

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Nové metabolické regulátory a prozánětlivé faktory
v etiopatogeneze diabetes mellitus 2. typu a obezity:
vliv farmakologických a dietních intervencí**

MUDr. Miloš Mráz

2011

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: 3. interní klinika 1. LF UK a VFN

Školitel: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

OBSAH

ABSTRAKT (CZ).....	4
ABSTRACT (EN).....	5
1. ÚVOD	6
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	7
3. MATERIÁL A METODIKA	9
4. VÝSLEDKY	11
5. DISKUSE	13
6. ZÁVĚRY.....	19
7. LITERATURA	22
8. TABULKY A GRAFY.....	25
9. SEZNAM PUBLIKACÍ	32

ABSTRAKT (CZ)

Výzkum na poli obezity, diabetes mellitus a jejich komplikací se v posledních letech stále více orientuje na identifikaci nových netradičních faktorů uplatňujících se při jejich vzniku. Cílem předkládané práce proto bylo prozkoumat úlohu nedávno objevených regulátorů metabolických a zánětlivých reakcí zahrnujících fibroblastové růstové faktory 19 a 21 a chemotaktické cytokiny a jejich receptory v patogeneze obezity a diabetes mellitus 2. typu.

Do studie bylo zařazeno celkem 182 subjektů rozdělených do 3 kategorií – pacienti s obezitou bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu (OB), skupina obézních diabetiků 2. typu (DM2) a zdravých kontrolních jedinců s normální hmotností (C). Zvolené intervence zahrnovaly 2 až 3 týdny nízkokalorické diety (VLCD – energetický obsah 2500 kJ/den), tříměsíční podávání agonisty receptorů PPAR α fenofibrátu a akutní hyperinzulinémii v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu.

Získané výsledky naznačují, že zvýšení hladin FGF-21 po VLCD a léčbě fenofibrátem může přispívat k pozitivním efektům těchto intervencí. Koncentrace FGF-19 jsou také částečně závislé na nutričním stavu organismu, nejsou však přímo spojeny s parametry glukózového metabolismu nebo inzulínové senzitivity. Obézní pacienti s i bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu se vyznačují zvýšeným expresním profilem chemotaktických a prozánětlivých cytokinů v podkožní tukové tkáni a korespondujících receptorů na periferních monocytech (PM), přičemž krátkodobá kalorická restrikce vede k úpravě tohoto profilu obzvláště na PM.

ABSTRACT (EN)

Identifying novel factors involved in the etiopathogenesis of obesity, diabetes mellitus and their complications has become one of the primary scopes of metabolic research in the last years. The aim of the present study was to evaluate the role of recently discovered metabolic and inflammatory regulators including fibroblast growth factors 19 and 21 and chemotactic cytokines in the development of obesity and type 2 diabetes mellitus (DM2).

A total number of 182 patients were included into the study. They were divided into 3 groups – patients with obesity but without type 2 diabetes mellitus, individuals with obesity and type 2 diabetes mellitus and healthy control normal-weight subjects. Selected interventions included 2 to 3 weeks of very-low-calorie diet (VLCD – energy content 2500 kJ/day), 3 months of administration of PPAR α receptor agonist fenofibrate and acute hyperinsulinemia during hyperinsulinemic isoglycemic clamp.

Our results indicate that the increase of circulating FGF-21 levels after VLCD and fenofibrate treatment could contribute to positive metabolic effects of these interventions. Serum FGF-19 concentrations also partially depend upon the nutritional status of the organism, although they are not directly influenced by parameters of glucose metabolism. Obesity regardless of DM2 is associated with increased expression of chemotactic and proinflammatory cytokines in subcutaneous adipose tissue and corresponding receptors on peripheral monocytes (PM). Short-term caloric restriction significantly improves this profile, especially on PM.

1. ÚVOD

Obezita, diabetes mellitus 2. typu a jejich komplikace představují jeden z nejpálčivějších medicínských problémů současnosti. Dle údajů WHO trpí celosvětově obezitou 500 milionů a diabetes mellitus 220 milionů lidí a předpokládá se, že tato čísla se do roku 2030 minimálně zdvojnásobí [1, 2]. V České Republice dosahuje aktuální prevalence obezity 23% a nadváhy 34% z celkového počtu obyvatel, přičemž výskyt diabetes mellitus 2. typu je ve skupině obézních až třikrát vyšší než u lidí s normální hmotností [3]. Ve snaze o lepší pochopení etiopatogenezy těchto onemocnění a navržení účinnějších možností jejich prevence a léčby se pozornost výzkumníků v poslední době začala zaměřovat na nové netradiční faktory podílející se na regulaci metabolických procesů a energetické homeostázy pocházejících kromě tukové tkáně i z jiných zdrojů, jako jsou např. imunokompetentní buňky (cytokiny, chemokiny), kosterní svaly (myokiny), játra (hepatokiny) nebo další orgány trávicího traktu (inkretiny...). Do této kategorie patří i někteří recentně objevení zástupci skupiny fibroblastových růstových faktorů, látek hrajících klíčovou roli při řízení různých biologických pochodů u lidí a vyšších živočichů všeobecně [4-6]. Dva ze tří endokrinně aktivních fibroblastových růstových faktorů (FGFs), FGF-21 a FGF-19, se podílejí na ovlivnění metabolismu sacharidů, lipidů a dalších látek a v experimentálních studiích vykazují příznivé efekty na celkovou metabolickou kompenzaci v podmínkách porušené glukózové homeostázy, což z nich tvoří potenciálně zajímavý cíl nově vyvíjených terapeutických intervencí.

Dalším procesem pojícím obezitu s diabetes mellitus 2. typu a jeho komplikacemi je subklinický zánět, charakterizovaný zvýšenou produkcí prozánětlivých faktorů, avšak bez přítomnosti klinických příznaků zánětu. Za základní příčinu vzniku lokální zánětlivé reakce v tukové tkáni je považována její infiltrace imunokompetentními buňkami, zejména makrofágy [7, 8]. Přesné mechanismy odpovědné za iniciaci a následný proces vstupu cirkulujících mononukleárních buněk do tukové tkáně obézních jedinců zatím nejsou jednoznačně definovány. Stěžejní roli při vzájemné interakci a komunikaci mezi periferními krevními elementy a buňkami tukové tkáně však pravděpodobně hrají cytokiny s chemotaktickými vlastnostmi, označované jako chemokiny, a jejich příslušné receptory, které standardně slouží ke stimulaci vstupu imunokompetentních buněk do míst zánětu a tkáňového poškození. Modulace chemotaktických signálů vycházejících z tukové tkáně může proto představovat cestu k ovlivnění nepříznivých reakcí odpovědných za rozvoj metabolických komplikací již v jejich zárodku, což by mělo zásadní význam pro zvýšení účinnosti stávajících léčebných strategií, snížení komplikací a zlepšení celkové prognózy pacientů trpících diabetes mellitus 2. typu a s ním asociovanými onemocněními.

