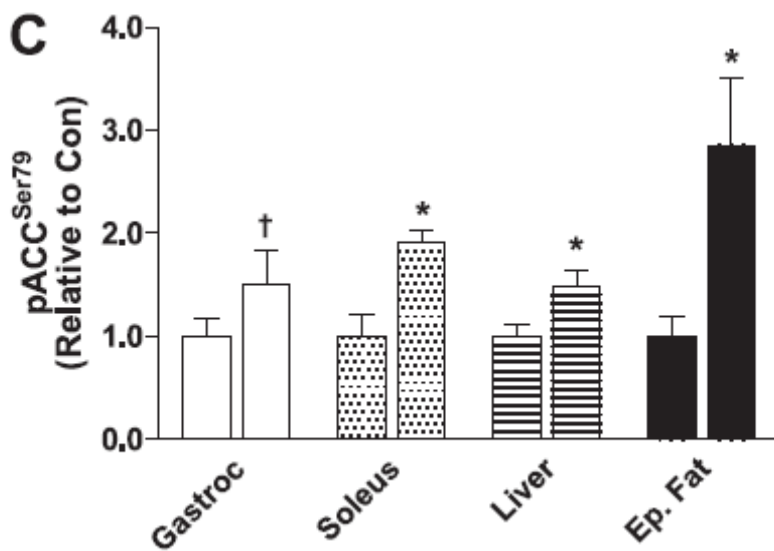
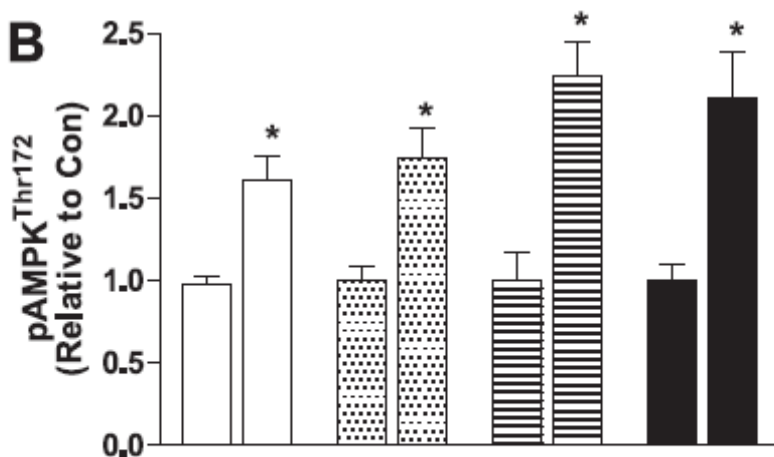
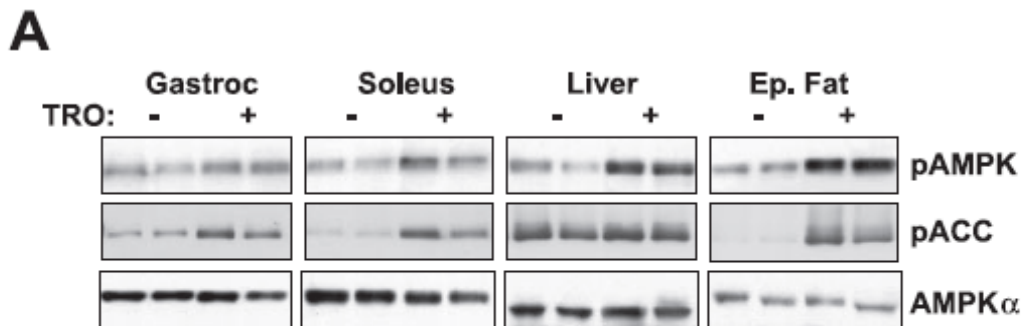
Thiazolidindiony

Jako přímé aktivátory AMPK se zdají podle posledních výzkumů i glitazony-thiazolidindiony, které jsou v současnosti v terapii DM používány. Dle níže uvedených autorů aktivují AMPK příliš rychle, než aby šlo o transkripční děj zprostředkovaný PPAR γ receptorem. Následující grafy ukazují přímou aktivaci AMPK její fosforylací na Thr 172 místě (pAMPK), jasně účinnou od hladiny 20 μ M Troglitazonu (TRO). Současně je zobrazena fosforylace i acetyl-CoA karboxylázy (pACC), která je závislá na AMPK aktivaci.



Graf ukazuje přímý vliv Troglitazonu (TRO) na aktivaci AMPK prostřednictvím fosforylace na Thr172 AMPK α podjednotce (AMPK α). Pokus byl proveden na svalu *musc. extensor digitorum longus* Sprague-Dawley potkana.

Aktivace AMPK prostřednictvím glitazonů se však děje i v jiných tkáních, než jen na svalech, jak ukazují níže uvedené grafy – pokus na *m. gastrocnemius*, *m. soleus*, játrech, a epididymální tukové tkáni v přítomnosti Troglitazonu (TRO) vedoucí k fosforylaci AMPK na Thr172 a následně ACC na Ser 79.



(LeBrasseur et al. 2006)

Grafy jasně ukazují výrazný efekt troglitazonu na fosforylaci AMPK a tudíž její aktivaci právě v epididymální tkáni potkana- **tedy obdobném modelu jako byl použit v naší práci.**

Vzhledem k nulovému efektu PPARgamma antagonisty SR-202 na účinek Troglitazonu v našem experimentu předpokládáme, že AMPK signální dráha může hrát i v našich experimentech svou roli, což je prezentováno v publikaci č.1.

Metformin

Metformin je používán jako antidiabetikum už řadu let. Jeho hlavní antidiabetický efekt je nejspíše zprostředkován bloádou uvolňování glukózy z jater (**Cusi et al. 1996**). Tradovaný efekt na zvýšené vychytávání glukózy v játrech a svalech nebyl i přes 26 týdnů trvající léčbu diabetiků-dobrovolníků pomocí PET detekce s perfuzí [1SF]2-fluoro-2-deoxy-D-glukózy prokázán. Na rozdíl od metforminu stejná léčba s rosiglitzanem sice nevedla k zvýšenému vychytávání glukózy v játrech, ale v jiných orgánech ano ($p < 0.05$). (**Iozzo et al. 2003**). Účinek metforminu na zvyšování insulinové senzitivity je přinejmenším částečně zprostředkován aktivací AMPK, kterou Metformin aktivuje jak v játrech, tak v kosterním svalu. Toto bylo mimo jiné prokázáno i tím, že u myši se specifickým knockoutem AMPKK-LKB1 v játrech dochází k úplnému vymizení efektu metforminu na pokles glykémie (**Shaw et al. 2005**). Mechanismus, jakým metformin snižuje vyplavování glukózy z jater, zůstává přesto nejasný. Buť ve vyšších koncentracích může inhibovat complex 1 cytochromu C elektronového transportu s následným poklesem poměru ATP/AMP a tím aktivovat AMPK (**Owen et al. 2000**). Další práce tuto možnost vylučují a upozorňují na možnost přímé aktivace AMPK metforminem bez změny energetické bilance buňky i bez vlivu na AMPKK (**Hawley et al. 2002**). Jasně je však to, že pokud je již AMPK aktivována, pak ovlivňuje glykogenolýzu, jak již bylo výše zmíněno.

Pro nejasný efekt metforminu na uptake glukózy v tukové tkáni nebyl tento zahrnut do experimentů na adipocytech.

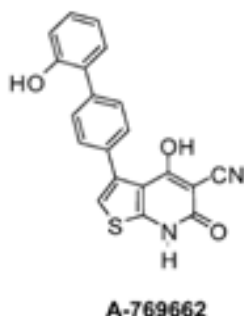
Hormonální a cytokinová regulace AMPK.

Na regulaci AMPK se také podílejí adipokiny a hormony produkované při zánětu a adipocyty. Tak byl popsán vliv adiponektinu na vzestup aktivity AMPK jak v játrech (**Yamauchi et al. 2002**), tak v příčně pruhovaných svalech (**Tomas et al. 2002**). Stejně tak leptin stimuluje AMPK a to jak přechodně přímo, tak α -adrenergním mechanismem. Naopak v hypotalamu efekt leptinu na AMPK je blokující a dle autorů to vede v důsledku k pocitu nasycení. U resistinu byl prokázán inhibiční vliv na AMPK (**Kahn et al 2005**), zatímco Interleukin 6 v tukové tkáni a ve svalech AMPK aktivuje (**Kelly et al. 2004, MacDonald et al. 2003**).

Z druhé strany AMPK je schopna regulovat sekreci adipokinů z tukových buněk a tak zatímco u TNF α a interleukinu 6 byl v důsledku AMPK aktivity zaznamenán pokles sekrece, sekrece adiponectinu působením AICAR aktivátoru AMPK stoupá (**Lihn et al. 2004**).

Katecholaminy a další látky aktivující AMPK

Aktivátorem AMPK jsou také katecholaminy, zvláště pak adrenalin, který je kromě hypoxie a hyperosmolarity hlavním prostředníkem aktivace AMPK při svalové práci. Podání

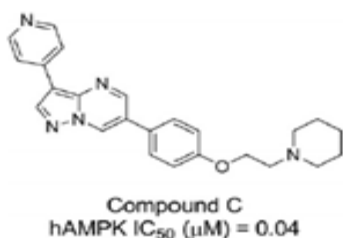


propranololu jako betablokátoru před působením adrenalinu má za následek snížení aktivace $\alpha 1$ a $\alpha 2$ podjednotek AMPK, jakož i snížení lipolýzy epididymální tukové tkáně potkana (**Koh et al. 2007**). Výzkumy z posledních let analyzují i nízkomolekulární látky aktivující AMPK, které mají na rozdíl od AICAR malý efekt na mitochondriální dýchání a nezvyšují AMP. (**Guigas et al. 2009**). Takovým

příkladem je látka A-769662 získaná analýzou vazeb 700000 látek na částečně purifikované jednotky AMPK (**Cool et al. 2006**). Teprve toxikologické studie ukáží, zda bude možné A-769662 používat v humánní medicíně.

6.6.2.2 Blokátory AMPK

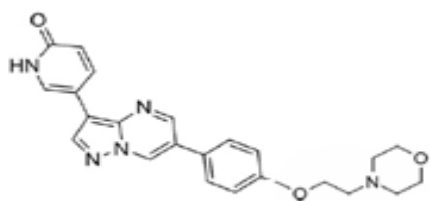
Inaktivace AMPK může probíhat pomocí protein fosfatáz jako je PP2A a PP2C, z nichž PP2C zajišťuje převážnou většinu AMPK dephosphorylace jak v buněčných liniích, tak ve tkáni (**Ingebritsen et al., 1983, Marley et al. 1996**). Proces defosforylace je však ovlivňován hladinou AMP, jehož vazba na AMPK sníží dostupnost fosfátové skupiny pro fosfatázu,



stejně jako zvýší dostupnost AMPK pro nadřazené AMPKK, které jsou konstitutivně aktivní (**Davies et al. 1995**).

V experimentální práci se však využívá prakticky jen specifický blokátor AMPK- Compound C. Jeho IC₅₀ = 0,04 μ M a má dostatečnou specifitu pro AMPK a jeho efekt byl potvrzen v mnoha pracích jak například v mozkové tkáni hlodavců (**Li J. et al. 2007**), tak v jaterní tkáni (**Zhou G et al. 2001**). Přesto poslední práce prokazují i non AMPK dependentní efekt Compound C s možnou bloádou (ERK8), dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinazy (DYRK), phosphorylaza kinazy (PHK), sarcoma

kinazy (Src) a fms-like tyrosine kinazy (Flt) **(Bain et al. 2007)**. To by také mohlo vysvětlovat



reakci některých buněk na Compound C i přes deficitní α podjednotky AMPK **(Emergling et al. 2007)**. Proto jsou vyvíjeny i další specifické blokátory AMPK, z nichž jednou z nadějných molekul je další derivát pyrazolo[1,5-

a]pyrimidinu sice s menší aktivitou ($IC_{50}= 0,06\mu M$), ale

zato nižší účinností i vůči zmíněným alternativním kinázám **(Machrouhi et al. 2010)**.
V našich experimentech jsme využili tudíž Compound C jako zatím nejvíce užívaný selektivní blokátor AMPK s dobrým efektem (viz publikace 1).

6.6.3 β_3 adrenergní receptor

Lidský gen pro β_3 -adrenoceptor se nachází na chromosomu 8p11.1-8p12 **(Nahmias et al. 1991)**. V genové struktuře vykazuje gen β_3 -receptoru více intronů než geny β_1 a β_2 receptorů. Lidský gen pro β_3 -receptor má 2 exony (druhý pouze pro posledních 6 aminokyselin), kdežto gen hlodavce obsahuje 3 exony. Významný rozdíl mezi β_3 , β_1 a β_2 receptorem je u β_3 receptoru neexistující fosforylační místo na krátkém C- úseku, které je u ostatních receptorů fosforylováno pomocí PKA nebo protein kinázou spřaženou s G-proteiny. To částečně vysvětluje absenci downregulace β_3 receptoru a nulovou resistenci i po dlouhodobé aktivaci β_3 -agonistou **(Pietri-Rouxel and Strosberg 1995)**. V roce 1998 byl popsán ještě β_4 receptor, **(Kaumann et al. 1998)**, jehož dalším výzkumem se zjistilo, že se spíše jedná pouze o konformační změnu β_1 adrenergního receptoru se změněnou afinitou k některým ligandům. To potvrdily i experimenty β_1 AR knockoutovaných myší, kde β_4 receptor chyběl také **(Kaumann et al. 2001; Konkar et al. 2000)**.

Míra exprese β_3 receptoru je u člověka mnohem menší než u potkana (cca 5x), přesto mRNA β_3 receptoru je detekovatelná a vyšší u omentálních adipocytů, než u podkožních **(Krief et al. 1993)**. Distribuce ve tkáni se zdá výhodná, neboť nejvyšší koncentrace β_3 agonistů se objevuje v mezenteriální tukové tkáni s adekvátní lipolytickou odpovědí **(Hashimoto et al. 1996)**. Spolu s tím fakt, že lipolýza je ve viscerálních adipocytech 3x více závislá na β receptoru než v subkutánních adipocytech **(Hellmer et al. 1992)** a fakt, že někteří autoři neprokázali β_3 dependentní lipolýzu v podkožním tuku vůbec **(Rosenbaum et al. 1993)**, dělá z β_3 -mimetik potenciálně velmi zajímavé látky k selektivnímu léčení obezity centrálního typu s omezením lipolýzy na viscerální tukovou tkáň mezenteria. Vztah metabolického syndromu a β_3 receptoru podtrhuje i skutečnost, že podle posledních publikací polymorphismus

Trp64Arg β_3 adrenoreceptorového genu snižující jeho aktivitu vede ke zvýšení insulinové resistance (**de Luis et al. 2010**) stejně jako ke snížení lipolýzy u omentálních adipocytů (**Umekawa et al. 1999**) u člověka. Někteří autoři však při experimentu s izolovanými omentálními adipocyty člověka β_3 dependentní lipolýzu neprokázali (**Van Liefde et al. 1994**). U β_3 -agonistů se předpokládá, že mají kromě periferního efektu i centrální efekt na hubnutí. Bylo popsáno, že β_3 agonista BRL-37344 podaný intraperitoneálně (i.p.) jak štíhlým tak obézním Zucker potkanům vedl k poklesu příjmu potravy. Tento indukovaný pokles byl snížen současným podáním propranololu jako β blokátoru do 3. komory mozku a to více u obézních potkanů, než štíhlých nebo po podání i.p. pokud předcházelo aplikaci BRL-37344 i.p. (**Tsujii and Bray 1997**). Centrální efekt β_3 mimetik je u člověka velmi nepravděpodobný, protože měřením exprese nebyla v mozkové tkáni člověka přítomnost mRNA β_3 receptoru prokázána (**Berkowitz et al. 1995**).

Mechanismus periferní lipolýzy v adipocytech je zprostředkován jak zvýšením cAMP v buňce tak u hnědého tuku i nejspíše extracelulární aktivací ERK1/2 fosforylace a aktivací G_s a nikoliv G_i proteinu (**Mizuno et al. 2000**) se spoluúčastní protein kinázy A (**Murphy et al. 1993**). ERK-MAPK signální dráha se podílí na lipolýze významnou měrou (30%) jen u 3T3-L1 preadipocytárních buněčných liniích (**Greenberg et al. 2001**) a nikoliv v bílé tukové tkáni (**Mizuno et al. 2000**).

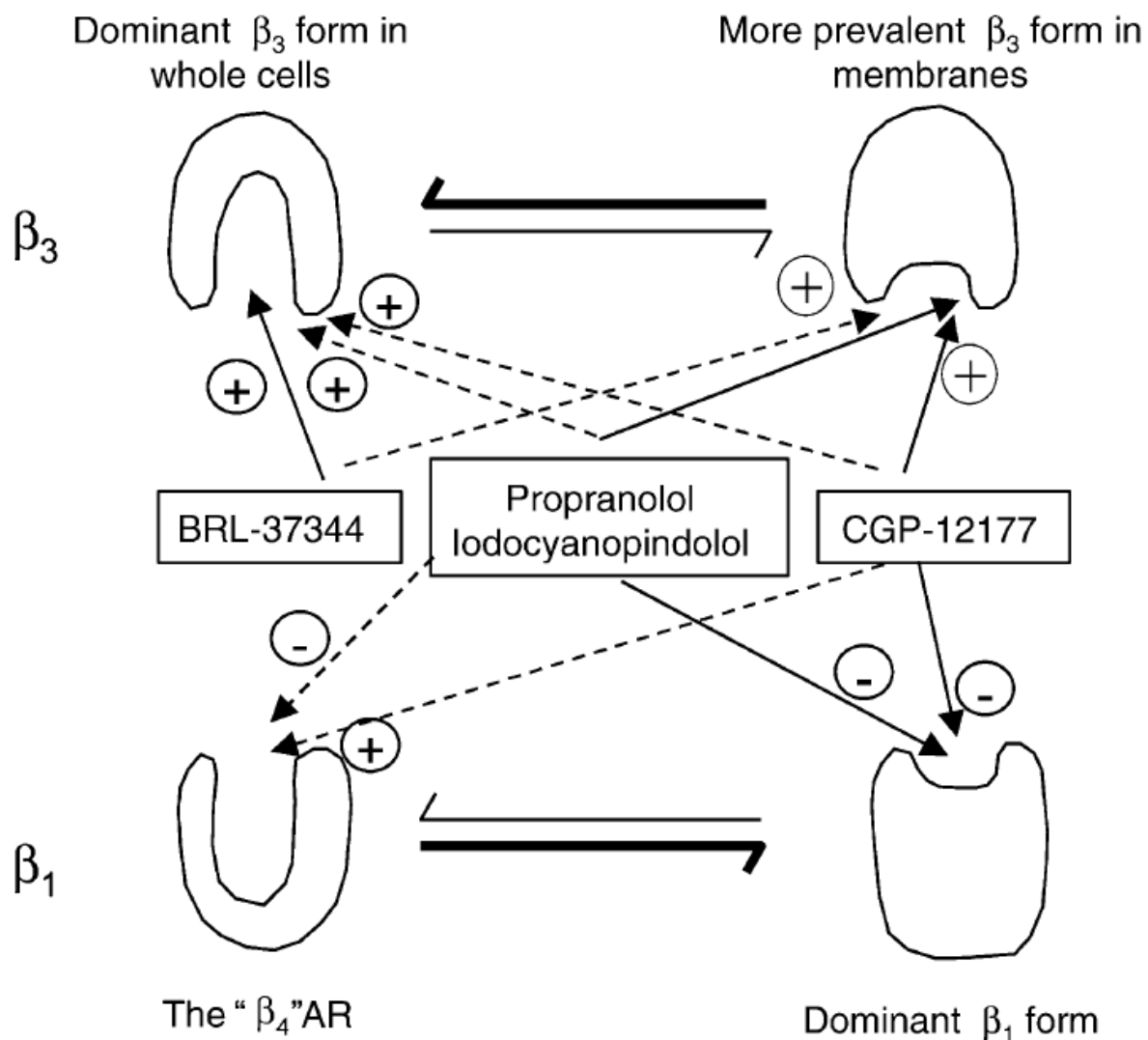
U studií zabývajících se efektem agonistů nebo antagonistů na β -3 adrenergní receptor a potažmo i na lipolýzu je třeba při srovnávání velké opatrnosti, podle toho jestli byly provedeny na membránových modelech nebo na celých buňkách. Podle provedení experimentů se totiž liší i efektivita agonistů a vaznost jednotlivých typů agonistů/antagonistů na receptor, jak ukazuje následující tabulka:

Relative affinities of agonists at human cloned β_3 -adrenoceptors vary with assay

	Function: K_a		Binding: K_i
	cAMP cells	Cyclase membranes	vs. [125 I]ICYP membranes
(–)-Isoprenaline (μ M)	0.014	3.9	30
Relative $K_{a/i}$ values			
(–)-Isoprenaline	(1)	(1)	(1)
(–)-Noradrenaline	7.9	2.4	5.0
BRL-37344	14	0.43	0.22
CGP-12177	101	1.2	0.017
Cyanopindolol	229	1.5	0.0027

A tak zatímco u isoprenalinu vidíme v tabulce až 30x nižší afinitu k receptoru v celých buňkách než na membránovém receptoru, tak agonista CGP-12177 má vazbu 100x vyšší na receptor v experimentu na izolovaných membránových receptorech ve srovnání s receptory v celé buňce.

Tyto rozdíly, jak ve vazbě na receptor, tak v aktivitě na receptoru lze vysvětlit buď odlišným stavem β -receptoru co se týče vazby s příslušným G-proteinem, nebo různým stavem konformace receptoru v jednotlivých pokusech. Dle autorů si lze představit 2 extrémní konformace β receptoru a to jak u β_1 tak u β_3 : Zatímco membránová konformace má větší afinitu k aryloxypropanolaminovým strukturám ať už agonistů (CGP-12177) nebo antagonistů (propranolol, iodocyanopindolol), což se pak odráží i u jejich aktivity na receptoru, konformace vyskytující se na celých buňkách má vyšší afinitu k aryloxypropanolaminovým strukturám (příkladem je agonista BRL37344). Obdobnou situaci si lze představit u β_1 a již zmíněném β_4 receptoru (který se ukázal být jen jiným konformačním stavem β_1 receptoru), jak ukazuje následující diagram. Na diagramu čárkované linie ukazují slabší afinitu ve srovnání s plnými liniemi a značky + / – označují agonisty / antagonisty na příslušném receptoru (Konkar et al. 2000; Arch 2002).



(Arch 2002)

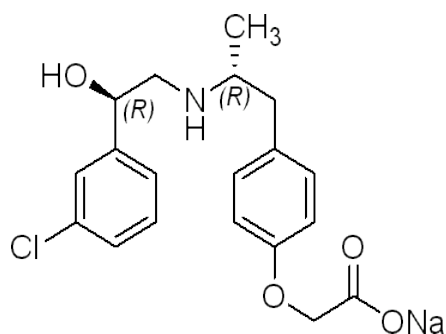
Takový model by vysvětloval mnohé rozporné výsledky experimentů na β_3 adrenergním receptoru.

Srovnáním selektivity a efektu agonistů a antagonistů na β -receptorech ukazuje následující tabulka (afinita je vyjádřena jako pKi a efekt je vyjádřen v procentech aktivace adenylátcyklázy vůči isoprenalinu):

Affinity and efficacy of drugs at β -adrenoceptors

	β_1 -adrenoceptor		β_2 -adrenoceptor		β_3 -adrenoceptor	
	PK _i	Efficacy	PK _i	Efficacy	PK _i	Efficacy
Isoprenaline	-6.61	100	-6.34	100	-5.80	100
Adrenaline	-5.40	133	-6.13	110	-3.90	106
Noradrenaline	-5.45	123	-4.58	103	-5.37	122
Propranolol	-8.75	-35	-9.10	-35	-6.73	-1
Pindolol	-8.59	-25	-8.32	-34	-7.36	13
CGP 12,177	-8.35	-19	-8.37	-32	-7.11	36
BRL 37,344	-4.42	-5	-5.04	-7	-6.37	28
SR 59,230	-7.79	-19	-7.21		-6.91	5
CGP 20,712A	-8.33	-25	-5.39	-30	-5.63	-20
ICI 118,551	-7.31	-22	-9.15	-32	-6.21	-30

(Hoffmann et al. 2004)



Jedním z nejvíce užívaných β_3 agonistů je aryloethanolaminový derivát BRL-37344, který byl použit i v našich experimentech. BRL-37344 je látka s 2 chirálními centry a podává se běžně jako racemická směs RR + SS. Izolace jednotlivých izomerů nevede ani k vyšší selektivitě vůči β_3 receptoru, ani k vyšší účinnosti (k účinnosti

racemátu se nejvíce blíží RR izomer) (Ida et al. 1996). V konkrétním případě účinku na pravou srdeční síň, tracheu a lipolýzu u potkana vypadá selektivita u BRL- 37344 a aktivita u jeho opticky aktivních isomerů následovně:

Agonist activities of racemate or optical isomers of BRL37344 for β -adrenoceptor subtypes

Agonist	Brown adipocyte		Tracheal relaxation (β_2)		Selectivity for lipolysis over:	
	lipolysis (β_3)	Right atrial rate (β_1)			Atria	Trachea
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)			
(RR + SS)BRL37344	5.3	570	18		110	3.4
(RR)BRL37344	2.6	240	8.0		92	3.1
(SS)BRL37344	>1,000	>10,000	>10,000			
(SR)BRL37344	2,500	>10,000	>1,000			
(RS)BRL37344	>300	>10,000	>300			

Přímo ve tkáni ještě dochází u části molekul k inverznímu zvratu z RR na RS izomer, tedy částečně (dle tabulky 60- 120 násobně) ztrátě lipolytické aktivity. (**zkráceno a upravno dle Ida K. et al. 1996**).

Ačkoliv β_3 receptor je schopen reagovat následnou produkcí cAMP jako druhého posla na různé agonisty, aktivace G_s proteinů a schopnost aktivovat ERK/MAPK dráhu se u jednotlivých agonistů β_3 liší, jak ukazuje následující tabulka:

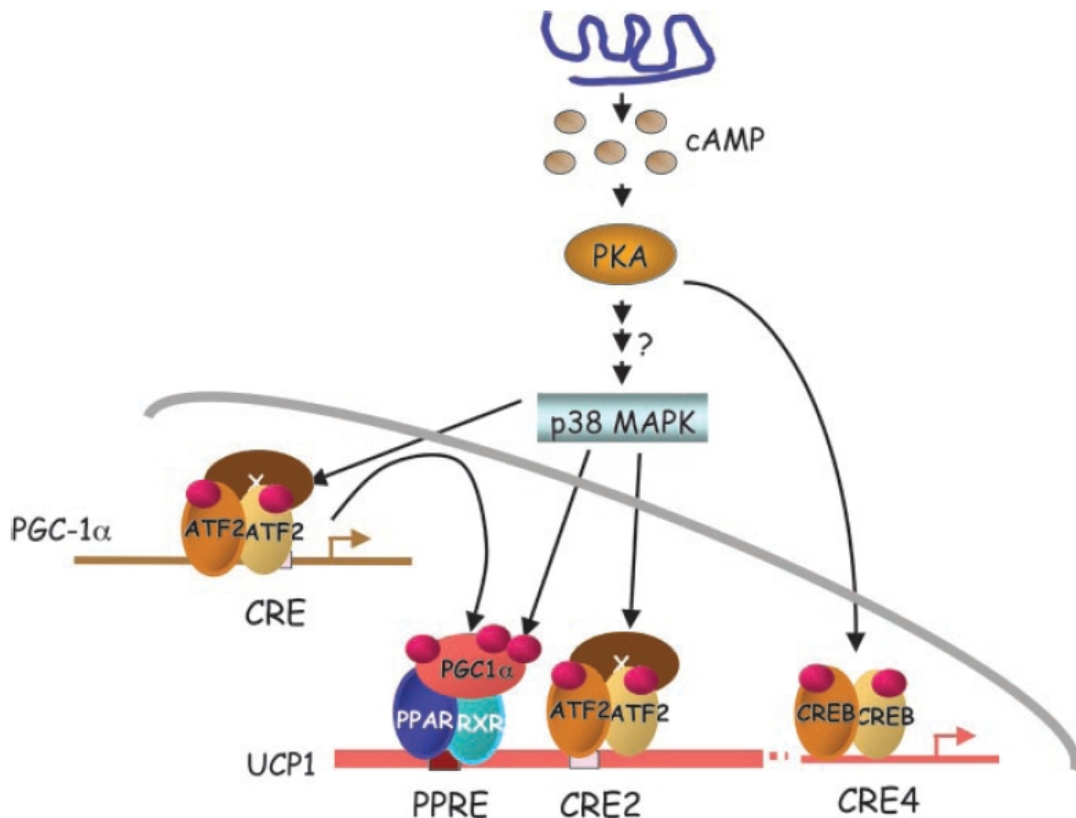
Effect of beta-AR ligands on human beta-3 AR-mediated activation of ERK and accumulation of cAMP

Ligand	ERK			cAMP	
	EC ₅₀	I.A.	Fold/Basal	EC ₅₀	I.A.
	nM			nM	
Isoproterenol	5 ± 2	1	2.1 ± 0.3	1 ± 1	1
Epinephrine	17 ± 7	1.5	3.2 ± 0.1	121 ± 19	0.8
Carazolol	23 ± 7	1.2	2.7 ± 0.2	6 ± 3	1.2
CL 316,243	96 ± 7	0.8	1.8 ± 0.1	87 ± 15	0.9
Norepinephrine	120 ± 4	0.9	2.0 ± 0.2	7 ± 1	0.9
CGP 12177A	121 ± 20	0.8	1.8 ± 0.1	4 ± 1	0.7
BRL 37344		Antagonist	1.2 ± 0.5	13 ± 2	1.1
Propranolol		Antagonist	1.0 ± 0.5	447 ± 24	0.4
Bupranolol		Antagonist	0.9 ± 0.4		Antagonist
Serum			7.0 ± 1.0		

Srovnáním vnitřní aktivity (I.A.) a EC50 je zřejmé, že BRL-34377 je spíše antagonistou než agonistou ERK, zatímco na produkci cAMP má obvyklý agonistický vliv (**tabulka upravena- zkrácena z Gerhardt et al. 1999**).

Liší se také v různých adipocytech, neboť výše popsáný β_3 agonista BRL-37344, který má dle tabulky antagonistický efekt na ERK1/2 u humánních β -3 receptorů se naopak u 3T3-L1 preadipocytů projevuje jako ERK1/2 agonista a v koncentraci kolem

1 μM 6-10x zvyšuje ERK fosforylaci (**Mizuno et al. 2000**). Podle stejných autorů ERK1/2 fosforylace nemá u bílého tuku člověka na lipolýzu vůbec vliv (**Mizuno et al. 1999**), může však ovlivnit transkripci různých aktivních proteinů. β_3 receptor může v tukové tkáni nejen působit lipolýzu, ale i indukovat expresi UCP, jak dokládá obrázek. To se děje prostřednictvím PKA a MAPK:

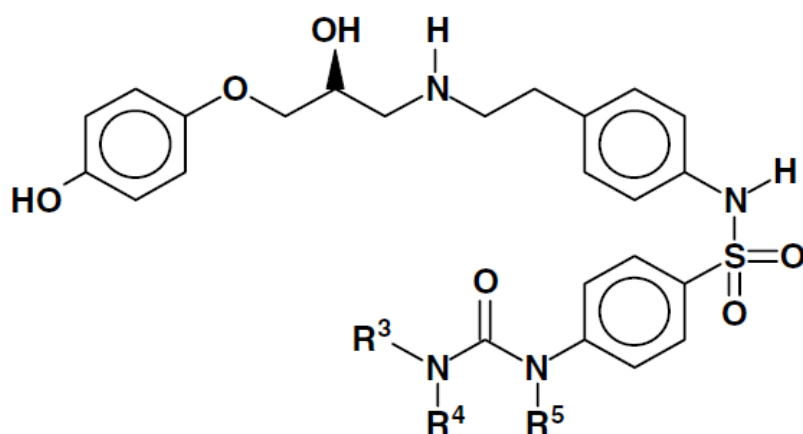


Taková indukce UCP1 byla dokumentována jen u hnědé tukové tkáně, která v dospělosti člověka nepředstavuje zásadní část tuku a její objem je v celkovém objemu tuku u dospělého člověka zanedbatelný. Tomu i odpovídá předpokládaná termogeneze u člověka závislá na hnědém tuku v optimistickém pohledu dosahující maximálně 4-7%, kdežto isoprenalinem zvýšený metabolický obrat dosahuje vzestupu až o 30% a nelze tudíž jeho efekt na termogenezi vysvětlovat jen působením na hnědou tukovou tkáň. Existují studie, které dokazují, že β_3 selektivní agonista (s β_1 a β_2 antagonistickým efektem) může vést k významnému vzestupu energetického obratu u člověka (**Arch 2001**).

BRL-37344 vede zároveň ke zvýšení vychytávání a oxidace glukózy v příčně pruhovaném svalu a toto je zprostředkováno proteinkinázou C přes předpokládaný poněkud odlišný receptor β_{skel} . (**Board et al. 2000**).

BRL-37344 byl použit i v naší experimentální práci s adipocyty jako β_3 selektivní agonista. Publikace 1.

Budoucnost výzkumu β_3 agonistů se zaměřuje na hledání selektivnějších a přitom velmi aktivních ligandů β_3 receptoru a to jak proto, že ovlivění β_1 a β_2 receptoru by mělo závažné nežádoucí účinky, tak proto, že hustota β_3 receptoru je v lidské tukové tkáni nízká. Výzkum provázejí komplikace v podobě nízké biologické dostupnosti některých preparátů nebo nedostatečné β_3 selektivity ve tkáni na rozdíl od buněčných linií (**Mathvink et al. 2000, Joseph et al. 2003**)



Jednou z perspektivních molekul se dle některých týmů zdá být derivát sulfonamidů, u něhož substituent na R3- N-hexan, R4, R5 bez substituentu (proton-H) má EC 50 až 0,43nM.

Pro vazbu na receptor se zdá být dle vazebných studií a QSAR modelování rozhodující jak iontová vazba v místě BS1 biofarmakoforu s Aspartátem 117 receptoru, tak další biofarmakoforové skupiny BS2- π elektrony aromatického jádra. Optimální vzdálenost BS1 a BS2 je 5,4 Ångströmů, další farmakoforová místa molekuly je ss3 a ss4 hydrofobní části a dále Brønstedova baze- akceptoru protonu na sulfonamidové skupině ss2.

další složku metabolického syndromu-hypertenzi, zahrnuli jsme do svých pozorování jak lipolytickou odpověď na stimulaci β_3 a PPAR γ agonisty, tak odpověď v podobě produkce NO a exprese iNOS. Navíc molekula NO působí i jako scavenger kyslíkových radikálů a tím ovlivňuje i spoustu dalších oxidačně redukčních dějů v buňce včetně fosforylačních dějů.

