

UNIVERZITA KARLOVA

3. lékařská fakulta



Dizertační práce

Praha, 2018

MUDr. Elena Wildová

UNIVERZITA KARLOVA

3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Kvantifikace inzulínové sekrece po podání syrovátkových proteinů
u zdravých jedinců a u diabetiků 2. typu

*Quantification of insulin secretion after administration
of whey proteins in healthy subjects and in patients
with type 2 diabetes*

Školitel: Prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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 These.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému (SIS 3.LF UK) jsou totožné.

V Praze, 26. února 2018

ELENA WILDOVÁ

Identifikační záznam:

WILDOVÁ, Elena. Kvantifikace inzulínové sekrece po podání syrovátkových proteinů u zdravých jedinců a u diabetiků 2. typu. [*Quantification of insulin secretion after administration of whey proteins in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes*]. Praha, 2018. 102 stran, 4 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, II. interní klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Centrum výzkumu výživy, metabolismu a diabetu, Ústav výživy 3. LF UK 2018. Prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

Klíčová slova: stimulovaná inzulínová sekrece, syrovátkové bílkoviny, zdraví jedinci, pacienti s diabetes mellitus 2. typu

Key words: stimulated insulin secretion, whey proteins, healthy individuals, patients with type 2 diabetes

Poděkování

V roce 2009, několik dnů po úspěšně složené poslední státní závěrečné zkoušce na lékařské fakultě, jsem nastoupila na 2. interní kliniku Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Při prvních setkáních s tehdejší přednostou kliniky a mým budoucím školitelem panem profesorem Andělem bylo nastíněno i téma mého doktorského studia – inzulínová sekrece po potravním stimulu syrovátkovými bílkovinami. Vzpomínám si velmi dobře, že jsem byla ráda za příchod nové příležitosti a za možnost objevování nových obzorů. Z dnešního pohledu musím přiznat, že pro mě doktorské studium bylo řádnou životní zkušeností, za kterou jsem nyní velmi vděčná. Proto musím zcela upřímně říci, že po celou dobu studia, mi byl můj školitel významnou oporou. Velmi si ho vážím mimo jiné právě proto, že z něho vždy vyzařoval neskonalý optimismus a přijímal přítomný okamžik s nadhledem a s důvěrou v úspěšný konec. Dále děkuji pracovníkům Ústavu výživy 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a pracovníkům Oddělení klinické fyziologie 2. interní kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, se kterými jsem měla čest spolupracovat. Na závěr bych chtěla poděkovat grantu NAZV 101B090 za finanční podporu.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	11
1. Úvod.....	15
2. Poznámky k inzulínové sekreci	17
2.1 Inzulín a C-peptid.....	17
2.2 Bazální inzulínová sekrece.....	18
2.3 Stimulovaná inzulínová sekrece po perorálním stimulu	23
2.3.1 Cefalická fáze inzulínové sekrece.....	23
2.3.2 Gastrointestinální fáze inzulínové sekrece.....	25
2.3.3 Substrátová fáze inzulínové sekrece.....	25
2.4 β -buněčná dysfunkce.....	29
2.5 Stimulační testy inzulínové sekrece	30
2.5.1 Časná fáze inzulínové sekrece.....	34
2.5.2 Pozdní fáze inzulínové sekrece.....	37
2.5.3 První fáze inzulínové sekrece	37
2.5.4 Druhá fáze inzulínové sekrece.....	39
2.6 Obnova β -buněčné funkce.....	40
3. Poznámky k syrovátkovým bílkovinám	41
3.1 Mléko	41
3.2 Mléčné bílkoviny.....	43
3.3 Surovátkové bílkoviny a inzulínová sekrece u zdravých jedinců	45
3.4 Surovátkové bílkoviny a inzulínová sekrece u pacientů s diabetes mellitus 2. typu ...	48
4. Hypotézy a cíle práce	51
5. Studie I. Zhodnocení stimulované inzulínové sekrece u zdravých jedinců.....	53
5.1 Materiál a metody.....	53
5.1.1 Charakteristika zdravých jedinců.....	53
5.1.2 Testy stimulované C-peptidové sekrece.....	53
5.1.3 Statistika a výpočty.....	56
5.2 Výsledky.....	57
5.2.1 C-peptidová odpověď.....	57

5.2.2	<i>Glykemická odpověď</i>	58
5.2.3	<i>C-peptidová odpověď - iAUC/min</i>	60
5.2.4	<i>Glykemická odpověď - iAUC/min</i>	60
5.2.5	<i>Tolerance testů</i>	61
5.3	Diskuze.....	61
6.	Studie II. Zhodnocení stimulované inzulínové sekrece u pacientů s diabetes mellitus 2. typu	65
6.1	Materiál a metody.....	65
6.1.1	<i>Charakteristika pacientů s diabetes mellitus 2. typu</i>	65
6.1.2	<i>Testy stimulované C-peptidové sekrece</i>	65
6.1.3	<i>Statistika a výpočty</i>	67
6.2	Výsledky.....	67
6.2.1	<i>C-peptidová odpověď</i>	67
6.2.2	<i>Glykemická odpověď</i>	68
6.2.3	<i>β-buněčná funkce a glykemická odpověď u pacientů s diabetes mellitus 2. typu</i>	69
6.2.4	<i>Tolerance testů</i>	70
6.3	Diskuze.....	70
7.	Závěry, zhodnocení cílů a hypotéz práce	73
8.	Souhrn	75
9.	Literatura	77
10.	Publikace a prezentace výstupů řešení dizertace	97
11.	Seznam příloh	101

