

**UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE
1.LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Autoreferát disertační práce



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

MUDr.Mgr.Jiří Hodis

Praha 2011

Doktorské studijní programy v biomedicině

Universita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Farmakologie a toxikologie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc.

Školící pracoviště: Universita Karlova v Praze
Farmakologický ústav 1.LF UK
Albertov 4, Praha 2
PSC 120 00

Školitel: Prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky děkanátu 1.lékařské fakulty.

Oponenti: Prof. MUDr. Miloslav Kršiak, DrSc.
Farmakologický ústav 3.LF UK

Doc. RNDr. Berta Otová, Csc.
Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN

Obsah	strana
Seznam použitých zkratek.....	3
Abstrakt v češtině.....	4
Abstrakt v angličtině.....	5
Úvod.....	7
Hypotézy a cíle práce.....	8
Materiál a metodika.....	9
Výsledky.....	12
Diskuse.....	19
Závěry.....	22
Použitá literatura.....	22
Seznam publikací.....	24-26

Seznam použitých zkratek:

AMP	- adenosin monofosfát
AMPK	- adenosin monofosfát kináza
ATP	- adenosin trifosfát
B2m	- beta 2 mikroglobulin
cAMP	- cyklický adenosin monofosfát
cGMP	- cyklický guanosin monofosfát
ESC	- European Society of Cardiology (Evropská kardiologická společnost)
L-NAME	- N ^G -nitro-L-arginine-methyl ester
LKB1	- AMPK nadřazená kináza ze skupiny Ser/Thr kináz
LLP, LPL	- lipoproteinová lipáza
NO	- oxid dusnatý
NOS	- NO syntáza
PGI ₂	- prostacyklin
PKA	- proteinkináza A
PPAR γ	- peroxisome proliferation activator receptor γ (nukleární receptor γ aktivovaný peroxisomovými proliferátory)

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)
SNAP	- S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicilamin
TNF α	- tumor necrosis faktor α

Abstrakt:

Zdůvodnění a cíle: I když obezita a metabolický syndrom představují ve světě závažný zdravotnický problém, arsenál farmakoterapie je pro léčbu dosud nedostatečný a jsou neustále hledány další signalizační děje a metabolické dráhy k ovlivnění farmaky. V naší práci jsme se zaměřili na buňky dvou hlavních orgánů představující riziko těchto nemocí - hepatocyty a viscerální adipocyty a na více - méně specifické signalizační a metabolické dráhy v těchto buněčných modelech (PPAR γ receptor- nukleární receptor γ aktivovaný peroxisomovými proliferátory, β_3 adrenergně navozenou lipolýzu ve viscerálních adipocytech a adrenergně a glukagonem navozenou glykogenolýzu v hepatocytech s vysokým obsahem glykogenu). Navíc jsem zařadili do sledovaných veličin organově nespecifickou produkci oxidu dusnatého (NO), transkripci indukovatelné NO syntázy (iNOS) jako další významé signalizační dráhy.

U modelu adipocytů jsem se snažili odpovědět na následující otázky:

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

U modelu hepatocytů bohatých na glykogen jsme si kladli otázky:

1/ Jakým typem adrenergního receptoru je zprostředkována adrenergně navozená jaterní glykogenolýza ?

2/ Jaký je vliv adrenergních agonistů ve srovnání s glukagonem na produkci NO a expresi iNOS a koreluje tento vliv s glykogenolýzou?

3/ Jaký vliv má naopak stimulace nebo blokáda produkce NO na glykogenolýzu?

Metody: Produkce NO po vlivu účinných látek byla zjišťována pomocí detekce NO oxidativních produktů, glykogenolýza byla detekována podle množství glukózy uvolněné do media z kultury hepatocytů, hladina NOS byla zjišťována komparativní polymerázovou řetězovou reakcí s reversní transkripcí (RT-PCR) u

hepatocytů a kvantitativní qRT PCR v reálném čase u adipocytů. Lipolýza byla hodnocena podle hladiny glycerolu uvolněného do media v kultuře adipocytů podle metody Lamberta a Neishe 1950.

Výsledek: Troglitazon jako PPAR γ agonista blokoval částečně lipolýzu stejně jako syntézu NO navozenou β_3 adrenomimetikem BRL-37344 v potkaních adipocytech. Přidáním PPAR γ antagonisty SR-202 však nedošlo k blokádě uvedeného efektu troglitazonu, což nás vedlo k hypotéze o možném nonPPAR γ efektu troglitazonu.