V první části naší práce jsme se proto zaměřili na vzájemné ovlivnění dvou výše uvedených signalizačních, pro viscerální adipocyty svým způsobem specifických, farmakologických cílů.

Snažili jsme se odpovědět na následující otázky:

- 1/ Ovlivňují se vzájemně signální dráhy závislé na glitazonech (deklarovaných jako PPAR γ specifictí agonisté) a β_3 adrenergních agonistech v účinku na lipolýzu?
- 2/ Ovlivňují se vzájemně signální dráhy závislé na glitazonech a β_3 adrenergních agonistech v účinku na NO produkci a iNOS expresi?

Významnou roli v metabolickém syndromu hraje ovlivnění glykemie. Kromě pomalého kolísání hladiny glykemie při svalové práci a příjmu potravy je nejsilnějším a nejrychlejším aktivátorem hyperglykemie jaterní glykogenolýza. V druhé části naší práce jsme se proto zaměřili na glykogenolýzu v jaterních buňkách bohatých na glykogen s cílem ověřit působení adrenergních agonistů na glykogenolýzu ve srovnání s glukagonem jako standartním glykogenolytickým agens. Jako v přechodí části jsme zahrnuli ovlivnění produkce NO a exprese iNOS těmito látkami v jaterních buňkách.

Snažili jsme se ve své práci odpovědět na následující otázky:

- 1/ Jaké látky s adrenergním účinkem mají větší vliv na jaterní glykogenolýzu v glykogen bohatých potkaních hepatocytech- β_1 nebo α_1 adrenergní agonisté?
- 2/ Jaký je vliv těchto látek na produkci NO a expresi iNOS a koreluje tento vliv s glykogenolýzou?
- 3/ Jaký vliv má stimulace nebo blokáda produkce NO naopak na glykogenolýzu?

Z úvodu této práce je patrné, že podobné pokusy byly prováděny na jiných buněčných modelech nebo buněčných liniích, dle našich dostupných zdrojů, nebyly do té doby provedeny pokusy stejného typu na primárních kulturách potkaních epididymálních adipocytů

a primárních kulturách potkaních hepatocytů bohatých na glykogen. Taktéž nebyla provedena korelace s NO produkcí a iNOS expresí na těchto kulturách ani použit za stejným účelem PPAR γ blokátor SR-202. Z předchozího úvodu také vyplývá, že nelze aproximovat vlastnosti jednoho typu buněčných linií na druhý (například účinek adrenergických látek na 3T3-L1 preadipocytech na kulturu primárně izolovaných adipocytů) a tudíž nezbývá, než podobné pokusy provést v různých modelových situacích a tím se teprve přiblížit k patofyziologickým podmínkám lidského organismu při obezitě a metabolickém syndromu.

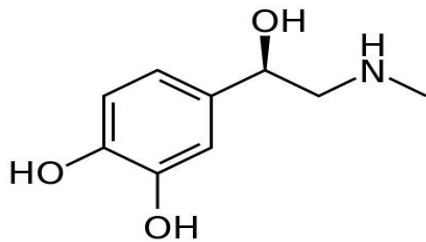
I když si naše práce jistě nekladla za cíl objevit mechanismus účinku nových léčiv pro léčbu obezity a metabolického syndromu, svými výsledky může prospět na dlouhé cestě k hledání nových cílových struktur a signalizačních drah pro taková léčiva.

7. Používané metody a experimentální modely v mé práci

Na tomto místě jsou zmíněny obecné principy metodiky práce, konkrétní postupy jsou zmíněny v jednotlivých publikacích včetně uspořádání jednotlivých pokusů.

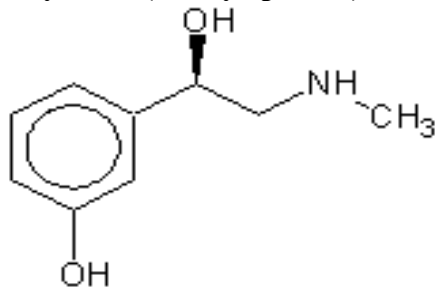
7.1 Použité chemikálie coby farmakologicky účinné látky

Adrenalin (Epinephrine)



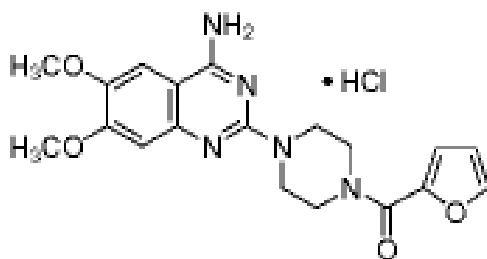
Chemický název: 4-[1-Hydroxy-2-(methylamino)ethyl]-1,2-benzenediol

Fenylefrin (Phenylephrine)



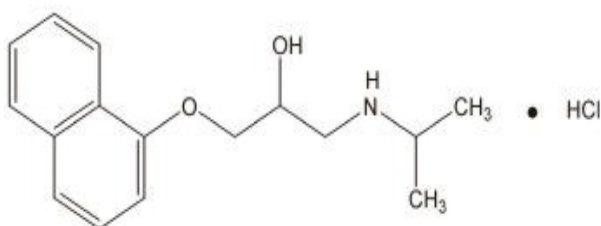
Chemický název: (*R*)-(-)-1-(3-Hydroxyphenyl)-2-methylaminoethanol hydrochloride

Prazocin



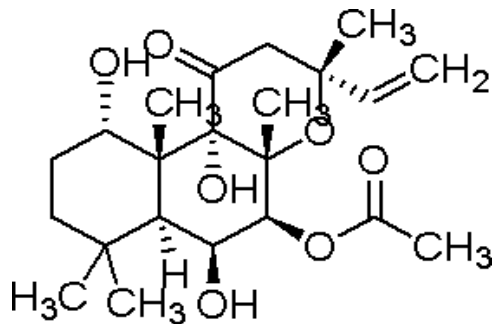
Chemický název : 1-(4-Amino-6,7-dimethoxy-2-quinazolinyl)-4-(2-furanylcarbonyl)piperazine hydrochloride

Propranolol



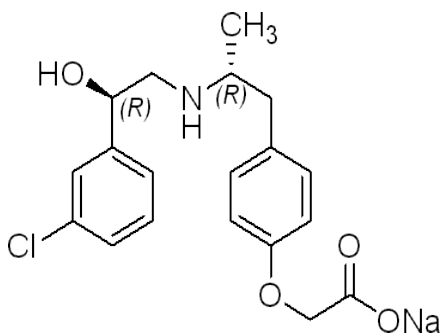
Chemický název: +/- 1-isopropylamino-3-(1-naphthyloxy)-2- propranolon hydrochloride

Foskolin



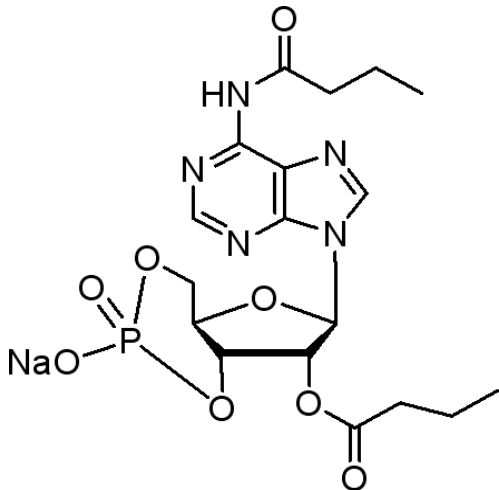
Chemický název: 7β-Acetoxy-8,13-epoxy-1α,6β,9α-trihydroxylabd-14-en-11-one

BRL-37344- selektivní β₃ – adrenergní agonista



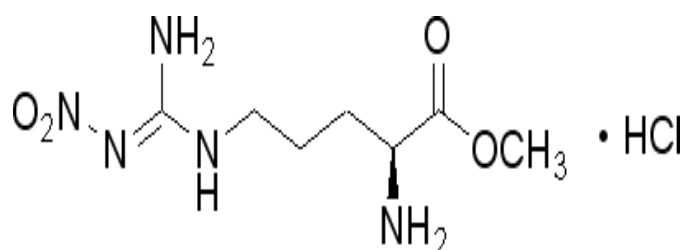
Chemický název: (±)-(R*,R*)-[4-[2-[[2-(3-Chlorophenyl)-2-hydroxyethyl] amino] propyl] phenoxy] acetic acid sodium

Db-cAMP



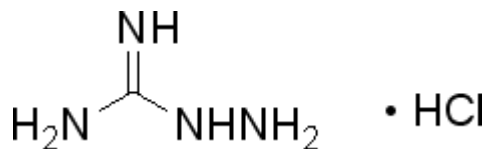
Chemický název: dibutyryl cAMP sodium salt

L-NAME



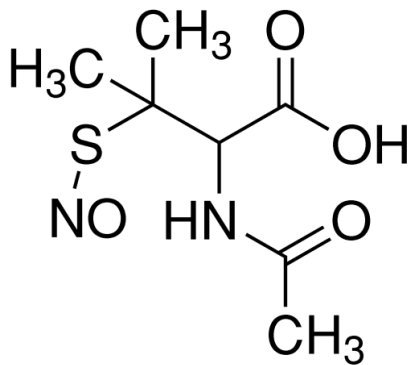
Chemický název: Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride

Aminoguanidin



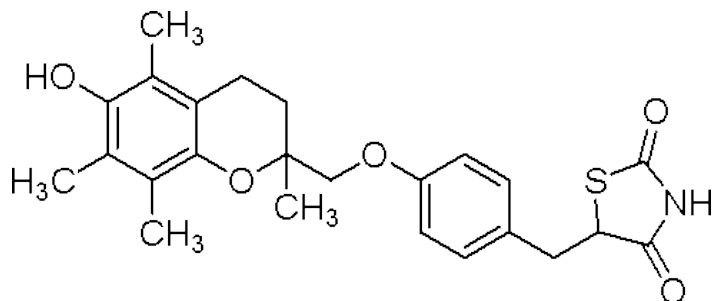
Chemický název: Aminoguanidine hydrochloride

SNAP



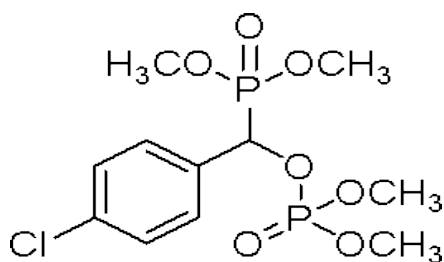
Chemický název: S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine

Troglitazon – selektivní PPAR γ agonista



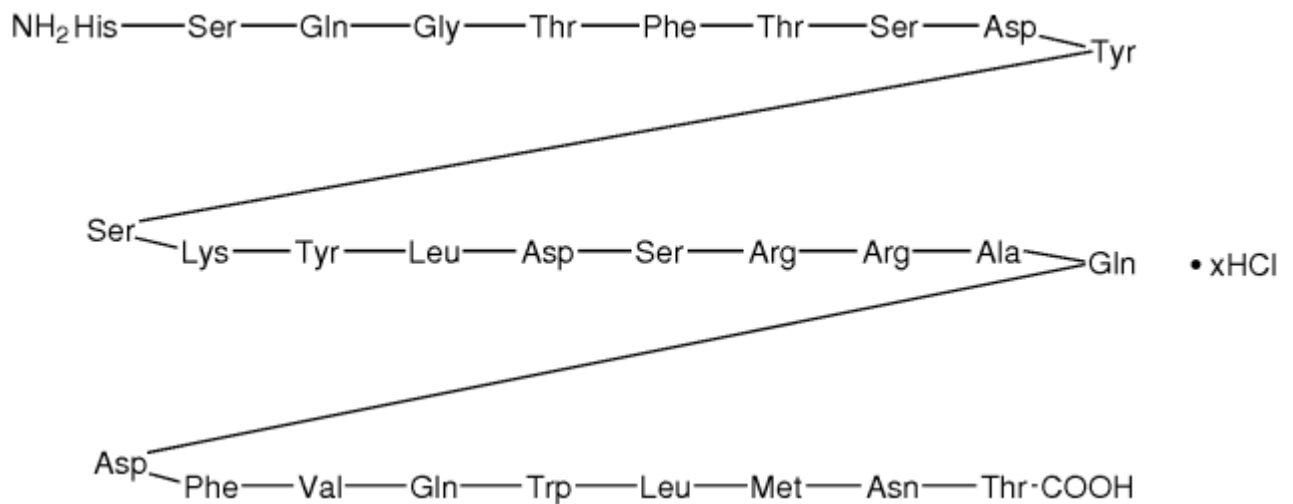
Chemický název: (\pm)-5-[4-[(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methoxy]benzyl]-2,4-thiazolidinedione

SR-202- selektivní blokátor PPAR γ



Chemický název: Dimethyl (α -dimethoxyphosphinyl-p-chlorobenzyl) phosphate

Glucagon:



Dále byla použita činidla na detekci a další chemikálie: sulfanylová kyselina, N-(1-Naphtyl)ethylendiamine, Dihydrochloride, dimethyl sulfoxid (DMSO) a další byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Praha).

7.2 Použitá laboratorní zvířata:

V pokusech byli použiti samci laboratorního potkana kmene Wistar od dodavatele Velaz sro. Únětice 139, Praha -západ. Byli zakoupeni v hmotnostním rozpětí mezi 150 a 300g a ve stáří 7-12 týdnů. Dříve než byla zvířata zařazena do pokusu, byla aklimatizována 7 dní a po celou dobu chována v zvířetníku Farmakologického ústavu 1.LF UK. Podmínky chovu byly udržovány při regulované stálé teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a relativní vlhkosti vzduchu $50 \pm 10\%$ a při 12 hodinovém cyklu střídání světla a tmy. Po celou dobu měla zvířata přístup k granulované standardní stravě a přístup k vodě ad libitum. 8-12 hodin před samotným experimentem byla zvířatům odejmuta tuhá strava.

Celkově chov probíhal ve shodě s Vyhláškou ministerstva zemědělství č 311/1997 Sb: O chovu a využití pokusných zvířat. Protokoly chovu zvířat byly ve shodě s schválením Odborné komise pro práci s pokusnými zvířaty 1.LF UK podle zákona ČNR č. 246/1992, na ochranu zvířat proti týrání, v platném znění.

7.3 Metodika izolace a kultivace adipocytů

Po usmrcení zvířat dislokací krční míchy za CO₂ anestezie, byla epididymální tkáň rozstříhána a inkubována 1 hod v roztoku KRB pufru (Krebs-Ringer-bicarbonate buffer, pH 7.4) s kolagenázou (2mg/2g tukové tkáně), následně byly vzniklé buňky protlačeny skrze nylonovou síťku s 500 μm velkými póry a 3x propláchnuty roztokem pufru KRP (136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM MgSO₄, 1.25 mM CaCl₂, 5 mM Na₃PO₄, 2 mM NaHCO₃, 25 mM HEPES pH 7.4). Takto homogenizované adipocyty byly inkubovány v 35-mm Petriho misce a udržovány při teplotě 37°C, ve směsi 95% vzduchu a 5% CO₂ v Dulbeccově modifikovaném Eagle's mediu s přidáním směsi gentamicinu a penicilinu a to po dobu 1, 2, 6, 12, 24 hodin podle probíhajících pokusů.

7.4 Metodika izolace a kultivace hepatocytů

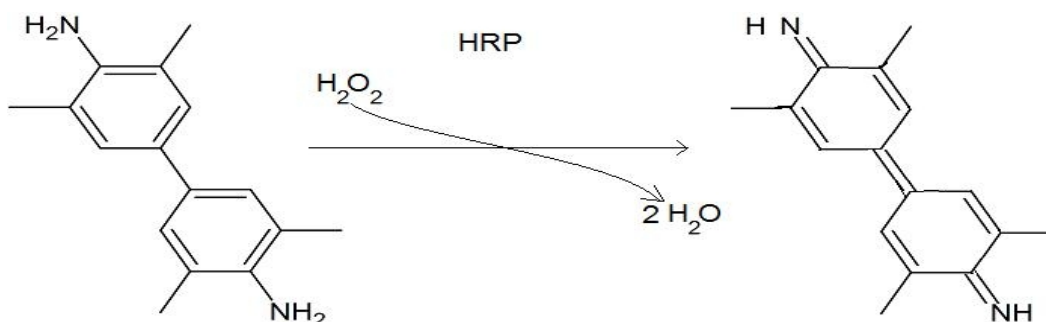
Hepatocyty byly izolovány z potkaních jater standardní dvou-fázovou metodou kolagenázové perfúze, kdy kolagenáza byla přidána v druhé fázi- tak jak bylo popsáno dříve (**Farghali et al 1994**). Po izolaci, byla zhodnocena buněčná životnost trypanovou modří.

Příprava buněk bohatých na glykogen:

Podle publikované metody dle Shiroyamy byly hepatocyty v množství 1.5×10⁶ umístěny na 35-mm Petriho misku potaženou kolagenem a udržovány při teplotě 37°C, ve směsi 95% vzduchu a 5% CO₂ ve Williamsově mediu E s přidáním gentamicinu, L-glutamine 10 mM HEPES, 6% fetálního bovinního séra, 10⁻⁷ M insulínu a 20 mM glukózy. Vysoký obsah glykogenu byl potvrzen jak biochemicky, tak histochemicky (**Shiroyama et al. 1998**).

7.5 Metodiky detekce

Resistin- hladiny byly měřeny ELISA metodou -kitem od firmy Bio Vendor založené na reakci tetramethyl benzidinu s křenovou peroxidázou ve vazbě na streptavidinový komplex:

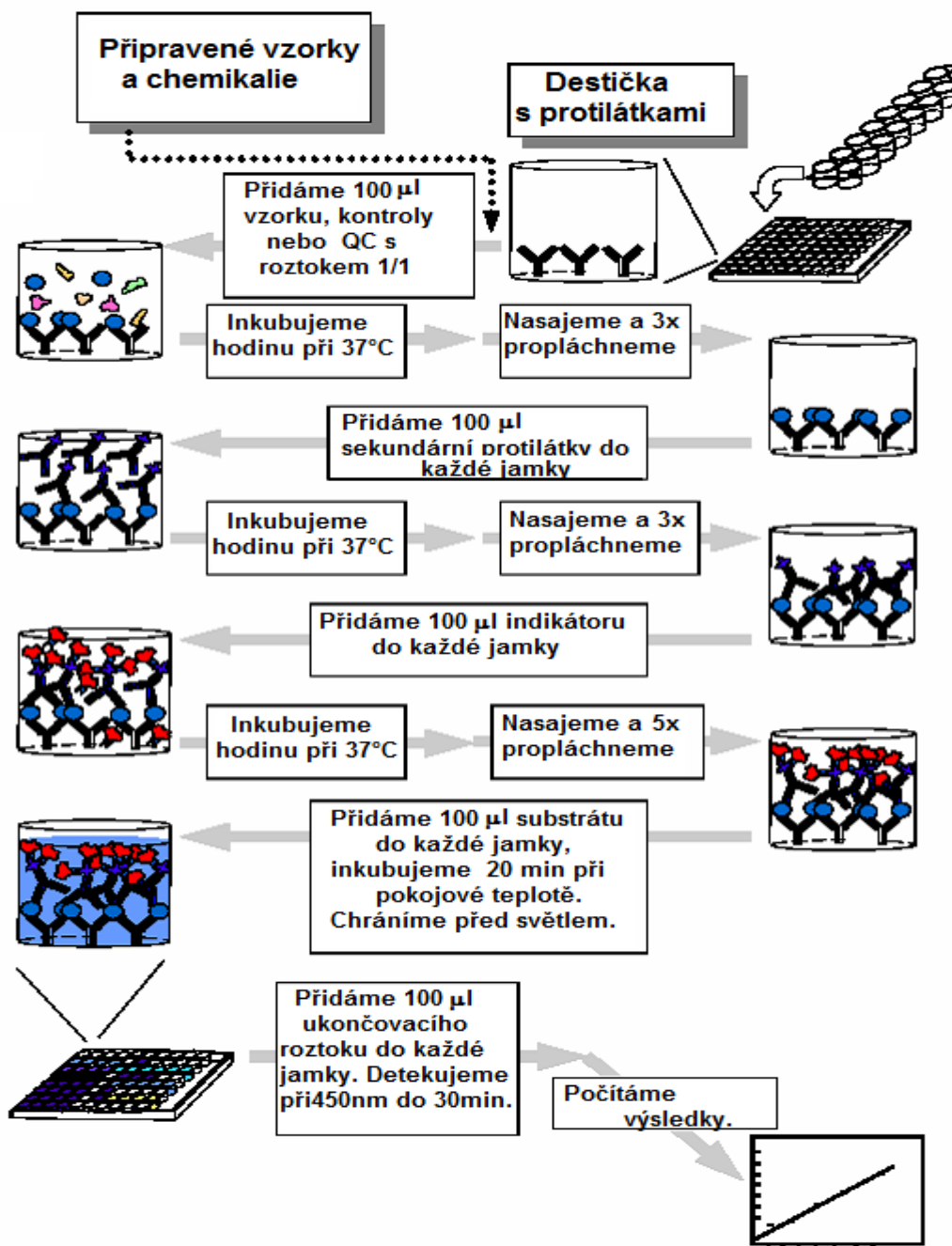


Vzniklá sloučenina absorbuje světelné záření při vlnové délce 285 nm.

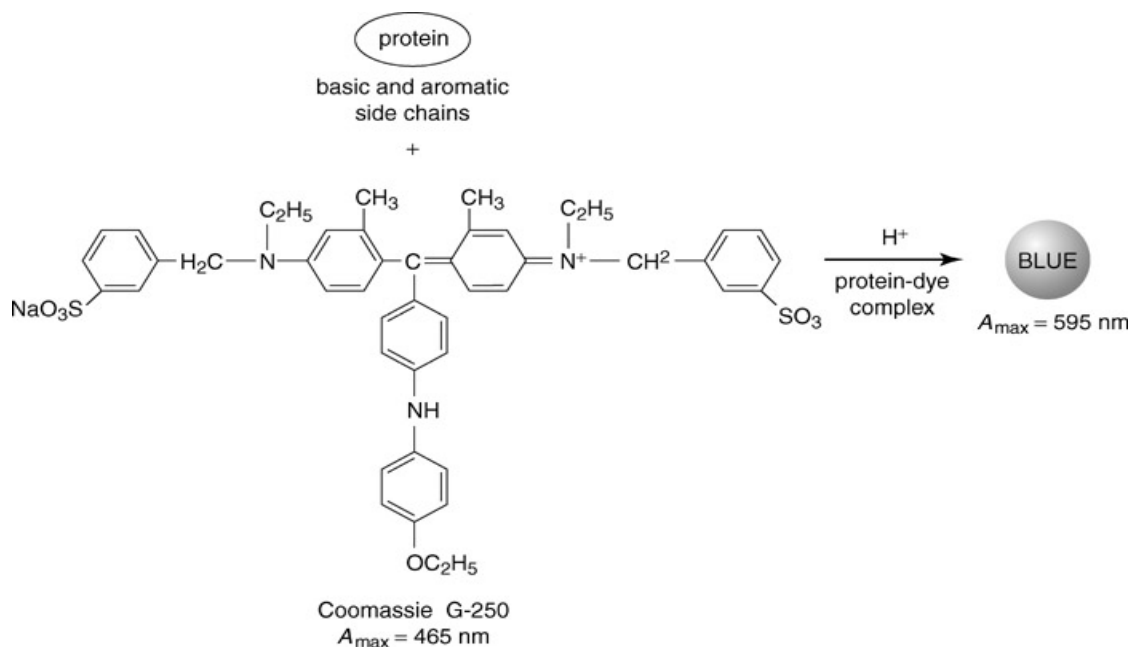
Výsledná hladina resistinu byla vypočítána dle kalibrační křivky.

Adiponectin- hladiny byly měřeny ELISA metodou -kitem od firmy Linco Research (nyní součást firmy Millipore). Reakce je založena na stejném principu, jako předchozí měření resistinu. Pro ilustraci uvádíme postup ve schématu:

SCHÉMA POSTUPU

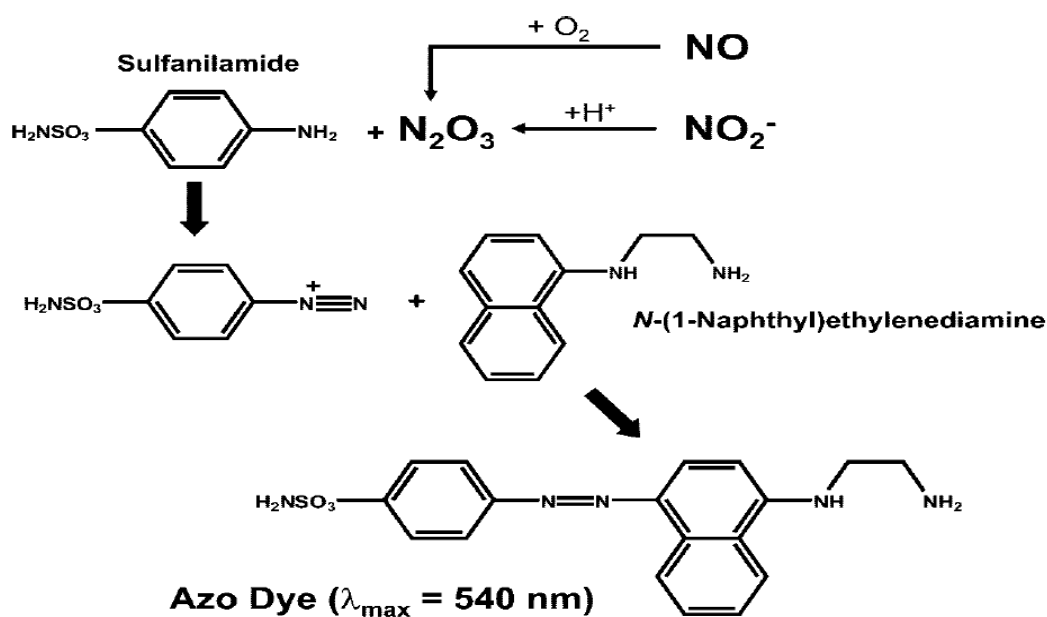


Množství proteinu v buňce bylo měřeno pomocí kitu od Sigma-Aldrich, Czech Republic. Reakce je založena na reakci s Coomassie blue barvivem za vzniku komplexu s s maximem absorpce kolem 595nm.



(Krohn 2005)

Produkce NO byla měřena přes jejich oxidační produkty NO_2^- and NO_3^- v mediu buněčných kultur kolorimetricky při 540 nm a pomocí Griessho reagentu. Hladina NO byla pak extrapolována podle NaNO_2 kalibrační křivky. Reakce je založena na vzniku červenofialové diazo-sloučeniny jak ukazuje následující schéma:



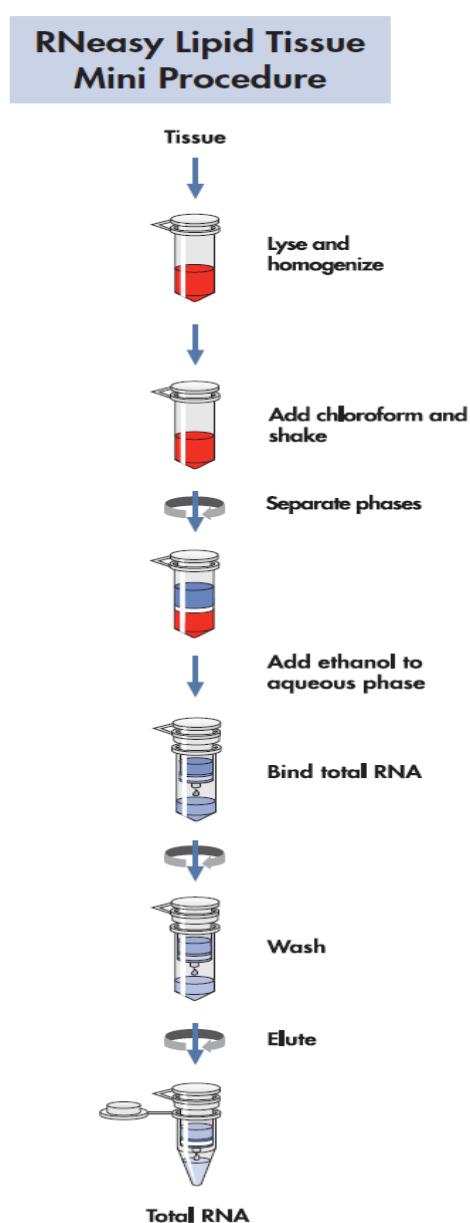
(Tarpey et al. 2004)

K testování byl použit kit pro stanovení $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ produktů firmy Roche.

Expresie iNOS v kulturách hepatocytů pomocí komparativní RT-PCR - po 24-hodinách kultivace byly hepatocyty použity pro reversní transkripci a PCR(RT-PCR).

Celková RNA z hepatocytů byla izolována podle předchozí metodiky (Farghali et al. 2002). The relativní množství iNOS mRNA bylo určeno srovnáním se signálem standardizovaného množství β -actinu a přepočítáno na celkové množství RNA extrahované z buněk.

Expresie iNOS v kulturách adipocytů pomocí kvantitativní RT-PCR



(RNeasy® Lipid Tissue Handbook)

Immediately after the end of cultivation, total RNA was isolated from adipocytes using the RNeasy lipid tissue mini kit according to the manufacturer's (Qiagen Czech Republic) instructions (see scheme). The RNA content in adipocytes, compared to other cell types, is very low, as shown in the table:

Mouse/rat tissue (10 mg)	Yield of total RNA (μg)
Adipose tissue	0.5-2.5
Brain	5-20
Heart	5-25
Intestine	10-60
Kidney	5-40
Liver	15-80
Lung	5-15
Muscle	5-35
Skin	2-5
Spleen	15-100

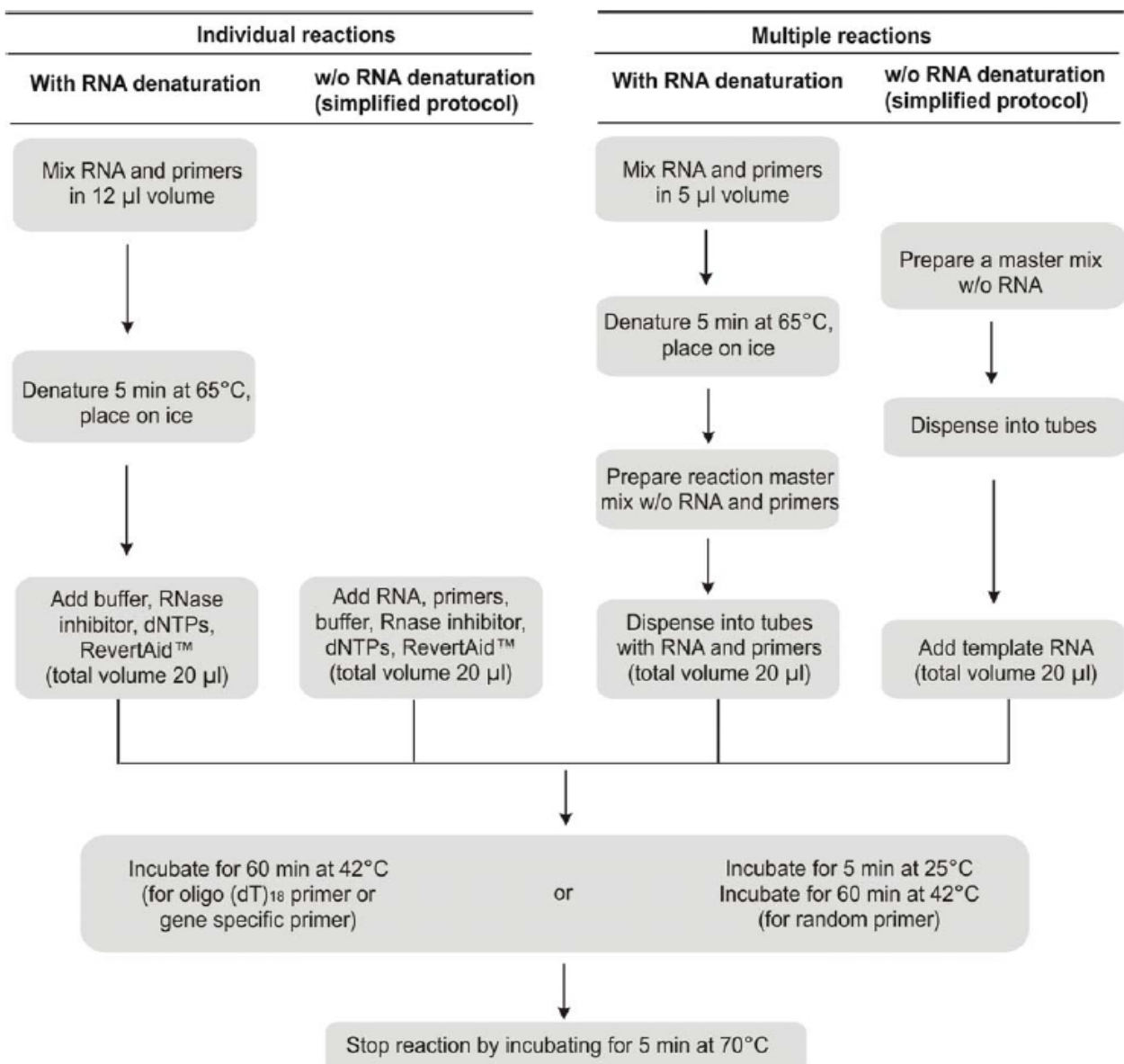
(RNeasy® Lipid Tissue Handbook)

qRT-PCR (performed by Václavíková Radka – SZÚ) Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using TaqMan Universal PCR Master mix (kit no. 4304437) and TaqMan Gene Expression

Assays (NOS2 kit no.: Rn00561646_m1 and beta

2 microglobulin (B2m) kit No.: Rn00560865_m1) zakoupených od Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Relativní kvantifikace genové exprese po RT-PCR byla zhodnocena pomocí gelové elektroforezy v 2 % agarozovém gelu při barvení ethidium bromidem. Celková koncentrace RNA byla vypočítána podle fluorescenční detekce s použitím ultra sensitive RiboGreen RNA fluorescent nucleic acid reagent (kit No.R11490, Invitrogen) podle návodu výrobce. RNA byla uchována v alikvotních dílech při -80 °C až do použití. cDNA byla syntetizována za použití 1,0 µg celkové RNA pomocí RevertAid™ First Strand cDNA syntézy (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) s náhodnými hexamer primery podle návodu výrobce.

Overview of cDNA synthesis procedures in individual and multiple reactions.