2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Při koncipování naší práce jsme vycházeli z předpokladu, že hladiny fibroblastových růstových faktorů 19 a 21 jsou ovlivněné přítomností obezity a diabetes mellitus 2. typu. Dále jsme předpokládali, že

aktivace receptorů PPAR- α pomocí jejich agonisty fenofibrátu stejně jako akutní hyperinzulinemie v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu budou mít za následek další změny hladin FGF-19 a FGF-21. Taktéž jsme předpokládali, že mezi podkožní tukovou tkání a periferními monocyty u obézních pacientů s diabetes mellitus 2. typu bude existovat jistá forma interakce zprostředkována chemotaktickými a dalšími prozánětlivými faktory, která bude přispívat k lokální i systémové zánětlivé reakci. A konečně jsme vycházeli z předpokladu, že za pozitivní metabolické účinky několikátýdenní nízkokalorické diety by mohly být alespoň zčásti odpovědné změny hladin FGF-21 a FGF-19 nebo mRNA exprese chemotaktických faktorů a jejich receptorů v podkožní tukové tkáni a na cirkulujících monocytech.

Specifické cíle naší práce byly následující:

- Zkoumat možnou úlohu fibroblastových růstových faktorů 19 (FGF-19) a 21 (FGF-21) při rozvoji obezity a diabetes mellitus 2. typu
- Pomocí vybraných farmakologických intervencí – akutní hyperinzulinémie a léčby agonistou PPAR- α – blíže popsat mechanismy podílející se na regulaci hladin FGF-19 a FGF-21
- Za pomoci stanovení mRNA exprese prostudovat úlohu chemoatrahujících faktorů a dalších cytokinů a adipokinů a příslušných receptorů produkovaných v podkožní tukové tkáni a v cirkulujících monocytech v procesech subklinického zánětu u diabetes mellitus 2. typu a obezity a zároveň posoudit vzájemný

vztah mezi periferními monocyty a tukovou tkání u těchto onemocnění

- Zhodnotit, zda změny cirkulujících hladin FGF-19 a FGF-21 nebo mRNA exprese vybraných chemokinů a cytokinů v podkožní tukové tkáni a cirkulujících monocyttech mohou vysvětlovat pozitivní vliv krátkodobé nízkokalorické diety na metabolickou kompenzaci u diabetes mellitus 2. typu spojeného s obezitou

3. MATERIÁL A METODIKA

Předkládaná práce je tvořena 3 studiemi zabývajícími se fibroblastovými růstovými faktory 19 a 21 a expresí prozánětlivých cyto- a chemokinů a jejich receptorů. Do první studie zkoumající sérové hladiny a tkáňovou expresi FGF-21 bylo zařazeno 26 obézních pacientů bez DM2, 11 diabetických pacientů s obezitou a 32 zdravých kontrolních subjektů s normální hmotností. Sérové hladiny FGF-21 byly stanoveny pomocí komerčního ELISA kitu a k analýze mRNA exprese FGF-21 v podkožní a viscerální tukové tkáni a ve vzorcích jater byla použita metoda RT PCR. Zvolené intervence zahrnovaly akutní hyperinzulinémii v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu, 3 týdny nízkokalorické diety (VLCD – energetický obsah 2500 kJ/den) a tříměsíční podávání agonisty receptorů PPAR α fenofibrátu.

Sérové koncentrace FGF-19 byly zkoumány u 29 pacientek s obezitou, 19 obézních žen s diabetes mellitus 2. typu a 30 zdravých

štíhlých probandek. Byly zvoleny stejné intervence jako u studie s FGF-21 – hyperinzulinemický izoglykemický clamp, nízkokalorická dieta a léčba fenofibrátem.

Studium mRNA exprese prozánětlivých cytokinů a příslušných receptorů v podkožní tukové tkáni a na periferních monocytech probíhalo ve skupině 12 obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu (T2DM), 8 obézních žen bez přítomnosti diabetes mellitus (OB) a 15 štíhlých zdravých žen (C). K analýze byl zvolen panel 39 genů pro faktory účastnící se zánětlivých reakcí s důrazem na chemotaktické působky podílející se na regulaci vstupu imunokompetentních buněk do tukové tkáně. mRNA exprese vybraných genů byla stanovena pomocí RT PCR ve vzorcích podkožní tukové tkáně a izolovaných periferních monocytech za bazálních podmínek a po 2 týdnech nízkokalorické diety.

U všech vyšetřovaných subjektů byla změřena tělesná výška a hmotnost a vypočítán body mass index (BMI – hmotnost v kg/výška v m²). Základní biochemické parametry byly stanoveny standardními laboratorními metodami. Sérové hladiny inzulínu a adiponektinu byly měřeny komerčními RIA kity. Sérové koncentrace leptinu, FGF-19 a FGF-21 byly měřeny komerčními ELISA kity a sérové hladiny IL-6, IL-8, CCL-2 a TNF- α byly stanovovány pomocí kitů LINCOplex na přístroji Luminex 2000.

Biopsie podkožní tukové tkáně byla u pacientů prováděna z abdominální oblasti pomocí aspirační jehlové biopsie, přičemž bylo odebráno přibližně 200-1000 mg tukové tkáně. Ke studiu exprese FGF-21 byly vzorky jaterní, podkožní a viscerální tukové

tkáně odebírány chirurgicky v průběhu operace od obézních pacientek podstupujících založení gastrického by-passu nebo sleeve gastrektomie a od kontrolní skupiny žen při elektivní cholecystektomii.

Monocyty byly z periferní krvi izolovány magnetickou izolační metodou za použití magnetických mikrokuliček značených monocytoým antigenem CD14 (metoda MiniMacs). Stanovení mRNA exprese bylo provedeno pomocí real-time PCR za využití panelu TaqMan® Custom Array.

Všechna klinická a laboratorní vyšetření byla prováděna na III. interní klinice VFN ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN. Perioperační bioptické vzorky tukové a jaterní tkáně byly získávány v součinnosti s 1. chirurgickou klinikou VFN.