Po přidání Compound C - blokátoru AMPK (adenosin monofosfát protein kinázy) byl zablokován efekt troglitazonu na β_3 adrenergně vyvolanou lipolýzu i NO produkci. Hladina iNOS (měřená pomocí metody RT-PCR) kopírovala hladinu celkového NO detekovaného v mediu kultury adipocytů pod vlivem jednotlivých látek.

U hepatocytů bohatých na glykogen jak adrenalin, tak fenylefrin vedl ke zvýšení glykogenolýzy a NO produkce, ale jen prazosin jako α adrenergní blokátor a nikoliv propranolol jako β blokátor byl schopen tomuto 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 adrenergní mimetika zaměněna za glukagon.

Závěr: Efekt troglitazonu na β_3 adrenergně navozenou lipolýzu viscerálních adipocytů a na 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 potkaních adipocytů je dle naší práce zprostředkovan 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 potkaních hepatocytů bohatých na glykogen. Efekt glukagonu je pak obdobný jako adrenergních agonistů.

Práce byla finančně podpořena z grantů: IGA MZ NR/9379-3/2007, VZ MSM 0021620807, GAČR 305/05/2425 a IGA MZ NL/7418-3.

Abstract:

Background and aims: Both obesity and metabolic syndrome form severe health problems in the whole world. Nevertheless the armament of pharmacotherapy for both disease units remains unsatisfactory and additional signalisation and metabolic pathways as targets for pharmacotherapy are sought.

We aimed our work to main organs in risk of the mentioned diseases –liver and visceral fat using hepatocytes and visceral adipocytes as model for targeting more or less specific pathways in them (PPAR γ receptor- peroxysome proliferation activators receptor γ , β_3 adrenergic triggered lipolysis in visceral adipocytes and adrenergic/glucagon triggered glycogenolysis in hepatocytes with high glycogen content). We included moreover Nitric oxide (NO) production and transcription of inducible NO synthase (iNOS) as important signalling pathways although they are organ nonspecific.

We tried to answer the following questions in visceral adipocytes model:

Are there any interactions between signaling pathways activated by glitazones (designated as PPAR γ specific agonists) and β_3 agonists specially in their effect in lipolysis, NO production and iNOS expression?

Whereas in hepatocyte culture model we asked questions as:

1/ What type of adrenergic receptor is involved in adrenergically triggered liver glycogenolysis?

2/ What is the influence of adrenergic agonists on NO production and iNOS expression in comparison to glucagon and does it correlates with glycogenolysis?

3/ What is the influence of NO production stimulation and blockade to glykogenolysis?

Methods: NO production was detected under the active agents treatments by the method of detection of NO oxidative products. 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 after the method of Lambert and Neish 1950.

Results: Troglitazone as PPAR γ agonist attenuated partially lipolysis triggered by β_3 agonist BRL-37344 and blocked the triggered NO synthesis in isolated rat 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 under different treatments.

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 effect of troglitazone on β adrenergically triggered lipolysis and NO production (iNOS transcription) appears to be probably non PPAR γ dependent but AMPK dependent after our results. The effect can be blocked by AMPK blocker but it is not affected by PPAR γ selective blocker. The catecholamine induced glycogenolysis is mediated through α adrenergic but not by β adrenergic receptor in rat glycogen rich hepatocytes after our research results. It has been blocked by α adrenergic but not by β adrenergic blocker. After the results of our experiments the glycogenolysis is modulated by NO donors and NOS inhibitors in glycogen rich hepatocyte culture. The glucagon effect resembles the effect of adrenergic agonists.

Supported by research grants: IGA MZ NR/9379-3/2007, VZ MSM 0021620807, GAČR 305/05/2425 a IGA MZ NL/7418-3.

Úvod

Obezita a metabolický syndrom jsou v současnosti považovány za pandemii rozvinutého světa a mají ročně na svědomí mnoho lidských životů. Vliv obezity na na zvýšení výskytu dalších onemocnění ukazuje **Tabulka č. 1**:

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 2004)

Hlavními orgány působícími buďto jako původci nebo jako jedni z hlavních aktérů u těchto onemocnění jsou játra a viscerální tuk. Neustále probíhá aktivní

výzkum ve snaze nalézt nové signální molekuly nebo specifické metabolické dráhy, přes které by bylo možné zacílit terapii právě na játra a viscerální tuk. Přes neexistující specifické cílové molekuly nebo receptory obou orgánů, je více-méně specifickým metabolickým dějem jater glykogenolýza se schopností uvolňovat glukozu do oběhu (**Agius 2007**) a u viscerálního tuku pak reakce na PPAR γ agonisty a β_3 adrenergní mechanismus lipolýzy (**Yang and Smith 2007**). Vzhledem k tomu, že jaterní glykogenolýza představuje většinový zdroj glukozu v séru v době lačnění a hyperglykemie nalačno je kromě obezity, dyslipidemie, hypertenze hlavním kritériem pro diagnózu metabolického syndromu, souvisí oba tyto děje s výše uvedenými zdravotními problémy. U obou orgánů současně spolu s dalšími orgánovými soustavami hraje významnou roli jako signální molekula oxid dusnatý - NO a to i jako marker oxidačně redukčních dějů v mitochondrii.