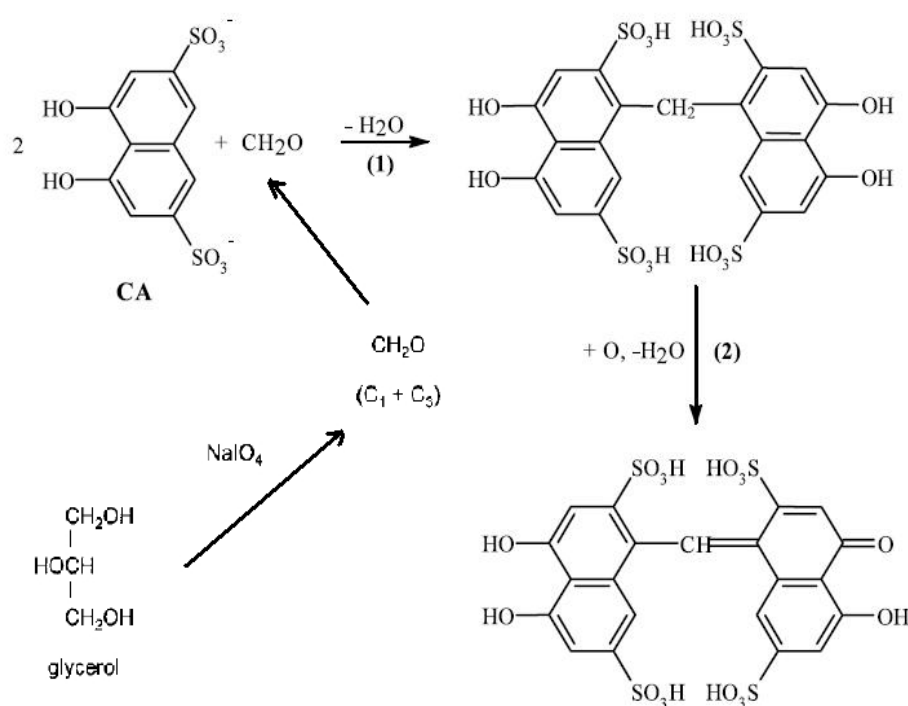


(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621, #K1622)

Expresi *NOS2* a *B2m* genů jsme vypočítali za pomoci přístroje RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Směs pro real-time PCR reakci obsahovala 10 μ l 2x TaqMan Universal PCR Master Mix, 1.0 μ l specifické TaqMan probe (s konečnou koncentrací 250 nM, označenou 6-FAM na 5'-konci a with non-fluorescentním zhášecem na 3'-konci, vše od Applied Biosystems), a primery jak pro *B2m*, tak pro *NOS2* amplifikaci (konečná koncentrace 900 nM u každého), 5 μ l z 4-násobně zředěné cDNA bylo přidáním vody upraveno na konečný objem 20 μ l. Parametry pro PCR byly počáteční denaturace při 95°C po dobu 15 min, následně 50 cyklů skládajících se z denaturace při 95°C po dobu 15 s a annealing/extenze při 60°C po dobu 60 s. Fluorescence byla měřena po každé extenzi. Kontrolní vzorek obsahoval vodu místo cDNA. Míra genové transkripce byla vždy počítána po trojicích. Jako endogenní kontrola sloužil *B2m*. Genová exprese *NOS2* byla hodnocena komparativní kvantifikací za předpokladu, že odpovídá $2^{-\Delta\Delta c_t}$, kde $\Delta\Delta c_t = \Delta c_t$ (zkoumaného vzorku) - Δc_t (kalibratoru). $\Delta c_t = c_t$ (cílového genu, u nás *NOS2*) - c_t (endogenní kontroly, u nás *B2m*) kde c_t je měřena v prahovém cyklu, kde fluorescence vzorku přesáhne ztelně fluorescence pozadí. mRNA z adipocytů, které sloužily jako kontrola a nebyly pod vlivem zkoumaných látek, byla použita jako kalibrator (tato hodnota byla označena jako 1).

Měření lipolýzy pomocí glycerolu

Lipolýza byla vyjádřena jako poměr uvolnění glycerolu z buněčné kultury adipocytů do kultivačního media. Při detekci byla využita metoda dle Lamberta a Neisha publikovaná v



roce 1950, kdy v kyselém prostředí trichloroctové kyseliny dojde k precipitaci bílkovin a následně při reakci s NaIO₄ k oxidaci glycerolu na formaldehyd. V další reakci v kyselém

prostředí s 30% H₂SO₄ dojde k substituci kyseliny chromotropové (CA) s formaldehydem za vzniku purpurově barevné sloučeniny s maximem adsorpce v 570 nm. Stanovení hladiny glycerolu bylo pak provedeno vzhledem ke kalibrační křivce sestrojené podle standardní řady ředěného glycerolu.

8. Statistické metody:

K zhodnocení statistické významnosti byly použity následující testy- Studentův párový test- k posouzení významnosti rozdílů dvou průměrů a rozdílu kontrolního a experimentálního měření na stejném vzorku. K analýze rozptylu byla použita metoda ANOVA s Bonferoniho párovým testem pomocí statistického programu GraphPad in Stat 3.06. K stanovení míry těsnosti a statistické závislosti byla použita analýza lineární regrese s testem významnosti koeficientu korelace.

9. Výsledky práce

V první části práce jsme se zaměřili na farmakologické modifikace signálů na kulturách primárně izolovaných potkaních epididymálních adipocytů.

Výsledky naší práce s primárně izolovanými epididymálními adipocyty potkana v prvních 24 hodinách kultivace ukazují na adrenergní regulaci lipolýzy, kdy β_3 agonista BRL-37344 významně zvyšoval lipolýzu, zatímco efekt PPAR γ agonisty- troglitazonu ani PPAR γ antagonisty SR-202 samotných nebyl na lipolýzu výrazný. Výrazně se však změnila situace, když měly možnost obě látky působit na BRL-37344 vyvolanou lipolýzu, kde došlo k výraznému poklesu lipolýzy vlivem jak troglitazonu, tak SR-202. Pokud byly všechny 3 látky podány současně, tedy SR-202 by teoreticky měl vyvolat blokádu účinku troglitazonu, tak tento efekt nebyl zaznamenán. Tento závěr nás vedl k přesvědčení, že je možné připustit i alternativní dráhu blokády lipolýzy než jen skrze PPAR γ nukleární receptor, což naznačují i práce v odborné literatuře (**LeBrasseur et al. 2006**). Jedině za takového předpokladu by mohly působit synergicky jak antagonist, tak agonista. Jednou z alternativních signálních drah s možností účinku na lipolýzu je AMPK aktivace.

Proto jsme v pokusu použili AMPK blokátor Compound C, který dle našich výsledků byl schopen zablokovat efekt troglitazonu na lipolýzu vyvolanou BRL-37344.

Při podobném uspořádání pokusu s měřením NO v kultivačním mediu, se ukázal stejný trend jako u lipolýzy. Pouze SR-202 vedl k vzestupu NO produkce. Z uspořádání pokusu je však zřejmé, že se nejedná o antagonismus SR-202 a troglitazonu, neboť pokud by

efekt SR-202 deklarovaného PPAR γ agonisty opravdu blokoval troglitazon, pak by tento jev byl vidět i při kombinaci těchto dvou látek bez BRL-37344. Naopak při srovnání efektu Troglitazonu, SR-202 samotného a jejich kombinace na NO produkci je zřejmé, že mají spíše aditivní afekt a nikoliv vzájemný antagonismus (k takovému závěru jsme došli i při krátkším 30 minutovém působení obou látek -data nejsou v práci uvedena). Tyto závěry nás vedly k myšlence vyzkoušet možnost AMPK signalizační dráhy i na NO produkci. Jak ukazuje AMPK blokátor opravdu vedl k blokádě efektu troglitazonu na BRL-37344 indukovanou lipolýzu.

Z literatury je známo, že AMPK je schopna blokovat transkripci iNOS (**Pilon et al. 2004**). Zajímalo nás tedy, zda NO produkce při uspořádání pokusu je také provázána snížením transkripce iNOS. Provedli jsme tudíž i real time q-RT-PCR. Výsledky jasně ukázaly, že zatímco po BRL-37344 došlo až ke 400% nárůstu mRNA iNOS, přidáním troglitazonu došlo k výraznému poklesu mRNA iNOS transkripce, což podporuje naši hypotézu.

V druhé části práce jsme se zaměřily na glykogenolýzu vyvolanou adrenergními agonisty a glukagonem.

Ve 30 a 60 minutách po působení glukagonu docházelo v primární kultuře potkaních hepatocytů bohatých na glykogen jak ke zvýšení glykogenolyzy, tak k vzestupu oxidu dusnatého a zároveň byl zaznamenán pomocí komparativní RT-PCR dvojnásobný vzestup iNOS genové exprese. Exprese nebyla ovlivněna L-NAME, neboť tento blokátor iNOS má až post-translační efekt. Naopak L-NAME spolu s aminoguanidinem (aminoguanidin ještě více) blokují nejen vliv glukagonu na NO produkci, ale i vliv glukagonu na glykogenolýzu.

Co se týče adrenergních agonistů, byla testována jak řada agonistů β a α - adrenergních, tak db-cAMP- analog druhého posla adrenergní stimulace a forskolin- látka vedoucí k vzestupu cAMP pomocí aktivace adenylátcyklázy. Všechny tyto látky zvyšovaly jak glykogenolýzu, tak NO produkci. Podobný výsledek byl zaznamenán se SNAP, jako exogenním donorem NO, při jehož působení opět stoupl stupeň glykogenolýzy i NO produkce.

I u pokusů s adrenergními agonisty byly zkoušeny blokátory jak adrenergních receptorů, tak blokátory NO syntázy. U blokátorů adrenergních receptorů došlo k blokádě efektu na NO a glykogenolýzu vyvolaného epinefrinem a phynelyphrinem jen při podání prazocinu a nikoliv při podání propranololu. Z čehož vyplývá, že signalizační dráha je nejspíše α -adrenergní a naopak β -adrenergní signalizace zde nehraje výraznou roli. Blokátory iNOS - L-NAME a

aminoguanidin (v koncentraci 10mM) byly schopny zablockovat vliv epinefrinu na glykogenolýzu i NO produkci, neovlivnily však významně iNOS transkripci.

10. Diskuze

Současné farmakoterapii obezity a metabolického syndromu se dosud nedaří zvládnout narůstající prevalenci diabetu a obezity v populaci rozvinutých států světa. A tak neustále probíhá aktivní výzkum ve snaze nalézt nové signální molekuly nebo specifické metabolické dráhy, na které by bylo možné zacílit terapii ve dvou hlavních orgánech, nejspíše původcích nebo jedné z hlavních aktérů u diabetu a obezity – jaterní tkáň a viscerální tukové tkáň. Od 90 let minulého století je navíc známo, že v mnoha signalizačních drahách výraznou roli hraje oxid dusnatý (NO) a to nejen jako hlavní molekula vazodilatace, ale i jako molekula ovlivňující zánětlivé reakce, oxidoredukční děje v mitochondriích a potažmo i fosforylační reakce a transkripci, kterou lze ovlivnit oxidačními a redukčními ději (ve vazbě například na SIRT1 histon/protein deacetylázu). V poslední době se ukazuje, že vazbou NO na různé molekuly dochází nejen ke vzniku stabilnějších forem NO s přenosem na větší vzdálenosti a tedy větším rozsahem ovlivňovaných buněk. V naší práci, kde jsme se zaměřili na lipolýzu, NO produkci a glykogenolýzu jsme došli k zajímavým závěrům. Jen velmi málo publikací dosud poukázalo na možnost nonPPAR γ efektu glitazonů, i když již některé práce se danou problematikou v současnosti zabývají.

V našich pokusech s PPAR γ agonisty a antagonisty jsme vycházeli ze základní premisy farmakologie, že agonista a antagonist, pokud nejsou ireversibilní, se ve svých účincích částečně nebo úplně ruší. Jestliže naše výsledky s PPAR γ agonistou troglitazonem a PPAR γ antagonistou SR-202 v sledované lipolýze a NO produkci v adipocytech shodovaly a vzájemně se při podání obou látek nerušily, nezbylo než připustit možnost nonPPAR γ účinku jedné nebo obou těchto látek.

Tato premisa se ukázala správnou při přidání AMPK blokátoru Compound C, kde látka blokovala efekt Troglitazonu na β_3 vyvolanou NO produkci iNOS transkripci a i lipolýzu téměř úplně. Je nám jasné, že jako důkaz bude třeba v budoucnu provést i WesternBlot analýzu fosforylované AMPK, stejně jako doplnit pokusy o další látky pokud možno selektivnější, než byly látky použité, přesto v základním výzkumu se tyto naše výsledky blíží k závěrům jiných pracovišť, které na 3T3-L1 preadipocytech (**Lennon et al. 2002**, **Yin et al. 2003**), lidských monocytech (**Naitoh et al. 2000**) a PPAR γ knock-out buňkách (**Chawla et al. 2001**, **Tsukamoto et al. 2004**) dokázaly obdobné výsledky. Tím se postupně překonává zažitá

představa o úplné receptorové selektivitě PPAR γ agonistů typu troglitazonu nebo ciglitazonu. Pokud by se v dalším výzkumu ukázal tento předpoklad jako pravdivý, měly by výsledky naší práce význam nejen teoretický ale i praktický. Pokud by totiž AMPK dependentní složka účinku glitazonů blokovala adrenergně vyvolanou lipolýzu, pak se otvírá možnost vyšší selektivitou dalších látek odstranit AMPK dependentní prolipogenní efekt glitazonů a odstranit tak jejich významný nežádoucí účinek- vzestup hmotnosti léčených pacientů. Celý výzkum nonPPAR γ efektu glitazonů nejen u nás, ale i ve světě je však v současnosti pouze v začátcích. Určitá skepse je tedy, tak jako v celé vědecké práci, na místě a jen čas ukáže, zda tyto výsledky budou využitelné pro praxi.

V druhé části své práce jsem se zaměřil na vyvolání glykogenolýzy α a β nespecifickými adrenergními agonisty, glukagonem a NO donory a její blokádu α a β specifickým adrenergním blokátorem a NOS nespecifickým inhibítorem. I když adrenergní mechanismus vyvolání glykogenolýzy je všeobecně znám, dosud panují neshody na typu receptoru, přes který katecholaminy glykogenolýzu vyvolávají (β_2 dependentní glykogenolýzu například popisuje práce **Erraji-Benchekroun et al. 2005**). A tak naše výsledky podporují názor, jenž předpokládá α - adrenergní mechanismus katecholaminy vyvolávané glykogenolýzy. Neboť prazocin jako α blokátor byl schopen blokovat katecholaminy vyvolanou glykogenolýzu v našich pokusech. Pokud se tyto výsledky v dalším výzkumu potvrdí pak praktický význam tohoto poznání lze najít například v tom, že současné blokátory receptoru pro glukagon indol-2-karboxamidy, které jsou velmi perspektivními léky pro terapii diabetu, vykazují nepříjemnou vlastnost a to ztrátu účinnosti v období 2-3 týdnů užívání. Mechanismus této komplikace dle některých autorů tkví v tom, že hepatocyty kompenzují blokádu glukagonového receptoru jiným mechanismem glykogenolýzy- tedy přes adrenergní receptor. Přesné poznání typu adrenergního receptoru a jeho blokáda specifickým α -adrenergním blokátorem může prodloužit efekt indol-2-karboxamidů a možná z nich vytvořit při kombinaci dobře říditelné a málo toxické látky na terapii hyperglykemie. Neméně zajímavým závěrem našich výsledků práce je fakt, že i nespecifické NOS blokátory jsou schopny glykogenolýzu zablokovat, stejně jako NO donory glykogenolýzu v izolovaných potkaních hepatocytech s vysokým obsahem glykogenu vyvolat. Mechanismus, jakým NO je schopno vyvolat glykogenolýzu, je dosud nejasný. Jako nejpravděpodobnější se zdá teorie, že inhibicí respiračního řetězce v mitochondrii vyvolává pokles ATP a vzestup AMP, který dále kromě aktivace AMPK přímo ovlivňuje několik enzymů glykogenolýzy, jak je uvedeno

v literárním přehledu této práce. Toto však není jediné možné vysvětlení. Nabízí se i možnost oxidoredukčních změn vyvolaných NO v buňce, které startují SIRT1 zprostředkovanou transkripci a teprve v druhé řadě ovlivňují glykogenolýzu. Dalšíh signálních drah je jistě více. A tak mimo skutečnost, že pro metabolický syndrom mají obě složky mého výzkumu- glykogenolýza a lipolýza zásadní význam a tudíž metabolický syndrom spojuje obě složky mé práce na hepatocytech a adipocytech, je další spojovací článek pro prezentované výsledky AMPK , která je taktéž schopna ovlivnit jak glykogenolýzu, tak lipolýzu a NO produkci a eventuelně by mohla být do budoucna východiskem pro další práci našeho výzkumného týmu.

11. Závěr

Efekt troglitazonu na lipolýzu viscerálních adipocytů a produkci NO (iNOS transkripci) se dle naší práce zdá být pravděpodobně nonPPAR γ dependentní- zato AMPK dependentní. Je blokáván AMPK blokátorem a neovlivněn PPAR γ selektivním blokátorem. Mechanismus adrenergně navozené glykogenolýzy a NO produkce u potkanních adipocytů je dle naší práce zprostředkován α adrenergním a nikoliv β adrenergním receptorem. Je blokován α blokátorem a neovlivněn β blokátorem. Donory NO a blokátory NOS ovlivňují dle naší práce i glykogenolýzu potkanních hepatocytů bohatých na glykogen. Efekt glukagonu na potkanní hepatocyty je obdobný jako u adrenergních agonistů.

Ve své práci jsem se zaměřil na vliv β_3 agonistů a PPAR γ agonistů/ antagonistů na izolované epididymální adipocyty potkana. Během výzkumu buněčného modelu adipocytů jsem zároveň zkoumal vliv β_3 agonistů/antagonistů a PPAR γ agonistů/ antagonistů na sekreci adipokinů (adiponectin, leptin, TNF α , resistin). Dále jsem se zaměřil na možnost ovlivnění glykogenolýzy glukagonem, β a α smíšenými adrenergními agonisty a α a β selektivními adrenergními antagonisty. Zároveň jsem zkoumal možnost ovlivnění glykogenolýzy NO donory nebo NOS inhibitory. Výsledky mé práce jsem odpublikoval v impaktovaných časopisech, prezentoval v posterové sekci na kongresu nebo prezentoval jako ústní sdělení. I když je zřejmé, že výsledky mé práce nepřinesou přímý výstup v léčbě lidí s obezitou a metabolickým syndromem, napomohou, doufám, výzkumným týmům, které se budou v budoucnu danou tematikou zabývat, tak jako mně zas pomohly práce, které byly publikovány dříve a jejichž přehled jsem uvedl v úvodu a jejichž odkazy jsou uvedeny níže. Všem lidem zapojeným jakýmkoliv způsobem do výzkumu v této problematice přeji na závěr hodně trpělivosti, analytické a pragmatické myšlení stejně jako nutnou dávku invence a štěstí. To samé si neskromně přeji i já sám sobě v následujících letech výzkumné práce.

12. Použitá literatura

1. **Agius L:** New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 21(4): 587–605, 2007
2. **Akesson L, Ahren B, Manganiello VC, Holst LS, Edgren G and Degerman E:** Dual effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and isoproterenol on lipid metabolism and signaling in primary rat adipocytes. *Endocrinology* 144: 5293–9, 2003
3. **Akesson L, Ahren B, Edgren G and Degerman E:** VPAC2-R mediates the lipolytic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide in primary rat adipocytes. *Endocrinology* 146:744–50, 2005.
4. **Albuszies G, Vogt J, Wachter U, Thiemermann C, Leverve XM, Weber S, Georgieff M, Radermacher P and Barth E:** The effect of iNOS deletion on hepatic gluconeogenesis in hyperdynamic murine septic shock. *Intensive Care Med.* 33:1094–1101, 2007.
5. **Alderton WK, Cooper CC and Knowles RG:** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593-615, 2001.
6. **Alvarez B and Radi R:** Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids.* 25: 295–311, 2003.
7. **Andersson K, Gaudiot N, Ribiere C, Elizalde M, Giudicelli Y, Arner P:** A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Br J Pharmacol* 126:1639–45, 1999.
8. **Arch JRS:** The β 3-Adrenergic system and β 3-Adrenergic agonists. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders;* 2:385-393, 2001.
9. **Arch JRS:** β 3-adrenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress. *European Journal of Pharmacology* 440: 99– 107, 2002.

10. **Arner P:** Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 19: 471-482, 2005.
11. **Arner P:** The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the Thiazolidinediones. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 14(3):137-45, 2003.
12. **Aronne LJ and Isoldi KK:** Cannabinoid-1 Receptor Blockade in Cardiometabolic risk Reduction: Efficacy. *Am J Cardiol*;100 [suppl]:18P–26P, 2007.
13. **Bahr M., Spelleken M., Bock M., von Holtey M., Kiehn R and Eckel J.:** Acute and chronic effects of troglitazone (CS-045) on isolated rat ventricular cardio- myocytes. *Diabetologia* 39:766–74, 1996.
14. **Bakopanos E and Silva JE:** Thiazolidinediones Inhibit the Expression of β_3 -adrenergic Receptors at a Transcriptional Level. *Diabetes* 49: 2108–2115, 2000.
15. **Banerjee RR and Lazar MA:** Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J. Biol. Chem.* 276: 25970–25973, 2001
16. **Bandsma RHJ, Wiegman CH, Herling AW, Burger HJ, ter Harmsel A, Meijer AJ, Romijn JA, Reijngoud DJ and Kuipers F:** Acute inhibition of glucose-6-phosphate translocator activity leads to increased de novo lipogenesis and development of hepatic steatosis without affecting VLDL production in rats. *Diabetes*; 50: 2591–2597, 2001.
17. **Banks WA:** The blood-brain barrier as a cause of obesity. Review. *Curr Pharm Des.* 14(16):1606-14, 2008.
18. **Belfrage P, Fredrikson G, Stralfors P, Tornquist H:** Adipose tissue lipases. In: Borgström B, Brockman H, editors. *Lipases.* Amsterdam, The Netherlands: Elsevier: 366–416, 1984.

- 19. Berkowitz DE, Nardone NA, Smiley RM, Price DT, Kreutter DK, Fremeau RT and Schwinn DA:** Distribution of β_3 adrenoreceptor mRNA in human tissues. *European Journal of Pharmacology. Molecular Pharmacology Section 289*: 223-228, 1995
- 20. Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Cinti S, Tisdale MJ and Trayhurn P:** Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci USA 101*:2500–5, 2004.
- 21. Birk JB and Wojtaszewski JF:** Predominant $\alpha_2/\beta_2/\gamma_3$ AMPK Activation during exercise in human skeletal muscle. *The Journal Physiology, 577*, 1021–1032, 2006.
- 22. Björnholm M, Al-Khalili L, Dicker A, Näslund E, Rössner S, Zierath JR and Arner P:** Insulin signal transduction and glucose transport in human adipocytes: effects of obesity and low calorie diet. *Diabetologia 45*: 1128–1135, 2002.
- 23. Blümer RM, van Roomen CP, Meijer AJ, Houben-Weerts JH, Sauerwein HP and Dubbelhuis PF:** Regulation of adiponectin secretion by insulin and amino acids in 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism 57*:1655–1662, 2008
- 24. Board M, Doyle P and Cawthorne MA:** BRL37344, but not CGP12177, stimulates fuel oxidation by soleus muscle in vitro. *European Journal of Pharmacology 406*: 33–40, 2000.
- 25. Borgs M, Bollen M, Keppens S, Yap S.H, Stalmans W and Vanstapel F:** Modulation of basal hepatic glycogenolysis by nitric oxide. *Hepatology 23 (6)*: 1564-1571, 1996.
- 26. Bossy-Wetzel E and Lipton SA.:** Nitric oxide signaling regulates mitochondrial number and function. *Cell Death and Differentiation 10.:* 757–760. 2003
- 27. Brasaemle DL, Levin DM, Adler-Wailes DC and Londos C:** The lipolytic stimulation of 3T3–L1 adipocytes promotes the translocation of normonesensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim Biophys Acta 1483*:251–262, 2000.
- 28. Bray GA and Ryan DH:** Drug Treatment of the Overweight Patient. *Gastroenterology. 132*:2239–2252, 2007.

- 29. Brown GC and Cooper CE:** Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Letters* 356: 295-298, 1994.
- 30. Brown JM and McIntosh MK:** Conjugated Linoleic Acid in Humans: Regulation of Adiposity and Insulin Sensitivity. *J. Nutr.* 133: 3041–3046, 2003.
- 31. Brown JEP, Onyango DJ and Dunmore SJ:** Resistin down-regulates insulin receptor expression, and modulates cell viability in rodent pancreatic β -cells. *FEBS Letters* 581: 3273–3276, 2007.
- 32. Cadenas E and Boveris A:** Mitochondrial Free Radical Production, Antioxidant Defenses and Cell Signaling in *The Handbook of Environmental Chemistry* 2(0): 219–234, 2005.
- 33. Camp HS, Chaudhry A and Leff T:** A Novel Potent Antagonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Blocks Adipocyte Differentiation But Does Not Revert the Phenotype of Terminally Differentiated Adipocytes. *Endocrinology* 142: 3207–3213, 2001.
- 34. Canová NK, Lincová D, Kmoníčková E, Kameníková L and Farghali H:** Nitric oxide production from rat adipocytes is modulated by β_3 -adrenergic receptor agonists and is involved in a cyclic AMP-dependent lipolysis in adipocytes. *Nitric Oxide* 14, 200–211, 2006.
- 35. Carpene C, Galitzky J, Collon P, Esclapez F, Dazats M and Lafontan M:** Desensitization of β -1 and β -2, but not β -3, adrenoceptor-mediated lipolytic responses of adipocytes after long-term norepinephrine infusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 237-247, 1993.
- 36. Carvalho E, Jansson PA, Axelsen M, Eriksson JW, Huang X, Groop L, Rondinone C, Sjöström L and Smith U:** Low cellular IRS 1 gene and protein expression predict insulin resistance and NIDDM. *FASEB J.* 13(15): 2173–2178, 1999.

- 37. Chang CJ, Kao JT, Lee TL, Lai CW and Cheng JT:** Comparison of isoproterenol with BRL37344 in activation of β_3 -adrenoceptors to inhibit the uptake of [14 C]deoxy-D-glucose and translocation of glucose transporter (GLUT4) to membrane fraction in rat adipocytes. *Journal of the Autonomic Nervous System* 61, 191 – 194. 1996
- 38. Chang K, Lee SJ, Cheong I, Billiar TR, Chung HT, Han JA, Kwon YG, Ha KS and Kim YM:** Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I κ B. *Experimental and Molecular Medicine* 36 (4): 311-324, 31 2004.
- 39. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P and Evans RM:** PPAR γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med.*7:48–52. 2001.
- 40. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I and Quon MJ:** Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 278: 45021– 6, 2003.
- 41. Choi KM, Lee J, Lee KW, Seo JA, Oh JH, Kim SG, Kim NH, Choi DS and Baik SH:** Serum adiponectin concentrations predict the developments of type 2 diabetes and the metabolic syndrome in elderly Koreans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61:75–80, 2004.
- 42. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H and Astrup A:** Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 370: 1706–13, 2007.
- 43. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH:** Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* May 23;345(1):50-4, 1994.
- 44. Clerc P, Rigoulet M, Leverve X and Fontaine E:** Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. *J Bioenerg Biomembr* 39,:158–166, 2007.

- 45. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG and Yeaman SJ:** Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 275:5011–5015, 2000.
- 46. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD and Kahn SE:** Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46:459–469, 2003.
- 47. Cohen SM, Duffy JL, Miller C, Kirk BA, Candelore MR, Ding VDH, Kaczorowski G, Tota LM, Werrmann JG, Wright M, Parmee ER, Tata JR and Zhang BB:** Direct observation (NMR) of the efficacy of glucagon receptor antagonists in murine liver expressing the human glucagon receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 14: 1506–1517, 2006.
- 48. Collins S, Cao W and Robidoux J:** Learning New Tricks from Old Dogs: β -Adrenergic Receptors Teach New Lessons on Firing Up Adipose Tissue Metabolism *Molecular Endocrinology* 18: 2123–2131, 2004.
- 49. Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, Dickinson R, Adler A, Gagne G, Iyengar R, Zhao G, Marsh K, Kym P, Jung P, Camp HS and Frevert E:** Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 3: 403–416, 2006.
- 50. Corman CL, Leung NM and Guberman AH:** Weight gain in epileptic patients during treatment with valproic acid: a retrospective study. *Can J Neurol Sci.* 24: 240–244. 1997
- 51. Cusi K, Consoli A and DeFronzo RA:** Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical and Metabolism*, 81: 4059–4067, 1996.
- 52. Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F and Beckman JA:** Diabetes and Vascular Disease: Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I. *Circulation*.108:1527-1532, 2003.

- 53. Dagon Y, Avraham Y and Berry EM:** AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2 α in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 43–47, 2006.
- 54. Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, Hajduch E, Ferre P and Foufelle F:** Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280: 25250–25257, 2005.
- 55. Daval M, Foufelle F and Ferré P:** Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue *J Physiol* 574.155:55–62, 2006.
- 56. Davies N, Trikkas C and Cooper CE:** Does carbon monoxide inhibit cytochrome oxidase in vivo? *Biochem. Soc. Trans.* 25: 406S. 1997.
- 57. Davies SP, Helps NR, Cohen PT and Hardie DG:** 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Letters*, 377: 421–425, 1995.
- 58. De Groot AA, Mathy MJ, Van Zwieten PA and Peters SLM:** Involvement of the β_3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42, 232–236, 2003.
- 59. De Luca C and Olefsky JM:** Inflammation and insulin resistance. *FEBS Letters* 582, 2008: 97–105.
- 60. De Luis DA, Ballesteros M, Ruiz E, Muñoz C, Penacho A, Iglesias P, López Guzmán A, Maldonado A, Cordero M, San Martín L, Puigdevall V, Romero E, González Sagrado M, Izaola O and Conde R:** Polymorphism Trp64Arg of β_3 adrenoceptor gene: allelic frequencies and influence on insulin resistance in a multicenter study of Castilla-León. *Nutr Hosp.* 25(2):299-303, 2010.
- 61. Decker K:** Biologically-active products of stimulated liver macrophages (kupffer cells). *European Journal of Biochemistry* 192 (2): 245-261, 1990.

- 62. Dempsey EC, Newton AC, Mochly RD, Fields AP, Rayland ME, Insel PA and Messing RO:** Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: L429-L438, 2000.
- 63. Deng G, Liu Z, Ye F, Luo X, Zhu W, Shen X, Liu H and Jiang H:** Tryptophan-containing dipeptide derivatives as potent PPAR γ antagonists: Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43:2699-2716, 2008.
- 64. Deng T, Shan S, Li PP, Shen ZF, Lu XP, Cheng J and Ning ZQ:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ transcriptionally up-regulates hormone-sensitive lipase via the involvement of specificity protein-1. *Endocrinology* 147(2): 875–884, 2006.
- 65. Deng WG and Wu KK:** Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by p300 and p50 acetylation. *The Journal of Immunology.* 171:6581–6588, 2003.
- 66. Derave W, Ai H, Ihlemann J, Witters LA, Kristiansen S, Richter EA and Ploug T:** Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle. *Diabetes*, 49: 1281–1287, 2000.
- 67. Dessy C, Moniotte S, Ghisdal P, Havaux X, Noirhomme P and Balligand JL:** Endothelial β_3 -adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation.* 110: 948-954, 2004.
- 68. Dixon R, Gourzis J, McDermott D, Fujitaki J, Dewland P and Gruber H:** AICA-riboside: safety, tolerance, and pharmacokinetics of a novel adenosine-regulating agent. *Journal of Clinical Pharmacology*, 31: 342–347, 1991.
- 69. Eberhardt W, Pluss C, Hummel R, Pfeilschifter J:** Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by il-1 β and cAMP in rat mesangial cells. *J. Immunol.* 160: 4961-4969, 1998.

- 70. Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC Jr. and Londos C:**
Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci US A* 89: 8537–8541, 1992.
- 71. Elizalde M, Ryden M, van Harmelen V, Eneroth P, Gyllenhammar H, Holm C, Ramel S, Ölund A, Arner P and Andersson K:** Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J. Lipid Res.* 41: 1244–1251, 2000.
- 72. Ellger B, Langouche L, Richir M, Debaveye Y, Vanhorebeek I, Van Leeuwen PA and Van den Berghe G:** Modulation of regional nitric oxide metabolism: Blood glucose control or insulin? *Intensive Care Med* 34:1525–1533, 2008.
- 73. Elliott WH and Elliott DC:** *Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, second edition, pp 222-233, 2001
- 74. EMEA:** European Medicines Agency updates on ongoing safety review of sibutramine: Weight-loss medicine assessed over cardiovascular concerns;
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2010/01/news_detail_000965.jsp&jsearched=true
- 75. Emerling BM, Viollet B, Tormos KV and Chandel NS:** Compound C inhibits hypoxic activation of HIF-1 independent of AMPK. *FEBS Letters* 581: 5727–5731, 2007.
- 76. Erraji-Benchekroun L, Couton D, Postic C, Borde I, Gaston J, Guillet JG and Andre C:** Overexpression of β_2 -adrenergic receptors in mouse liver alters the expression of gluconeogenic and glycolytic enzymes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E715–E722, 2005.
- 77. Fabbri E, Buzzi M, Biondi C and Capuzzo A:** Alpha- adrenoceptor-mediated glucose release from perfused catfish hepatocytes. *Life Sciences* 65 (1): 27-35, 1999.
- 78. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H**

and Auwerx J: The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR-gamma gene. *J. Biol. Chem.*, 272: 18779–18789, 1997.

79. Farghali H, Kameníková L and Hynie S: Preparation of functionally active immobilized and perfused mammalian cells: an example of hepatocyte bioreactor *Physiol. Res.* 43: 121-125, 1994.

80. Farghali H, Canová N, Gaier N, Lincová D and Kmoníčková E. Strestíková P, and Masek K: Inhibition of endotoxemia-induced nitric oxide synthase expression by cyclosporin A enhances hepatocyte injury in rats: amelioration by NO donors. *Int Immunopharmacol.* 2: 117-127. 2002

81. Farghali H and Kameníková L: Oxid dusnatý-NO in **Lincová, D., Farghali. H. et al.:** *Základní a aplikovaná farmakologie.* Praha, Galen et Karolinum, 2005:s 301-307

82. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M and Paschke R: Tumor Necrosis Factor α Is a Negative Regulator of Resistin Gene Expression and Secretion in 3T3-L1 Adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288: 1027–1031, 2001

83. Fava M: Weight gain and antidepressants. *J Clin Psychiatry.* 61: 37–41, 2000.

84. Feinstein DL, Spagnolo A, Akar C, Weinberg G, Murphy P, Gavriluk V and Dello Russo C: Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? *Biochemical Pharmacology.* 70, 177–188, 2005.

85. Festuccia WT, Laplante M, Berthiaume M, Gélinas Y and Deshaies Y: PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia.* 49: 2427–2436, 2006.

86. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB: Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr* 83(5):S192-203, 2007.