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (SPSS Inc.,USA). Jednotlivé parametry byly vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standard error of the mean – střední chyba průměru). Za statisticky významné byly považovány rozdíly a korelace, kde hladina významnosti (p) bylo menší než 0,05.

4. VÝSLEDKY

Ve studii s FGF-21 byly za bazálních podmínek sérové hladiny FGF-21 signifikantně vyšší u obézních pacientek i žen s DM2 v porovnání s kontrolní skupinou (323 ± 35 a 395 ± 56 vs. 213 ± 23 pg/ml, $p < 0.05$), přičemž mezi OB a T2DM skupinou se jeho koncentrace

vzájemně nelišily (*Tabulka 1*). Tři týdny nízkokalorické diety stejně jako tři měsíce léčby fenofibrátem vedly k významnému zvýšení sérových hodnot FGF-21 (339 ± 60 vs. 587 ± 124 pg/ml, $p < 0,05$ pro VLCD a 364 ± 68 vs. 593 ± 54 pg/ml, $p < 0,05$ pro fenofibrát). Hyperinzulinémie v průběhu clampu měla u T2DM pacientek na rozdíl od kontrolní skupiny za následek signifikantní nárůst koncentrací FGF-21, který se ještě zvýraznil po léčbě fenofibrátem. U obézních žen byla mRNA exprese FGF-21 ve viscerálním tuku zvýšená dvounásobně oproti kontrolní skupině, zatímco v podkožní tukové tkáni nebyl mezi oběma skupinami zaznamenán signifikantní rozdíl. Po 3 týdnech nízkokalorické diety došlo u obézních pacientek k signifikantnímu vzestupu mRNA exprese FGF-21 v podkožním tuku.

Bazální sérové koncentrace FGF-19 byly v druhé podstudii signifikantně nižší u obézních jedinců než v kontrolní skupině ($132,1 \pm 12,7$ vs. $202,2 \pm 16,7$ pg/ml, $p < 0,05$ – *Tabulka 2*), zatímco mezi diabetickými pacientkami a dalšími dvěma skupinami nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl ($189,2 \pm 30,9$ vs. $132,1 \pm 12,7$ pg/ml, n.s. a $189,2 \pm 30,9$ vs. $202,2 \pm 16,7$ pg/ml, n.s. – *Tabulka 2*). Akutní hyperinzulinémie měla tendenci snižovat hladiny FGF-19 u T2DM i kontrolní skupiny. Tři týdny nízkokalorické diety neměly u obézních subjektů vliv na koncentrace FGF-19 ($140,3 \pm 19,7$ vs. $176,1 \pm 27,1$ pg/ml, n.s.). Tříměsíční léčba fenofibrátem vedla u diabetických pacientek k významnému snížení sérového FGF-19 ($194,6 \pm 26,2$ vs. $107,5 \pm 25,0$ pg/ml, $p < 0,05$).

Ve třetí části práce zabývající se expresemi prozánětlivých chemokinů a cytokinů v podkožním tuku a cirkulujících monocytech vykazovaly v porovnání s kontrolní skupinou diabetické pacientky i obézní ženy bez diabetu signifikantně vyšší sérové hladiny prozánětlivých faktorů (CRP, TNF- α , IL-6, IL-8). V podkožní tukové tkáni měly tyto 2 skupiny zvýšenou mRNA expresi makrofágového antigenu CD68 a prozánětlivých chemokinů (CCL-2, -3, -7, -8, -17, -22 – *Tabulka 3*), která byla doprovázená vyšší expresí komplementárních chemokinových receptorů (CCR-1, -2, -3, -5 – *Tabulka 3*) a dalších prozánětlivých receptorů (TLR-2, -4, receptory pro TNF α a IL-6) na cirkulujících monocytech, přičemž tento profil byl více vyjádřený u T2DM skupiny. Dva týdny nízkokalorické diety vedly u obézních diabetiček ke snížení tělesné hmotnosti spojené se zlepšením metabolického profilu. V periferních monocytech došlo po dietě k signifikantnímu snížení exprese chemokinových receptorů (*Graf 1*), zatímco v podkožním tuku klesla exprese chemokinů CCL-8 a CXCL-10 a výrazně vzrostla exprese chemokinu CCL-17 (*Graf 2*).

5. DISKUSE

Skupina fibroblastových růstových faktorů s endokrinní aktivitou, zahrnující i FGF-19 a FGF-21, představuje nedávno identifikovanou rodinu působků podílejících se na regulaci celé řady biologických procesů včetně metabolické a hormonální homeostázy. Výsledky experimentálních studií na zvířecích modelech prokázaly, že FGF-21

představuje důležitý metabolický regulátor nutný pro aktivaci jaterní oxidace lipidů, metabolismus triglyceridů a tvorbu ketolátek při ketogenní dietě. U myši je FGF-21 klíčovým mediátorem pleiotropních účinků receptorů PPAR α [9-12]. Jeho exogenní přívod vede k významnému snížení glykémie u diabetických hlodavců i primátů [13, 14], což naznačuje potenciál FGF-21 při léčbě diabetes mellitus 2. typu a dalších složek metabolického syndromu [10].

Na rozdíl od značného množství dat z experimentálních studií, jsou účinky a regulace FGF-21 u lidí zatím prozkoumány jen málo [15, 16]. V naší práci jsme potvrdili, že vyšší sérové koncentrace FGF-21 jsou asociovány s obezitou a diabetes mellitus 2. typu a že jsou dále zvyšovány podáváním agonisty PPAR α a kalorickou restrikcí. Tři týdny nízkokalorické diety vedly kromě poklesu hmotnosti i ke zlepšení inzulínové senzitivity (stanovené pomocí HOMA indexu), což naznačuje, že některé pozitivní účinky redukční diety mohou být důsledkem zvýšení sérových koncentrací FGF-21. I přes to, že podávání agonisty PPAR α fenofibrátu zvýšilo diabetickým pacientům hladiny FGF-21 v podobném rozsahu jako tomu bylo u restrikce příjmu potravy, v parametrech inzulínové senzitivity měřených izoglykemickým hyperinzulinemickým clampem nebyla zaznamenána žádná změna. Uvedené výsledky proto nepodporují hypotézu, že by endogenní zvýšení FGF-21 mělo být primárně odpovědné za zlepšení inzulínové senzitivity u této skupiny pacientů. Mezi další důležité poznatky vyplývající z naší práce, patří fakt, že krátkodobá hyperinzulinémie v průběhu clampu ovlivňuje sérové hladiny FGF-21 jinak u obézních diabetiků a jinak u zdravých

štíhlých osob. U pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu došlo v průběhu tříhodinového izoglykemického hyperinzulinemického clampu k signifikantnímu vzestupu koncentraci FGF-21, zatímco v kontrolní skupině naopak hodnoty FGF-21 v polovině clampu přechodně poklesly. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu je hypotéza, že zvýšení hladin FGF-21 představuje u inzulinrezistentních diabetiků 2. typu kompenzační mechanismus sloužící ke zvýšení vychytávání glukózy alterovaném inzulinovou rezistencí. Celkově však získané výsledky svědčí pro to, že i u lidí (podobně jako u experimentálních zvířecích modelů) jsou sérové hladiny FGF-21 regulovány v závislosti na nutričním stavu organismu.