V naší práci jsme se zaměřili jak na ovlivnění primárně izolovaných epididymálních adipocytů potkana pomocí PPAR γ agonistů i antagonistů, tak na vzájemné ovlivnění těchto látek v β_3 adrenergním mechanismu indukované lipolýzy a NO produkce. V části publikované zatím jen v podobě abstraktů jsme zkoumali i vliv výše uvedených látek na sekreci adiponectinu, TNF α a resistinu. V druhé části práce jsme se zaměřili na ovlivnění glykogenolýzy v primárně izolovaných hepatocytech potkana adrenergními agonisty i antagonisty, glukagonem stejně jako NO donory a NOS blokátory.

Hypotézy a cíle práce

Z předchozích prací na našem ústavu jsme věděli, že β_3 adrenergní signalizační dráha ovlivňuje kromě lipolýzy i expresi iNOS. Protože molekula NO je mimo jiné nejsilnějším endogenním vazodilatačním působkem, tedy molekulou ovlivňující i 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.

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?

V druhé části naší práce jsme se zaměřili na glykogenolýzu v jaterních buňkách bohatých na glykogen s cílem ověřit působení adrenergních agonistů na glykogenolýzu ve srovnání s glukagonem jako standardním glykogenolytickým agens. Jako v přechozí 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 potkaních hepatocytech bohatých na glykogen- β_1 nebo α_1 adrenergní agonisté?
2/ Jaký je jejich 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? Byť 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 dostupné literatury vyplývá, že nelze aproximovat vlastnosti jednoho typu buněčných linií na druhý (například účinek adrenergních látek na 3T3-L1 preadipocytech nelze přenést na kulturu primárně izolovaných adipocytů) a tudíž nezbývá, než podobné pokusy provést v různých modelových situacích a tím se přiblížit k patofyziologickým podmínkám lidského organismu při obezitě a metabolickém syndromu.

Materiál a metodika

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

Použité chemikálie coby farmakologicky účinné látky: Adrenalin (Epinefrine), Fenylefrin (Phenylephrine), Prazocin, Propranolol, Forskolin, BRL-37344- selektivní β_3 – adrenergní agonista, Db-cAMP (dibutyryl cAMP sodná sůl),

L-NAME- neselektivní NOS inhibitor, Aminoguanidin- mírně selektivní NOS inhibitor,

SNAP- donor NO (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine), Troglitazon – selektivní PPAR γ agonista, SR-202- selektivní blokátor PPAR γ , Glukagon.

Použitá laboratorní zvířata

V pokusech byli použiti samci laboratorního potkana kmene Wistar od dodavatele Velaz s.r.o., Únětice. Byli zakoupení 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 zvěřinci Farmakologického ústavu I.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 ke 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 ČR 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 I.LF UK podle zákona ČNR č. 246/1992, na ochranu zvířat proti týrání, v platném znění.

Metodika izolace a kultivace adipocytů

Po usmrcení zvířat dislokací krční míchy za CO_2 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 $500\ \mu\text{m}$ velkými póry a 3x propláchnuty roztokem pufru KRP (136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM MgSO_4 , 1.25 mM CaCl_2 , 5 mM Na_3PO_4 , 2 mM NaHCO_3 , 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% CO_2 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.

Metodika izolace a kultivace hepatocytů

Hepatocyty byly izolovány z potkaních jater standardní dvoufázovou metodou kolagenázové perfúze, kdy kolegenázy 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 1.5×10^6 umístěny na 35-mm Petriho misku potaženou kolagenem a udržovány při teplotě 37°C , ve směsi 95% vzduchu a 5% CO_2 ve Williamsově mediu E s přidáním gentamicinu, L-glutamin 10 mM HEPES, 6% fetalního bovinního séra, 10^{-7}M insulinu a 20 mM glukózy. Vysoký obsah glykogenu byl potvrzen jak biochemicky, tak histochemicky (Shiroyama et al. 1998).