- 87. Fraeyman N and Vanermen A:** Influence of aging on the β -receptor and glucagon-receptor-mediated glycogenolysis in rat hepatocytes. *Mechanisms of Ageing and development* 70 (1-2): 115-126,1993.
- 88. Fredrikson G, Stralfors P, Nilsson NO and Belfrage P:** Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J Biol Chem* 256:6311–20, 1981.
- 89. Fredrikson G, Tornqvist H and Belfrage P:** Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 876:288–93, 1986.
- 90. Fryer LG D, Hajduch E, Rencurel F, Salt IP, Hundal HS, Hardie DG, Carling D:** Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes*. 49: 1978-1985, 2000.
- 91. Gardner OS, Dewar BJ and Graves LM:** Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome-proliferator-activated receptor ligands: An example of nongenomic signaling. *Mol Pharmacol*. 68: 933–941, 2005.
- 92. Garcin ED, Arvai AS, Rosenfeld RJ, Kroeger MD, Crane BR, Andersson G, Andrews G, Hamley PJ, Mallinder PR, Nicholls DJ, St-Gallay SA, Tinker AC, Gensmantel NP, Mete A, Cheshire DR, Connolly S, Stuehr DJ, Åberg A, Wallace AV, Tainer JA and Getzoff ED:** Anchored plasticity opens doors for selective inhibitor design in nitric oxide synthase. *Nat Chem Biol* 4(11):700-7, 2008.
- 93. Garton J, Campbell DG, Carling D, Hardie DG, Colbran RJ and Yeamans J:** Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur. J. Biochem*. 179: 249-254, 1989.
- 94. Gasic S, Tian B and Green A:** Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem* 274:6770–6775, 1999.

- 95. Gaudiot N, Jaubert AM, Charbonnier E, Sabourault D, Lacasa D, Giudicelli Y and Ribière C:** Modulation of white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *J Biol Chem* 273(22):13475–81, 1998.
- 96. Gavrilu A, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller LC, Orlova C and Mantzoros CS:** Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: Cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4823–4831, 2003
- 97. Gerich JE.** Control of glycaemia. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 7(3): 551-86, 1993.
- 98. Gerhardt CC, Gros J, Strosberg AD and Issad T:** Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by human β_3 -adrenergic receptor: New pharmacological profile and mechanism of activation. *Molecular Pharmacology*. **55**: 255–262, 1999.
- 99. Giulivi C, Kato K and Cooper CE:** Nitric oxide regulation for oxygen consumption I: cellular physiology. *Review. Am J Physiol Cell Physiol*. 291:C1225-31, 2006.
- 100. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, De Backer G, Ebrahim S, Gjelsvik B, Herrmann-Lingen C, Hoes A, Humphries S, Knapton M, Perk J, Priori SG, Pyorala K, Reiner Z, Ruilope L, Sans-Menendez S, Scholte op Reimer W, Weissberg P, Wood D, Yarnell J, Zamorano JL, Walma E, Fitzgerald T, Cooney MT, Dudina A; European Society of Cardiology (ESC) Committee for Practice Guidelines (CPG):** ESC guidelines on Diabetes, Pre-diabetes and Cardiovascular Diseases. *Eur Heart J*. 28(19):2375-414, 2007
- 101. Granik VG and Grigor'ev NB:** Exogenous donors of nitric oxide (a chemical aspect). *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, Vol. 51, No. 8: 1375—1422, 2002
- 102. Granja AG, Sabina P, Salas ML, Fresno M and Revilla Y:** Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by viral A238L-mediated inhibition of p65/RelA acetylation and p300 transactivation. *Journal of Virology*. 10487–10496, 2006.

- 103.Granneman JG:** Effects of agonist exposure on the coupling of β_1 and β_3 adrenergic receptors to adenylyl cyclase in isolated adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261: 638-642, 1992.
- 104.Gravholt CH, Schmitz O, Simonsen L, Bulow J, Christiansen JS and Moller N:** Effects of a physiological GH pulse on interstitial glycerol in abdominal and femoral adipose tissue. *Am J Physiol* 277: E848-54, 1999.
- 105.Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G and Nimer SD:** Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.*;4:281-99. 1995
- 106.Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ and Londos C:** Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266:11341-11346, 1991.
- 107.Greenberg AS, Shen WJ, Muliro K, Patel S, Souza SC., Roth RA and Kraemer FB:** Stimulation of Lipolysis and Hormone-sensitive Lipase via the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 45456-45461, 2001
- 108.Guarino MP, Afonso RA, Raimundo N, Raposo JF and Macedo MP:** Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G588-G594, 2003.
- 109.Guigas B, Sakamoto K, Taleux N, Reyna SM, Musi N, Viollet B and Hue L:** Critical Review- Beyond AICA Riboside: In Search of New Specific AMP-activated Protein Kinase Activators. *Life.* 61(1): 18-26, 2009.
- 110.Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Fleming I, Busse R, Pritchard Jr. KA and Sessa WC:** Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J. Biol. Chem.* 278: 44719-44726, 2003.

- 111.Fishman AP:** Aminorex to Fen/Phen An Epidemic Foretold. *Circulation*. 99: 156-161. 1999
- 112.Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R:** Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277:4806–4815, 2002.
- 113.Hainer V:** *Základy klinické obezitologie*. Grada Publishing a.s. 2004.
- 114.Haluzík M a Svačina Š:** *Metabolický syndrom a nukleární receptory PPAR*. Grada Publishing a.s. 2005.
- 115.Han SH, Quon MJ, Kim J and Koh KK:** Adiponectin and Cardiovascular Disease Response to Therapeutic Interventions. *J Am Coll Cardiol*. 49:531–538, 2007.
- 116.Harbrecht BG, Perpetua M, Fulmer M and Zhang BC:** Glucagon regulates hepatic inducible nitric oxide synthesis in vivo. *Shock* 22: 157-162, 2004.
- 117.Hardie DG:** Minireview: The AMP-Activated Protein Kinase Cascade: The Key Sensor of Cellular Energy Status. *Endocrinology* 144: 5179–5183, 2003.
- 118.Hashimoto K, Nagao Y, Ida K, Takeda M, Murakurni N, Kato K and Mizotu M:** Improvement of Metabolic Disorders and Visceral Fat Obesity by the β_3 -Adrenoceptor Agonist (R*,R*)-(&)-Methyl-4-[2-[2-hydroxy-2- (3- chlorophenyl) ethylamino]propyl] - phenoxyacetate Hydrobromide (BRL35 135A) in Genetically Obese Rodents. *Biochemical Pharmacology* 52: 1529-1535, 1996.
- 119.Hauner H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K and Eckel J:** Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 38:764–771, 1995.
- 120.Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS and Hardie DG:** The antidiabetic drug metformin activates the AMPactivated protein kinase cascade via an adenine nukleotide independent mechanism. *Diabetes* 51: 2420–2425, 2002.

- 121.Hellmer J, Marcus C, Sonnenfeld T and Arner P:** Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75:15–20, 1992.
- 122.Heng S, Harris KM and Kantrowitz ER:** Designing inhibitors against fructose 1,6-bisphosphatase: Exploring natural products for novel inhibitor scaffolds. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45: 1478–1484, 2010.
- 123.Hodis J, Kutinová-Canová N, Potmesil P, Kameníková L, Kmonícková E, Zídek Z and Farghali H.:** The role of adrenergic agonists on glycogenolysis in rat hepatocyte cultures and possible involvement of NO. *Physiol Res.* 56(4):419-425, 2007.
- 124.Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ and Klotz KN:** Comparative pharmacology of human β -adrenergic receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369:151–159, 2004.
- 125.Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS and Spiegelman BM:** Altered gene expression for tumor necrosis factor α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134:264–270, 1994.
- 126.Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV Jr, Shelton DL, Hébert CC:** FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J.* 19, 4046–4055, 2000.
- 127.Hollenga C, Brouwer F and Zaagsma J:** Differences in functional cyclic AMP compartments mediating lipolysis by isoprenaline and BRL 37344 in four adipocyte types. *Eur J Pharmacol* 200: 325-330, 1991.
- 128.Holm C, Kirchgessner TG, Svenson KL, Fredrikson G, Nilsson S, Miller CG, Shively JE, Heinzmann C, Sparkes RS, Mohandas T, Lusic AJ, Belfrage P and Schotz MC:** Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science* 241:1503–1506, 1988.

- 129.Holm C, Osterlund T, Laurell H and Contreras JA:** Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Ann Rev Nutr* 20:365– 393, 2000.
- 130.Horman S, Vertommen D, Heath R, Neumann D, Mouton V, Woods A, Schlattner U, Wallimann T, Carling D, Hue L and Rider MH:** Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alphasubunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 5335–5340, 2006.
- 131.Horton RA, Knowles RG and Titheradge MA:** Endotoxin causes reciprocal changes in hepatic nitric-oxide synthesis, gluconeogenesis, and flux through phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 204 (2): 659-665, 1994 (1)
- 132.Horton RA, Ceppi ED, Knowles RG and Titheradge MA:** Inhibition of hepatic-gluconeogenesis by nitric-oxide-a comparison with endotoxic-shock. *Biochemical Journal* 299 (17): 735-739, 1994 (2)
- 133.Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM:** Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87–91, 1993.
- 134.Huber M and Keppler D:** Eicosanoids and the liver. *Prog. Liver Dis.* 9: 117-141, 1990.
- 135.Hulthe J, Hulten LM and Fagerberg B:** Low adipocyte-derived plasma protein adiponectin concentrations are associated with the metabolic syndrome and small dense low-density lipoprotein particles: atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism* 52:1612–1614, 2003.
- 136.Hunsaker DM and Hunsaker JC:** Obesity Epidemic in the United States (A Cause of Morbidity and Premature Death); in *Forensic Pathology Reviews, Vol. 2* . Humana Press Inc., 2007

- 137.Hurley RL, Barre LK, Wood SD, Anderson KA, Kemp BE, Means AR and Witters LA:** Regulation of AMP-activated protein kinase by multi-site phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 36662–36672, 2006.
- 138.Hutchinson DS and Bengtsson T:** AMP-activated protein kinase activation by adrenoceptors in L6 skeletal muscle cells: mediation by alpha1-adrenoceptors causing glucose uptake. *Diabetes*. 55: 682–690, 2006.
- 139.Hutchinson DS, Chernogubova E, Dallner OS, Cannon B and Bengtsson T:** β -Adrenoceptors, but not α -adrenoceptors, stimulate AMP-activated protein kinase in brown adipocytes independently of uncoupling protein-1. *Diabetologia* 48: 2386–2395, 2005.
- 140.Ida K, Hashimoto K, Kamiya M, Muto S, Nakamura Y, Kato K and Miota M:** Stereoselective Action of (R*,R*)-(+)-Methyl-4-[2-[2-hydroxy-2-(3-chlorophenyl)ethylamino]propyl]-phenoxyacetic Acid (BRL37344) on β -Adrenoceptors and Metabolic Chiral Inversion. *Biochemical Pharmacology* 52: 1521-1527, 1996.
- 141.Ingebritsen TS, Stewart AA and Cohen P:** The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *European Journal of Biochemistry*, 132: 297–307, 1983.
- 142.Iozzo P, Hallsten K, Oikonen V, Virtanen KA, Parkkola R, Kemppainen J, Solin O, Lonqvist F, Ferrannini E, Knuuti J and Nuutila P:** Effects of metformin and rosiglitazone monotherapy on insulin-mediated hepatic glucose uptake and their relation to visceral fat in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:2069- 2074, 2003.
- 143.Jablonski KA, McAteer JB, de Bakker PI, Franks PW, Pollin TI, Hanson RL, Saxena R, Fowler S, Shuldiner AR, Knowler WC, Altshuler D and Florez JC;** Diabetes Prevention Program Research Group. Common variants in 40 genes assessed for diabetes incidence and response to metformin and lifestyle intervention in the diabetes prevention program. *Diabetes*. 59(10): 2672-81, 2010.

- 144. Janowska J, Zahorska-Markiewicz B and Olszanecka-Glinianowicz M:** Relationship between serum resistin concentration and proinflammatory cytokines in obese women with impaired and normal glucose tolerance. *Metabolism Clinical and Experimental* 55:1495– 1499, 2006.
- 145. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B and Gross RW:** Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279:48968–75, 2004.
- 146. Ji JD, Cheon HJ, Jun JB, Choi SJ, Kim YR, Lee YH, Kim TH, Chae IJ, Song GG, Yoo DH, Kim SY and Sohn J:** Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *Journal of Autoimmunity*. 17: 215–221, 2001.
- 147. Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G:** Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J. Nutr. Biochem.* 17: 571–588, 2006.
- 148. Jones PS, Savory R, Barratt P, Bell AR, Gray TJ, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland N G and Bell DR:** Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur. J. Biochem.*, 233, 219–226, 1995.
- 149. Joseph SS, Lynham JA, Molenaar P, Grace AA, Colledge WH and Kaumann AJ:** Intrinsic sympathomimetic activity of (-)-pindolol mediated through a (-)-propranolol-resistant site of the β_1 -adrenoceptor in human atrium and recombinant receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 368: 496–503, 2003.

- 150.Kalamidas SA, Kotoulas OB and Hann AC:** Studies on glycogen autophagy: Effects of phorbol myristate acetate, ionophore A23187, or phentolamine. *Microsc. Res. Tech.* 57: 507-511, 2002.
- 151.Kahn BB and Flier JS:** Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106: 473–481, 2000.
- 152.Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H and Holm C:** cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase: evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem* 272:27218–27223, 1997.
- 153.Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H and Patscha JR:** Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 309:286–290, 2003.
- 154.Kashaw SK, Rathi L, Mishra P and Saxena AK:** Development of 3D-QSAR Models in Cyclic Ureidobenzenesulfonamides: Human β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 13: 2481–2484, 2003.
- 155.Kaumann AJ, Preitner F, Sarsero D, Molenaar P, Revelli J-P and Giacobino JP:** (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative β 4-adrenoceptors in wild-type and β 3-adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 53:670–675, 1998.
- 156.Kaumann AJ, Engelhardt S, Hein L, Molenaar P and Lohse M:** Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double β 1/ β 2-adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of β 1-adrenoceptors for putative β 4-adrenoceptor pharmacology. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 363:87–93, 2001.
- 157.Kawachi H, Moriya NH, Korai T, Tanaka S, Watanabe M, Matsui T, Kawada T and Yano H:** Nitric oxide suppresses preadipocyte differentiation in 3T3-L1 culture. *Mol Cell Biochem.* 300:61–67, 2007.

- 158.Kawakami M, Murase T, Ogawa H, Ishibashi S, Mori N, Takaku F and Shibata S:** Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *J Biochem (Tokyo)* 101:331–338, 1987.
- 159.Kawanaka K, Nolte LA, Han DH, Hansen PA and Holloszy JO:** Mechanisms underlying impaired GLUT-4 translocation in glycogen-supercompensated muscles of exercised rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism.* 279:E1311–1318, 2000.
- 160.Kelly M, Keller C, Avilucea PR, Keller P, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Hidalgo J, Saha A K, Pedersen BK and Ruderman NB:** AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochemical and Biophysical Research. Communication,* 320: 449–454, 2004.
- 161.Kim KH, Lee K, Moon YS and Sul HS:** A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 276: 11252–11256, 2001.
- 162.Kliwer SA, Xu HE, Lambert MH and Willson TM:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: From Genes to Physiology. *Recent Prog Horm Res* 56:239-63, 2001.
- 163.Kleinert H, Pautz A, Linker K and Schwarz PM:** Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 500: 255– 266, 2004.
- 164.Kleinert H, Schwarz PM and Förstermann U:** Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol. Chem.* 384: 1343 – 1364, 2003.
- 165.Klener P:** Cytokiny ve vnitřním lékařství. Grada 1997.
- 166.Klover PJ and Mooney RA:** Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36 (5): 753-758, 2004.
- 167.Knowles RG and Moncada S:** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249– 258, 1994.

- 168.Koh KK, Han SH and Quon MJ:** Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol* 46:1978–1985, 2005.
- 169.Konkar AA, Zhu Z and Granneman JG:** Aryloxypropanolamine and catecholamine ligand interactions with the β 1-adrenergic receptor: evidence for interaction with distinct conformations of β 1-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 923– 932, 2000.
- 170.Korkmaz H, Bloch W, Bölck B, Labbé D, Addicks K and Arnhold S:** The developmental stage and cell type dependent phosphorylation of eNOS in murine enteric mucosa and myenteric plexus. *J Mol Hist* 38:227–235, 2007.
- 171.Krief S, Lönnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Amer P, Strosberg AD, Ricquier D and Emorine LJ:** Tissue Distribution of β 3-adrenergic Receptor mRNA in Man. *J. Clin. Invest* 91:344-349, 1993.
- 172.Krohn RI:** The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Toxicology*; APPENDIX 31, 2005.
- 173.Kurebayashi S, Xua X, Ishii S, Shiraishi M, Kouhara H and Kasayamaa S:** A novel thiazolidinedione MCC-555 down-regulates tumor necrosis factor- α -induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 182,71–77, 2005.
- 174.Lafontan M, Berlan M, Sengenès C, Moro C, Crampes F and Galitzky J:** AMP- and cGMP-dependent control of lipolysis and lipid mobilization in humans: putative targets for fat cell management. In: *Insights into Receptor Function and New Drug Development Targets*, eds. Conn M, Kordon C and Christen Y: 53-77, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006.
- 175.Lambert M and Neish AC:** Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. *Can J Res* 28:83-89, 1950.

- 176.Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Rydén M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, van Harmelen V, Gross RW, Holm C, Arner P:** Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54(11):3190–3197, 2005.
- 177.Langin D:** Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacological Research* 53: 482–491, 2006.
- 178.LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB and Tomas E:** Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: 175–181, 2006.
- 179.Leclercq IA, Morais ADS, Schroyen B, Van Hul N and Geerts A:** Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences – Review. *Journal of Hepatology* 47:142–156, 2007.
- 180.Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Strada E, Seip R, Orlova C and Mantzoros CS:** Circulating Resistin Levels Are Not Associated with Obesity or Insulin Resistance in Humans and Are Not Regulated by Fasting or Leptin Administration: Cross-Sectional and Interventional Studies in Normal, Insulin- Resistant, and Diabetic Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(10):4848–4856, 2003.
- 181.Leff T:** AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochemical Society Transactions* 31: 224-227, 2003.
- 182.Lehrke M, Reilly MP., Millington SC, Iqbal N, Rader DJ and Lazar MA:** An inflammatory Cascade Leading to Hyperresistinemia in Humans. *PLoS Med* 1(2): e45, 2004.
- 183.Lennon AM, Ramage M, Dessouroux Am and Pierre M:** MAP kinase cascades are activated in astrocytes and preadipocytes by 15-deoxy-Delta(12–14)-prostaglandin J(2) and the thiazolidinedione ciglitazone through peroxisome proliferator activator receptor gamma-independent mechanisms involving reactive oxygenated species. *J Biol Chem* 277: 29681–29685, 2002.

- 184. Leung JM, Stanley T, Mathew J, Curling P, Barash P, Salmenpera M, Reves JG, Hollenberg M and Mangano DT:** An initial multicenter, randomized controlled trial on the safety and efficacy of acadesine in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *SPI Research Group. Anesthesia and analgesia* 78: 420–434, 1994.
- 185. Li J, Zeng Z, Viollet B, Ronnett GV and McCullough LD:** Neuroprotective Effects of Adenosine Monophosphate- Activated Protein Kinase Inhibition and Gene Deletion in Stroke. *Stroke*. 38(11):2992-2999, 2007.
- 186. Li M, Pascual G and Glass CK:** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4699–4707, 2000.
- 187. Lihn AS, Jessen N, Pedersen SB, Lund S and Richelsen B:** AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316: 853–858, 2004.
- 188. Lincová D and Farghali H:** Základní a aplikovaná farmakologie. Galén 2005
- 189. Linscheid P, Keller U, Blau N, Schaer DJ and Müller B:** Diminished production of nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin by rosiglitazone in adipocytes. *Biochem Pharmacol.* 65(4):593-598, 2003.
- 190. Longnus SL, Wambolt RB, Parsons HL, Brownsey RW and Allard MF:** 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 284:936-944, 2003.
- 191. Loke YK, Derry S and Pritchard-Copley A:** Appetite suppressants and valvular heart disease – a systematic review. *BMC Clinical Pharmacology* 2:6, 2002.

- 192. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura and Matsuzawa Y:** PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50:2094–2099, 2001.
- 193. MacDonald C, Wojtaszewski JF, Pedersen BK, Kiens B and Richter EA:** Interleukin-6 release from human skeletal muscle during exercise: relation to AMPK activity. *Journal of Applied Physiology* 95: 2273–2277, 2003.
- 194. Machrouhi F, Ouhamou N, Laderoute K, Calaoagan J, Bukhtiyarova M, Ehrlich PJ and Klon AE:** The rational design of a novel potent analogue of the 5'-AMP-activated protein kinase inhibitor compound C with improved selectivity and cellular activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 20(22):6394-6399, 2010.
- 195. Mairal A, Langin D, Arner P and Hoffstedt J:** Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia.* 49, 1629–1636, 2006.
- 196. Manzl C, Schubert M, Schwarzbaum PJ and Krumschnabel G:** Effects of chemical anoxia on adrenergic responses of goldfish hepatocytes and the contribution of alpha- and beta-adrenoceptors. *Journal of Experimental Zoology* 292(5): 468-476, 2002.
- 197. Marcus C, Ehrén H, Bolme P and Arner P:** Regulation of lipolysis during the neonatal period. Importance of thyrotropin. *J Clin Invest* 82:1793–1797, 1988.
- 198. Marley AE, Sullivan JE, Carling D, Abbott WM, Smith GJ, Taylor IW, Carey F and Beri RK:** Biochemical characterization and deletion analysis of recombinant human protein phosphatase 2C alpha. *The Biochemical Journal.* 320: 801–806, 1996.
- 199. Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B and Auwerx J:** Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J. Biol. Chem.* 272: 28210–28217, 1997.

- 200. Martyn JAJ, Kaneki M and Yasuhara S:** Obesity-induced Insulin Resistance and Hyperglycemia - Etiologic Factors and Molecular Mechanisms. *Anesthesiology*. 109:137–148, 2008.
- 201. Mathvink RJ, Tolman JS, Chitty D, Candelore MR, Cascieri MA, Colwell LF Jr., Deng L, Feeney WP, Forrest MJ, Hom GJ, MacIntyre DE, Miller RR, Stearns RA, Tota L, Wyvratt MJ, Fisher MH and Weber AE:** Discovery of a Potent, Orally Bioavailable β_3 Adrenergic Receptor Agonist, (*R*)-*N*-[4-[2-[[2-Hydroxy-2-(3-pyridinyl)ethyl]amino] ethyl]phenyl] -4-[4-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiazol-2-yl]benzenesulfonamide. *J. Med. Chem.* 43: 3832-3836, 2000.
- 202. Mc Ternan PG, Fisher FM, Valsamakis G, Chetty R, Harte A, MC Ternan CL, Clark PMS, Smith SA, Barnett AH and Kumar S:** Resistin and Type 2 Diabetes: Regulation of Resistin Expression by Insulin and Rosiglitazone and the Effects of Recombinant Resistin on Lipid and Glucose Metabolism in Human Differentiated Adipocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(12):6098–6106, 2003.
- 203. Mehebik N, Jaubert AM, Sabourault D, Giudicelli Y and Ribière C:** Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C379–C387, 2005.
- 204. Mei J, Holst LS, Landstrom TR, Holm C, Brindley D, Manganiello V and Degerman E:** C2-ceramide influences the expression and insulin-mediated regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 51:631–7, 2002.
- 205. Mineo H, Oda C, Chiji H, Kawada T, Shimizu K and Taira T:** Thiazolidinediones exhibit different effects on preadipocytes isolated from rat mesenteric fat tissue and cell line 3T3-L1 cells derived from mice. *Cell Biology International* 31:703-710, 2007.

- 206. Mizuno K, Kanda Y, Kuroki Y, Tomiyama K and Watanabe Y:** Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in 3T3-L1 adipocytes by stimulation of β adrenoceptor 3. *European Journal of Pharmacology* 385:63–69,1999.
- 207. Mizuno K, Kanda Y, Kuroki Y and Watanabe Y:** The stimulation of b -adrenoceptor causes phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through a G - but not G-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Pharmacology* 404:63–68, 2000.
- 208. Moncada S and Higgs EA:** Nitric Oxide and the Vascular Endothelium. *HEP* 176(I): 213–254, 2006.
- 209. Moore MC, DiCostanzo CA, Smith MS, Farmer B, Rodewald TD, Neal DW, Williams PE and Cherrington AD:** Hepatic portal venous delivery of a nitric oxide synthase inhibitor enhances net hepatic glucose uptake *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E768–E777, 2008.
- 210. Moraes RC, Blondet A., Birkenkamp-Demtroeder K., Tirard J., Orntoft TF, Gertler A, Durand P, Naville D and Bégeot M:** Study of the Alteration of Gene Expression in Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice by Microarray and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analyses. *Endocrinology* 144: 4773–4782, 2003.
- 211. Moreau R:** Are nitric oxide synthases new players in the pathophysiology of fulminant hepatic failure? *J Hepatol* 37: 678-680, 2002.
- 212. Moreira FA and Crippa JAS:** The psychiatric side-effects of rimonabant. *Rev Bras Psiquiatr.* 31(2):145-153, 2009.
- 213. Moriyama M, Nakanishi Y, Tsuyama S, Kannan Y, Ohta M and Sugano T:** Change from β - to α -adrenergic glycogenolysis induced by corticosteroids in female rat liver. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 273 (1): R153-R160, 1997.

- 214. Morley JE and Flood JF:** Effect of competitive antagonism of NO synthetase on weight and food intake in obese and diabetic mice. *Am J Physiol* 266: R164-168, 1994.
- 215. Mukherjee R, Hoener PA, Jow L, Bilakovics J, Klausning K, Mais DE, Faulkner A, Croston GE and Paterniti JR Jr.:** A Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR γ) Modulator Blocks Adipocyte Differentiation but Stimulates Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular Endocrinology* 14:1425–1433, 2000.
- 216. Muriel P:** Regulation of nitric oxide synthesis in the liver *J. Appl. Toxicol.* **20**: 189-195, 2000.
- 217. Murphy GJ, Kirkham DM, Cawthorne MA and Young P:** Correlation of β 3-adrenoreceptor-induced activation of cyclic AMP-dependent protein kinase with activation of lipolysis in rat white adipocytes. *Biochemical Pharmacology* 46 (4): 575-581, 1993.
- 218. Musi N and Goodyear LJ:** Insulin Resistance and Improvements in Signal Transduction. *Endocrine* 29(1):73–80, 2006.
- 219. Nagaev I and Smith U:** Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 561–564, 2001.
- 220. Nahmias C, Blin N, Elalouf JM, Mattei MG, Strosberg AD and Emorine LJ:** Molecular characterization of the mouse, β ₃-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *The EMBO Journal* 10(12):3721 -3727, 1991.
- 221. Naitoh T, Kitahara M and Tsuruzoe N:** The effect of activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) on human monocyte function: PPAR γ ligands do not inhibit tumor necrosis factor- α release in human monocytic cell line THP-1. *Cell Biol Toxicol* 16:131–135, 2000.

- 222.Nantel F, Bonin H, Emorine LJ, Zilberfarb V, Strosberg AD, Bouvier M and Marullo S:** The human β_3 -adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol. Pharmacol* 43: 548-555, 1993.
- 223.Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B:** Medical management of hyperglycemia in type 2 Diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 32: 193-203, 2009.
- 224.Nedergaard J, Ricquier D and Kozak LP:** Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects - Meeting on Uncoupling Proteins. *EMBO Rep* 6(10):917-21, 2005.
- 225.Nishida M, Funahashi T and Shimomura I:** Pathophysiological significance of adiponectin. *Med Mol Morphol* 40:55–67, 2007.
- 226.Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A, Shibata R, Qiu J, Kudo C, Shin HK, Moskowitz MA and Ouchi N:** Adiponectin Prevents Cerebral Ischemic Injury Through Endothelial Nitric Oxide Synthase–Dependent Mechanisms. *Circulation* 117:216-223, 2008
- 227.Nisoli E, Clementi E, Carruba MO and Moncada S:** Defective Mitochondrial Biogenesis: A Hallmark of the High Cardiovascular Risk in the Metabolic Syndrome? *Circ. Res.* 100:795-806, 2007.
- 228.Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Nagaretani H, Kumada M, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Hiraoka H, Iwashima Y, Ishikawa K, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H, Ogiwara T and Matsuzawa Y:** Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 43:1195–1200, 2004.
- 229.Oikonomakos NG:**Glycogen Phosphorylase as a Molecular Target for Type 2 Diabetes Therapy. *Current Protein and Peptide Science* 3: 561-586, 2002.

- 230.Okazaki H, Osuga J, Tamura Y, Yahagi N, Tomita S, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Kimura S, Gotoda T, Shimano H, Yamada N and Ishibashi S:** Lipolysis in the Absence of Hormone-Sensitive Lipase Evidence for a Common Mechanism Regulating Distinct Lipases. *Diabetes* 51:3368–3375, 2002.
- 231.Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y and Kadowaki T:** Troglitazone Increases the Number of Small Adipocytes without the Change of White Adipose Tissue Mass in Obese Zucker Rats. *J. Clin. Invest* 101:1354–1361, 1998.
- 232.Olken NM and Marletta MA:** NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry* 32(37):9677-85, 1993.
- 233.Ota S, Horigome K, Ishii T, Nakai M, Hayashi K, Kawamura T, Kishino A, Taiji M and Kimura T:** Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388:311–316, 2009.
- 234.Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T and Matsuzawa Y:** Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein. *Circulation* 100:2473– 6, 1999.
- 235.Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y:** Adiponectin, adipocyte-derived protein, inhibits endothelial NFκB signaling through cAMPdependent pathway. *Circulation* 102:1296 –301, 2000.
- 236.Owen MR, Doran E and Halestrap AP:** Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical Journal* 348: 607–614, 2000.

- 237.Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M and Scherer PE:** Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278:9073–9085, 2003.
- 238.Pan J, Burgher KL, Szczepanik AM and Ringheim GE:** Tyrosine phosphorylation of inducible nitric oxide synthase : implications for potential post-translational regulation. *Biochem. J.* 314: 889-894, 1996.
- 239.Peraldi P, Xu M and Spiegelman BM:** Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- α -induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest* 100:1863–1869, 1997.
- 240.Pérez-Ortiz JM, Tranque P, Burgos M, Vaquero CF and Llopis J:** Glitazones Induce Astrogloma Cell Death by Releasing Reactive Oxygen Species from Mitochondria: Modulation of Cytotoxicity by Nitric Oxide. *Mol Pharmacol* 72:407–417, 2007
- 241.Petersen KF and Sullivan JT:** Effects of a novel glucagon receptor antagonist (Bay 27-9955) on glucagonstimulated glucose production in humans. *Diabetologia* 44:2018–2024, 2001.
- 242.Pietri-Rouxel F and Strosberg AD:** Pharmacological characteristics and species-related variations of β 3-adrenergic receptors. *Fundam Clin Pharmacol* 9:211–218, 1995.
- 243.Pilkis S, E1-Maghrabi M and Claus T:** Fructose-2,6-bisphosphate in control of hepatic gluconeogenesis. *Diabetes* 13: 582-599, 1990.
- 244.Pilon G, Dallaire P and Marette A:** Inhibition of Inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 20767–20774, 2004.
- 245.Plomgaard P, Nielsen AR, Fischer CP, Mortensen OH, Broholm C, Penkowa M, Krogh-Madsen R, Erikstrup C, Lindegaard B, Petersen AMW, Taudorf S and Pedersen BK:** Associations between insulin resistance and TNF- α in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes.*Diabetologia* 50:2562–2571, 2007.

- 246.Prathipati P and Saxena AK:**Characterization of β_3 -adrenergic receptor: determinativ of pharmacophore and 3D QSAR model for β_3 adrenergic receptor agonism. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 19: 93–110, 2005.
- 247.Proietto J and Andrikopoulos S:** Molecular mechanisms of increased glucose production: Identifying potential therapeutic targets. *Journal of Investigative Medicine* 52 (6): 389-393, 2004.
- 248.Puy-Portillo M, Del Barrio AS, Garcia-Calonge MA and Martinez JA:** Desenzitisation effect of in vivo treatment with metaproterenol on β -1, β -2 and β -3-adrenergic responsiveness in rat adipocytes. *Life Sciences* 58:405-414, 1996.
- 249.Qiang L, Wang H, Farmer SR:** Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L alpha. *Mol Cell Biol* 27(13): 4698–4707, 2007.
- 250.Qureshi SA, Candelore MR, Xie D, Yang X, Tota LM, Ding VD, Li Z, Bansal A, Miller C, Cohen SM, Jiang G, Brady E, Saperstein R, Duffy JL, Tata JR, Chapman KT, Moller DE and Zhang BB:** A novel glucagon receptor antagonist inhibits glucagonmediated biological effects. *Diabetes* 53:3267–3273, 2004.
- 251.Rahn Landström T, Mei J, Karlsson M, Manganiello V and Degerman E:** Down-regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase 3B in 3T3-L1 adipocytes induced by tumour necrosis factor α and cAMP. *Biochem J* 346:337–43, 2000.
- 252.Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya I, Yao-Borengasser A, Phanavanh B, Lecka-Czernik B, Rasouli N and Kern PA:** The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J. Lipid Res.* 47, 2444–2450, 2006.
- 253.Ribiere C, Jaubert AM, Gaudiot N, Sabourault D, Marcus ML, Boucher JL, Denis-Henriot D and Giudicelli Y:** White Adipose Tissue Nitric Oxide Synthase: A Potential Source for NO Production. *Biochemical and biophysical research communications* 222: 706–712, 1996.

- 254.Rieusset J, Touri F, Michalik L, Escher P, Desvergne B, Niesor E and Wahli W:** A new selective peroxisome proliferator-activated receptor antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol. Endocrinol.* 16: 2628–2644, 2002.
- 255.Rivera N, Everett-Grueter CA, Edgerton DS, Rodewald T, Neal DW, Nishimura E, Larsen MO, Jacobsen LO, Kristensen K, Brand CL and Cherrington AD:** A novel glucagon receptor antagonist, NNC 25-0926, blunts hepatic glucose production in the conscious dog. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321: 743–752, 2007.
- 256.Rodbell M:** Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239: 375–380, 1964.
- 257.Rosenbaum M, Malbon CC, Hirsch J and Leibel RL:** Lack of β_3 -adrenergic effect on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 77(2):352-5, 1993.
- 258.Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, Rauser L, McBride A, Hufeisen SJ and Roth BL:** Evidence for Possible Involvement of 5-HT_{2B} Receptors in the Cardiac Valvulopathy Associated With Fenfluramine and Other Serotonergic Medications. *Circulation* 102:2836-2841, 2000.
- 259.Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F and Ido Y:** AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E751–E760, 2010.
- 260.Russell JM and Mackell JA:** Bodyweight gain associated with atypical antipsychotics: epidemiology and therapeutic implications. *CNS Drugs* 15 : 537–551, 2001.
- 261.Rutter GA, Da Silva XG and Leclerc I:** Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *The Biochemical Journal* 375: 1–16, 2003.