I když u myši byla jako hlavní zdroj FGF-21 identifikována játra [9, 17, 18], u lidí byla mRNA exprese FGF-21 detekována i v podkožní tukové tkáni, kde zároveň pozitivně korelovala se sérovým FGF-21 [15]. V naší práci jsme stanovovali mRNA expresi FGF-21 v podkožní a viscerální tukové tkáni a ve vzorcích z jaterního parenchymu. Na rozdíl od Zhanga a kol [15] jsme nenašli signifikantní rozdíl v expresi FGF-21 v podkožním tuku mezi obézními jedinci a kontrolní skupinou. U obézních pacientů jsme však zachytili zvýšenou expresi FGF-21 ve viscerální tukové tkáni v porovnání se štíhlými kontrolními subjekty. Exprese FGF-21 v játrech se ukázala být více než 100-násobně vyšší než v tukové tkáni, což potvrzuje, že i u lidí představují játra nejdůležitější místo tvorby FGF-21.

FGF-19 je další recentně objevený regulační protein, patřící do stejné podskupiny endokrinně aktivních fibroblastových růstových faktorů jako FGF-21. FGF-19 hraje ústřední roli při supresi syntézy a sekrece žlučových kyselin. Jelikož je metabolismus žlučových kyselin úzce spjat s dalšími metabolickými drahami, obzvláště s metabolismem lipidů [19, 20], nabízí se zajímavá hypotéza, že by se FGF-19 mohl podílet i na regulaci metabolismu cholesterolu, triglyceridů, lipoproteinů a glukózy [17, 21]. Hlodavci zvýšeně exprimující FGF-19 se vyznačují nižší tělesnou hmotností a zlepšenou glukózovou tolerancí a inzulinovou senzitivitou ve srovnání s kontrolními zvířaty. Navíc jsou chráněni před vznikem obezity indukované vysokotukovou dietou [17]. U lidí nejsou údaje týkající se vztahu FGF-19 k různým metabolickým parametrům (obzvláště k parametrům metabolismu glukózy) tak jednoznačné. Naše výsledky naznačují, že FGF-19 koreluje negativně s body mass indexem (BMI), přičemž tato korelace je nejvýraznější u osob s nejtěžší obezitou (3. stupeň obezity s BMI > 40 kg/m²), zatímco u diabetických pacientů s průměrným BMI ~ 36 kg/m² jsou hodnoty FGF-19 oproti kontrolní skupině jenom mírně snižené.

Tři týdny nízkokalorické diety vedly u obézních diabetiků 2. typu k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti, snížení glykémie, inzulinémie a HOMA indexu inzulinové rezistence a lehké úpravě lipidového profilu. Hladiny FGF-19 vykazovaly mírnou tendenci k růstu, rozdíl však nedosahoval statistické významnosti. Zda i FGF-19, podobně jako FGF-21, hraje určitou roli při adaptaci na hladovění, zatím ze získaných výsledků není jasné. Je však možné

konstatovat, že sérové hladiny FGF-19 jsou alespoň částečně ovlivněny nutričním stavem a tělesnou hmotností, obzvláště při vyšších stupních obezity. Chybění jednoznačného spojení mezi hladinami FGF-19 a parametry glukózového metabolismu a inzulinové senzitivity je v souladu s výsledky podobných studií u lidí, které zatím neprokázaly existenci kauzálního vztahu mezi FGF-19 a poruchami glukózové homeostázy [22, 23].

Jelikož fibráty jako hypolipidemika s primárním účinkem na triglyceridy působí, podobně jako hlavní aktivátor syntézy FGF-19 Farnesoidní X receptor (FXR), přes receptor PPAR α , v další části naší práce jsme se zaměřili na posouzení vlivu podávání fenofibrátu na hladiny FGF-19 s cílem zjistit, zda pozitivní metabolické efekty léčby fibráty mohou alespoň částečně souviset se změnami koncentrací FGF-19. Tříměsíční léčba fenofibrátem vedla u hypertriglyceridemických pacientů ke snížení sérových hladin triglyceridů bez změny tělesné hmotnosti nebo hodnot celkového a HDL cholesterolu. Hladiny FGF-19 po podávání fenofibrátu výrazně poklesly, což naznačuje, že fibrátem vyvolaná aktivace PPAR α není doprovázená indukcí tvorby FGF-19.

Chronický subklinický zánět představuje jeden z ústředních mechanismů podílejících se na patogenezi obezity a s ní souvisejících metabolických a kardiovaskulárních komplikací [7]. Vzhledem k tomu, že stěžejní úloha při vzniku prozánětlivého stavu je připisována infiltraci makrofágů do tukové tkáně, v poslední části naší práce jsme se zaměřili na zkoumání faktorů podílejících se na vzájemné interakci mezi periferními mononukleárními buňkami a

tukovou tkání s důrazem na vybrané chemotaktické cytokiny a jejich receptory. V naší práci se nám jako prvním podařilo prokázat zvýšenou expresi chemokinů CCL-17 a CCL-22 u obézních pacientů s i bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu, což jsou faktory podílející se především na chemotaxi T_H2 lymfocytů (pomocné T lymfocyty 2. typu) [24]. Celkově vykazovala podkožní tuková tkáň obézních jedinců v porovnání se štíhlými kontrolními subjekty zvýšenou expresi 4 chemokinů (CCL-3, CCL-7, CCL-17 a CCL-22), což svědčí pro fakt, že i samotná obezita významně zvyšuje chemotaktický potenciál tukové tkáně. U diabetiků 2. typu došlo navíc ke zvýšení exprese dvou dalších významných CC chemokinů CCL-2 a CCL-8.