Metodiky detekce

Expresse iNOS v kulturách adipocytů pomocí kvantitativní RT-PCR

qRT-PCR (provedla RNDr. Václavíková Radka, PhD –SZÚ) Quantitative real-time polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena pomocí TaqMan Universal PCR Master mix a TaqMan Gene Expression Assays zakoupených od Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Relativní kvantifikace genové

exprese po RT-PCR byla zhodnocena pomocí gelové elektroforézy 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 podle návodu výrobce. cDNA byla syntetizována za použití pomocí RevertAidTM First Strand cDNA syntézy s náhodnými hexamer primery podle návodu výrobce. Expres *NOS2* a *B2m* genů jsme vypočítali za pomoci přístroje RotorGene 6000. 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 fluorescenci 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 Neishe publikovaná v roce 1950.

Produkce NO byla měřena přes jejich oxidační produkty NO_2^- a NO_3^- v mediu buněčných kultur kolorimetricky při 540 nm a pomocí Griessého reagentu. Hladina NO byla pak extrapolována podle NaNO_2 kalibrační křivky. K testování byl použit kit pro stanovení $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ produktů firmy Roche.

Expres 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**). Relativní množství iNOS mRNA bylo určeno srovnáním se signálem standardizovaného množství β -actinu a přepočítáno na celkové množství RNA extrahované z buněk.

Statistické metody

K zhodnocení statistické významnosti byly použity - Studentův párový test - k posouzení významnosti rozdílů dvou průměrů a rozdílů kontrolního a experimentálního měření na stejném vzorku. K analýze rozptylu byla použita metoda ANOVA s Bonferoniho párovým testem s pomocí statistického programu

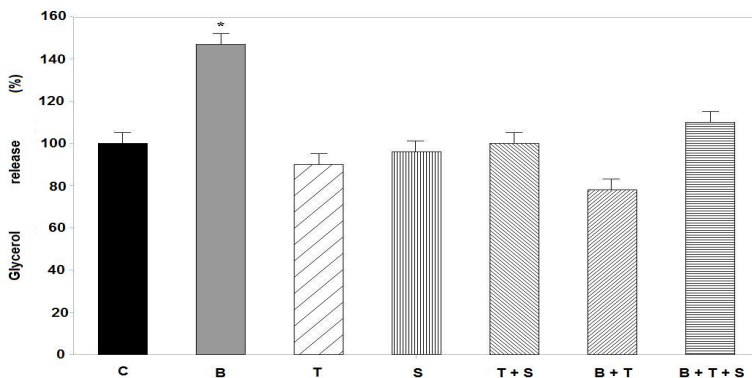
GraphPad in Stat 3.06. K stanovení míry těsnosti a statistické závislosti byla použita analýza lineární regrese s testem významnosti koeficientu korelace.

Výsledky

Na kulturách primárně izolovaných potkaních epididymálních adipocytů.

V prvních 24 hodinách kultivace výsledky ukazují na adrenergní regulaci lipolýzy, kdy β_3 agonista BRL-37344 významně zvyšoval lipolýzu, zatímco efekt na lipolýzu u PPAR γ agonisty- troglitazonu ani u PPAR γ antagonisty SR-202 samotných nebyl výrazný. Pokud však působily obě látky na BRL-37344 vyvolanou lipolýzu, došlo k výraznému poklesu lipolýzy vlivem jak troglitazonu, tak SR-202. Pokud byly všechny 3 látky podány současně, pak SR-202 teoreticky měl vyvolat blokádu účinku troglitazonu, tak tento efekt nebyl zaznamenán (Obr.1- C-kontrola, B- β_3 agonista BRL-37344, T-PPAR γ agonista troglitazon, S-PPAR γ antagonist SR-202, T+S, B+T, B+T+S- kombinace)

Obr 1: Závislost lipolýzy (uvolnění glycerolu) na působení různých látek

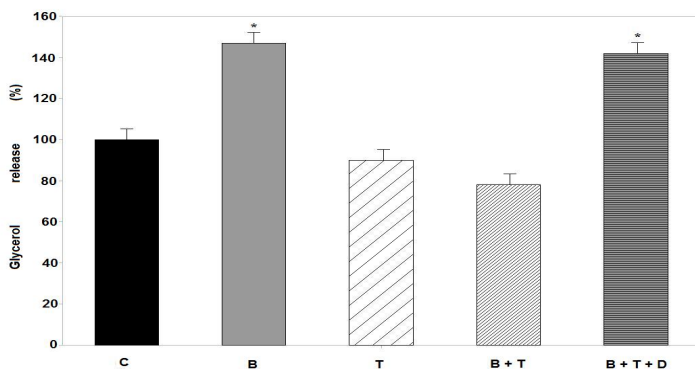


(* $p < 0.05$ vůči kontrole)

Výsledek 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).