- 262. Ryden M, Dicker A, Harmelen VV, Hauner H, Brunnberg M, Perbeck L, Lonnqvist F, Arner P:** Mapping of early signalling events in TNF α -mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* 277:1085–91, 2002.
- 263. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y and Funahashi T:** Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J* 68:975–981, 2004.
- 264. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Nagaretani H, Kumada M, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Hiraoka H, Iwashima Y, Ishikawa K, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H, Ogihara T and Matsuzawa Y:** Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 43:1195–1200, 2004.
- 265. Sakamoto T, Kaikita K, Miyamoto S, Kojima S, Sugiyama S, Yoshimura M and Ogawa H:** Effects of nicorandil on endogenous fibrinolytic capacity in patients with coronary artery disease. *Circ J* 68:232–235, 2004.
- 266. Salamone JD, McLaughlin PJ, Sink K, Makriyannis A and Parker LA:** Cannabinoid CB1 receptor inverse agonists and neutral antagonists: Effects on food intake, food-reinforced behavior and food aversions. *Physiology and Behavior* 91:383–388, 2007.
- 267. Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D and Hardie DG:** AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *The Biochemical Journal*, 334(1): 177–187, 1998.
- 268. Sanghani MP and Scarpace PJ:** Atypical β -adrenergic receptors in rat-liver-evidence for transient expression during aging. *Journals of Gerontology* 49(2): B60-B64, 1994.
- 269. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S:** Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- γ action in humans. *Diabetes* 50(10): 2199–2202, 2001.

- 270.Sengenes C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M and Galitzky J:** Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J* 14:1345–51, 2000.
- 271.Sengenes C, Zakaroff-Girard A, Moulin A, Berlan M, Bouloumie A, Lafontan M and Galitzky J:** Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R257–265, 2002.
- 272.Sengenes C, Bouloumie A, Hauner H, Berlan M, Busse R, Lafontan M and Galitzky J:** Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 278:48617–48626, 2003.
- 273.Schweizer M and Richter C:** Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.204(1):169-175, 1994.
- 274.Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ and Baskin DG:** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661– 671, 2000.
- 275.Shapiro L and Scherer PE:** The crystal structure of a complement- 1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 8:335–338, 1998.
- 276.Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M and Cantley LC:** The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310, 1642–1646, 2005.
- 277.Shekelle PG, Hardy ML, Morton SC, Maglione M, Mojica WA, Suttorp MJ, Rhodes SL, Jungvig L and Gagne J.:** Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *JAMA* 289(12):1537-45, 2003.
- 278.Shekelle PG, Morton SC, Maglione MA, Suttorp M, Tu W, Li Z, Maggard M, Mojica WA, Shugarman L, Solomon V, Jungvig L, Newberry SJ, Mead D and Rhodes S:** Pharmacological and Surgical Treatment of Obesity. Evidence Report/Technology Assessment No. 103. AHRQ Publication No. 04-E028-2. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality, 2004.

- 279. Shen WJ, Patel S, Yu Z, Jue D and Kraemer FB:** Effects of rosiglitazone and high fat diet on lipase/esterase expression in adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1771, 177–184, 2007.
- 280. Sheu SH, Kaya T, Waxman DJ and Vajda S:** Exploring the Binding Site Structure of the PPAR γ Ligand-Binding Domain by Computational Solvent Mapping. *Biochemistry* 44:1193-1209, 2005,
- 281. Shiroyama K, Moriwaki K and Yuge O:** The direct effect of dopamine on glucose release from primary cultured rat hepatocytes. *In vivo* 12(5): 527-529, 1998.
- 282. Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y and Asano T:** Humoral Regulation of Resistin Expression in 3T3-L1 and Mouse Adipose Cells. *Diabetes* 51: 1737–1744, 2002.
- 283. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B and Auwerx J:** PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*. 15: 5336-5348, 1996(a).
- 284. Schoonjans K, Staels B and Auwerx J:** The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1302: 93-109, 1996(b).
- 285. Silverman RB:** Design of Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors for the Prevention and Treatment of Neurodegenerative Diseases. **Accounts of chemical research**. 42(3):439-451, 2009.
- 286. Sinha TK, Thajchayapong P, Queener SF, Allen DO and Bell NH:** On the lipolytic action of parathyroid hormone in man. *Metabolism* 25:251–260, 1976.

- 287.Smith U, Axelsen M, Carvalho E, Eliasson B, Jansson PA, Wesslau C:** Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. Ann. New York Acad. Sci. 892: 119–126,1999
- 288.Sohda T, Mizuno K, Tawada H, Sugiyama Y, Fujita T and Kawamatsu Y:** Studies on antidiabetic agents. I. Synthesis of 5-[4-(2-methyl-2-phenylpropoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (AL-321) and related compounds. Chem. Pharm. Bull. 30: 3563-3573, 1982.
- 289.Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, Lien P, Franciosa MD, Moss LG and Greenberg AS:** Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3–L1 adipocytes. J Biol Chem 273:24665–24669, 1998.
- 290.Souza SC, Yamamoto MT, Franciosa MD, Lien P and Greenberg AS:** BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor- α : a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones. Diabetes 47:691–695, 1998.
- 291.Stadler J, Barton D, Beilmoeller H, Diekmann S, Hierholzer C, Erhard W and Heidecka CD:** Hepatocyte nitric-oxide biosynthesis inhibits glucose output and competes with urea synthesis for L- arginine. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 31 (1):G183-G188, 1995.
- 292.Stites DP and Terr AI:** Základní a klinická imunologie. Victoria Publishing. 1994
- 293.Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD and Carling D:** The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. The Biochemical Journal, 345(3): 437–443, 2000.
- 294.Stejskal D, Prošková J, Adamovská S, Juráková R, Bartek J:** Preliminary experience with resistin assessment in common population. Biomed. Papers 146(2): 47–49, 2002.

- 295. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS and Lazar MA:** The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307–312, 2001
- 296. Stralfors P, Olsson H and Belfrage P:** Hormone-sensitive lipase. In *The Enzymes*. Boyer PD, Krebs EG, Eds. New York, Academic Press: 147–177, 1987
- 297. Sugita H, Kaneki M., Tokunaga E, Sugita M., Koike C, Yasuhara S, Tompkins RG and Jeevendra M:** Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282 (2): E386- E394, 2002.
- 298. Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D and Beri RK:** Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett.* 353: 33–36, 1994.
- 299. Summers SA, Whiteman EL, Birnbaum MJ:** Insulin signaling in the adipocyte. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24(4): S67–S70, 2000.
- 300. Sun Y, Connors KE and Yang DQ:** AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Mol Cell Biochem* 306:239–245, 2007.
- 301. Suzuki A, Kusakai G, Kishimoto A, Shimojo Y, Ogura T, Lavin MF and Esumi H:** IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 324:986–992, 2004.
- 302. Svačina Š:** *Metabolický syndrom*. Triton, 2001.
- 303. Takahashi M, Funahashi T, Shimomura I, Miyaoka Y and Matsuzawa Y:** Plasma leptin levels and body fat distribution. *Horm Metab Res* 28:751–752, 1996

- 304. Tallett AJ, Blundell JE and Rodgers RJ:** Endogenous opioids and cannabinoids: System interactions in the regulation of appetite, grooming and scratching. *Physiology and Behavior* 94(3):422-31, 2008.
- 305. Tarpey MM, Wink DA and Grisham MB:** Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R431–R444, 2004.
- 306. Thomas MS, Zhang WR, Jordan PM, Saragovi HU and Tagliabatella G:** Signaling pathways mediating a selective induction of nitric oxide synthase II by tumor necrosis factor alpha in nerve growth factor-responsive cells. *Journal of Neuroinflammation* 2:19, 2005.
- 307. Thomson DM, Herway ST, Fillmore N, Kim H, Brown JD, Barrow JR, Winder WW:** AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol* 104, 429–438, 2008.
- 308. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CC, Itani SI, Lodish HF and Ruderman NB:** Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proceedings of National Academic Sciences of the United States of America*, 99:16309–16313, 2002.
- 309. Torres J, Cooper CE, Sharpe M and Wilson MT:** Reactivity of Nitric Oxide with Cytochrome c Oxidase: Interactions with the Binuclear Centre and Mechanism of Inhibition. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 30(1):63-69, 1998.
- 310. Tosh D and Agius L:** Glycogen degradation by adrenergic agonists and glucagon in periportal and perivenous rat hepatocyte cultures. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1221(3): 238-242, 1994.
- 311. Tsuchiya K, Sakai H, Suzuki N, Iwashima F, Yoshimoto T, Shichiri M and Hirata Y:** Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high-fat-induced obese mice. *Endocrinology*. 148(10): 4548-56, 2007.

- 312. Tsukamoto H, Hishinuma T, Suzuki N, Tayama R, Hiratsuka M, Tomioka Y, Mizugaki M and Goto J:** Thiazolidinediones increase arachidonic acid release and subsequent prostanoid production in a peroxisome proliferator- activated receptor gamma-independent manner. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 73:191–213, 2004.
- 313. Umekawa T, Yoshida T, Sakane N, Kogure A, Kondo M and Honjyo H:** Trp64Arg mutation of β_3 -adrenoceptor gene deteriorates lipolysis induced by β_3 -adrenoceptor agonist in human omental adipocytes. *Diabetes* 48: 117–120, 1999.
- 314. Van Liefde I, Ermen AV and Vauquelin G:** No functional atypical β_1 -adrenergic receptors in human omental adipocytes. *Life Sci* 54: 209-214, 1994.
- 315. Vanermen A and Frayeman N:** Desensitization of alpha (1)-receptor, β -receptor and glucagon-receptor in rat hepatocytes –influence of aging *Mechanisms of Ageing and Development* 75 (1): 45-58, 1994.
- 316. Vardanega-Peicher M, Lopes G, Lima FB, Curi R, Nakano LC and Bazotte PB:** Time sequence of changes in the responsiveness of glycogen breakdown to adrenergic agonists in perfused liver of rats with insulin-induced hypoglycemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33 (7): 805-813, 2000.
- 317. Vicario PP, Candelore MR, Schaeffer MT, Kelly L, Thompson GM, Brady EJ, Saperstein R, MacIntyre DE, Tota LM and Cascieri MA:** Desensitisation of β_3 -adrenergic receptor- stimulated adenylyl cyclase activity and lipolysis in rats. *Life Sciences* 62: 627-638, 1998.
- 318. Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim K-H and Sul HS:** Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279:47066–47075, 2004.
- 319. Violette B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, Giri S and Andreelli F:** AMPK inhibition in health and disease *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45(4): 276–295, 2010.

- 320. Voleti B and Agrawal A:** Statins and nitric oxide reduce C reactive protein production while inflammatory conditions persist. *Mol. Immunol.* 43: 891-896, 2006.
- 321. Vos TA, Van Goor H, Tuyt L, De Jager-Krikken A, Leuvenink R, Kuipers F, Jansen PLM and Moshage H:** Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Endotoxemic Rat Hepatocytes Is Dependent on the Cellular Glutathione Status. *Hepatology* 29:421-426, 1999.
- 322. Wang H, Qiang L and Farmer SR:** Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol. Cell. Biol* 28(1): 188–200, 2008.
- 323. Way JM, Görgün CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR Jr, Willson TM, Kliwer SA and Hotamisligil GS:** Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by PPAR γ agonists. *J. Biol. Chem.* 276, 25651–25653, 2001
- 324. Weyrich P, Machicao F, Staiger H, Simon P, Thamer C, Machann J, Schick F, Guirguis A, Fritsche A, Stefan N, Häring HU:** Role of AMP-activated protein kinase γ 3 genetic variability in glucose and lipid metabolism in nondiabetic whites. *Diabetologia* 50:2097–2106, 2007.
- 325. Winder WW and Thomson DM:** Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochem Biophys* 47:332–347, 2007.
- 326. Woods SC:** The Endocannabinoid System: Mechanisms Behind Metabolic Homeostasis and Imbalance. *The American Journal of Medicine* 120(2A): S9–S17, 2007.
- 327. Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN and Spiegelman BM:** A Synthetic Antagonist for the Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Inhibits Adipocyte Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 275(3): 1873–1877, 2000.

- 328. Yamaguchi S, Katahira H, Ozawa S, Nakamichi Y, Tanaka T, Shimoyama T, Takahashi K, Yoshimoto K, Imaizumi MO, Nagamatsu S and Ishida H:** Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 289: E643–649, 2005.
- 329. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB and Kadowaki T:** Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 8: 1288–1295, 2002.
- 330. Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K and Kadowaki T:** Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 108, 1001–1013, 2001a
- 331. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S and Kadowaki T:** The Mechanisms by Which Both Heterozygous Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Deficiency and PPAR γ Agonist Improve Insulin Resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 276(44): 41245–41254, 2001b
- 332. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY and Chuang LM:** Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3815–3819, 2001.

- 333. Yang X and Smith U:** Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? *Diabetologia* 50:1127–1139, 2007.
- 334. Yatagai T, Nagasaka S, Taniguchi A, Fukushima M, Nakamura T, Kuroe A, Nakai Y and Ishibashi S:** Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 52:1274–1278, 2003.
- 335. Yeaman SJ:** Hormone-sensitive lipase—a multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1052:128–132, 1990.
- 336. Yin W, Mu J and Birnbaum MJ:** Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 43074–43080, 2003.
- 337. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-ruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A and Zechner R:** Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306: 1383–1386, 2004

13.1 Publikace 1

Hodis J, Vaclavíková R and Farghali H: Beta-3 agonist-induced lipolysis and nitric oxide production: relationship to PPARgamma agonist/antagonist and AMP kinase modulation. *General Physiology and Biophysics* 1(30):90-99, 2011

Beta-3 agonist-induced lipolysis and nitric oxide production: relationship to PPARgamma agonist/antagonist and AMP kinase modulation

Jiří Hodis¹, Radka Vaclavíková² and Hassan Farghali¹

¹ Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

² Biotransformations Group, National Institute of Public Health, Center of Occupational Diseases, Prague, Czech Republic

Abstract. PPARgamma receptor agonist – troglitazone increases insulin sensitivity in visceral adipocytes and also increases fat mass. Beta-3 adrenergic receptor agonists mediate lipolysis and NO production (iNOS transcription) in visceral adipocytes. Troglitazone could possibly interfere with Beta-3-triggered lipolysis. We tested the crosstalk between PPARgamma agonist and Beta-3 agonist pathways on lipolysis and NO production in first 24 hours of treatment. Isolated epididymal rat adipocytes were cultivated in DMEM for 24 hours with treatment with Beta-3 agonist – BRL-37344, PPARgamma agonist – troglitazone, PPARgamma antagonist – SR-202 and AMPK blocker – compound C alone as well as in combinations. After 24 hours, lipolysis was measured by free glycerol, NO production by Griess reagent and iNOS mRNA by qRT-PCR. BRL-37344 increased lipolysis and NO production with iNOS transcription. Troglitazone increased all the three parameters as well but less than BRL-37344. Combination of troglitazone or SR-202 with BRL-37344 decreased NO production, iNOS transcription and lipolysis triggered before adding of BRL-37344. Compound C completely blocked the effect of troglitazone (and SR-202 as well) on BRL-37344. PPARgamma agonist/antagonist interferes with Beta-3 agonist activity in 24 hours. Troglitazone/SR-202 effect on Beta-3 triggered lipolysis and iNOS mRNA production is probably not PPAR gamma- but rather AMPK-dependent in first 24 hours (AMPK blocker – compound C blocked the effect).

Key words: Nitric oxide — Lipolysis — Adipocytes — Beta-3 agonists — Troglitazone — PPARgamma

Abbreviations: AMPK, adenosine monophosphate kinase; ANP, atrial natriuretic peptide; HSL, hormone sensitive lipase; MAPK, mitogen activated protein kinase; MGL, monoglyceride lipase; NEFA, non-esterified fatty acids; NFkB, nuclear factor kB; NOS, NO synthase; nNOS neuronal NOS; eNOS, endothelial NOS; iNOS, inducible NOS; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PKG, protein kinase G; PPARgamma, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) agonists (glitazones, thiazolidindiones) along with metformin are known as anti-insulin resistance drugs and are approved by EASD (European association for the Study

of Diabetes) and ADA (American Diabetes Association) for diabetes mellitus type 2 treatments (Nathan et al. 2009). Beside PPARgamma specific activity glitazones were described to have nonPPAR gamma – AMPK direct activating effect (LeBrasseur et al. 2006). PPARgamma specific antagonists were developed, from which SR-202 (phosphonophosphate) was reported to modulate selectively PPARgamma transcriptional activity both *in vitro* and *in vivo* (Rieusset et al. 2002). Beside glucose-lowering effect, glitazones led to weight gain, increased fat mass partially by improving the adipocyte's insulin sensitivity. The increase of the fat mass

Correspondence to: Jiří Hodis, Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University, Albertov 4, 120 00 Prague 2, Czech Republic
E-mail: hodis@atlas.cz

after PPARgamma agonists is dependent on induction of lipogenic enzymes acyl-coenzyme A (acyl-CoA): diacylglycerol transferase and fatty acid synthetase together with marked decrease of non-esterified fatty acids and triacylglyceride levels in blood (Schoonjans et al. 1996), lipoprotein lipase enhancing subsequent entrance of non-esterified fatty acids into adipocyte from vessel (Ranganathan et al. 2006) or intracellular transport facilitating proteins – fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase (Martin et al. 1997). The inhibition of lipolysis may be the other possible explanation.

Lipolysis in adipocytes is performed mainly by 3 known lipases: hormone sensitive lipase (HSL), adipose triglyceride lipase (ATGL) and monoglycerol lipase (MGL) (Arner 2005). HSL is activated mainly by phosphorylation performed by two protein kinases: PKA triggered by cAMP and PKG triggered by cGMP. cGMP increase is the result of atrial natriuretic peptide (ANP) or NO stimulation (Lafontan et al. 2006). One mode of increase HSL activity *via* phosphorylation is dependent on NO (cGMP) site1 phosphorylation by PKG (Garton et al. 1989). That is why NO should be involved in concerting HSL lipolysis.

NO as a free radical gas is generated by NO synthase (NOS; EC 1.14.13.39) in living organisms. The family of NOS enzymes consists of two constitutive isoforms, neuronal NOS (nNOS, NOS-I), endothelial NOS (eNOS, NOS-III), and one inducible NOS (iNOS, NOS-II) (Knowles and Moncada 1994; Alderton et al. 2001). In fat tissue iNOS plays the main role in NO production while eNOS production of NO production is low and nNOS has not been detected in adipocytes (Elizalde et al. 2000). NO production in adipocytes is mainly triggered by iNOS mRNA transcription. This mechanism is reviewed in some reports (Fryer et al. 2000; Jobgen et al. 2006). iNOS transcription and/or activation can be increased by Beta-3 agonists with cAMP as second messenger and PKA consequently (De Groot et al. 2003; Dessy et al. 2004; Canova et al. 2006). It was reported that CCAAT box (C/EBP binding site, positions –155 bp to –163 bp) is essential for cAMP-mediated induction of the rat iNOS promoter with involvement of C/EBPbeta and C/EBPdelta (Eberhardt et al. 1998). This mechanism is supposed in BRL-37344 triggered iNOS mRNA transcription as this pathway is unique for BRL-34344 treatment without concomitant side (ERK/MAPK) pathways (Gerhardt et al. 1999). NO as the main molecule of vasodilatation is being recognized to have metabolic consequences with impact on different metabolic pathways as reviewed earlier (Kleinert et al. 2003, 2004).

According to available literature, the short-term interaction of PPARgamma agonist or PPARgamma antagonist with Beta-3 agonist in primary isolated epididymal rat adipocytes has not been reported so far.

The present work, therefore, was directed to shed light on the crosstalk between Beta-3 mediated lipolysis and

NO production and the consequences of the PPARgamma agonist co-treatment. The selection of Beta-3 agonist as pharmacological tool is justified in the present work to help to differentiate the PPAR gamma agonist and antagonist effect on stimulated lipolysis and NO production.

Clarifying of the interactions mentioned above can help and lead to further step towards understanding adverse effects of glitazones in fat tissue and contribute to future investigations in seeking effective anti insulin-resistance drugs and antiobesity drugs.

Materials and Methods

Experimental animals

Male Wistar rats (Velaz-Lysolaje 250–350 g body weight, age 1.5–2 month) were used throughout the presented studies. Rats obtained tap water and standard granulated chow *ad libitum* and were maintained under standard 12/12 h light/dark cycle, temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity $50 \pm 10\%$. All rats were cared in compliance with the general guidelines of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague. The study protocol was approved by the Faculty Ethical Committee.

Isolation of rat white adipocytes

The rats were sacrificed and the epididymal fat pads were removed and kept in saline at 37°C . After drying in a piece of gauze, dissected fat pads were cut into small pieces and processed to the adipocyte isolation by collagenase digestion as described earlier (Rodbell 1964).

Briefly, adipose tissue was digested in a plastic vial with Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB; in mM: 121.0 NaCl, 5.95 KCl, 14.3 NaHCO_3 , 1.34 NaH_2PO_4 , 1.2 MgCl, 8 L-glutamine, 2.5 CaCl_2 and 12.7 glucose; pH 7.4) containing 2% bovine serum albumin (BSA) and 2 mg collagenase/5 ml of solution for 2 g of adipose tissue. The adipose tissue was subjected to constant shaking at 37°C for 60 min. After this incubation period, fat cells were separated from connective tissue by filtration through a nylon mesh 150 μm . The isolated adipocytes were washed three times with glucose-free KRB (in mM: 136 NaCl, 4.7 KCl, 1.25 MgSO_4 , 1.25 CaCl_2 , 5 Na_3PO_4 , 2 NaHCO_3 , 25 HEPES pH 7.4; with 2% BSA) to remove collagenase and stromavascular cell fraction accumulating as an infranatant under the floating fat cells.

Chemicals and reagents

High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin solution $100 \times$ L-glutamine, BSA fraction V, fatty acid-free BSA, BRL-37344 sodium salt, tro-

glitazone, SR-202, compound C (P-5499), DMSO, sulfanilic acid, *N*-(1-naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride and chromotropic acid were obtained from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic).

Gibco fetal bovine serum (FBS) was purchased from KRD (Prague, Czech Republic) and the crude collagenase was obtained from Sevapharma (Prague, Czech Republic). All other chemicals were obtained from standard sources and were the highest grade available or as described in Materials and Methods.

Primary adipocyte culture and treatments

Isolated adipocytes were incubated under sterile conditions in DMEM medium, pH 7.4, supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 100 µg/ml streptomycin and 100 IU/ml penicillin. BRL-37344, SR-202 or troglitazone was added before fat cells seeding directly to the culture medium to obtain the final concentration of 0.2 µM BRL-37344 (published non toxic concentration up to 10 µM, Gerhardt et al. 1999), 130 µM SR-202 (published non toxic concentration up to 400 µM, Rieusset et al. 2002), 40 µM troglitazone (minimal effect on mRNA iNOS seen above 10 µM, Pilon et al. 2004; minimal effect in decrease of inflammatory cytokines above 30 µM and no cytotoxic effect was seen till 60 µM troglitazone in some studies, Ji et al. 2001).

500 µl of packed adipocytes were placed in the 5.5 ml of enriched DMEM in air tight sterile polystyrene Petri dishes (Merci, Prague, Czech Republic) and maintained at 37°C, 95% air, and 5% CO₂. The floating adipocytes formed a well-visible fat layer on the surface of the medium. Hence, the medium under the fat cells was considered an infranatant. The dish-wares were loosely covered by lids and gently shaken. The treated and untreated adipocytes were incubated for 24 h as described in Table 1 which

demonstrates the treatment schedule with relevant Figures shown in results section.

Determination of NO production

NO production was determined by measuring the levels of its oxidation end products NO₂⁻ and NO₃⁻. The data presented here were expressed as nitrite levels of the total amount of nitrite/nitrate after the conversion of nitrate to nitrite by nitrate reductase in the presence of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. The nitrite formed was detected colorimetrically (540 nm) from centrifuged infranatant by nitrite/nitrate colorimetric method modified for 96-well plates or by Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine, and 2.5% H₃PO₄). The nitrite levels were extrapolated from NaNO₂ calibration curve.

Determination of lipolysis

Lipolysis was determined as the glycerol released to the culture medium from adipocytes. Glycerol medium levels were assessed spectrophotometrically (570 nm) according to a previously described method (Lambert and Neish 1950). Briefly, the 300-µl medium aliquots were rapidly transferred into glass tubes containing 300 µl of 10% (w/v) trichloroacetic acid. After shaking, the precipitates were separated by centrifugation at 3000 rpm for 3 min. Two hundred microliters of the supernatant was removed, mixed with 50 µl of 0.05 M NaIO₄ and incubated for 10 min at room temperature. Then, 50 µl of 2 M As₂O₃ dissolved in 10 N NaOH was added. Ten minutes later, 2.5 ml of chromotropic reagent, consisting of 30% H₂SO₄ and water-dissolved chromotropic acid (5.6 mM end concentration in reagent), was added and the resulting mixture was boiled for 30 min in water bath. After cooling

Table 1. Treatments of Beta-agonist (BRL-37344), PPARgamma agonist (troglitazone), PPARgamma antagonist (SR-202) and AMPK blocker (compound C) and their combination (24 hours cultivation)

Measured effect	Treatment								Fig. No.
	B	T	S	D	B+T	T+S	B+T+S	B+T+D	
Lipolysis (glycerol)	+	+	+		+	+	+		1
Lipolysis dependence on AMPK (glycerol)	+	+		+	+			+	2
NO production (medium nitrite)	+	+	+		+	+	+		3
NO production dependence on AMPK (medium nitrite)	+	+		+	+			+	4
iNOS mRNA (qRT-PCR)	+	+			+				5

B, BRL-37344; T, troglitazone; S, SR-202; D, compound C.

of the sample to room temperature, the absorbance of the purple product was measured colorimetrically at 570 nm and the glycerol levels were extrapolated from glycerol standard calibration curve.

The Beta-3-mediated lipolysis in adipocytes in 24 hours differs from that in the first 30 minutes. The period of 24 hours cultivation before measurement was suggested as compromise period between short acting catecholamines with maximal effect after 3 hours but still measurable activity in 24 hours and later on the activity of thiazolidinediones with ordinary time of action about 3 days. To minimize the possible downregulation of beta receptors after 3 days of cultivation as described earlier (Vicario et al. 1998), BRL-37344 as Beta-3 selective agonist was chosen among others because Beta-3 receptor is described to be the least down regulated beta receptor (Carpenne et al. 1993; Nantel et al. 1993) with stable BRL-37344 activity seen even after 10 days in comparison with other Beta agonists (Beta-3 not specific) (Granneman 1992; Puy-Portillo et al. 1996). Lipolysis and cAMP response to BRL-37344 is described to be stable even for different kinds of adipocytes from Wistar rat, lean Zucker (Fa/?) rats, obese Zucker (fa/fa) rats and human fat. In comparison, the response to isoprenaline is not similar in these different cell types (Hollenga et al. 1991). Moreover, BRL-37344 is selectively activating cAMP-PKA pathway without concomitant ERK-MAPK activation. This feature is specific for this compound in contrast to other Beta-3 agonists (Gerhardt et al. 1999).

Quantitative RT-PCR of *iNOS*

Isolation of total mRNA was performed immediately after cultivation *via* RNAase lipid tissue mini kit according to the manufacturer's recommendation (Qiagen, Czech Republic). Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using TaqMan Universal PCR Master mix (kit No. 4304437) and TaqMan Gene Expression Assays (*NOS₂* kit No.: Rn00561646_m1 and beta 2 microglobulin (*B2m*) kit No.: Rn00560865_m1) obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Relative quantification of gene expression – evaluation by real-time PCR-RNA integrity was determined by gel electrophoresis in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The total RNA concentration was estimated with fluorescence detection using an ultra sensitive RiboGreen RNA fluorescent nucleic acid reagent (kit No. R11490, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA was stored in aliquots at -80°C until use. cDNA was synthesized using 1.0 μg of total RNA by help of RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) with random hexamer primers according to the manufacturer's instructions. Expression of *NOS₂* and *B2m* genes was estimated using RotorGene 6000 machine

(Corbett Research, Sydney, Australia). The real-time PCR reaction mixtures contained 10 μl of 2x TaqMan Universal PCR Master Mix, 1.0 μl of specific TaqMan probe (final concentration 250 nM, labeled with 6-FAM at the 5'-end and with non-fluorescent quencher at the 3'-end, all Applied Biosystems), and primers for either *B2m* or *NOS₂* amplification (final concentration of 900 nM each), 5 μl of 4-times diluted cDNA template and water to a final volume of 20 μl . Cycling parameters were initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 60 s. Fluorescence was acquired after each extension step. The non-template control contained water instead of cDNA. Levels of the gene transcripts were quantified from triplicates. *B2m* was used as an endogenous control. The *NOS₂* gene expression was evaluated by comparative quantification assuming that it equals to $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ where $\Delta\Delta\text{ct} = \Delta\text{ct}(\text{sample of interest}) - \Delta\text{ct}(\text{calibrator})$. $\Delta\text{ct} = \text{ct}(\text{target gene, i.e. } NOS_2) - \text{ct}(\text{endogenous control, i.e. } B2m)$ where ct represents threshold cycle at which the fluorescence rises appreciably above the background fluorescence. mRNA from untreated adipocytes of experimental rats served as the calibrator (its value was assumed to equal 1).

Statistical analysis

All experiments were performed at a minimum three times in triplicates (means of at least 9 values) with blind samples as the media background.

The statistical significance of difference of mean scores was determined using the paired (for comparison of nitrate+nitrite *vs.* nitrite levels) or unpaired two-tailed Student's *t*-test or one-way ANOVA with *post hoc* Tukey-Kramer multiple comparison test. The time-dependence examination experiments were performed separately for each time point, thus the time differences were compared using one-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni pairwise comparison test, which compare data of longer time intervals with appropriate data of the shortest time interval in one experimental group. Results showing *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Lipolysis in visceral adipocytes is mainly modulated by adrenergic pathway beside ANP pathway. In our experiments adipocytes were incubated in 24 hours with Beta-3 agonist BRL-37344, PPARgamma agonist troglitazone, PPARgamma antagonist SR-202 and combination of the three treatments (see Table 1). Figure 1 demonstrates that the lipolysis was not significantly modulated by PPARagonist/antagonist in first 24 hours of primary isolated rat visceral adipocytes which

suggests that direct effect of these treatments on lipolytic activity would not be significant. As expected, the Beta-3 agonist activation of lipolysis reached to 150% of control level. In contrast to the Beta-3 triggered lipolysis was significantly down regulated by addition of troglitazone or SR-202 as seen in Figure 1. The observation that PPARgamma agonist and antagonist exhibited the same down regulation of Beta-3 triggered lipolysis led us to the concept, that the activity of these two compounds may be mediated through a different mode than only the PPARgamma pathway. Published results show that AMPK could be the alternative way of action of thiazolidindiones and similar compounds (LeBrasseur et al. 2006).

Figure 2 depicts that the effect of troglitazone on Beta-3 triggered lipolysis is modulated by AMPK as AMPK selective blocker (compound C). Addition of compound C to troglitazone+Beta-3 agonist mixture increases Beta-3-stimulated lipolysis to the level of Beta-3 alone level and in fact blocks the decrease caused by troglitazone.

As we found in the present results of an impact of PPARgamma agonists on lipolysis, we wonder if the same effect would appear in NO production since enhanced NO production during Beta-3 receptor activation in primary adipocytes was described in several reports (De Groot et al. 2003; Dessy et al. 2004; Canova et al. 2006).

The results of different treatment on NO production (Figure 3) demonstrate the same trend as shown with lipolysis in BRL-37344 (Beta-3 agonist) treatment, troglitazone (PPARgamma agonist) treatment and combination troglitazone and BRL-3734 treatments. The difference from lipolysis pattern can be seen in SR-202 addition to the mixture with troglitazone and to the mixture troglitazone and BRL-37344, where SR-202 exhibited additional

increase of NO production in both cases, while in lipolysis combination of troglitazone and SR-202 showed no effect. In our experiments NO is increased after troglitazone/SR-202 mixture but the effect of these compounds on Beta-3 agonist-triggered NO production is down-regulating. Moreover, the combination of PPARgamma agonist and antagonist should attenuate the effect and get back to basic control NO level. Instead the combination of PPARgamma agonist and antagonist show additive effect on NO production. The elevation of NO production after BRL-37344+troglitazone+SR-202 cannot be therefore explained as antagonist effect of SR-202 on troglitazone (otherwise SR-202 would block troglitazone effect on NO production when given in combination troglitazone+SR-202 without BRL-37344), rather this effect can be explained as additive effect of two independent pathways on NO production (similar results could be seen in our short-time (30 min) cultivation – data not shown).

The results of similar effect of PPARgamma agonist on Beta-3 pathway like in lipolysis and additive not opposite effect of PPARgamma agonist and antagonist mixture led us to investigate if this action is also mediated through AMPK pathway. As shown in Figure 4, AMPK blocker – compound C addition to troglitazone+Beta-3 agonist mixture increases Beta-3-stimulated NO production to the level of only Beta-3 level and in fact attenuates the decrease caused by troglitazone. At least troglitazone effect on Beta-3-triggered NO production seems to be AMPK-dependent. These our results with NO could be explained by known AMPK decreased transcription of mRNA iNOS (Pilon et al. 2004). That is why iNOS quantitative RTPCR was performed. The results of mRNA-iNOS shown in Figure 5 demonstrate that NO production in visceral adipocytes depends mainly on increase iNOS transcription

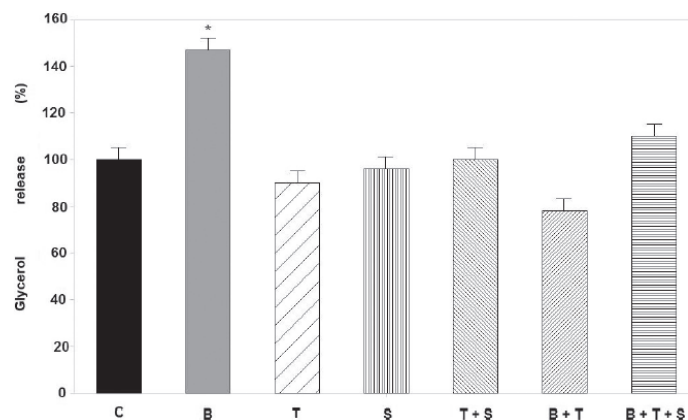


Figure 1. Effect of troglitazone, SR-202 and BRL-37344 and their combinations on lipolysis in isolated adipocytes expressed as free glycerol after 24 hour of cultivation. One-way ANOVA; * $p < 0.05$ vs. control and all other treatments. C, control; B, BRL-37344; T, troglitazone; S, SR-202.

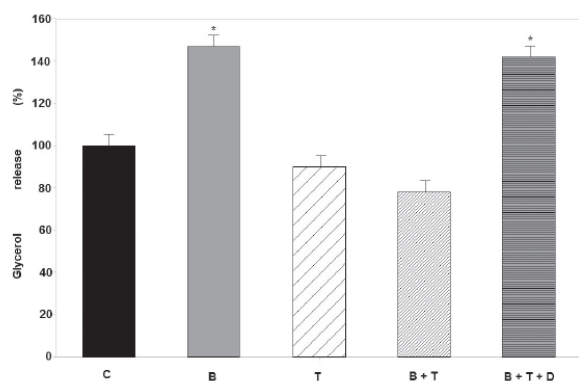


Figure 2. Effect of AMPK blocker – compound C on attenuation of BRL-37344-induced lipolysis with troglitazone. One-way ANOVA; * $p < 0.05$ vs. control. D, compound C (other abbreviations see Fig. 1).

after Beta-3 agonist (400% increase of iNOS mRNA level after BRL-37344). Mild enhancement of iNOS transcription can be seen in troglitazone treatment whereas combination of the Beta-3 agonist and troglitazone treatment completely blocks the iNOS mRNA transcription rate.