Chemokiny působí na cílové buňky prostřednictvím specifických chemokinových receptorů (pro CC chemokiny jsou to CC receptory - CCR) [24]. V naší studii jsme prokázali významný nárůst exprese 3 ze 4 zkoumaných CC receptorů na periferních monocytech u obézních pacientů s i bez přítomnosti diabetes mellitus (CCR-1, CCR-2 a CCR-5 u T2DM a CCR-1, CCR-2 a CCR-5 u obézní skupiny), který přesně doplňoval nadměrnou expresi CC chemokinů z podkožního tuku. Uvedené nálezy podporují existenci intenzivních cytokinových a hormonálních interakcí mezi tukovou tkání a cirkulujícími monocyty jako jedné ze základních součástí vzniku subklinického zánětu u obezity a asociovaných metabolických onemocnění.

U obézních pacientů s DM2 je i mírná redukce tělesné hmotnosti (~5-10% z výchozí hodnoty) spojena s redukcí inzulinové rezistence

a zlepšením glykemické kompenzace [25]. V naší studii vedly dva týdny kalorické restrikce (energetický příjem 2500 kJ/den) k signifikantnímu poklesu míry systémového subklinického zánětu, doprovázenému významným a konzistentním snížením mRNA exprese téměř všech chemokinových a cytokinových receptorů na periferních monocytech. Na druhou stranu v podkožní tukové tkáni nebylo zaznamenáno téměř žádné snížení mRNA exprese komplementárně zvýšených cytokinů. To naznačuje, že monocyty jsou krátkodobou dietou ovlivněny více než podkožní tuk, což podporuje hypotézu, že právě cirkulující mononukleární buňky jsou jedním z primárních mediátorů účinků VLCD a mohou hrát důležitou, i když zatím nedostatečně poznanou roli v patogeneze diabetes mellitus 2 typu.

6. ZÁVĚRY

Fibroblastový růstový faktor 21 je regulační protein produkovaný především v játrech a podílející se na řízení metabolismu glukózy, lipidů a energetické bilance organismu. U zvířat hraje FGF-21 důležitou roli při adaptaci na hladovění a jeho exogenní přívod vede ke zlepšení metabolických parametrů u laboratorních hlodavců i primátů. V naší studii jsme ukázali, že hladiny FGF-21 jsou signifikantně zvýšené u pacientů s obezitou s i bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu v porovnání se štíhlými subjekty. Dále jsme prokázali, že nízkokalorická dieta stejně jako podávání agonisty PPAR α vedou k dalšímu zvýšení hodnot FGF-21, zatímco inzulinová

senzitivita se zlepšila jenom u subjektů po kalorické restrikci. Způsob ovlivnění koncentrací FGF-21 akutní hyperinzulinémií závisel na přítomnosti poruchy metabolismu glukózy – u pacientů s diabetes mellitus 2. typu došlo v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu ke vzestupu hladin FGF-21, zatímco u zdravých štíhlých jedinců jeho hodnoty přechodně spíše klesaly. Získané výsledky svědčí pro to, že i u lidí (podobně jako u experimentálních zvířecích modelů) jsou sérové hladiny FGF-21 regulovány v závislosti na nutričním stavu organismu. Je možné, že zvýšení koncentrací FGF-21 představuje u inzulin-rezistentních diabetiků 2. typu jistý druh kompenzačního mechanismu sloužícího ke zvýšení vychytávání glukózy alterovaného inzulinovou rezistencí. Fibroblastový růstový faktor 19, produkovaný především v enterocytech, představuje hlavní supresor syntézy žlučových kyselin a zároveň inhibuje i vyprazdňování žlučníku. Zvířecí studie naznačily jeho potenciálně pozitivní vliv na metabolismus lipidů a sacharidů, i když dosavadní výsledky u lidí jsou spíše inkonzistentní. V naší práci se podobně jako v jiných studiích nepodařilo prokázat přímou asociaci mezi hladinami FGF-19 a parametry glukózového metabolismu nebo inzulinové senzitivity. Na druhou stranu sérové koncentrace FGF-19 korelovaly negativně s tělesnou hmotností, přičemž tento vztah byl vyjádřen obzvláště u osob s vysokým stupněm obezity. Nízkokalorická dieta neměla žádný vliv na hodnoty FGF-19, zatímco podávání agonisty PPAR α vedlo k jejich signifikantnímu snížení. Akutní hyperinzulinémie vykazovala tendenci ke snížení sérových hladin FGF-19, což naznačuje existenci

dalších regulačních mechanismů kromě přímého působení žlučových kyselin na střevní buňky.

Subklinický zánět je považován za jeden z hlavních mechanismů integrujících obezitu, diabetes mellitus 2. typu a další komponenty metabolického syndromu. Hlavní úloha při vzniku lokálního zánětu v tukové tkáni je v současnosti připisována infiltraci tukové tkáně imunokompetentními buňkami, obzvláště makrofágy, pocházejícími z periferní cirkulace. Přesné mechanismy interakce tukové tkáně a periferních monocytů (prekurzorů tkáňových makrofágů) však dosud nejsou plně objasněny. Naše výsledky prokázaly, že podkožní tuková tkáň obézních pacientů zvýšeně exprimuje celou paletu chemotaktických cytokinů, působících primárně na mononukleární buňky. Ty se zároveň vyznačují nadměrnou expresí příslušných chemokinových a cytokinových receptorů. Přítomnost diabetes mellitus 2. typu uvedený chemoatrakční a prozánětlivý profil dále potencovala. Zlepšení metabolického a zánětlivého stavu po krátkodobé kalorické restrikci bylo alespoň z části zprostředkováno úpravou expresního profilu chemokinových a cytokinových receptorů na periferních monocytech. Získané poznatky ukazují, že periferní monocyty jsou důležitý a dosud málo zdůrazňovaný faktor účastnící se patogeneze obezity a diabetes mellitus 2. typu, který je možné rychle a pozitivně ovlivnit dietní intervencí.