Proto jsme v pokusu použili AMPK blokátor Compound C, který byl schopen zablokovat efekt troglitazonu na lipolýzu vyvolanou BRL-37344 (Označení viz výše D-AMPK blokátor Compound C)

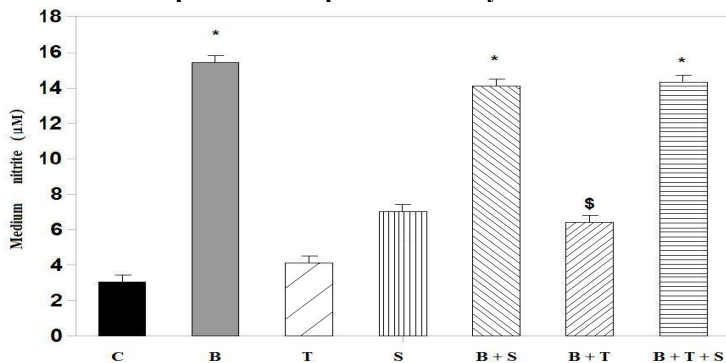
Obr. 2. Závislost lipolýzy na různých látkách s přidáním Compound C



(* $p < 0.05$ vůči kontrole)

Při podobném uspořádání pokusu s měřením NO v kultivačním mediu (Obr. 3), se ukázal stejný trend jako u lipolýzy. Pouze SR-202 sám vedl k vzestupu NO produkce. Ani zde se však 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 troglitazonu a SR-202 i bez BRL-37344, což se neprokázalo (data nejsou uvedena). 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 obdobnému závěru jsme došli i při kratším 30 minutovém působení obou látek -data nejsou uvedena).

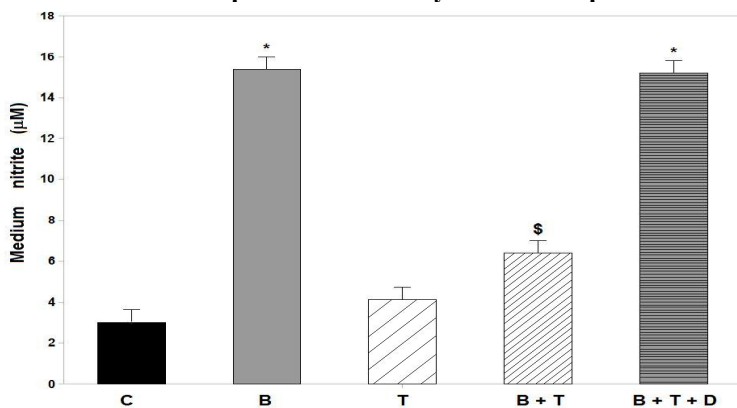
Obr. 3: Závislost NO produkce na působení různých látek



(* $p < 0.05$ vůči kontrole \$ $p < 0.05$ vůči B samotnému)

Tyto závěry nás vedly k myšlence vyzkoušet možnost AMPK signalizační dráhy i na NO produkci. Jak ukazuje AMPK blokátor opravdu vedl k blokadě efektu troglitazonu na BRL-37344 indukovanou lipolýzu.

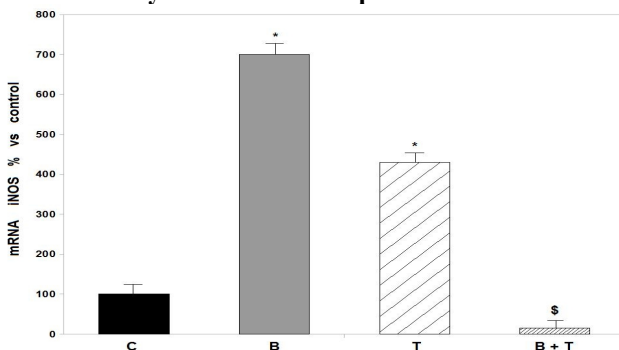
Obr. 4: Závislost NO produkce na různých látkách s přidáním Compound C



(* $p < 0.05$ ku kontrole \$ $p < 0.05$ ku B)

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-RTPCR. Výsledky jasně ukázaly, že zatímco po BRL-37344 došlo až ke 400% nárůstu mRNA iNOS, přidáním troglitazonu došlo k výraznému poklesu mRNA iNOS transkripce.