Discussion

The present data shed light on whether troglitazone (PPARgamma agonist) affect unstimulated lipolysis in 24 hours culture of visceral adipocytes. In our results the lipolysis was not significantly modulated by PPARgamma agonist or PPARgamma antagonist in first 24 hours of cultivation of vis-

ceral adipocytes. Some published papers describe elevation of ATGL mRNA transcription (4-fold) after PPARgamma agonist in a period of 15 weeks *in vivo* treatment with glitazone (Shen et al. 2007) or ATGL and MGL mRNA increase after 12 hours of *in vitro* cultivation in adipose tissue (Festuccia et al. 2006). But ATGL and MGL type of lipase, however, were found not to have important impact on lipolysis in human fat tissue being less active in triglyceride lipolysis (ATGL 6–10 fold) than HSL (Mairal et al. 2006). One report demonstrates that rosiglitazone PPARgamma agonist produced 3-fold increase of HSL mRNA in 24 hours after treatment in hepatoma SMMC-7721 cell line and primary human fetal liver cells (CCC-L) but not in adipose tissue (Deng et al. 2006). We assume that direct effect of glitazones on constitutive lipolytic activity in adipocytes in short period of 24 hours could be small according to the present data.

On the other hand we followed the assumption that troglitazone affects BRL-37344 (Beta-3 agonist)-triggered lipolysis in 24 hours culture of visceral adipocytes. In contrast to troglitazone or SR-202 alone and in combination, the Beta-3-triggered lipolysis was significantly down-regulated by troglitazone alone or PPARgamma blocker SR-202 in our experiments. Although there is a report describing PPARgamma-dependent decrease of Beta-3 adrenergic receptor mRNA transcription in 24 hours cultivation of HIB-1B brown adipocytes (Bakopanos and Silva 2000), the observation that PPARgamma agonist and antagonist produced the same results (decrease of Beta-3-triggered lipolysis instead of opposing effect) led us to hypothesize, that the activity of these two compounds is possibly mediated through an alternative and not only PPARgamma pathway in white adipocytes.

According to the available literature, there are several alternative non-PPARgamma pathways activated by glita-

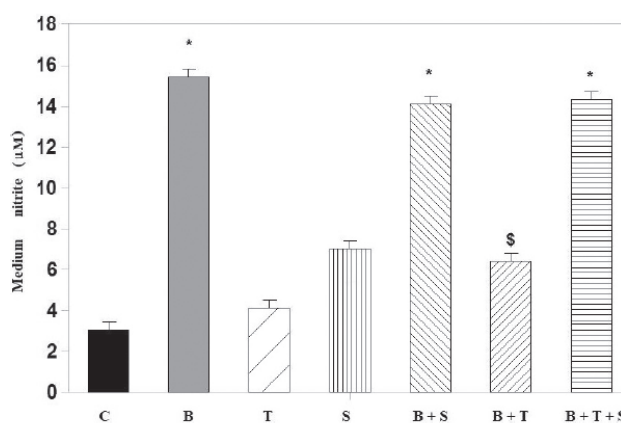


Figure 3. Effect of troglitazone, SR202 and BRL-37344 on NO production in isolated adipocytes expressed as NO_2^- . One-way ANOVA; * $p < 0.05$ vs. control; \$ $p < 0.05$ vs. BRL-37344 (abbreviations see Fig. 1).

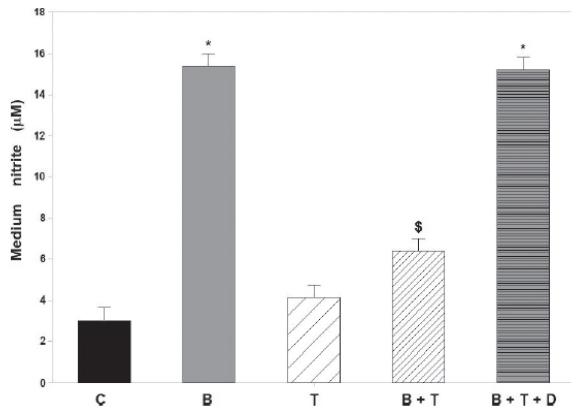


Figure 4. Effect of AMPK blocker – compound C on attenuation of BRL-37344-induced NO production with troglitazone. One-way ANOVA; * $p < 0.05$ vs. troglitazone; \$ $p < 0.05$ vs. BRL-37344 (abbreviations see Fig. 2).

zones: AMPK (LeBrasseur et al. 2006), MAPK (Gardner et al. 2005), NFkB (Kurebayashi et al. 2005), PKC (Bahr et al. 1996) and others (Feinstein et al. 2005). That is why we used compound C – selective AMPK blocker into the present experiments. Since AMPK blocker added to medium attenuated the effect of glitazone/PPARgamma antagonist in our experiments, the AMPK pathway could be the possible explanation. There are reports suggesting AMPK pathway as antilipolytic effect for glitazone, e.g. AICAR (known as AMPK direct activator) treatment inhibited lipolysis both in 3T3-L1 adipocytes and visceral adipocytes (Sullivan et al. 1994; Daval et al. 2005). Also the expression increase

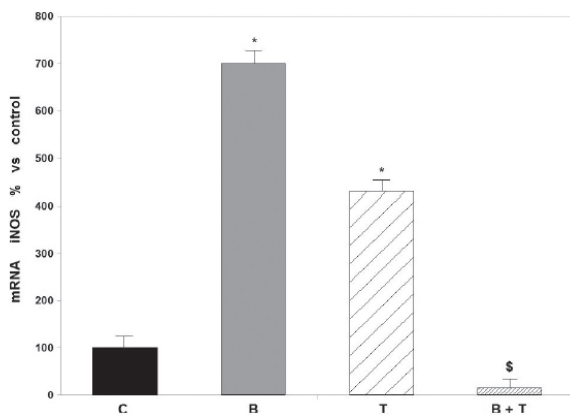


Figure 5. Quantitative RT-PCR rat iNOS after 24 hours. One-way ANOVA; * $p < 0.05$ vs. control; \$ $p < 0.05$ vs. BRL-37344 (abbreviations see Fig. 1).

of gene encoding a constitutively active form of AMPK/ dominant negative form of AMPK in $\alpha 1$ -AMPK subunit knock-out mice (the predominant subunit expressed in white adipocytes) had blocking effect on isoprenaline-mediated lipolysis (Yin et al. 2003). The main proposed mechanism of lipolysis regulation is believed to be regulatory phosphorylation of HSL. The supposed mechanisms of AMPK blockade of HSL is through phosphorylation in different site (site 2; Ser-565-constitutional site) than PKA activating phosphorylation site (site 1; Ser-563-regulatory site). After phosphorylation of HSL by PKA, activity of HSL increase by 61%, while after AMPK phosphorylation of HSL the ability of PKA site 1 phosphorylation decreases with at least 20–30% of lipolytic activity of HSL (Garton et al. 1989).

The impact of troglitazone on NO production is noteworthy. Troglitazone treatment exhibited an increase of NO production (Figs. 3, 4) and iNOS transcription (Fig. 5) in our experiments. This increase is even higher by addition of selective PPARgamma antagonist resulting in additive rather than opposite effect. These results also support the idea of nonPPARgamma effect of iNOS transcription and concomitant NO production. According to the available reports the PPARgamma agonists down regulate iNOS transcription (Li et al. 2000) in contrary to our experiments and SR-202 PPARgamma antagonist should block and not enhance the troglitazone effect. However, there are several pathways however activating iNOS transcription *via* PKA, NFkB, JAK/STAT, p38 MAPK and others (Kleinert et al. 2003). As troglitazone and other similar compounds are known to activate these pathways we can assume that iNOS transcription increase after troglitazone, SR-202 or their combination may be explained in this way.

Troglitazone has impact on NO production triggered by Beta-3 agonist and the profile of this effect is the same as in lipolysis. Beta-3-triggered iNOS transcription shows the opposite effect to that with troglitazone alone treatment. Troglitazone exhibited decreasing effect on iNOS transcription triggered by BRL-37344 (Figs. 4 and 5) which moreover seems to be AMPK dependent (Fig. 4). There are published data, that AMPK can decrease iNOS mRNA transcription triggered by LPS by 80–90% (Pilon et al. 2004). Although the exact mechanism is not clear so far, there are several crossroads of AMPK pathway and cAMP-PKA-pathway that can explain our result in the dramatic decrease of NO after Beta-3 agonist and PPARgamma agonist combinations. AMPK and PKA phosphorylate the identical site of cyclic AMP response element binding protein (CREB1) and therefore they can be competing at the same phosphorylation site (Thomson et al. 2008). AMPK is able inactivate p300 protein by phosphorylation of its Ser-89 site with concomitant reduction of its affinity for multiple nuclear receptors and interfere PKA activation of p300 protein (Leff 2003). Protein p300, after some authors, is crucial for iNOS

mRNA transcription initiation (Deng et al. 2003; Granja et al. 2006). PKA can activate AMPK by phosphorylation enhancing the above mentioned effect in positive feedback. This could finally explain the effect of the dramatic decrease of iNOS mRNA transcription after Beta-3 and PPARgamma agonists' mixture treatments.

In our experiments we tried to elucidate possible interaction of PPARgamma and Beta-3 agonist in 24 hours of cultivation of visceral rat adipocytes. These interactions were proved mainly in PPARgamma blockade of Beta-3 agonist-induced lipolysis and NO production (together with iNOS transcription). We have shown in our results that both PPARgamma agonist and antagonist produced the same results supporting the theory, that the blockade is indeed nonPPARgamma-dependent. We found, moreover, that the effect is AMPK-dependent as AMPK blocker (compound C) attenuated both effect of PPARgamma agonist and antagonist on Beta-3-triggered lipolysis and NO production.

Acknowledgements. The authors would like to thank Eva Prchliková, Libuše Šlehobrová and Alena Hloušková for their skilful technical assistance. This study was supported by grant GAČR 305/07/006, VZ MSM 021620807 and GAČR 305/97/0061.

References

- Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593–615
doi:10.1042/0264-6021:3570593
- Arner P. (2005): Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin. Endocrinol. Metab.* **19**, 471–482
doi:10.1016/j.beem.2005.07.004
- Bahr M., Spelleken M., Bock M., von Holtz M., Kiehn R., Eckel J. (1996): Acute and chronic effects of troglitazone (CS-045) on isolated rat ventricular cardio- myocytes. *Diabetologia* **39**, 766–774
doi:10.1007/s001250050509
- Bakopoulos E., Silva J. E. (2000): Thiazolidinediones inhibit the expression of beta3-adrenergic receptors at a transcriptional level. *Diabetes* **49**, 2108–2115
doi:10.2337/diabetes.49.12.2108
- Canová N. K., Lincová D., Kmoníčková E., Kameníková L., Farghali H. (2006): Nitric oxide production from rat adipocytes is modulated by beta-3-adrenergic receptor agonists and is involved in a cyclic AMP-dependent lipolysis in adipocytes. *Nitric Oxide* **14**, 200–211
doi:10.1016/j.niox.2005.06.006
- Carpene C., Galitzky J., Collon P., Esclapez F., Dauzats M., Lafontan M. (1993): Desensitization of beta-1 and beta-2, but not beta-3, adrenoceptor-mediated lipolytic responses of adipocytes after long-term norepinephrine infusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**, 237–247
- Daval M., Diot-Dupuy E., Bazin R., Hainault I., Viollet B., Vaulont S., Hajduch E., Ferre P., Fougelle F. (2005): Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 25250–25257
doi:10.1074/jbc.M41422200
- De Groot A. A., Mathy M. J., Van Zwieten P. A., Peters S. L. (2003): Involvement of the beta-3 adrenoceptor in nebevicolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **42**, 232–236
doi:10.1097/00005344-200308000-00012
- Deng T., Shan S., Li P. P., Shen Z. F., Lu X. P., Cheng J., Ning Z. Q. (2006): Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma transcriptionally up-regulates hormone-sensitive lipase via the involvement of specificity protein-1. *Endocrinology* **147**, 875–884
doi:10.1210/en.2005-0623
- Deng W. G., Wu K. K. (2003): Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by p300 and p50 acetylation. *J. Immunol.* **171**, 6581–6588
- Dessy C., Moniotte S., Ghisdal P., Havaux X., Noirhomme P., Bal-ligand J. L. (2004): Endothelial beta-3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation* **110**, 948–954
doi:10.1161/01.CIR.0000139331.85766.AF
- Eberhardt W., Pluss C., Hummel R., Pfeilschifter J. (1998): Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by il-1b and cAMP in rat mesangial cells. *J. Immunol.* **160**, 4961–4969
- Elizalde M., Ryden M., van Harmelen V., Eneroth P., Gyllenhammar H., Holm C., Ramel S., Ölund A., Arner P., Andersson K. (2000): Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J. Lipid Res.* **41**, 1244–1251
- Feinstein D. L., Spagnolo A., Akar C., Weinberg G., Murphy P., Gavriluk V., Dello Russo C. (2005): Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? *Biochem. Pharmacol.* **70**, 177–188
doi:10.1016/j.bcp.2005.03.033
- Festuccia W. T., Laplante M., Berthiaume M., Gélinais Y., Deshaies Y. (2006): PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* **49**, 2427–2436
doi:10.1007/s00125-006-0336-y
- Fryer L. G., Hajduch E., Rencurel F., Salt I. P., Hundal H. S., Hardie D. G., Carling D. (2000): Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes* **49**, 1978–1985
doi:10.2337/diabetes.49.12.1978
- Gardner O. S., Dewar B. J., Graves L. M. (2005): Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome-proliferator-activated receptor ligands: An example of nongenomic signaling. *Mol. Pharmacol.* **68**, 933–941
doi:10.1124/mol.105.012260
- Garton J., Campbell D. G., Carling D., Hardie D. G., Colbran R. J., Yeaman J. (1989): Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur. J. Biochem.* **179**, 249–254
doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb14548.x

- Gerhardt C. C., Gros J., Strosberg A. D., Issad T. (1999): Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by human beta-3 adrenergic receptor: New pharmacological profile and mechanism of activation. *Mol. Pharmacol.* **55**, 255–262
- Granja A. G., Sabina P., Salas M. L., Fresno M., Revilla Y. (2006): Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by viral A238L-mediated inhibition of p65/RelA acetylation and p300 transactivation. *J. Virol.* **10487–10496**
doi:10.1128/JVI.00862-06
- Granneman J. G. (1992): Effects of agonist exposure on the coupling of beta 1 and beta-3 adrenergic receptors to adenylyl cyclase in isolated adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**, 638–642
- Hollenga C., Brouwer F., Zaagsma J. (1991): Differences in functional cyclic AMP compartments mediating lipolysis by isoprenaline and BRL 37344 in four adipocyte types. *Eur. J. Pharmacol.* **200**, 325–330
doi:10.1016/0014-2999(91)90590-M
- Ji J. D., Cheon H. J., Jun J. B., Choi S. J., Kim Y. R., Lee Y. H., Kim T. H., Chae I. J., Song G. G., Yoo D. H., Kim S. Y., Sohn J. (2001): Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J. Autoimmun.* **17**, 215–221
doi:10.1006/jaut.2001.0542
- Jobgen W. S., Fried S. K., Fu W. J., Meininger C. J., Wu G. (2006): Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 571–588
doi:10.1016/j.jnutbio.2005.12.001
- Kleinert H., Schwarz P. M., Förstermann U. (2003): Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol. Chem.* **384**, 1343–1364
doi:10.1515/BC.2003.152
- Kleinert H., Pautz A., Linker K., Schwarz P. M. (2004): Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 255–266
doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.030
- Knowles R. G., Moncada S. (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249–258
- Kurebayashi S., Xua X., Ishii S., Shiraishi M., Kouhara H., Kasayama S. (2005): A novel thiazolidinedione MCC-555 down-regulates tumor necrosis factor- α -induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **182**, 71–77
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.02.004
- Lafontan M., Berlan M., Sengenès C., Moro C., Crampes F., Galitzky J. (2006): AMP- and cGMP-dependent control of lipolysis and lipid mobilization in humans: putative targets for fat cell management. In: *Insights into Receptor Function and New Drug Development Targets*. (Eds. M. Conn, C. Kordon and Y. Christen), pp. 53–77, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
doi:10.1007/3-540-34447-0_4
- Lambert M., Neish A. C. (1950): Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. *Can. J. Res.* **28**, 83–89
- LeBrasseur N. K., Kelly M., Tsao T. S., Farmer S. R., Saha A. K., Ruderman N. B., Tomas E. (2006): Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**, E175–181
doi:10.1152/ajpendo.00453.2005
- Leff T. (2003): AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 224–227
doi:10.1042/BST0310224
- Li M., Pascual G., Glass C. K. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4699–4707
doi:10.1128/MCB.20.13.4699-4707.2000
- Mairal A., Langin D., Arner P., Hoffstedt J. (2006): Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia* **49**, 1629–1636
doi:10.1007/s00125-006-0272-x
- Martin G., Schoonjans K., Lefebvre A. M., Staels B., Auwerx J. (1997): Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPAR-gamma activators. *J. Biol. Chem.* **272**, 28210–28217
doi:10.1074/jbc.272.45.28210
- Nantel F., Bonin H., Emorine L. J., Zilberfarb V., Strosberg A. D., Bouvier M., Marullo S. (1993): The human Beta-3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol. Pharmacol.* **43**, 548–555
- Nathan D. M., Buse J. B., Davidson M. B., Ferrannini E., Holman R. R., Sherwin R., Zinman B. (2009): Medical management of hyperglycemia in type 2 Diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* **32**, 193–203
doi:10.2337/dc08-9025
- Pilon G., Dallaire P., Marette A. (2004): Inhibition of Inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 20767–20774
doi:10.1074/jbc.M401390200
- Portillo M. P., Del Barrio A. S., Garcia-Calonge M. A., Martinez J. A. (1996): Desensitization effect of in vivo treatment with metaproterenol on beta-1, beta-2 and beta-3-adrenergic responsiveness in rat adipocytes. *Life Sci.* **58**, 405–414
doi:10.1016/0024-3205(95)02305-4
- Ranganathan G., Unal R., Pokrovskaya I., Yao-Borengasser A., Phanavanh B., Lecka-Czernik B., Rasouli N., Kern P. A. (2006): The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J. Lipid Res.* **47**, 2444–2450
doi:10.1194/jlr.M600248-JLR200
- Rieusset J., Touri F., Michalik L., Escher P., Desvergne B., Niesor E., Wahli W. (2002): A new selective peroxisome proliferator-activated receptor antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol. Endocrinol.* **16**, 2628–2644
doi:10.1210/me.2002-0036
- Rodbell M. (1964): Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* **239**, 375–380
- Shen W. J., Patel S., Yu Z., Jue D., Kraemer F. B. (2007): Effects of rosiglitazone and high fat diet on lipase/esterase expression in adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* **1771**, 177–184
- Schoonjans K., Peinado-Onsurbe J., Lefebvre A. M., Heyman R. A., Briggs M., Deeb S., Staels B., Auwerx J. (1996): PPARalpha

- and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15, 5336–5348
- Sullivan J. E., Brocklehurst K. J., Marley A. E., Carey F., Carling D., Beri R. K. (1994): Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett.* 353, 33–36
doi:10.1016/0014-5793(94)01006-4
- Thomson D. M., Herway S. T., Fillmore N., Kim H., Brown J. D., Barrow J. R., Winder W. W. (2008): AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J. Appl. Physiol.* 104, 429–438
doi:10.1152/jappphysiol.00900.2007
- Vicario P. P., Candelore M. R., Schaeffer M. T., Kelly L., Thompson G. M., Brady E. J., Saperstein R., MacIntyre D. E., Tota L. M., Cascieri M. A. (1998): Desensitisation of Beta-3 -adrenergic receptor- stimulated adenylyl cyclase activity and lipolysis in rats. *Life Sci.* 62, 627–638
doi:10.1016/S0024-3205(97)01158-2
- Yin W., Mu J., Birnbaum M. J. (2003): Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 43074–43080
doi:10.1074/jbc.M308484200

Received: May 25, 2010

Final version accepted: October 1, 2010

13.2 Publikace 2

Hodis J, Gaier N, Farghali H: Nitric oxide in patients with obesity and metabolic syndrome. *Cas Lek Cesk.* 148(1):34-8, 2009

Oxid dusnatý u obezity a metabolického syndromu

Hodis J, Gaier N, Farghali H.

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Farmakologický ústav

SOUHRN

Oxid dusnatý (NO) ve své pleiotropní roli ovlivňuje mnohé systémy. Mimo jiné se účastní v patofyziologii metabolického syndromu a obezity. Článek podává přehled základních publikací, které poukazují na efekt NO na mitochondriální respiraci, inzulínovou rezistenci zvláště v jaterní buňce a další faktory glukózového metabolismu, stejně jako hledá příčinu zhoršení biologické dostupnosti NO u diabetu a obezity.

Klíčová slova: oxid dusnatý, mitochondriální respirace, inzulínová rezistence.

SUMMARY

Hodis J, Gaier N, Farghali H. Nitric Oxide in Patients with Obesity and Metabolic Syndrome

Nitric oxide in its pleiotropic role interacts with many diverse systems and beside others acts in pathophysiology of obesity and metabolic syndrome. Our review tends to summarize available basic publications aimed at the impact of NO on mitochondrial respiration, insulin resistance mainly in hepatocyte and the impact of NO on other factors of glucose metabolism. In this review, the authors try to shed light to pathophysiology of impaired NO bioavailability during diabetes and obesity too.

Key words: nitric oxide, mitochondrial respiration, insulin resistance. *Ho.*

Cas Lék čes 2009; 148: xxx-xx.

OXID DUSNATÝ (NO)

NO jako volný radikálový plyn vzniká během enzymatické reakce mezi L-argininem, O_2 a NADPH za tvorby citrulinu a vzniku NADP⁺ pomocí syntázy oxidu dusnatého (NOS; EC 1.14.13.39). Známý **mechanismus účinku** hlavně zahrnuje relaxaci cév. Nezávisle na relaxačním efektu na cévy bylo zjištěno, že NO (hlavně vzniklé z nNOS a eNOS) je endogenní aktivátor rozpustné guanylátcyklázy, tvořící cGMP. NOS je rodina enzymů, která se skládá ze dvou kalcium-calmodulin-dependentních, konstitutivních izoform, neuronální NOS (nNOS, NOS-I) a endoteliální NOS (eNOS, NOS-III), a kalcium-independentní, inducibilní NOS (iNOS, NOS-II) (1, 2). Část izoformy eNOS se nachází hlavně v membránové frakci, kdežto izoforma iNOS jak v rozpustné, tak v membránové frakci (3).

Rozklad a přenos

Oxid dusnatý reaguje s kyslíkem za tvorby N_2O_4 , který se dále spojuje s vodou za tvorby směsi dusitanových a dusičnanových anionů. Dusitanové aniony jsou oxidovány na dusičnanové oxyhemoglobinem. Oxid dusnatý je inaktivován hemem a volným radikálem –superoxidem. Zhašeči – scavengery superoxidu – jako například superoxid dysmutá-

za, chrání NO, zvyšují intenzitu jeho účinku a prodlužují jeho trvání. Naopak interakce oxidu dusnatého se superoxidem vede k tvorbě peroxynitritu a následnému poškození tkání. Účinek peroxynitritu je regulován obsahem glutathionu v buňce. Za fyziologických podmínek reaguje glutathion s NO za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO), mnohem stabilnější formy NO. Nitrosoglutathion může sloužit jako přenašeč NO s dlouhodobou životností (4).

OBEZITA

V současnosti je obezita definována jako BMI (body mass index = váha v kg/výška v m^2) přes 30, nadváha pak BMI mezi 25 a 30 (definici dle obvodu pasu viz níže). Optimální životní prognóza je v pásmu BMI 20 mezi 22. V USA stoupla prevalence obezity a nadváhy u dospělých nad 20 let na 54,9 % za posledních 10 let. Přitom životní prognóza se u lidí obézních v jejich 20 letech snižuje až o 20 let věku. Vysoká prevalence (15%) obezity a nadváhy amerických dětí ve věku 6–19 let ukazuje na špatný trend do budoucna (5). Obezita s sebou nese hlavně několikanásobné zvýšení morbidity na další onemocnění, a to již od BMI 27 (hypertenze 2,9×, infarkt myokardu 1,9×, cévní mozkové příhody 3,1×, diabetes mellitus 2,2,9×, dna 2,5, hyperlipidémie 1,5× kolo-

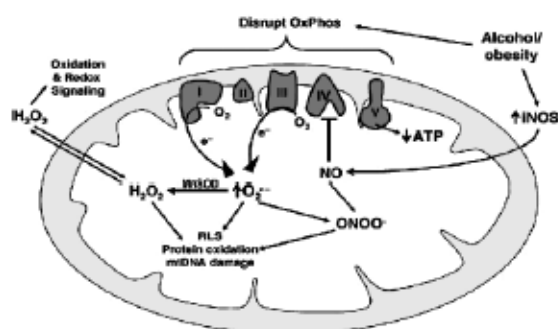
Adresa pro korespondenci:
MUDr. Mgr. Jiri Hodis
Farmakologický ústav 1. LF UK
Albertov 4, 120 00 Praha 2
fax: +420 266 038 218, e-mail: hodis@atlas.cz

rektální karcinom 1,3×, rakovinu krčku nebo těla dělohy 1,6×, rakovinu prsu 1,2×) (6).

ROLE NO U OBEZITY

Mnoho výzkumných týmů předpokládá, že NO hraje významnou roli v regulaci energetické rovnováhy, neboť například podání nespecifického inhibitoru NO syntázy – N-nitro-L-arginine-metyl esteru (L-NAME) vede k poklesu váhy a snižuje příjem potravy u myši (7). Tento efekt je vyšší u myši na tučné dietě. Tam dochází i ke snížení velikosti adipocytů po L-NAME stejně jako snížení akumulace mastných kyselin v adipocytu. V souvislosti s tím

L-NAME blokuje efekt vysokotučné diety na obsah triglyceridů (TAG) v játrech, zvyšuje glukózovou toleranci a *in vivo* i inzulinovou senzitivitu. Autoři předpokládají, že tento efekt je díky zvýšené ztrátě energie, neboť L-NAME zvyšuje hladinu mRNA uncoupling proteinů 1 a 3 (UCP1,3), a to



Obr. 1. Vliv NO na mitochondrii (upraveno dle 19)

jak ve svalu, tak v hnědé tukové tkáni. Zajímavé je, že L-NAME zároveň zvyšuje expresi peroxisome proliferator-activated receptoru γ (PPAR γ) ve svalu (8). Navíc tvorba NO v mitochondrii pomocí mitochondriální syntázy redukuje vnitřní dýchání, a tím i spotřebu kyslíku (9). To se nejspíše děje inhibicí mitochondriální respirace skrze přímou vazbu NO na cytochrom C-oxidázu (cGMP-independenční dráhou) (10). Vazba NO na cytochrom C-oxidázu je reverzibilní a kompetitivní s kyslíkovou molekulou. Stechiometrický poměr inhibice mezi O_2 a NO je 1 : 2000, tedy na inhibici 30 pM O_2 je třeba 60 nM NO, jak prokazuje práce v *in vitro* pokusech. Autoři však použili fyziologické hladiny NO a O_2 a považují tuto stechiometrii za možnou i v podmínkách *in vivo* (11). Pozdější práce však ukazují na jinou stechiometrii O_2 /NO = 1 : 30, stejně jako se změnila původní představa vazby NO na Fe_3^{2+} a3 podjednotky cytochrom C-oxidázy (CcO) na novější představu o vazbě na Cu_2^{2+} část CcO (12). Zůstává platné, že NO je asi 200× silnějším inhibítoem CcO než CO (13). V těchto pokusech problematický je i fakt, že NO je de-facto scavengerem volného O , dále že NO samotné je u nNOS a eNOS zpětnovazebným inhibítoem další produkce NO a naopak, že NOS enzym i v nedimerizované formě, a tedy ve formě neschopné tvořit NO je schopen přesto oxidovat NADPH na $NADP^+$, což dohromady značně

komplikuje měření stechiometrie oxidoredukčních dějů a spotřebu O_2 .

Zdá se, že roli hraje i substrát, který používá mitochondrie na tvorbu ATP. (Například Schweizer a Richter popsali blok CcO navozený NO u pyruvátu a malátu jako substrátu tvorby ATP (14), zatímco jinde můžeme najít záznam, že u substrátu s vazbou na $FADH_2$ (succinát nebo palmitoyl-l-carnitin) vede přidání NO k zefektivnění oxidativní fosforylace zvýšením ATP produkce za snížení úniku protonů a zachování nebo snížení spotřeby O_2 , a tím přibližuje stechiometrii reakce spalování substrátu vázaného na NADH, jako je malát a glutamát. (15). Mnozí autoři pak poukazují na fakt, že při NO navozené blokádě CcO dochází ke zvýšenému vstupu Ca^{2+} do mitochondrií, což může být i podkladem buněčné smrti navozené velkým excesem NO vytvořeného iNOS například při sepsi.

Na druhé straně někteří autoři zjistili fakt, že NO vede k zvýšení mitochondriální biogeneze v hnědých tukových buňkách, a to zprostředkovaně přes aktivaci cGMP. Lze tedy předpokládat, že množství mitochondrií se zvyšuje, i když jejich oxidační schopnost je nízká, a toto všechno vede ke zvýšení spotřeby potravy *in vivo* (16). V jiných publikacích lze nalézt i pozitivní roli NO na snižování zásob tuku – u eNOS knock-outovaných myši se nachází nižší počet mitochondrií v hnědé tukové tkáni (BAT), snížená exprese UCP-1 a PPAR γ . Nalézáme zde i defektní výdej energie, zvýšení hmotnosti, inzulinovou rezistenci a hypertenzi (17). Ovlivnění jednotlivých složek není vázáno na sebe v řetězci, ale je nezávislé, neboť jiní autoři popsali, že hnědé tukové buňky s poruchou PPAR γ normálně exprimují UCP1 (18).

Existují i spekulace o centrálním efektu NO na chuť k jídlu. NO samotný uvolněný z eNOS a iNOS údajně nepřímo stimuluje transport inzulínu skrze hematoencefalickou bariéru. A bylo prokázáno, že podávání inzulínu do CNS indukuje hyperglykémii, hypoinsulinémii a anorexii, snižuje v hypothalamu expresi neuropeptidu Y a snižuje tělesnou váhu. Tedy NO by tak nepřímo zvýšeným transportem inzulínu do mozku mohl vést ke snížení váhy. Naopak NO uvolněný z nNOS v buňkách endotelu mozkových cév inhiboval transport inzulínu do mozku a měl ve svém důsledku efekt opačný (20).

METABOLICKÝ SYNDROM

Definice metabolického syndromu podle Mezinárodní federace pro diabetes obsahuje: pozitivní anamnézu obezity centrálního typu (definované jako obvod pasu > 94 cm u evropských mužů a > 80 cm u evropských žen s určitou odlišností u jiných národů)

a navíc některé další 2 znaky z následujících 4:

A. zvýšená hladina TAG (triglyceridů) > 1,7 mmol/l (150 mg/dl) nebo již zavedená specifická terapie této hyperlipidémie a/nebo

B. snížený HDL- cholesterol < 1,03 mmol/l (40 mg/dl) u mužů a < 1,29 mmol/l (50 mg/dl) u žen nebo specifická terapie této dyslipidémie a/nebo

C. zvýšení krevního tlaku: systolického > 130 nebo diastolického > 85 a nebo léčba hypertenze v anamnéze a/nebo

D. zvýšená glykémie nalačno (FPG) > 5,6 mmol/l (100mg/dl) nebo předchozí anamnéza diabetes mellitus 2. typu.

Nebezpečí metabolického syndromu netkví pouze ve zvýšení kardiovaskulární morbidity (nadváha více jak 20 kg vede k více jak šestinásobnému zvýšení prevalence ischemické choroby srdeční), ale zároveň v riziku vzniku diabetu mellitus 2. typu. Míru tohoto rizika popisuje pro prognózu 10 let dotazník FINDRISC bez obtíží dostupný na (21).

Jestliže je metabolický syndrom založen, mimo jiné, hlavně na inzulinové rezistenci, můžeme se ptát, kde v těle je rozhodující tkáň pro její vznik. Dominantní roli u inzulinorezistence dle některých autorů hrají játra; sval a tuk nejsou pro vznik inzulinorezistence rozhodující (22).

OXID DUSNATÝ U METABOLICKÉHO SYNDROMU – VLIV NO NA INZULINOREZISTENCI

Bylo publikováno několik prací, které spojovaly vznik inzulinorezistence s indukcí iNOS stejně jako s hladinou volných mastných kyselin, prozánětlivých cytokinů, oxidativním stresem. NO je schopen ovlivňovat inzulinovou signalizaci v několika krocích: snižovat Akt aktivitu přes s-nitrosylaci specifických cysteinových zbytků, vést k degradaci Irs1 v buňkách přičně pruhovaného svalu. NOS 2 knock-outované myši jsou chráněny proti inzulinové rezistenci přičně pruhovaného svalstva, což je spojeno se zvýšením PI3K-Akt aktivity. Během zánětu pak právě NOS2 zprostředkovává inzulinovou rezistenci kosterního svalstva například při sepsi s předpokládaným mechanismem založeným na s-nitrosylaci inzulinového receptoru, Irs1 a Akt (23). Během zánětu s indukovaným iNOS a až 1000x vyšší produkcí NO spolu s výskytem oxidativních radikálů dochází, dle některých autorů, k posttranslačním změnám proteinů (S-nitrosylaci cysteinových zbytků a tyrosinovou nitrací) i působením peroxynitritu. Tyto změny jsou samozřejmě nezávislé jak na cGMP, tak na hladině kalcia. Oxidativní stres výrazně zvyšuje S-nitrosylaci a inaktivaci nebo rozklad signálních proteinů inzulinové dráhy. V játrech obeztních, Leptin-deficientních myši je 2,5x zvýšena exprese iNOS ve srovnání s kontrolou a zvyšuje se i hladina nitrotyrosinu – markeru nitračního stresu. Při podání iNOS inhibitoru L-N6-(1-Iminoetyl)lysinu(L-NIL) dochází jak ke zvýšení transkripce a translace Irs-1 a bylo zaznamenáno i zvýšení transkripce Irs2. Toto následně vede ke zlepšení inzulinové signální dráhy přes IRS – PI3K a současně ke zlepšení kontroly glykémie a inzulinosenzitivity (nižší hladině glykémie nalačno a hladině lačného inzulinu). Tyto změny však nejsou spojeny se změnami cGMP, což vypadá, jakoby endoteliální a neuronální NOS nehrály v inzulinorezistenci roli. Podobný efekt na Irs-1 v přičně pruhovaném svalu u obeztní, diabetické (leptin-deficientní) myši, jako je po blokátoru L-NIL, lze však dosáhnout i genetickým poškozením genu pro iNOS. I u pacientů s diabetem typu 2 se setkáváme se zvýšenou expresí iNOS stejně jako S-nitrosylovanými proteiny a tyrosinovou nitrací (24). Jak naznačují další práce, ovlivnění glukozového metabolismu pomocí NO nemusí být jen na základě ovlivnění inzulinové dráhy samotné. V nedávno otištěné naší publikaci jsme zjistili, že blokátory NOS jako aminoguanidinu (silněji) a L-NAME (méně) jsou schopné snížit výrazně glykogenolýzu indukovanou adrenalinem spolu se snížením produkce NO (25). V jiné práci Albuszies et al.

zjišťuje inaktivaci phosphoenolpyruvát karboxykinázy – hlavního enzymu glukoneogeneze u iNOS+/+ myši za septického šoku, zatímco iNOS knock-outované myši mají tento enzym plně aktivní (26).