7. LITERATURA

1. WHO. *Obesity and Overweight Fact Sheet*. 2011 [cited; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>].
2. WHO. *Diabetes Fact Sheet*. 2011 [cited; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>].
3. Matoulek, M., S. Svacina, and J. Lajka, [*The incidence of obesity and its complications in the Czech Republic*]. *Vnitr Lek*. **56**(10): p. 1019-27.
4. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *Fibroblast growth factors*. *Genome Biol*, 2001. **2**(3): p. REVIEWS3005.
5. Itoh, N. and D.M. Ornitz, *Evolution of the Fgf and Fgfr gene families*. *Trends Genet*, 2004. **20**(11): p. 563-9.
6. Popovici, C., et al., *An evolutionary history of the FGF superfamily*. *Bioessays*, 2005. **27**(8): p. 849-57.
7. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
8. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1785-8.
9. Badman, M.K., et al., *Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states*. *Cell Metab*, 2007. **5**(6): p. 426-37.
10. Kharitononkov, A. and A.B. Shanafelt, *Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases*. *BioDrugs*, 2008. **22**(1): p. 37-44.
11. Moyers, J.S., et al., *Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling*. *J Cell Physiol*, 2007. **210**(1): p. 1-6.
12. Lefebvre, P., et al., *Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(3): p. 571-80.
13. Kharitononkov, A., et al., *FGF-21 as a novel metabolic regulator*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(6): p. 1627-35.

14. Kharitononkov, A., et al., *The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21*. *Endocrinology*, 2007. **148**(2): p. 774-81.
15. Zhang, X., et al., *Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans*. *Diabetes*, 2008. **57**(5): p. 1246-1253.
16. Chen, W.W., et al., *Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2008. **116**(1): p. 65-8.
17. Tomlinson, E., et al., *Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity*. *Endocrinology*, 2002. **143**(5): p. 1741-7.
18. Nishimura, T., et al., *Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1492**(1): p. 203-6.
19. Lefebvre, P., et al., *Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(1): p. 147-191.
20. Insull, W., Jr., *Clinical Utility of Bile Acid Sequestrants in the Treatment of Dyslipidemia: A Scientific Review*. *South Med J*, 2006. **99**(3): p. 257-273
10.1097/01.smj.0000208120.73327.db.
21. Fu, L., et al., *Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes*. *Endocrinology*, 2004. **145**(6): p. 2594-603.
22. Brufau, G., et al., *Improved glycemic control with colesevelam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly associated with changes in bile acid metabolism*. *Hepatology*, 2010. **52**(4): p. 1455-64.
23. Schreuder, T.C., et al., *The hepatic response to FGF19 is impaired in patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. **298**(3): p. G440-5.
24. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 610-21.

25. Anderson, J.W., E.C. Konz, and D.J. Jenkins, *Health advantages and disadvantages of weight-reducing diets: a computer analysis and critical review*. J Am Coll Nutr, 2000. **19**(5): p. 578-90.

8. TABULKY A GRAFY

Tabulka 1: FGF-21 – antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní, obézní a DM2 skupiny

Skupina	Kontrolní	Obézní	DM2
Počet subjektů	32	26	11
Věk (roky)	47,7 ± 2,3	41,6 ± 2,3	54,1 ± 2,4 [°]
BMI (kg/m²)	23,9 ± 0,4	45,6 ± 1,7**	36,7 ± 2,9* [°]
Glykémie (mmol/l)	4,30 ± 0,23	5,64 ± 0,38**	8,48 ± 0,68** [°]
Cholesterol (mmol/l)	5,07 ± 0,17	4,65 ± 0,21	5,22 ± 0,32
Triglyceridy (mmol/l)	1,15 ± 0,11	1,57 ± 0,13*	2,96 ± 0,39* [°]
Inzulín (mIU/l)	11,18 ± 2,06	24,81 ± 2,93**	44,2 ± 7,1** [°]
HOMA index	2,08 ± 0,56	5,94 ± 0,80**	16,66 ± 0,21** [°]
Leptin (ng/ml)	12,32 ± 1,64	45,87 ± 2,28**	32,43 ± 3,81** [°]
Adiponektin (µg/ml)	22,41 ± 1,82	13,21 ± 1,09**	17,46 ± 4,04
FGF-21 (pg/ml)	213 ± 23	323 ± 35*	395 ± 56*

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Statistická signifikance je hodnocena pomocí jednocestné analýzy rozptylu (One-way ANOVA). *p<0.05 vs. kontrolní skupina; ** p<0.01 vs. kontrolní skupina; ° p<0.01 DM2 vs. obézní skupina; BMI – body mass index; FGF-21 – fibroblastový růstový faktor 21; HOMA – homeostasis model assessment.

Tabulka 2: FGF-19 – antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní, obézní a DM2 skupiny

Skupina	Kontrolní	Obézní	DM2
Počet subjektů	30	29	19
Věk (roky)	48,4 ± 2,2	45,9 ± 1,4	51,4 ± 1,5
BMI (kg/m²)	23,8 ± 0,3	44,6 ± 1,5*	36,7 ± 1,2*°
Glykémie (mmol/l)	4,30 ± 0,23	5,72 ± 0,33*	10,07 ± 0,84*°
Cholesterol (mmol/l)	5,07 ± 0,17	4,99 ± 0,23	4,38 ± 0,21
Triglyceridy (mmol/l)	1,16 ± 0,11	1,68 ± 0,15*	2,82 ± 0,26*°
Inzulin (mIU/l)	14,72 ± 1,65	24,59 ± 2,34*	46,60 ± 4,02*°
HOMA index	2,50 ± 0,48	6,06 ± 0,66*	18,05 ± 1,46*°
Leptin (ng/ml)	12,57 ± 1,54	47,67 ± 2,19*	28,1 ± 3,30*°
Adiponektin (µg/ml)	22,23 ± 1,88	14,94 ± 1,19*	13,02 ± 2,11*
FGF-19 (pg/ml)	202,2 ± 16,7	132,1 ± 12,7*	189,2 ± 30,9

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Statistická signifikance je hodnocena pomocí jednocestné analýzy rozptylu (One-way ANOVA). *p<0.05 vs. kontrolní skupina; ° p<0.01 DM2 vs. obézní skupina; BMI – body mass index; FGF-19 – fibroblastový růstový faktor 19; HOMA – homeostasis model assessment.

Tabulka 3: Chemokiny a chemokinové receptory – rozdíly v mRNA expresi na periferních monocytech a v podkožní tukové tkáni u pacientů s obezitou a obezitou a DM2 v porovnání s kontrolní skupinou.