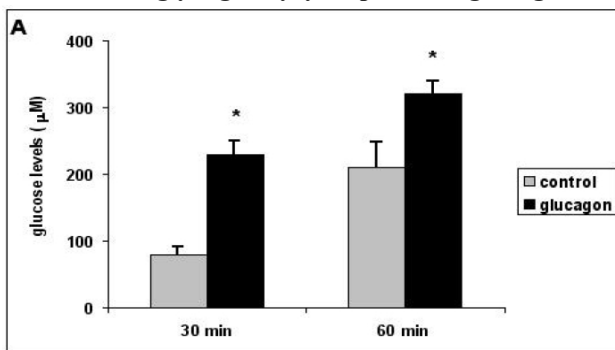
Obr. 5: Závislost hladiny mRNA iNOS na působení různ. látek



(* $p < 0.05$ vůči kontrole § $p < 0.05$ vůči B samotnému, označení látek viz výše)

Na kulturách primárně izolovaných potkaních hepatocytů s vysokým obsahem glykogenu: V druhé části práce jsme se zaměřily na glykogenolýzu vyvolanou adrenergními agonisty a glukagonem.

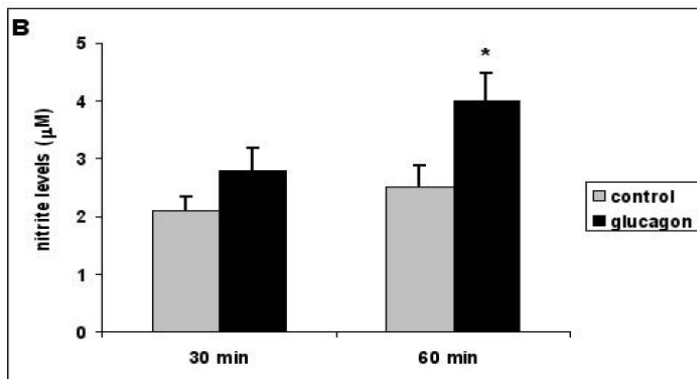
Obr. 6A: Závislost glykogenolýzy na působení glukagonu



(* $p < 0.05$ vůči kontrole)

Ve 30 a 60 minutách po působení glukagonu docházelo v v primární kultuře potkannch hepatocytů bohatých na glykogen jak ke zvýšení glykogenolyzy (**Obr. 6 A**), tak k vzestupu oxidu dusnatého (**Obr. 6B**):

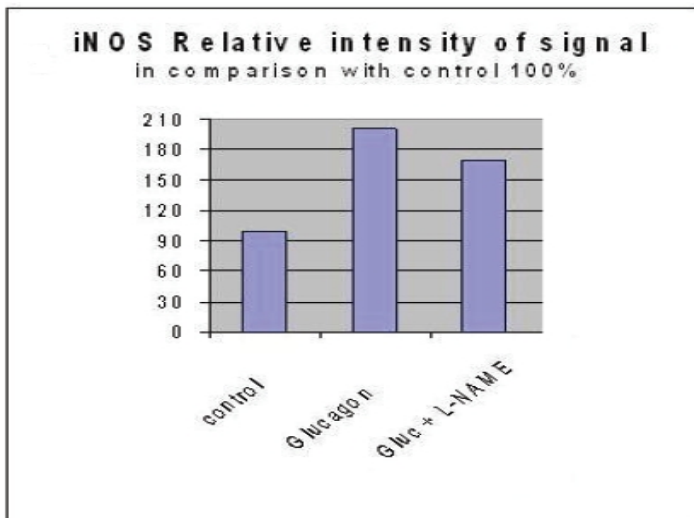
Obr. 6B: Závislost produkce NO na působení glukagonu



(* $p < 0.05$ vůči kontrole)

a zároveň byl zaznamenán pomocí komparativní RT-PCR dvojnásobný vzestup iNOS genové exprese:

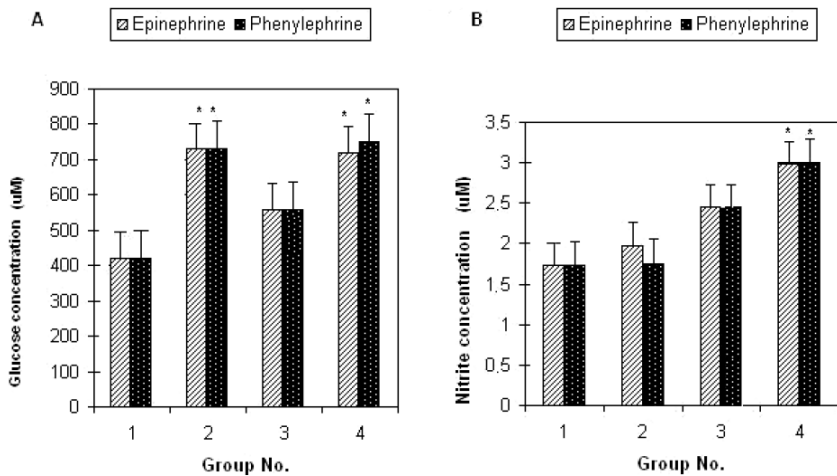
Obr. 7: Závislost hladiny mRNA iNOS na působení glukagonu a L-NAME



Expresce 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 (výsledky zde nejsou demonstrovány).