Na rozdíl od předchozích prací jiní autoři poukazují na opačný trend, kdy zvýšení NO se zdá ve vztahu k metabolickému syndromu výhodné a to zvláště jeho produkt peroxonitrit a označují naopak L-NAME (blokátor NOS) jako induktor inzulinorezistence: Například ve studii Guarina et al. různí donory NO byly schopny snížit inzulinorezistenci vyvolanou L-NAME. Zajímavý je závěr, že zatímco NO donor SIN-1(3-morpholinosydonimine) snižuje jaterní inzulinorezistenci po podání do portální žíly, působí neenzymatický vzestup NO a superoxidu (O_2^-) (je donorem NO/O_2^- napodobující tak lépe aktivitu iNOS), jiný NO donor – SNP, uvolňuje sice rychle a spontánně NO, ale bez O_2^- . V prvním případě tak dochází k tvorbě GSNO v játrech. Ve druhém případě není inzulinorezistence ovlivněna. Zajímavý je i fakt, že inzulinorezistence pomocí SIN-1 je ovlivněna pouze podáním tohoto donoru do portální žíly, zatímco intravenózní systémové podání obou nebo jednoho každého donoru nevede k žádnému efektu na inzulinorezistenci (27). Podobný efekt intraportálně podaného L-NAME a SIN-1 popsal ve své práci Moore a kol., kde je popsán i vazodilatační efekt na portální žílu u dávky SIN-1 3 mg/mlm, zatímco dávka 10x nižší vazodilataci portální žíly nezpůsobuje (28).

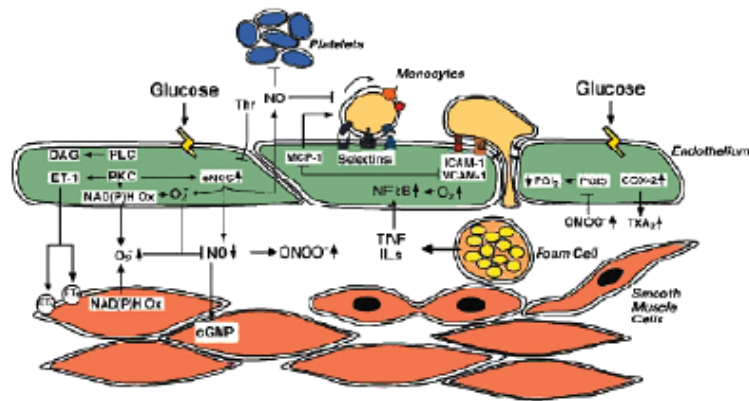
VLIV METABOLICKÉHO SYNDROMU A OBEZITY NA NO

Možné mechanismy ovlivnění NO produkce a biodostupnosti

Je známo, že mnohé cytokiny jsou spojovány s metabolickým syndromem a obezitou. Například $TNF\alpha$ je spojován v pozitivní korelaci s centrální obezitou i metabolickým syndromem (29) a je dokázáno, že je schopen indukovat iNOS (30). Naopak negativní korelace je prokázána u adiponektinu (31) a jeho vliv na NOS byl taktéž prokázán (32).

Změna v transkripci

Zvýšení transkripce iNOS jak v humánních, tak potkaních hepatocytech na základě cytokinové signalizace se děje prostřednictvím transkripčních faktorů zvláště nuclear factor- κB (NF- κB). Aby byl nuclear factor- κB (NF- κB) aktivován, vyžaduje však translokaci z cytoplazmy do jádra a tato translokace je silně závislá na redoxním stavu buňky. To je možná důvodem, proč je odlišná odpověď na LPS v Kupferových buňkách jater, kde je nezávislá na hladině intracelulárního glutathionu a naopak v hepatocytech a buněčných liniích makrogágů, kde je na hladině glutathionu silně závislá. Jednotlivé druhy buněk se liší i odpovědí na dexametazon, kde v hepatocytech dexametazon tlumí LPS indukovanou produkci NO, kdežto v Kupferových buňkách nikoliv. Podle některých posledních výsledků se zdá, že v Kupferových buňkách je produkce nuclear factor- κB (NF- κB) konstitutivní, kdežto v hepatocytech je až následně indukovaná LPS (33).



Obr. 2. Zvýšená tvorba endotelem tvořených kontrakčních faktorů vazokonstrikčních prostanoidů (upraveno dle 36)

Postranlační změny

Zdá se, že efekt cytokinů je založen nejen na ovlivnění transkripce NOS, ale i na fosforylaci enzymu. Autoři Nishimura et al. popsal efekt deficitu adiponektinu u adiponektin knock-out myši na fosforylaci eNOS se zvýšením produkce NO (34). Autoři Ellger et al. zkoumali efekt modelu diabetu na dlouhodobě kriticky nemocných zvířat na dostupnost volného NO. Zjistili, že dostupnost NO byla přímo závislá na glykémii, nesovisela s inzulinémií. Inzulin nehrál ani roli v indukcii exprese iNOS nebo eNOS, což si lze vysvětlit inhibicí PI3K dráhy inzulinové signalizace jak zánětem, tak hyperglykemií. Zdá se, že snížení produkce NO při hyperglykémii není ovlivněno ve fázi transkripce NOS, protože NOS exprese byla naopak zvýšená a jedná se spíše o posttranslační změny. Autoři předpokládají, že se jedná spíše o zpětnou negativní vazbu, kdy NO tlumí další aktivitu eNOS (vyšší oxidací hemového železa uvnitř NOS molekuly) než změnu kofaktorů (BH4, NADPH nebo glutathionu), kterou nezaznamenali. Jiným mechanismem snížení biodostupnosti NO u diabetu je i možné snížení substratu-argininu, kde byla nalezena slabá, ale pozitivní korelace mezi NOS-aktivitou a hladinou argininu (35). O ovlivnění dostupnosti NO v endotelu při diabetu referuje přehledně článek Creagera a Lusher. Hyperglykémie snižuje biodostupnost oxidu dusnatého (NO) a prostacyklinu (PGI2) a zvyšuje se syntéza vazokonstrikčních prostanoidů a endothelinu (ET-1) a to rozličnými mechanismy:

Možný mechanismus snížení (na endotelu závislé) vazodilatace při diabetes mellitus:

Snížená syntéza NO/senzitivita vůči NO
 snížená dostupnost L-argininu,
 poškozená signalizace v endotelialních buňkách G_i protein závislých signálů,
 snížená dostupnost kofaktorů pro syntézu NO (Ca²⁺, calmodulin, tetrahydrobiopterin, NADPH).

Endogenní inhibice NO syntázy (asymetrický dimethylarginin (ADMA))

Zvýšená inaktivace NO a/nebo jeho odbourávání
 vzestup neenzymatických glykačních molekul (AGE),
 aktivace polyolové dráhy,
 aktivace na diacylglycerolu (DAG) závislé protein kinázy C (PKC),
 uncoupling eNOS.

ZÁVĚR

Dle přehledu literatury, který zde předkládáme, se zdá nyní již jasně, že NO hraje důležitou roli v metabolických dějích spojených s obezitou a metabolickým syndromem. I když jeho efekt není dosud zcela jasný, zdá se, že kromě vazodilatačního efektu ovlivnění NOS vede k mnoha dalším dějům zahrnující změny redox potenciálu a změnu oxidativní fosforylace v mitochondrii. Zbývá nám ještě dlouhá cesta k odhalení všech funkcí NO v obezitě a metabolickém syndromu, přestože již hodně práce na tomto poli, jak ukazuje tento článek, bylo vykonáno.

Zkratky

ATP	– adenosin trifosfát
BAT	– hnědá tuková tkáň
BH4	– tetrahydro-biopterin
BMI	– body mass index
CcO	– C-oxidázy
cGMP	– cyklický adenosin monofosfát
CNS	– centrální nervový systém
COX-2	– cyclooxygenáza 2
FADH ₂	– redukovaný flavin-adenosin-dinukleotid
HDL	– high density lipoprotein
IRS-1	– insulin receptor-substrate-1
LPS	– lipopolysacharid
L-NAME	– L-arginine-metyl esteru
NADPH/NADP ⁺	– redukováná/oxidovaná forma nikotin-adenosin-dinukleotid-fosfátu
NO	– oxid dusnatý
PI3K-Akt	– fosfo-inositol-trifosfát-Akt
PPAR α	– peroxisome proliferator-activated receptoru α
SNP	– nitroprussid sodný
TNFα	– tumor necrosis faktor alfa
TxA2	– tromboxan A2
UCP	– uncoupling protein

Ostatní zkratky jsou vysvětleny v textu.

LITERATURA

1. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249–258.
2. Alderton WK, Cooper CC, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593–615.

3. **Ribiere C, Jaubert AM, Gaudiot N, et al.** White Adipose Tissue Nitric Oxide Synthase: A Potential Source for NO Production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 222: 706–712.
4. **Farghali HA, Kameníková L.** Oxid dusnatý-NO. In Lincová D, Farghali H, et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galen et Karolinum 2005; 301–307.
5. **Hunsaker DM, Hunsaker JC.** Obesity Epidemic in the United States (A Cause of Morbidity and Premature Death); in *Forensic Pathology Reviews*, Vol. 2 . Humana Press Inc., DOI10.1385/1592598722 ISBN 978-1-59259-872-4 (Online) 2007.
6. **Hainer V.** *Základy klinické obezitologie*. Praha: Grada Publishing a.s. 2004; 36.
7. **Morley JE, Flood JF.** Effect of competitive antagonism of NO synthetase on weight and food intake in obese and diabetic mice. *Am J Physiol* 1994; 266 (1Pt2): R164–R168.
8. **Tsuchiya K, Sakai H, Suzuki N, et al.** Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high-fat-induced obese mice. *Endocrinology* 2007; 21: doi:10.1210/en.2006-1371.
9. **Giulivi C, Kato K, Cooper CE.** Nitric oxide regulation for oxygen consumption I: cellular physiology. *Review. Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(6): C1225-31. Epub 2006 Aug 2.
10. **Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, et al.** Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 1994; 345: 50–54.
11. **Brown GC, Cooper CE.** Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Letters* 1994; 356: 295–298.
12. **Torres J, Cooper CE, Sharpe M, Wilson MT.** Reactivity of Nitric Oxide with Cytochrome c Oxidase: Interactions with the Binuclear Centre and Mechanism of Inhibition. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1998; 30.
13. **Davies N, Trikkas C, Cooper CE.** Does carbon monoxide inhibit cytochrome oxidase in vivo? *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 406S.
14. **Schweizer M, Richter C.** Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochemical and Biophysical research Communications* 1994; 204(1): 169–175.
15. **Clerc P, Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E.** Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39: 158–166 DOI 10.1007/s10863-007-9074-1.
16. **Nisoli E, Clementi E, Carruba MO, Moncada, S.** Defective Mitochondrial Biogenesis: A Hallmark of the High Cardiovascular Risk in the Metabolic Syndrome? *Circ Res* 2007; 100: 795–806.
17. **Bossy-Wetzel E, Lipton SA.** Nitric oxide signaling regulates mitochondrial number and function. *Cell Death and Differentiation* 2003; 10: 757–760. doi:10.1038/sj.cdd.4401244.
18. **Nedergaard J, Ricquier D, Kozak LP.** Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects – Meeting on Uncoupling Proteins. *EMBO reports* 2005; 6: No 10.
19. **Mantena SK, King AL, Andringa KK, et al.** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol – and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radic Res* 2008; doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.029.
20. **Banks WA.** The blood-brain barrier as a cause of obesity. *Review. Curr Pharm Des* 2008; 14: 1606–1614.
21. **ESC guidelines on Diabetes.** Pre-diabetes and Cardiovascular Diseases. *European Heart Journal* 2007; 9(Suppl C): 1–74.
22. **Leclercq IA, Morais ADS, Schroyen B, et al.** Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences – Review. *Journal of Hepatology* 2007; 47: 142–156.
23. **de Luca C, Olefsky JM.** Inflammation and insulin resistance. *FEBS Letters* 2008; 582: 97–105.
24. **Martyn JAJ, Kaneki M, Yasuhara S.** Obesity-induced Insulin Resistance and Hyperglycemia – Etiologic Factors and Molecular Mechanisms. *Anesthesiology* 2008; 109: 37–48.
25. **Hodis J, Kutinová-Canová N, Potmesil P, et al.** The role of adrenergic agonists on glycogenolysis in rat hepatocyte cultures and possible involvement of NO. *Physiol Res* 2007; 56: 419–425. Epub 2006 Aug 22.
26. **Albuszies G, Vogt J, Wachter U, Thiemermann C, et al.** The effect of iNOS deletion on hepatic gluconeogenesis in hyperdynamic murine septic shock. *Intensive Care Med* 2007; 33: 1094–1101. DOI 10.1007/s00134-007-0638-7.
27. **Guarino MP, Afonso RA, Raimundo N, et al.** Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G588–G594. First published December 2002; 4: 10.1152/ajpgi.00423.2002.
28. **Moore MC, DiCostanzo CA, Smith MS, et al.** Hepatic portal venous delivery of a nitric oxide synthase inhibitor enhances net hepatic glucose uptake *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E768–E777. First published January 2008; 22: doi:10.1152/ajpendo.00184.2007.
29. **Kahn BB, Flier JS.** Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 473–481.
30. **Thomas MS, Zhang WR, Jordan PM, et al.** Signaling pathways mediating a selective induction of nitric oxide synthase II by tumor necrosis factor alpha in nerve growth factor-responsive cells. *Journal of Neuroinflammation* 2005; 19: doi:10.1186/1742-2094-2-19.
31. **Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, et al.** Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3815–3819.
32. **Chen H, Montagnani M, Funahashi T, et al.** Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 45021–45026.
33. **Vos TA, Van Goor H, Tuyt L, et al.** Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Endotoxemic Rat Hepatocytes Is Dependent on the Cellular Glutathione Status. *Hepatology* 1999; 29: 421–426.
34. **Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A, et al.** Adiponectin Prevents Cerebral Ischemic Injury Through Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Mechanisms. *Circulation* 2008; 117: 216–223.
35. **Ellger B, Langouche L, Richir M, et al.** Modulation of regional nitric oxide metabolism: Blood glucose control or insulin? *Intensive Care Med* 2008; 34: 1525–1533 DOI 10.1007/s00134-008-1118-4.
36. **Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA.** Diabetes and Vascular Disease: Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I. *Circulation* 2003; 108: 1527–1532 DOI: 10.1161/01.CIR.0000091257.27563.32.

Práce vznikla za podpory IGA MZ NR/9379-3/2007, VZ MSM 0021620807.

13.3 Publikace 3

Farghali H, Hodis J, Kutinová-Canová N, Potměšil P, Kmoníčková E and Zídek Z: Glucose release as a response to glucagon in rat hepatocyte culture: Involvement of NO signaling. *Physiol. Res.* 57: 569-575, 2008

Glucose Release as a Response to Glucagon in Rat Hepatocyte Culture: Involvement of NO Signaling

H. FARGHALI¹, J. HODIS¹, N. KUTINOVÁ-CANOVÁ¹, P. POTMĚŠIL²,
E. KMONÍČKOVÁ², Z. ZÍDEK²

¹Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, ²Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Received March 1, 2007

Accepted May 15, 2007

On-line July 26, 2007

Summary

Glucagon and α -adrenergic-induced glycogenolysis is realized via the agonist/adenylyl cyclase/cAMP/protein kinase signaling pathway or via the activation of phosphorylase kinase by the mobilized calcium that supports the inhibition of glycogen synthase, respectively. The role of nitric oxide (NO) in this process has not been extensively studied. The present work was directed to the question whether NO is produced during glucagon-induced glycogenolysis in rat hepatocyte in a similar way like α -adrenoceptor stimulation. Glycogen-rich hepatocyte cultures were used. NO production (NO_2^-) was assessed under the influence of glucagon, dibutyl cyclic AMP (db-cAMP), forskolin, the nitric oxide synthase (NOS) inhibitors N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and aminoguanidine, and the NO donor S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP). Inducible NOS (iNOS) mRNA was examined by reverse transcription-polymerase chain reaction. Glycogenolysis was followed up by estimation of medium glucose levels. The amount of glucose and NO_2^- released by glycogen-rich hepatocytes was increased as a result of glucagon, db-cAMP, forskolin and SNAP treatments. iNOS gene expression was upregulated by glucagon. Glycogenolysis that occurs through glucagon receptor stimulation involves NO production downstream of transduction pathways through an isoform of NO synthase. The present and previous studies document possible involvement of NO signaling in glycogenolytic response to glucagon and adrenergic agonists in hepatocytes.

Key words

Nitric oxide • Glucagon • Glycogenolysis • Hepatocytes

Corresponding author

H. Farghali, Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University, Albertov 4, 128 00 Prague 2, Czech Republic.
Fax: +420 224968106. E-mail: hfarg@lf1.cuni.cz

Introduction

It is established that the liver plays a central role in the control of glucose production and that disturbances, which occur in some metabolic diseases, could indicate the presence of alterations in glycogen deposition of various causes with either increase or decrease in liver glycogen. The molecular mechanisms of increased glucose production to identify potential therapeutic targets were reviewed (Proietto and Andrikopoulos 2004, Klover and Mooney 2004) and it has been recognized that hepatocytes are critical for glucose homeostasis. The signaling pathways that participate in hormone-induced glycogen degradation are documented (Decker 1990, Huber and Keppler 1990, Borgs *et al.* 1996).

Glucagon raises cyclic AMP (cAMP) levels that activate protein kinase A (PKA) and this in turn leads to the activation of phosphorylase and glycogen breakdown. At the same time, PKA phosphorylates and helps to inactivate glycogen synthase. Moreover, epinephrine through its α_1 -adrenergic receptors regulates hepatic glycogenolysis in some animal species. Altogether, glucagon and epinephrine on the one hand, and insulin on the other, determine the status of glycogen store. The regulation of glycogenolysis in hepatocytes by both hormones appears to be equally important under physiological and pathological conditions (Van Ermen and Fraeyman 1994, Moriyama *et al.* 1997, Shiroyama *et al.* 1998, Fabbri *et al.* 1999, Vardanega-Peicher *et al.* 2000, Manzl *et al.* 2002, Kalamidas *et al.* 2002).

Although the pathways that modulate glycogen level in the liver have been fairly well elucidated, the role

of nitric oxide (NO) in this process is not extensively studied. In our previous work, we found that glycogenolysis in rat hepatocytes that occurs through α -adrenergic stimulation involve NO production (Hodis *et al.* 2007). Indeed, NO exerts functional regulatory effects in all organs, tissues and cells, which were examined including the liver (Muriel 2000, Moreau 2002, Chang *et al.* 2004, Harbrecht *et al.* 2004, Voleti and Agrawal 2006). It was reported that NO affects glycogen and glucose homeostasis (Horton *et al.* 1994a, Horton *et al.* 1994b, Stadler *et al.* 1995, Borgs *et al.* 1996, Sugita *et al.* 2002). The data available suggest that glucagon may participate in the *in vivo* regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression after proinflammatory stimuli. Nevertheless, it is not yet clear to which extent NO is involved in the modulation of glycogenolytic pathways. The present work was, therefore, directed to extend our previous observation by the study that shed more light on whether NO is produced during glucagon-induced glycogenolysis in rat hepatocyte cultures in a similar way like adrenergic stimulation (Hodis *et al.* 2007). The glycogen-rich rat hepatocytes in culture were used for glycogenolysis studies under glucagon, dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP), forskolin, and the NO donor S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP). NO production was assessed under various treatments.

Materials and Methods

Chemicals

Glucagon was obtained in ampoules (Glucagen 1 mg HypoKit inj. sic.) from Novo Nordisk, Denmark. Sulfanilic acid, N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, dibutyryl cyclic AMP sodium-potassium salt (db-cAMP), N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), aminoguanidine, S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP), forskolin (7 β -acetoxy-1 α ,6 β ,9 α -trihydroxy-8,13-epoxy-labd-14-en-11-one), dimethyl sulfoxide (DMSO), HEPES, Dulbecco's phosphate buffered saline, William's medium E, gentamycin, L-glutamine and fetal bovine serum (FBS) and bovine serum albumin fraction V (BSA), were obtained from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Collagenase and glucose assay kit were obtained from Sevapharma and Vian Diagnostika (Prague, Czech Republic), respectively. A commercial kit for nitrite/nitrate colorimetric detection was obtained from Roche Diagnostic (Prague). Other chemicals were obtained from standard sources.

Animals

Male rats of Wistar strain (Velaz-Lysolaje, 200-250 g body weight) received humane care and the study procedures were carried out in accordance with the Animal Care Guidelines of the First Faculty of Medicine.

Isolation and preparation of glycogen-rich hepatocyte culture

Hepatocytes were isolated from anesthetized rats by a standard two-phase collagenase perfusion method as previously reported (Farghali *et al.* 1994). After isolation, cell viability was at least 90 % as assessed by trypan blue. The preparation of glycogen-rich hepatocytes was performed according to Shiroyama *et al.* (1998) with minor modification (Hodis *et al.* 2007). Hepatocytes from untreated animals were plated into collagen-coated cell culture dishes and maintained at 37 °C, 95 % air, and 5 % CO₂ in William's medium E, supplemented with gentamycin, L-glutamine, 10 mM HEPES, 6 % FBS, 2x10⁻⁷ M insulin and 20 mM glucose overnight. The produced glycogen-rich cells were used to determine glycogenolytic glucose release. High glycogen content of hepatocytes was confirmed biochemically and histochemically (Shiroyama *et al.* 1998). This model proved to be convenient for the study of glycogenolysis by glucose release since there are no substrates as lactate, amino acids or other types of sugar necessary for gluconeogenesis.

Drug treatments and measurement of glycogenolytic glucose release

The medium of the glycogen-rich hepatocytes was changed to glucose-free Dulbecco's phosphate buffered saline just before the relevant treatment. Glucagon (0.5-10 μ g/ml) was added to the glucose-free Dulbecco's phosphate buffered saline medium in culture. Cultured hepatocytes were treated with forskolin (50 μ M), db-cAMP (1 mM) or SNAP (25 and 250 μ M). DMSO at final concentration of less than 1 % (v/v) used as the solvent for some compounds (e.g. forskolin) was found to be without any effect on the measured parameters. The time course of glucose release was followed till 60 min of incubation. The estimation of medium glucose levels was done spectrophotometrically according to the enzymatic glucose assay kit instructions from Vian Diagnostika (Prague, Czech Republic).

Determination of nitric oxide production

NO production from the cells into the medium was measured in appropriate time intervals as indicated in

the Results. NO production was determined by measuring the levels of its oxidation products NO_2^- and NO_3^- in the culture medium. This was detected colorimetrically (540 nm) by Griess reagent and/or by nitrite/nitrate colorimetric method from Roche Diagnostic. The nitrite levels were extrapolated from NaNO_2 calibration curve.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for iNOS expression

The 24-h cultured hepatocytes were used for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) without glucagon or under glucagon or L-NAME + glucagon treatment. RNA from hepatocytes was isolated by the standard procedure by Quiagen® RNeasy mini kit as described earlier for iNOS (Farghali *et al.* 2002). Total RNA content was finally measured by spectrophotometry-Eppendorf® BioPhotometer, RNA purity was counted from absorption rate of 260/280 nm respectively. The total RNA was amplified and reverse transcribed into cDNA via RT-PCR. 2.3 μl of cDNA formed was treated with PCR reaction mix after following protocol: Mix (47.7 μl) = H_2O 33.6 μl + red buffer 5.0 μl + black MgCl_2 4.0 μl + primer F 0.3 μl + primer R 0.3 μl + blue NTP 1.0 μl + yellow enhancer 1.0 μl + Taq® polymerase 2.5 μl . Cycler's conditions being: 2'94°//25x (20'94°/10'59°1'72°)//10'72°. The primers were constructed as described before (Farghali *et al.* 2002) 5'-GGC AGA CTG GAT TTG GCT GGT C-3'; R 5'-AGG TGT TCC CCA GGT AGG TAG C-3', comprising exon-intron DNA boundaries eliminating external contaminating DNA to be involved into PCR reaction. The relative level of iNOS mRNA expression was determined after normalization to the β -actin signal to account for variability in the amount of RNA that had been extracted from cells.

Amplified samples were run on agarose gels and stained with ethidium bromide. Images were captured using a monochrome camera and signal density measured by Kodak 1D Image Analysis Software Version 3.0 and compared to control sample.

Statistical analysis

In most of the experiments, the protein content of hepatocytes was estimated and was found to be variable per culture plate. Therefore, control culture plate was done for every single experiment. The experiments were performed at a minimum 6-8 times in triplicates (means of 18-24 values \pm S.E.M.) with blind samples as the media background. The statistical significance of

difference of mean scores was determined using the unpaired Student's t-test or ANOVA where appropriate. $P \leq 0.05$ values were considered statistically significant.

Results

Figure 1 demonstrates that the amount of glucose and nitrite released by glycogen-rich hepatocytes was significantly increased as a function of incubation time by glucagon (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment. These data show that at sampling times 30 and 60 min, both glucose and nitrite levels were higher under glucagon treatment as compared to control treatment. The effects were not evident at time 120 min (data are not shown). Sampling times of 30 and 60 min were, therefore, chosen for the subsequent experiments. In hepatocyte culture, treatment with glucagon increased iNOS gene expression (measured by RT-PCR) by about twofold (Fig. 2). This figure shows a photograph of an agarose gel of iNOS mRNA levels, where iNOS mRNA was detected in non-induced control hepatocytes. Following the treatment with glucagon, there was an intense PCR product of iNOS that was observed after 60 min exposure of hepatocytes in culture. It is clear that L-NAME did not significantly affect the level of iNOS mRNA which was expected because L-NAME is an inhibitor of NOS *per se* (i.e. post-translation effect).

Table 1 shows the relative effect of five different treatments (30 and 60 min incubation) on nitrite production and glucose release in hepatocyte culture. Both aminoguanidine and L-NAME at high concentrations were able to decrease significantly NO production (measured as nitrite) and glycogenolysis (measured as glucose) induced by glucagon. This effect was measurable and significant in most cases at 30 and 60 min with aminoguanidine being more potent. Moreover, Table 1 demonstrates that both db-cAMP and the specific activator of adenylyl cyclase, forskolin, significantly increased both glucose release and nitrite levels.

The effects of exogenously delivered NO (SNAP addition) on glucose release and nitrite levels is demonstrated in Figure 3. As expected, SNAP at 25 and 250 μM concentrations in the culture medium produced highly significant concentration-dependent increase in total nitrite levels as compared to control treatment (Fig. 3B). In addition, SNAP significantly increased basal glucose production 30 min after incubation when compared to control values (Fig. 3A).

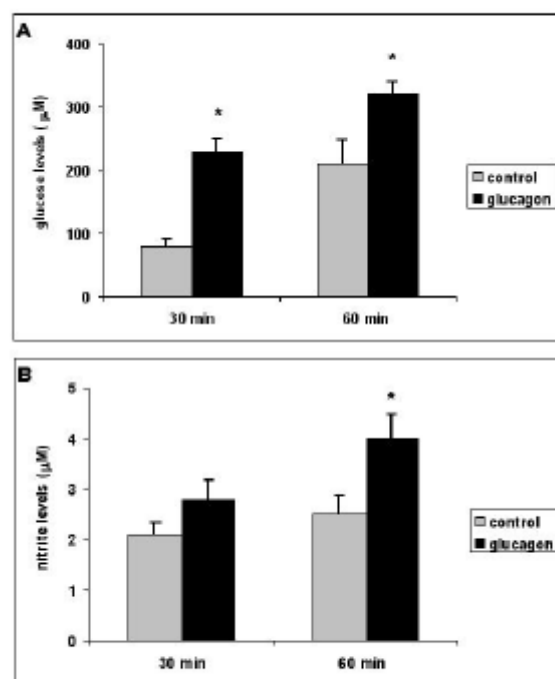


Fig. 1. Glucose (A) and nitrites (B) released to culture medium by glycogen-rich hepatocytes under control conditions and glucagon (1 µg/ml) treatment after 30 and 60 min. Values are expressed as means \pm S.E.M. * Significantly different from the respective control group ($P < 0.05$).

Discussion

The role of NO in a number of liver functions is being investigated intensively. It was suggested that nitric oxide synthases are players in the pathophysiology of some hepatic diseases (Moreau 2002). In several other reports, it was found that NO affects glycogen and glucose homeostasis (Horton *et al.* 1994a,b, Stadler *et al.* 1995, Borgs *et al.* 1996, Sugita *et al.* 2002). However, it is still not clear how NO is involved in the modulation of glycogenolytic pathways under physiological conditions. Moreover, there are data which indicate that glucagon may participate in the *in vivo* regulation of hepatic iNOS expression after proinflammatory stimuli (Harbrecht *et al.* 2004). The current investigation was motivated by our previous finding on the involvement of NO release in the activation of hepatocyte glycogenolysis after α -adrenoceptor stimulation (Hodis *et al.* 2007). The importance of the present study stems from the fact that liver has a central role in the control of glucose production and that the hepatocytes are the main players. Therefore, research is directed towards finding out

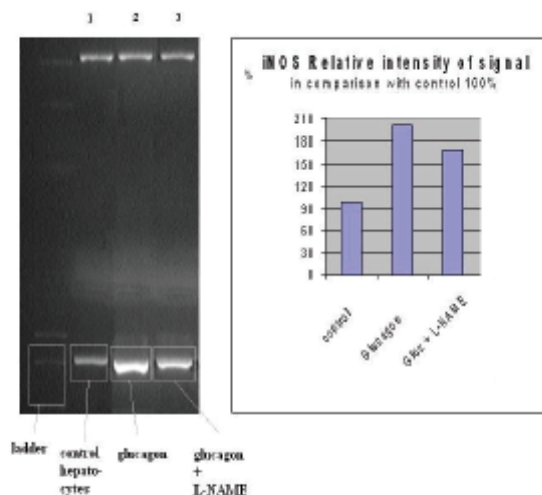


Fig. 2. A representative photograph of an agarose gel of RT-PCR demonstrating iNOS mRNA levels, where columns depict iNOS mRNA ladder with 386 bp and cultured hepatocytes under: 1) no treatment (control), 2) 1 µg/ml glucagon, 3) 1 µg/ml glucagon + 10 mM L-NAME treatment. The graph illustrates the quantified signal density of iNOS PCR products of treated hepatocytes compared to control sample. Results were recorded after 60 min incubation.

pharmacological means that modulates hepatocyte signaling pathways with consequent alterations in glycogenolysis or gluconeogenesis.

The present data demonstrate that glucagon-stimulated glycogenolysis in hepatocytes is accompanied by an increase in NO release. The present findings together with our previous ones (Hodis *et al.* 2007) demonstrate that NO is released, probably, as a common denominator signal during glycogenolysis as revealed for both α -adrenergic- and glucagon-agonistic effects.

The measurement of glycogenolysis was carried out in glycogen-rich hepatocytes prepared according to Shiroiyama *et al.* (1998). These cells are suitable for determination of agonist-induced glycogenolytic glucose release in glucose-free incubation medium. Significantly higher nitrite levels produced by glucagon were observed 60 min after the incubation of hepatocytes in culture. The effect of glucagon on NO production is expected to occur at later time than the effect on glucose. This is due to the fact that NO is not directly measured but rather its oxidation product in the medium, i.e. nitrite/nitrate, which needs time to be formed from NO.

Taken together, it seems that glucagon- and α -adrenergic-induced glycogenolysis that are mediated *via* the agonist/adenylyl cyclase/PKA cascade and

Table 1. The relative effect of incubation (30 and 60 min) with glucagon (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), aminoguanidine (AG, 10 mM) + glucagon, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 mM) + glucagon, dibutyl cAMP (db-cAMP, 1 mM) and forskolin (50 μM) treatments on nitrite production and glucose release from hepatocytes in culture (mean values \pm S.E.M. of 20-24 cultures).

Treatments	Percent of control ^a \pm SEM			
	Nitrite (μM) after		Glucose (μM) after	
	30 min	60 min	30 min	60 min
Glucagon	114 \pm 15	133 \pm 11*	267 \pm 25*	148 \pm 12*
AG + glucagon	75 \pm 5*	53 \pm 5*	90 \pm 15	117 \pm 10
L-NAME + glucagon	150 \pm 8*	76 \pm 6*	191 \pm 30*	150 \pm 15*
db-cAMP	120 \pm 10*	160 \pm 8*	140 \pm 10*	90 \pm 25
Forskolin	116 \pm 4*	120 \pm 3*	147 \pm 13*	75 \pm 8*

* Significantly different from control ($P \leq 0.05$).

^a Percent of the amount of produced nitrite or glucose in treated culture per the amount in appropriate control culture (treated/control \times 100).

cAMP signaling pathway or *via* the activation of phosphorylase kinase by the mobilized calcium that is aided by the inhibition of glycogen synthase (Dempsey *et al.* 2000), may involve downstream NO production. This is further evidenced by the adenylyl cyclase activator, forskolin, and the stable congener to cAMP, db-cAMP, because both of them produce qualitatively identical effects on glycogenolysis and NO production as glucagon. Moreover, we added SNAP at two concentrations to hepatocyte culture, and we observed dose-dependent increase in basal glycogenolysis. Accordingly, we may suggest that endogenous NO produced downstream of agonist/receptor signal transduction pathway and coupling through an isoform of NOS, plays a role in glycogenolysis. This is further supported by our data demonstrating that aminoguanidine (and to some extent also L-NAME) were able to partially inhibit the glycogenolytic effect of glucagon and epinephrine. Moreover, iNOS mRNA was significantly enhanced by both glucagon (present data) and epinephrine (Hodis *et al.* 2007). The present data do not rule out the involvement of either NOS isoform in contributing to the glycogenolytic signaling pathway(s) in isolated cultured hepatocytes. Recently, we have found a similar involvement of NO signaling during β -adrenergic lipolysis in rat white adipocytes (Kutinova-Canova *et al.* 2006) indicating the widespread role of

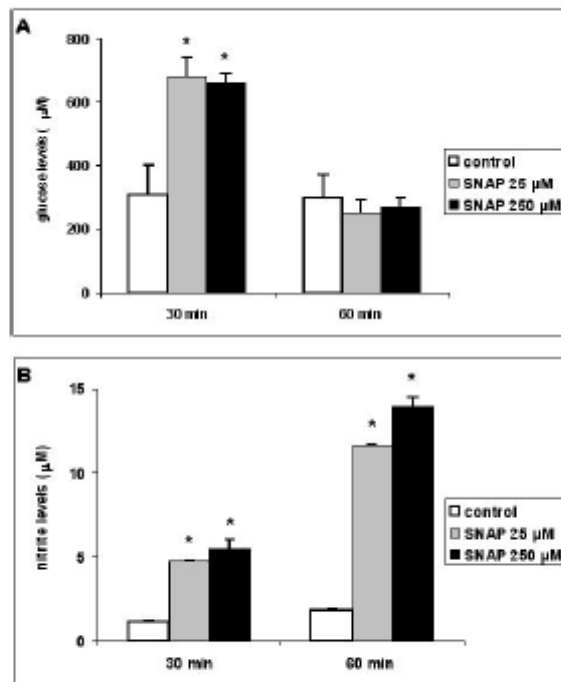


Fig. 3. The effect of S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP, 25 and 250 μM) treatment on glucose (A) and nitrite (B) release from glycogen-rich hepatocytes cultured for 30 and 60 min. Values are expressed as means \pm S.E.M. * Significantly different from the respective control group ($P \leq 0.05$).