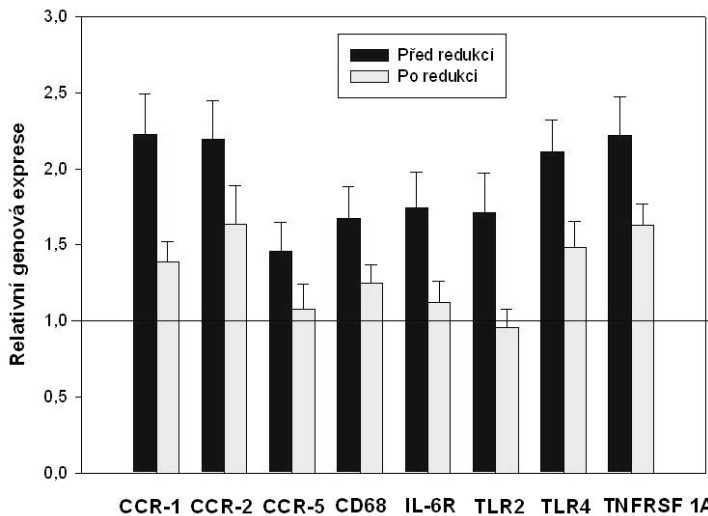
<i>Symbol genu</i>	<i>Název genu</i>	<i>Periferní monocyty</i>				<i>Podkožní tuková tkáň</i>			
		<i>Obézní bez DM2</i>		<i>Obézní s DM2</i>		<i>Obézní bez DM2</i>		<i>Obézní s DM2</i>	
		<i>Násobek</i>	<i>P</i>	<i>Násobek</i>	<i>P</i>	<i>Násobek</i>	<i>P</i>	<i>Násobek</i>	<i>P</i>
<i>CD68</i>	CD68 antigen	1,40	0,010	1,67	0,008	1,73	0,022	2,18	0,001
<i>CCL-2</i>	CC-chemokinový ligand 2	0,84	NS	0,38	0,034	1,28	NS	2,73	0,022
<i>CCL-3</i>	CC-chemokinový ligand 3	1,36	NS	1,71	NS	1,70	0,041	2,59	0,021
<i>CCL-5</i>	CC-chemokinový ligand 5	1,22	NS	1,27	NS	0,65	NS	0,93	NS
<i>CCL-7</i>	CC-chemokinový ligand 7	ND		ND		2,27	0,007	7,34	<0,001

Symbol genu	Název genu	Periferní monocyty				Podkožní tuková tkáň			
		Obézní bez DM2		Obézní s DM2		Obézní bez DM2		Obézní s DM2	
		Násobek	P	Násobek	P	Násobek	P	Násobek	P
<i>CCL-8</i>	CC-chemokininový ligand 8	0,99	NS	1,12	NS	1,45	NS	2,29	0,011
<i>CCL-17</i>	CC-chemokininový ligand 17	ND		ND		4,32	0,001	2,92	0,006
<i>CCL-22</i>	CC-chemokininový ligand 22	ND		ND		3,73	0,003	5,02	0,002
<i>CXCL-10</i>	CXC-chemokininový ligand 10	0,68	NS	0,29	NS	1,50	NS	1,23	NS
<i>CCR-1</i>	CC-chemokininový receptor 1	2,12	0,045	2,22	<0,001	1,65	NS	2,39	<0,001
<i>CCR-2</i>	CC-chemokininový receptor 2	2,06	0,007	2,20	<0,001	1,04	NS	1,41	NS

Symbol genu	Název genu	Periferní monocyty				Podkožní tuková tkáň			
		Obézní bez DM2		Obézní s DM2		Obézní bez DM2		Obézní s DM2	
		Násobek	P	Násobek	P	Násobek	P	Násobek	P
<i>CCR-3</i>	CC-chemokinový receptor 3	2,93	0,003	0,74	NS	0,62	NS	0,96	NS
<i>CCR-5</i>	CC-chemokinový receptor 5	1,29	NS	1,46	0,042	1,91	NS	2,46	<0,001

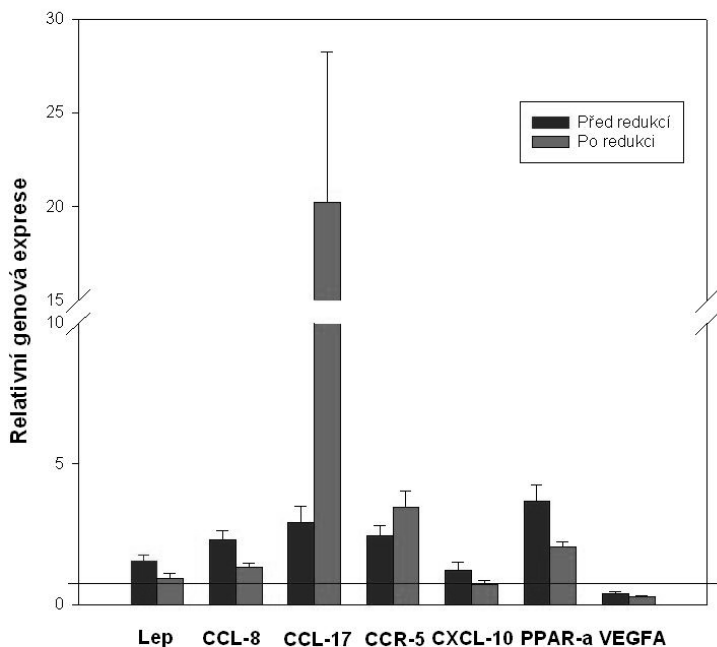
Průměrná hodnota relativní genové exprese kontrolní skupiny byla brána jako 1. ND – nedetekovatelné. NS – nesignifikantní.

Graf 1: Periferní monocyty – změny v mRNA expresi u pacientů s DM2 po 2 týdnech VLCD v porovnání se vstupním stavem



Průměrná hodnota relativní genové exprese kontrolní skupiny byla brána jako 1. Zobrazeny jsou jenom geny vykazující signifikantní změnu ($p < 0,05$) po VLCD. (CCR-1, -2, -5 – CC chemokinový receptor 1, 2, 5, IL-6R – receptor pro interleukin 6, TLR2, 4 – toll-like receptor 2, 4, TNFRSF 1A –1A receptor pro tumor nekrotizující faktor, VLCD – nízkokalorická dieta).

Graf 2: Podkožní tuková tkáň – změny v mRNA expresi u pacientů s DM2 po 2 týdnech VLCD v porovnání se vstupním stavem



Průměrná hodnota relativní genové exprese kontrolní skupiny byla brána jako 1. Zobrazeny jsou jenom geny vykazující signifikantní změnu ($p < 0,05$) po VLCD. (Lep – leptin, CCL-8, -17 – CC chemokin 8, 17, CCR-5 – CC chemokinový receptor 5, CXCL-10 – CXC chemokin 10, PPAR- α – receptor α aktivovaný peroxizomovým proliferátorem, VEGFA – vaskulární endoteliální růstový faktor A, VLCD – nízkokalorická dieta).