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.

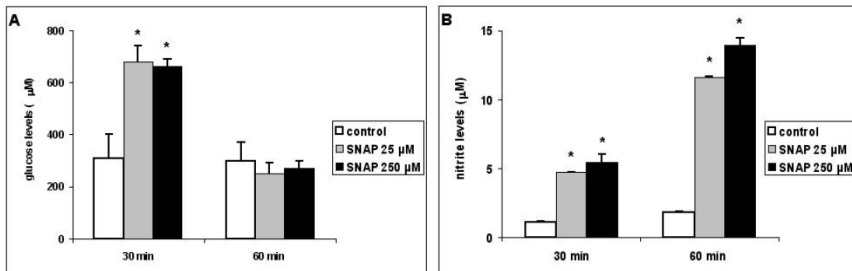
Obr. 8A a 8B ukazuje vliv fenylefrinu a epinefrinu na glykogenolýzu a produkci NO (označení dle publikace)



Hladina glukózy (A) a NO (B) při působení adrenalinu (epinephrine) a fenylefrinu (phenylephrine) podle skupin (Group No.) - 1)30 min inkubace-kontrola, 2) 30 min inkubace při působení adrenalinu a fenylefrinu, 3) 60 min inkubace- kontrola, 4) 60 min inkubace při působení adrenalinu a fenylefrinu(* $p < 0.05$ vůči kontrole)

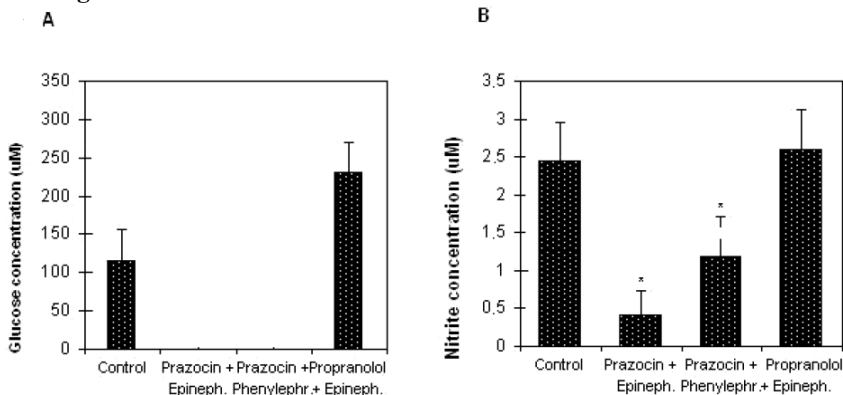
Podobný výsledek byl zaznamenán se SNAP(S-nitroso-N-acetyl penicillaminem), jako exogenním donorem NO, při jehož působení opět stoupl stupeň glykogenolýzy (po 30 min - **Obr.9A**) i NO produkce (jak po 30 tak 60 min- **Obr. 9B**).

Obr. 9: Závislost glykogenolýzy (A), NO produkce (B) na působení SNAP



Efekt působení S-nitroso-N-acetyl penicillaminu (SNAP- 25 a 250 µM) na uvolnění glukózy (A) and NO (B) z kultury potkaních hepatocytů bohatých na glykogen po 30 a 60 minutách. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka (*p<0.05 vůči kontrole). I u pokusů s adrenergními agonisty byly zkoušeny blokátory jak adrenergních receptorů, tak blokátory NO syntházy. U blokátorů adrenergních receptorů došlo k blokádě efektu na glykogenolýzu (**Obr. 10A**) a NO (**Obr. 10B**) vyvolaného epinefrinem a phynelyphrinem jen při podání prazocinu (α - blokátoru) a nikoliv při podání propranololu (β - blokátoru).

Obr. 10: Závislost glykogenolýzy (A) a NO produkce (B) na působení adrenergních látek



(*p<0.05 vůči kontrole)

Z výsledků 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 zablokovat vliv adrenalinu (epinefrinu) na glykogenolýzu i NO produkci (**Tabulka č 2**), neovlivnily však významně iNOS transkripce (data nejsou demonstrována).

Tabulka č 2.

Použité látky	Procenta vůči kontrole			
	NO po		Glukóza po	
	30 minutách	60 minutách	30 minutách	60 minutách
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 – aminoguanidin, **Epi** – adrenalin (epinephrine), **NAME** – N ω -nitro-L-arginin methyl ester, **db-cAMP** – dibutyryl cyklickyAMP.

(* statistická významnost na hladině $p < 0.05$).