NO in various pathophysiological processes of the liver as well as other well established functions in other organs and tissues.

In summary, our studies may suggest that under the present experimental conditions, endogenous NO is produced downstream of glucagon-receptor or α -adrenoceptor signal transduction pathways through an isoform of NO synthases and that it plays a role in glycogenolysis. This is supported by our findings that: 1) glucagon and epinephrine increased NO and simultaneously stimulated glycogenolysis, 2) prazosin (a selective α -adrenergic blocker) but not propranolol (non selective β -adrenergic blocker) was able to inhibit the glycogenolytic effect of α -adrenergic agonists concomitantly with a reduction of the amount of nitrite formed in the medium, 3) both glucagon and epinephrine increased iNOS mRNA, 4) db-cAMP and the adenylyl cyclase activator, forskolin, stimulated both nitrite production and glucose release, 5) NO exogenously delivered through SNAP to hepatocyte culture stimulated glycogenolysis, and 6) inhibitors of NO synthase reduced nitrite production and glycogenolysis in cultured rat hepatocytes. However, more studies are needed to further clarify of NO role in glycogenolysis.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Libuše Šlehobrová and

Alena Hloušková for their skilful technical assistance. This work was supported by the research grants: IGA MZ NR/9373-3/2007, GAČR 305/05/2425, and VZ MSM 0021620807.

References

- BORGS M, BOLLEN M, KEPPE S, YAP SH, STALMANS W, VANSTAPEL F: Modulation of basal hepatic glycogenolysis by nitric oxide. *Hepatology* **23**: 1564-1571, 1996.
- CHANG K, LEE SJ, CHEONG I, BILLIAR TR, CHUNG HT, HAN JA, KWON YG, HA KS, KIM YM: Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I κ B. *Exp Mol Med* **36**: 311-324, 2004.
- DECKER K: Biologically-active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* **192**: 245-261, 1990.
- DEMPSEY EC, NEWTON AC, MOCHLY ROSEN D, FIELDS AP, RAYLAND ME, INSEL PA, MESSING RO: Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol* **279**: L429-L438, 2000.
- FABBRI E, BUZZI M, BIONDI C, CAPUZZO A: Alpha-adrenoceptor mediated glucose release from perfused catfish hepatocytes. *Life Sci* **65**: 27-35, 1999.
- FARGHALI H, KAMENÍKOVÁ L, HYNIE S: Preparation of functionally active immobilized and perfused mammalian cells: an example of hepatocyte bioreactor. *Physiol Res* **43**: 121-125, 1994.
- FARGHALI H, CANOVÁ N, GAIER N, LINCOVÁ D, KMONÍČKOVÁ E, STREŠTÍKOVÁ P, MAŠEK K: Inhibition of endotoxemia-induced nitric oxide synthase expression by cyclosporin A enhances hepatocyte injury in rats: amelioration by NO donors. *Int Immunopharmacol* **2**: 117-127, 2002.
- FRAEYMAN N, VAN ERMEN A: Influence of aging on the beta- and glucagon-receptor-mediated glycogenolysis in rat hepatocytes. *Mech Ageing Dev* **70**: 115-126, 1993.
- HARBRECHT BG, PERPETUA M, FULMER M, ZHANG BC: Glucagon regulates hepatic inducible nitric oxide synthesis in vivo. *Shock* **22**: 157-162, 2004.
- HODIS J, KUTINOVÁ-CANOVÁ N, POTMĚŠIL P, KAMENÍKOVÁ L, KMONÍČKOVÁ E, ZÍDEK Z, FARGHALI H: The role of adrenergic agonists on glycogenolysis in rat hepatocyte culture and possible involving of NO. *Physiol Res* **56**: 419-425, 2007.
- HORTON RA, KNOWLES RG, TITHERADGE MA: Endotoxin causes changes in hepatic nitric-oxide synthesis, gluconeogenesis, and flux through phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 659-665, 1994a.
- HORTON RA, CEPPI ED, KNOWLES RG, TITHERADGE MA: Inhibition of hepatic gluconeogenesis by nitric oxide – a comparison with endotoxic shock. *Biochem J* **299**: 735-739, 1994b.
- HUBER M, KEPPLER D: Eicosanoids and the liver. *Prog Liver Dis* **9**: 117-141, 1990.
- KALAMIDAS SA, KOTOULAS OB, HANN AC: Studies on glycogen autophagy: effects of phorbol myristate acetate, ionophore A23187, or phentolamine. *Microsc Res Tech* **57**: 507-511, 2002.
- KLOVER PJ, MOONEY RA: Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 753-758, 2004.
- KUTINOVÁ-CANOVÁ N, LINCOVÁ D, KMONÍČKOVÁ E, KAMENÍKOVÁ L, FARGHALI H: Nitric oxide production from rat adipocytes is modulated by β_3 -adrenergic receptor agonists and is involved in a cyclic AMP-dependent lipolysis in adipocytes. *Nitric Oxide-Biol Chem* **14**: 200-211, 2006.
- MANZL C, SCHUBERT M, SCHWARZBAUM PJ, KRUMSCHNABEL G: Effects of chemical anoxia on adrenergic responses of goldfish hepatocytes and the contribution of alpha- and beta-adrenoceptors. *J Exp Zool* **292**: 468-476, 2002.
- MOREAU R: Are nitric oxide synthases new players in the pathophysiology of fulminant hepatic failure? *J Hepatol* **37**: 678-680, 2002.

-
- MORIYAMA M, NAKANISHI Y, TSUYAMA S, KANNAN Y, OHTA M, SUGANO T: Change from beta- to alpha-adrenergic glycogenolysis induced by corticosteroids in female rat liver. *Am J Physiol* 273: R153-R160, 1997.
- MURIEL P: Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. *J Appl Toxicol* 20: 189-195, 2000.
- PROIETTO J, ANDRIKOPOULOS S: Molecular mechanisms of increased glucose production: Identifying potential therapeutic targets. *J Invest Med* 52: 389-393, 2004.
- SHIROYAMA K, MORIWAKI K, YUGE O: The direct effect of dopamine on glucose release from primary cultured rat hepatocytes. *In vivo* 12: 527-529, 1998.
- STADLER J, BARTON D, BEIL-MOELLER H, DIEKMANN S, HIERHOLZER C, ERHARD W, HEIDECHE CD: Hepatocyte nitric-oxide biosynthesis inhibits glucose output and competes with urea synthesis for L-arginine. *Am J Physiol* 268: G183-G188, 1995.
- SUGITA H, KANEKI M, TOKUNAGA E, SUGITA M, KOIKE C, YASUHARA S, TOMPKINS RG, JEEVENDRA M: Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol* 282: E386-E394, 2002.
- VAN ERMEN A, FRAEYMAN N: Desensitization of α_1 -receptor, beta-receptor and glucagon-receptor in rat hepatocytes – influence of ageing. *Mech Ageing Dev* 75: 45-58, 1994.
- VARDANEGA-PEICHER M, LOPES G, LIMA FB, CURI R, NAKANO LC, BAZOTTE PB: Time sequence of changes in the responsiveness of glycogen breakdown to adrenergic agonists in perfused liver of rats with insulin-induced hypoglycemia. *Braz J Med Biol Res* 33: 805-813, 2000.
- VOLETI B, AGRAWAL A: Statins and nitric oxide reduce C reactive protein production while inflammatory conditions persist. *Mol Immunol* 43: 891-896, 2006.
-

13.4 Publikace 4

Hodis J, Kutinová-Canová N, Potměšil P, Kameníková L, Kmoníčková E, Zídek Z and Farghali H: The role of adrenergic agonists on glycogenolysis in rat hepatocyte cultures and possible involvement of NO. *Physiol. Res.* 56: 419-425, 2007

The Role of Adrenergic Agonists on Glycogenolysis in Rat Hepatocyte Cultures and Possible Involvement of NO

J. HODIS, N. KUTINOVÁ-CANOVÁ, P. POTMĚŠIL¹, L. KAMENÍKOVÁ,
E. KMONÍČKOVÁ¹, Z. ZÍDEK¹, H. FARGHALI

Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University and ¹Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Received May 12, 2006

Accepted July 24, 2006

On-line available August 22, 2006

Summary

Certain liver metabolic diseases point to the presence of disturbances in glycogen deposition. Epinephrine raises the cAMP level that activates protein kinase A leading to the activation of phosphorylase and glycogen breakdown. In the present report, we sought to investigate whether NO is produced during adrenoceptor agonist-induced glycogenolysis in rat hepatocytes in cultures. Isolated glycogen rich rat hepatocytes in cultures were used. NO production (NO_2^-) was assessed under the effect of adrenergic agonists and adrenergic agonist/antagonist pairs, dibutyl cyclic AMP sodium-potassium salt (db-cAMP), NO synthase (NOS) inhibitors N^ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), aminoguanidine (AG) and the NO donor S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP). The inducible NO synthase (iNOS) mRNA was examined by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Glycogenolysis was quantified by glucose levels released into medium. The amount of glucose and NO_2^- released by hepatocytes was increased as a result of epinephrine, phenylephrine or db-cAMP treatments. The increase in glucose and NO_2^- released by epinephrine or phenylephrine was blocked or reduced by prazosin pretreatment and by NOS inhibitors aminoguanidine and L-NAME. iNOS gene expression was up-regulated by epinephrine. It can be concluded that glycogenolysis occurs through α -adrenoceptor stimulation and a signaling cascade may involve NO production.

Key words

Glycogen • Glycogenolysis • NO • iNOS • Epinephrine • cAMP

Introduction

Liver damage which occurs in certain metabolic diseases may point to the presence of disturbances in glycogen deposition due to various reasons that either promote accumulation of glycogen in the liver or lead to depressed levels of liver glycogen where the two processes are reciprocally controlled. Control of hepatic

glycogenolysis involves intricate paracrine and endocrine communication between hepatocytes and other cells (Decker 1990, Huber and Keppler 1990, Borgs *et al.* 1996). Signaling pathways that are included in hormone-induced glycogen degradation are well documented. Glucagon is known to be the most potent activator of glycogenolysis and its role in glycogenolysis has been extensively studied. In addition, epinephrine raises the

cAMP level that activates protein kinase A (PKA) and this in turn leads to the activation of phosphorylase and glycogen breakdown. At the same time, PKA phosphorylates and helps to inactivate glycogen synthase. This means that the latter two hormones on the one hand, and insulin on the other, determine which one predominates. This helps to ensure that when glycogen is broken down, it is also not being synthesized; the control mechanisms are reciprocal in the two systems (Elliott and Elliott 2001). The adrenergic regulation of glycogenolysis in hepatocytes is of importance under both physiological and pathological conditions. A number of studies were conducted in this regard where α_1 and β receptors were reported to exist in hepatocytes (Van Ermen and Fraeyman 1994, Shiroyama *et al.* 1998, Fabbri *et al.* 1999, Vardanega-Peicher *et al.* 2000, Manzl *et al.* 2002). The reported data indicate that several types of adrenergic receptors may play a role in glycogenolysis. Even a change from β - to α -adrenergic glycogenolysis was reported in the rat liver (Moriyama *et al.* 1997).

Though the pathways that modulate glycogen levels in the liver are almost clear, the role of nitric oxide (NO) in this process is not extensively studied. Currently it is well known that NO possesses functional regulatory effects in all organs, tissues and cells which have been hitherto examined, including the liver. The role of NO in a number of liver functions has been investigated in previous studies (Muriel 2000, Chang *et al.* 2004). It was suggested that nitric oxide synthases (NOSs) are new players in the pathophysiology of some liver diseases (Moreau 2002). Reports indicate that NO affects glycogen and glucose homeostasis (Borgs *et al.* 1996, Stadler *et al.* 1995, Horton *et al.* 1994a,b, Sugita *et al.* 2002). However, it is still not clear how NO is involved in the modulation of glycogenolytic pathways or in liver glycogen homeostasis. Modulation of the reactions involved in the production and release of glucose from hepatocytes is a possible approach to developing new classes of oral hypoglycemic agents (Proietto and Andrikopoulos 2004). In the present work, we investigated whether NO is produced during adrenoreceptor agonist-induced glucose release by rat hepatocytes in cultures. To achieve this goal, isolated glycogen-rich rat hepatocytes in culture were used for the glycogenolysis studies and NO expression was assessed under the effect of various adrenergic agonists, adrenergic agonist/antagonist pairs, cAMP and nitric oxide donors.

Methods

Chemicals and reagents

William's medium E, supplemented with gentamicin, L-glutamine and 10 % FBS, bovine serum albumin fraction V (BSA), epinephrine, phenylephrine, prazosin, propranolol (+/- 1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propranolon hydrochloride), sulfanilic acid, N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, dibutyryl cyclic AMP sodium-potassium salt (db-cAMP), N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), aminoguanidine (AG), S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP), dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma-Aldrich (Prague). Collagenase and Glucose assay kit were obtained from Sevapharma (Prague). All other chemicals were obtained from standard sources and were the highest grade available.

Animals, isolation and preparation of glycogen-rich hepatocyte cultures

Male rats of Wistar strain (Velaz, Lysolaje, 200-250 g body weight) were used throughout the present studies. Hepatocytes were isolated from rats by the standard two-phase perfusion method where collagenase was included in the second phase as previously reported (Farghali *et al.* 1994).

After isolation, cell viability as assessed by trypan blue was more than 90 %. The preparation of glycogen-rich hepatocytes was carried out according to Shiroyama *et al.* (1998) with modification. Briefly, 1.5×10^6 hepatocytes from untreated animals were plated into 35-mm collagen-coated cell culture dishes and maintained at 37 °C, 95 % air, and 5 % CO₂ in William's medium E, supplemented with gentamicin, L-glutamine 10 mM HEPES, 6 % fetal bovine serum, 10^{-7} M insulin and 20 mM glucose. The glycogen-rich cells were used to determine glycogenolytic glucose release. High glycogen content of hepatocytes was confirmed by both biochemical and histochemical means (Shiroyama *et al.* 1998). This model proved to be convenient for the study of glycogenolysis.

Measurement of glucose release

The medium of the glycogen-rich hepatocytes was changed to Dulbecco's phosphate buffered saline (containing neither glucose nor amino acids, nor lactate) just before the appropriate treatment. Control hepatocyte cultures without agonist addition were always included to express the precise glycogenolytic effect of agonists.

Epinephrine (10^{-7} - 10^{-4} M), phenylephrine (10^{-7} - 10^{-4} M), isoprenaline (2 μ M), dobutamine (10 μ M) without or preceded with prazosin or propranolol to the glucose-free Dulbecco's phosphate buffered saline medium. The time course of glycogenolysis was followed till 120 min of incubation. Glycogenolysis was followed up by estimation of medium glucose medium levels spectrophotometrically according to an enzymatic glucose assay kit.

Nitric oxide production and other biochemical measurements

The time course of NO production, cell protein content (protein kit Sigma-Aldrich, Czech Republic), ALT leakage (Biocon, Germany) from cells into the medium were measured at appropriate time intervals as indicated in the section Results. NO production was determined by measuring the levels of its oxidation products NO_2^- and NO_3^- in the culture medium. This was detected colorimetrically (540 nm) by Griess reagent. The nitrite levels were extrapolated from NaNO_2 calibration curve.

iNOS expression in cultured hepatocytes by RT-PCR

The 24-h cultured hepatocytes were used for the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA from hepatocytes was isolated by the standard procedure described earlier (Farghali *et al.* 2002) for iNOS. The relative level of iNOS mRNA expression was determined after normalization to the β -actin signal to account for variability in the amount of RNA that had been extracted from the cells.

Statistical analysis

All experiments were performed at a minimum 6-8 times in triplicates (means of at least of 18-24 values, see results) with blind samples as the media background. The statistical significance of the difference of mean scores was determined using the unpaired Student's *t*-test. Results showing $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

The amount of glucose and nitrite released by glycogen-rich hepatocytes was significantly increased as a function of time by adrenergic drug treatment. Figure 1 demonstrates that at sampling times 30 and 60 min, both glucose and nitrite levels were higher under adrenergic

Table 1. The relative effect of incubation (30 and 60 min) with 5 treatments on nitrite production and glycogenolysis in hepatocyte culture after 24 h expressed in % of control (mean values of 20-24 cultures \pm S.E.M.)

Treatments	Percent of control \pm S.E.M.**			
	Nitrite after		Glucose after	
	30 min	60 min	30 min	60 min
AG	78 \pm 7*	38 \pm 8*	91 \pm 15	90 \pm 13
AG+Epi	83 \pm 3*	79 \pm 6*	103 \pm 15	158 \pm 13*
NAME	90 \pm 10	78 \pm 9*	100 \pm 3	140 \pm 3*
NAME+Epi	158 \pm 7*	78 \pm 6	126 \pm 13	93 \pm 15
db-cAMP	120 \pm 10*	160 \pm 8*	140 \pm 10*	90 \pm 25

AG - aminoguanidine, Epi - epinephrine, NAME - N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester, db-cAMP - dibutyryl cyclic AMP sodium-potassium salt. * significant difference from control ($P < 0.05$). ** amount of produced nitrite or glucose in treated cultures in percent of the control culture

drugs treatment as compared to the control treatment. Nitrite level was also higher in both cases as compared to control, the difference being significant 60 min after incubation of hepatocytes in culture. The increase in the amount of glucose and nitrite induced by epinephrine or phenylephrine was completely blocked or significantly reduced by prazosin pretreatment (Fig. 2). This figure also demonstrates that the pretreatment with propranolol has no effect on epinephrine-induced increase in glucose or nitrite production. In hepatocyte cultures, treatment with epinephrine increased iNOS gene expression as measured by RT-PCR. Figure 3 shows a representative photograph of an agarose gel of iNOS mRNA levels. In non-induced, control hepatocytes, iNOS mRNA was detected. Following treatment with epinephrine there was a marked PCR production of iNOS that was observed after 60 min exposure of hepatocyte in culture. At the posttranslational level, Table 1 shows the relative effect of incubation (30 and 60 min) with five treatments on nitrite production and glycogenolysis in hepatocyte cultures after 24 h. Both aminoguanidine at high concentrations (10 mM) and L-NAME (10 mM) were able to significantly decrease NO production and glycogenolysis induced by epinephrine. This effect was measurable and significant in most cases at 30 and 60 min, the aminoguanidine effect being more potent.

Discussion

The liver plays a central role in the control of

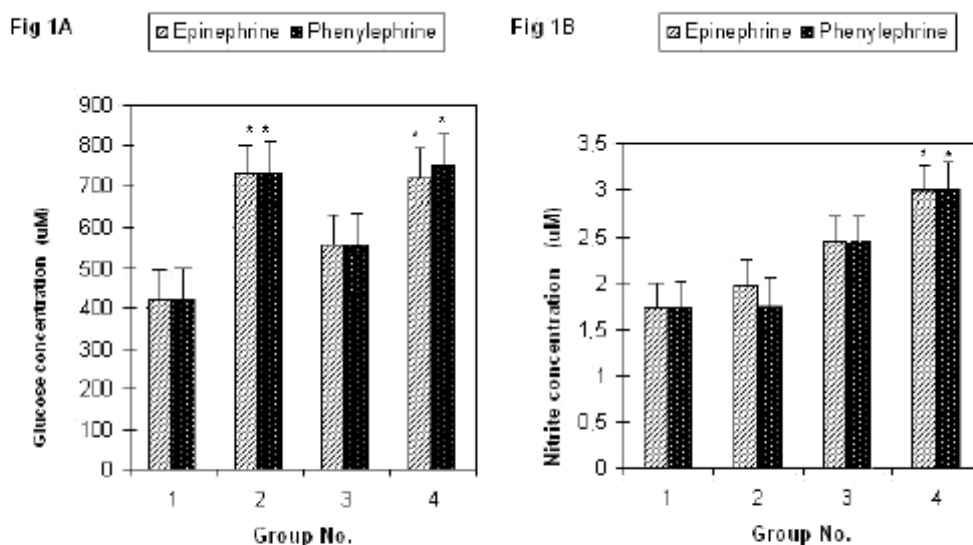


Fig. 1 (A, B). Glucose (A) and nitrite (B) levels under epinephrine and phenylephrine treatments. 1) 30 min incubation control, 2) 30 min incubation epinephrine and phenylephrine, 3) 60 min incubation control, 4) 60 min incubation epinephrine and phenylephrine. * Significantly different from control ($P < 0.05$).

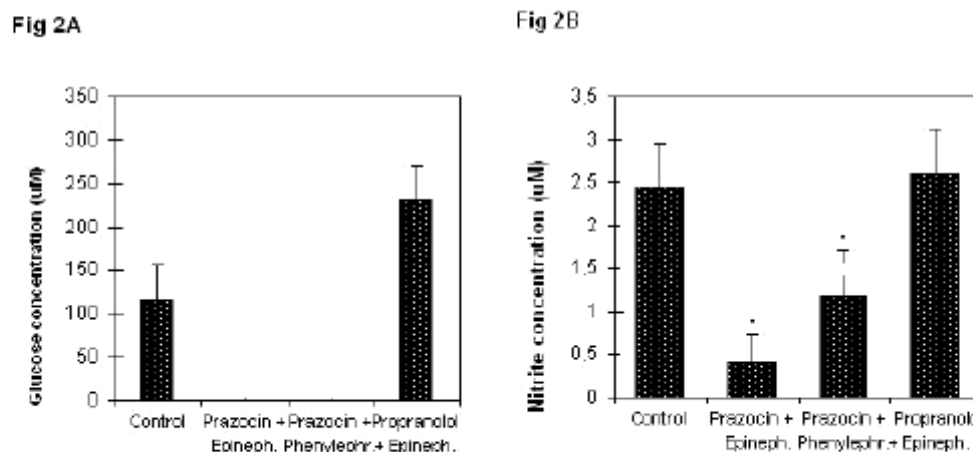


Fig. 2 (A, B). The effect of prazosin and propranolol pretreatment on glucose (A) and nitrite (B) increase induced by epinephrine and phenylephrine treatments. * Significantly different from control ($P < 0.05$).

glucose production. Due to the importance of hepatocytes in this regard, intensive research is directed towards finding out pharmacological means that modulate hepatocyte signaling pathways leading to glycogenolysis or modulation of gluconeogenesis. This important aspect may be directed to patients with type 2 diabetes who are going on to require insulin therapy to achieve glucose control. New classes of oral hypoglycemic agents could be targeting the inappropriately elevated endogenous glucose production. Among several approaches reported (Moriyama *et al.* 1997) there are modulators of

glycogenolysis and gluconeogenesis, inhibitors of stimulatory hormones or their receptors. The present data demonstrate that epinephrine and phenylephrine, but not isoprenaline or dobutamine, enhanced glucose release in hepatocytes in culture. However, reports indicate that various adrenergic, both alpha and beta agonists, stimulate glycogenolysis depending on animal age and zones of hepatocytes (Fraeyman and Van Ermen 1993, Sanghani and Scarpace 1994, Tosh and Agius 1994).

Nevertheless, the present study demonstrates that NO is released, probably as a common denominator

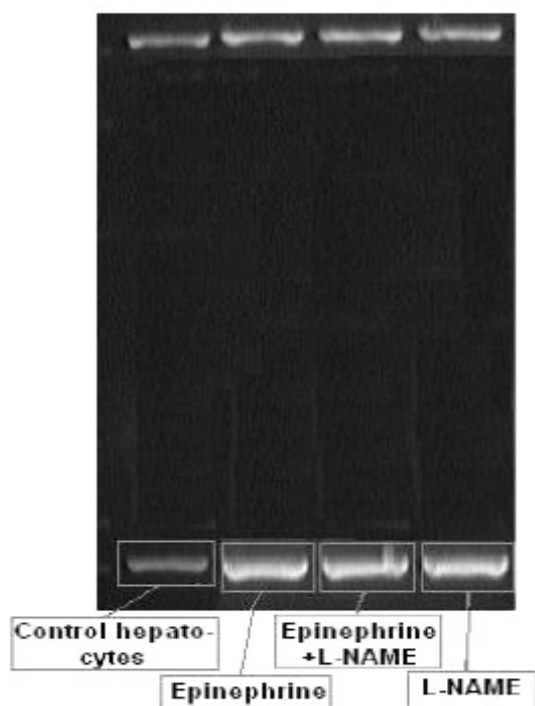


Fig. 3. A representative photograph of an agarose gel of iNOS mRNA levels.

signal during the process of glycogenolysis as revealed for both an adrenergic-agonistic effect with consequent glucose release. Measurement of glycogenolysis was carried out by the preparation of glycogen-rich hepatocytes according to Shiroiyama *et al.* (1998) which were used to determine glycogenolytic glucose release in a glucose-free incubation medium. The incubation of hepatocytes in William's medium E containing high glucose and insulin concentrations (to obtain glycogen-rich hepatocytes) and the switching into Dulbecco's phosphate buffered saline medium should turn down to a minimum the expected pathway of gluconeogenesis which is based mainly on lactate as a reactant (Meyer *et al.* 2003). Dulbecco's phosphate buffered saline medium as the only medium in the second part of the experiment disrupts additional pathways of forming glucose based on the uptake of reaction substrates from extra-cellular environment.

The role of nitric oxide (NO) in a number of liver functions has been investigated in several previous studies. It was suggested that nitric oxide synthases (NOSs) are involved in the pathophysiology of some hepatic diseases (Moreau 2002). In several other reports it was found that NO affects glycogen and glucose

homeostasis (Borgs *et al.* 1996, Stadler *et al.* 1995, Horton *et al.* 1994a,b, Sugita *et al.* 2002). However, it is still not clear how NO is involved in the modulation of glycogenolytic pathways under physiological conditions.

Interestingly enough, it was found in the present report that the α_1 -selective adrenoceptor blocker (prazosin) inhibited epinephrine-induced glycogenolysis and also NO production.

The present data provide evidence that α -adrenergic-induced glycogenolysis is realized via the agonist/adenylyl cyclase/protein kinase A (PKA) cascade and cAMP signaling pathway, involving downstream NO production. This is supported by the fact that the stable congener to cAMP, db-cAMP, produced identical effects on glycogenolysis and NO production as epinephrine. Moreover, SNAP used at the concentrations of 25-250 μ M in hepatocyte cultures led to a dose-dependent increase in basal glycogenolysis (data not shown). Hence, our study suggested that endogenous NO produced downstream of agonist/receptor signal transduction pathway and coupling through an isoform of NOS plays a role in glycogenolysis. This is further supported by our data demonstrating that both L-NAME and aminoguanidine were able to partially inhibit the glycogenolytic effect of epinephrine. Moreover, iNOS mRNA was significantly enhanced by epinephrine. Indeed, the role of iNOS in adrenoceptor-stimulated glycogenolysis under physiological conditions was not yet reported according to the available data. The present data do not rule out the involvement of either NOS isoform in contributing to the glycogenolytic signaling pathway(s) in isolated cultured hepatocytes. Maintaining blood glucose levels within a physiological range is an important function requiring multiple metabolic pathways and involving several cell types, including the important role for hepatocytes. The importance of this study, therefore, stems out from the fact that hepatocytes are critical for glucose homeostasis (Klover and Mooney 2004). Hepatocytes can respond to either feeding or fasting by storing or producing glucose as necessary. Glucagon, catecholamines and insulin are well-studied regulators of glycogen stores. Transcriptional regulation of rate-limiting enzymes and modulation of enzyme activity through phosphorylation and allosteric regulation are involved. Therefore, the contribution of more signals which are involved in these functions would be significant. Our data indicate that under the present experimental conditions, glycogenolysis occurs through α -adrenoreceptor stimulation, which is known to be

realized via the adenylyl cyclase/cAMP protein kinase A signaling cascade, may involve NO production downstream of receptor-cAMP pathways. It was reported that iNOS is regulated mainly at the transcriptional level by several transcriptional factors such as nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), Fos/Jun, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), interferon- γ (IFN- γ) activation site (GAS), and IFN regulatory factor (IRF) and some of these transcription factors (AP-1, NF- κ B, and C/EBP) are reported to be regulated by glycemia. Therefore, there is a possibility that glycogenolysis may be involved in the regulation of iNOS gene expression via

the regulation of these transcriptional factors (Won *et al.* 2003).

This gives further proof about the diversity of the roles of NO (whether at physiological levels or the induced ones) in hepatocyte metabolic functions.

Acknowledgements

The author would like to thank Libuše Šlehobrová, Alena Hloušková and Mgr. Jana Křížková for their skilful technical assistance. This study was supported by grant IGA MZ NL/7418-3.

References

- BORGS M, BOLLEN M, KEPPELS S, YAP SH, STALMANS W, VANSTAPEL F: Modulation of basal hepatic glycogenolysis by nitric oxide. *Hepatology* 23: 1564-1571, 1996.
- CHANG K, LEE SJ, CHEONG I, BILLIAR TR, CHUNG HT, HAN JA, KWON YG, HA KS, KIM YM: Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I κ B. *Exp Mol Med* 36: 311-324, 2004.
- DECKER K: Biologically-active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192: 245-261, 1990.
- ELLIOTT WH, ELLIOTT DC: *Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, 2001, pp 222-233.
- FABBRI E, BUZZI M, BIONDI C, CAPUZZO A: Alpha-adrenoceptor mediated glucose release from perfused catfish hepatocytes. *Life Sci* 65: 27-35, 1999.
- FARGHALI H, KAMENÍKOVÁ L, HYNIE S: Preparation of functionally active immobilized and perfused mammalian cells: an example of hepatocyte bioreactor. *Physiol Res* 43: 121-125, 1994.
- FARGHALI H, CANOVÁ N, GAIER N, LINCOVÁ D, KMONÍČKOVÁ E, STŘEŠTÍKOVÁ P, MAŠEK K: Inhibition of endotoxemia-induced nitric oxide synthase expression by cyclosporin A enhances hepatocyte injury in rats: amelioration by NO donors. *Int Immunopharmacol* 2: 117-127, 2002.
- FRAEYMAN N, VAN ERMEN A: Influence of aging on the beta-receptor and glucagon-receptor-mediated glycogenolysis in rat hepatocytes. *Mech Ageing Dev* 70: 115-126, 1993.
- HORTON RA, KNOWLES RG, TITHERADGE MA: Endotoxin causes reciprocal changes in hepatic nitric-oxide synthesis, gluconeogenesis, and flux through phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 659-665, 1994a.
- HORTON RA, CEPPI ED, KNOWLES RG, TITHERADGE MA: Inhibition of hepatic-gluconeogenesis by nitric oxide: a comparison with endotoxic-shock. *Biochem J* 299: 735-739, 1994b.
- HUBER M, KEPPLER D: Eicosanoids and the liver. *Prog Liver Dis* 9: 117-141, 1990.
- KLOVER PJ, MOONEY RA: Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 753-758, 2004.
- MANZL C, SCHUBERT M, SCHWARZBAUM PJ, KRUMSCHNABEL G: Effects of chemical anoxia on adrenergic responses of goldfish hepatocytes and the contribution of alpha- and beta-adrenoceptors. *J Exp Zool* 292: 468-476, 2002.
- MEYER C, STUMVOLL M, WELLE S, WOERLE HJ, HAYMOND M, GERICH J: Relative importance of liver, kidney, and substrates in epinephrine-induced increased gluconeogenesis in humans. *Am J* 285: 819-826, 2003.
- MOREAU R: Are nitric oxide synthases new players in the pathophysiology of fulminant hepatic failure? *J Hepatol* 37: 678-680, 2002.
- MORIYAMA M, NAKANISHI Y, TSUYAMA S, KANNAN Y, OHTA M, SUGANO T: Change from beta- to alpha-adrenergic glycogenolysis induced by corticosteroids in female rat liver. *Am J Physiol* 273: R153-R160, 1997.
- MURIEL P: Regulation of nitric oxide synthesis in the liver *J Appl Toxicol* 20: 189-195, 2000.

- PROIETTO J, ANDRIKOPOULOS S: Molecular mechanisms of increased glucose production: identifying potential therapeutic targets *J Invest Med* 52: 389-393, 2004.
- SANGHANI MP, SCARPACE PJ: Atypical beta-adrenergic receptors in rat liver: evidence for transient expression during aging. *J Gerontol* 49: B60-B64, 1994.
- SHIROYAMA K, MORIWAKI K, YUGE O: The direct effect of dopamine on glucose release from primary cultured rat hepatocytes. *In vivo* 12: 527-529, 1998.
- STADLER J, BARTON D, BEIL-MOELLER H, DIEKMANN S, HIERHOLZER C, ERHARD W, HEIDECHE CD: Hepatocyte nitric oxide biosynthesis inhibits glucose output and competes with urea synthesis for L- arginine. *Am J Physiol* 268: G183-G188, 1995.
- SUGITA H, KANEKI M, TOKUNAGA E, SUGITA M, KOIKE C, YASUHARA S, TOMPKINS RG, JEEVENDRA M: Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E386-E394, 2002.
- TOSH D, AGIUS L: Glycogen degradation by adrenergic agonists and glucagon in periportal and perivenous rat hepatocyte cultures. *Biochim Biophys Acta* 1221: 238-242, 1994.
- VAN ERMEN A, FRAEYMAN N: Desensitization of alpha₁-receptor, beta-receptor and glucagon-receptor in rat hepatocytes –influence of ageing. *Mech Ageing Dev* 75: 45-58, 1994.
- VARDANEGA-PEICHER M, LOPES G, LIMA FB, CURI R, NAKANO LC, BAZOTTE PB: Time sequence of changes in the responsiveness of glycogen breakdown to adrenergic agonists in perfused liver of rats with insulin-induced hypoglycemia. *Braz J Med Biol Res.* 33: 805-813, 2000.
- WON JS, IM YB, KEY L, SINGH I, SINGH AK: The involvement of glucose metabolism in the regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in glial cells: possible role of glucose-6-phosphate dehydrogenase and CCAAT/enhancing binding protein. *J Neurosci* 23: 7470 –7478, 2003.

Corresponding author

J. Hodis, Institute of Pharmacology; First Faculty of Medicine, Charles University, Albertov 4, 120 00 Prague 2, Czech Republic. E-mail: hodik@volny.cz