9. SEZNAM PUBLIKACÍ

1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace
 - a) s impact faktorem
 - Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z, Michalsky D, Kasalicky M, Haluzikova D, Matoulek M, Dostalova I, Humenanska V, Haluzik M. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Sep;71(3):369-75. - **IF 3,4**
 - Mraz M, Lacinova Z, Drapalova J, Haluzikova D, Horinek A, Matoulek M, Trachta P, Kavalkova P, Svacina S, Haluzik M. The effect of very-low-calorie-diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, April 2011, 96(4) – **IF 6,5**
 - Mraz M, Lacinova Z, Kavalkova P, Haluzikova D, Trachta P, Drapalova J, Hanusova V, Haluzik M. Serum concentrations of fibroblast growth factor 19 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of acute hyperinsulinemia, very-low calorie diet and PPAR- α agonist treatment. *Physiol Res*. 2011 May 16. [Epub ahead of print] – **IF 1,6**

2. publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace
- a) s impact faktorem
- Roubíček T, Bártlová M, Krajičková J, Haluzíková D, Mráz M, Lacinová Z, Kudla M, Teplan V, Haluzík M. Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease. *Nutrition*. 2009 Jul-Aug;25(7-8):762-8. – **IF 2,3**
 - Dostálová I, Roubíček T, Bártlová M, Mráz M, Lacinová Z, Haluzíková D, Kaválková P, Matoulek M, Kasalický M, Haluzík M. Increased serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine-1 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of very low calorie diet. *Eur J Endocrinol*. 2009 Sep;161(3):397-404. – **IF 3,9**
 - Haluzíková D, Dostálová I, Kaválková P, Roubíček T, Mráz M, Papežová H, Haluzík M. Serum concentrations of adipocyte fatty acid binding protein in patients with anorexia nervosa. *Physiol Res*. 2009;58(4):577-81. – **IF 1,6**
 - Dolinková M, Dostálová I, Lacinová Z, Michalský D, Haluzíková D, Mráz M, Kasalický M, Haluzík M. The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Sep 10;291(1-2):63-70. – **IF 3,6**
 - Dostálová I, Kaválková P, Haluzíková D, Lacinová Z, Mráz M, Papežová H, Haluzík M. Plasma concentrations of fibroblast growth factors 19 and 21 in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Sep;93(9):3627-32. – **IF 6,3**

- Bošanská L, Petrák O, Zelinka T, Mráz M, Widimský Jr J, Haluzík M. The effect of pheochromocytoma treatment on subclinical inflammation and endocrine function of adipose tissue. *Physiol Res.* 2009;58(3):319-25, Epub 2008 Jul 18. – **IF 1,6**
 - Roubíček T, Dolínková M, Bláha J, Haluzíková D, Bošanská L, Mráz M, Křemen J, Haluzík M. Increased angiotensinogen production in epicardial adipose tissue during cardiac surgery: possible role in a postoperative insulin resistance. *Physiol Res* 2009; 57(6):911-7, Epub 2007 Nov 30. – **IF 1,6**
- b) bez impact faktoru
- Mráz M, Haluzík M. Selfmonitoring glykémie. In: Haluzík M et al: *Praktická léčba diabetu, Mladá fronta, Praha 2009.*
 - Mráz M. et. al. Kontinuální monitorace glykémie: Minulost, současnost a perspektivy. – In: Haluzík M. et al. *Trendy soudobé diabetologie. Svazek 12, Galén, Praha 2008.*
 - Mráz M, Kopecky P, Hovorka R, Haluzík M: Intensive insulin therapy in the ICU: The use of computer algorithms. *British Jnl of Intensive Care*, Winter 2008, 129-134.
 - Mráz M, Svačina Š, Haluzík M. Kontinuální monitorace glykémie: Minulost, současnost a perspektivy. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2009, 12(2), 72-8.
 - Mráz M, Dulíková L, Galajda P. Arterial hypertension, endothelial dysfunction and defects of haemostasis. *Acta Med Mart* 2004; 4(3): 9-15.

- Roubíček T, Mráz M, Bártlová M, Kaválková P, Haluzíková D, Trachta P, Housová J, Matoulek M, Svačina Š, Haluzík M. Vliv 6-měsíčního podávání exenatidu na kompenzaci diabetes mellitus 2. typu, antropometrické a biochemické parametry. *Vnitr Lek.* 2010 Jan;56(1):15-20.
- Křemen J, Mráz M, Roubíček T, Svačina Š, Haluzík M. Hyperglykemie v intenzivní péči u kardiologických pacientů. *Postgrad Med* 2009, Suppl. 1.
- Kružliak P, Mráz M, Dulíková L, Očenášová L, Galajda P, Mokán M. Metabolic syndrome and hormones of adipose tissue. *Acta Med Mart* 2008; 8(1): 23-28.
- Bošanská L, Lacinová Z, Roubíček T, Mráz M, Bártlová M, Doležalová R, Housová J, Křemen J, Haluzíková D, Matoulek M, Haluzík M. Vliv nízkokalorické diety na solubilní adhezivní molekuly a jejich sérovou expresi v tukové tkáni obézních žen. *Čas Lék Česk.* 2008; 147 (1): 32-7.
- Lacinová Z, Michlaský D, Kasalický M, Dolinková M, Haluzíková D, Roubíček T, Krajičková J, Mráz M, Matoulek M, Haluzík M. Vliv obezity na genovou expresi adiponektinu a jeho receptoru v subkutánní tukové tkáni. *Vnitr Lek.* 2007 Nov; 53(11), 1190-7.
- Roubíček T, Křemen J, Bláha J, Matias M, Kopecký P, Rulišek J, Anderlová K, Bošanská L, Mráz M, Chassis LJ, Hovorka R, Svačina Š, Haluzík M. Pilotní studie hodnotící glykemickou kompenzaci pomocí prediktivního algoritmu . *Čas Lék Česk.* 2007;146(11):868-73.

- Jeseňák M, Lietavová Z, Szökeová A, Lietava P, Plameňová I, Mráz M, Buchanec J, Bánovčín P. Thalidomid - „novodobý comeback“. *Klin Farmakol Farmac* 2007, 21 (2).
- Jeseňák M, Lietavová Z, Szökeová A, Lietava P, Mráz M, Bánovčín P, Buchanec J, Mokáň M: Thalidomid – „staronový liek“. *Med Mon*, 2006, 2, 1, 4-12.