(množství uvolněného NO a glukózy je v pokusné kultuře vyjádřeno v procentech vůči kontrolní skupině buněk – procenta vyjadřují průměr z 20-24 pokusných kultur \pm směrodatná odchylka)

Diskuse

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 jedněch 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 transkripce, 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 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 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 lipolýzu a NO produkci 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 M et al. 2002**), lidských monocytech (**Naitoh T et al. 2000**) a PPAR γ knock-out buňkách (**Chawla A et al. 2001**, **Tsukamoto H et al. 2004**) dokázaly obdobný nonPPAR γ efekt glitazonů. Tím se postupně překonává zažitá představa o úplné receptorové selektivitě PPAR γ agonistů typu troglitazonu nebo ciglitazonu, lze však předpokládat, že toto se nemusí týkat selektivnějších PPAR γ agonistů typu pioglitazonu nebo rosiglitazonu.

Náš výsledek může mít význam nejen teoretický ale i praktický, protože pokud naše výsledky prokazují, že AMPK složka účinku glitazonů blokuje adrenergně vyvolanou lipolýzu, pak se otevírá možnost vyšší selektivitou dalších látek odstranit AMPK dependentní prolipogenní efekt glitazonů a odstranit tak jejich významný nežádoucí účinek- zveskupování 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 naše 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 inhibitorem.

I když adrenergní mechanismus vyvolání glykogenolýzy je všeobecně znám, dosud panují neshody na typu receptoru, přes který katecholaminy glykogenolýzu vyvolávají (β_2 dependetní glykogenolýzu například popisuje práce **Erraji-Benchekroun et al. 2005**). Naše výsledky podporují předpokládaný α - adrenergní mechanismus katecholaminy vyvolávané glykogenolýzy. To dokazuje fakt, že prazosin jako α blokátor a nikoliv propranolol jako byl schopen blokovat katecholaminy vyvolanou glykogenolýzu v našich pokusech. Praktický význam tohoto poznání vidíme například v tom, že současné blokátory receptoru pro glukagon indol-2-karboxamidy, které jsou 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.

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 inhibiční 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 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 a dalších 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 nití pro prezentované výsledky AMPK , která je taktéž schopna ovlivnit jak glykogenolýzu, tak lipolýzu a NO produkci a mohla by být eventuelně do budoucna východiskem pro další práci našeho výzkumného týmu.

Závěry:

Efekt troglitazonu na lipolýzu viscerálních adipocytů a pravděpodobně i produkci NO se dle naší práce zdá být nonPPAR γ dependetní- zato AMPK dependentní. Je blokáván AMPK blokátorem a neovlivněn PPAR γ selektivním blokátorem. Mechanismus adrenergně navozené glykogenolýzy a NO produkce u potkaních adipocytů je dle výsledků 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 potkaních hepatocytů bohatých na glykogen. Efekt glukagonu na potkaní hepatocyty (ve smyslu sledované glykogenolýzy a produkce NO) je obdobný jako u adrenergních agonistů. Další

Výsledky práce byly odpublikovány v impaktovaných časopisech, prezentovány v posterové sekci na kongresech nebo prezentovány jako ústní sdělení.

Použitá literatura

Pozn: ve vlastní disertační práci bylo použito 337 citovaných prací, proto na tomto místě jsou uvedeny jen v autoreferátu použité citace, aby byl dodržen obvyklý rozsah stran autoreferátu.

1. **Agius L:** New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism 21(4): 587–605, 2007
2. **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.
3. **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.
4. **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.

5. **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
6. **Hainer V:** *Základy klinické obezitologie.* Grada Publishing a.s. 2004.
7. **Lambert M and Neish AC:** Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. *Can J Res* 28:83-89, 1950.
8. **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.
9. **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.
10. **Naitoh T, Kitahara M and Tsuruzoe N:** The effect of activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) on human monocyte function: PPARgamma ligands do not inhibit tumor necrosis factor-alpha release in human monocytic cell line THP-1. *Cell Biol Toxicol* 16:131–135, 2000.
11. **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.
12. **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.

13. **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.
14. **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.

**Seznam publikací *in extenso*, které jsou podkladem disertace
(v retrospektivním pořadí s uvedením IF)**

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, 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, **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**

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 PPAR γ mediated. Obesity Facts 2(suppl 2):197, 2009 ISBN 978-3-8055-9196-6
(2009 ECO 2009- Amsterdam- poster presentation)
4. Hodis J and 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 and 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- α and lipolysis in rat adipocytes. International Journal of Obesity 2008, 32(S1): S63 (2008 ECO 2008- Geneve- poster presentation)
8. Hodis J and 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 and 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 70 (2006 ESCI Annual Scientific Meeting Prague- oral presentation)