Seznam použitých zkratk

[Ca ²⁺] _e	koncentrace extracelulárního vápníku, extracellular Calcium ions
[Ca ²⁺] _i	koncentrace intracelulárního vápníku, intracellular Calcium ions
[Na ⁺] _e	koncentrace extracelulárního sodíku, extracellular Natrium ions
[Na ⁺] _i	koncentrace intracelulárního sodíku, intracellular Natrium ions
AC	adenylátcykláza, Adenylyl Cyclase
ADP	adenosindifosfát, Adenosine DiPhosphate
ACh	acetylcholin, AcetylCholine
AIR	akutní inzulínová odpověď, Acute Insulin Response
AST	argininový stimulační test, Arginin Stimulation Test
ATP	adenosintrifosfát, Adenosine TriPhosphate
AUC	plocha pod křivkou, Area Under the Curve
BCAAs	větvené aminokyseliny, Branched Chain Amino Acids
BMI	index tělesné hmotnosti, Body Mass Index
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát, Cyclic Adenosine MonoPhosphate
CaV	napětově-závislý vápníkový kanál, Voltage-gated Calcium channel
CoA	koenzym A, Coenzyme A
C-peptid	spojovací peptid, Connecting-peptid
CPIR	cefalická fáze inzulínové sekrece, Cephalic Phase Insulin Release
CPT-1	karnitinpalmitoyltransferáza 1, Carnitine PalmitoylTransferase 1
DAG	1,2-diacylglycerol, 1,2-DiAcylGlycerol
DI	dispoziční index, Disposition Index
DIO	orální dispoziční index, Oral Disposition Index
DPP-4	dipeptidylpeptidáza-4, DiPeptidyl Peptidase-4
FAO	Potravinářská a zemědělská organizace spojených národů, Food and Agriculture Organization
FFAR-1	receptor 1 pro volné mastné kyseliny, Free Fatty Acid Receptor 1
FFAs	volné mastné kyseliny, Free Fatty Acids
GA	Golgiho aparát, Golgi Apparatus
GER	drsne endoplazmatické retikulum, Granular Endoplasmatic Reticulum
GIP	glukózo-dependentní inzulintropní polypeptid, Glucose-dependent Insulintropic Polypeptide
GLP-1	glukagonu podobný peptid 1, Glucagon-Like Peptide-1

GRP	polypeptid uvolňující gastrin, Gastrin-Releasing Peptide
GSIS	glukózou stimulovaná inzulinová sekrece, Glucose-Stimulated Insulin Secretion
GST	glukagonový stimulační test, Glucagon Stimulation Test
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou, High Density Lipoproteins
HEC	hyperinzulinemický euglykemický klemp, Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp
HOMA(2)-IR	index inzulinové rezistence (2), HOmeostatic Model Assessment (2) - Insulin Resistance
iAUC	inkrementální (přírůstková) plocha pod křivkou, incremental Area Under the Curve
iAUC/min	inkrementální (přírůstková) plocha pod křivkou normalizována na jednotku času, incremental Area Under the Curve per minute
IDF	Mezinárodní mlékárenská federace, International Dairy Federation
IGI	inzulinogenní index, InsulinoGenic Index
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát, Inositol-1,4,5-triPhosphate
IPA	beta-laktosin A, Isoleucin-Prolin-Alanin
IR	inzulinová rezistence, Insulin Resistance
IS	inzulinová senzitivita, Insulin Sensitivity
ISI _{comp}	index Matsudy, Matsuda index
IVGTT	intravenózní glukózový toleranční test, IntraVenous Glucose Tolerance Test
K ⁺ _{ATP} kanál	ATP-senzitivní draslíkový kanál, ATP-sensitive potassium channel
LCFA-CoA	estery koenzymů mastných kyselin s dlouhým řetězcem, Long Chain Fatty Acyl-CoA
Mal-CoA	malonyl-koenzym A, Malonyl-CoA
mFSIVGTT	modifikovaný intravenózní glukózový toleranční test s častými odběry analytů, modified Frequently Sampled IntraVenous Glucose Tolerance Test
MIT	mitochondrie, MITochondria
MMTT	test založený na podání smíšené stravy, Mixed Meal Tolerance Test
mRNA	informační jednovláknová nukleotidová kyselina, messenger RiboNucleic Acid
OGIS ₁₂₀	index inzulinové senzitivity stanovený po perorálním podání glukózy, Oral Glucose Insulin Sensitivity ₁₂₀

OGTT	orální glukózový toleranční test, Oral Glucose Tolerance Test
OWGT	test s podáním syrovátkových bílkovin a glukózy, Oral Whey Glucose Stimulation Test
OWIST	test s podáním 75 g samotných syrovátkových bílkovin, Oral Whey Stimulation Test
OWT	test s podáním 40 g samotných syrovátkových bílkovin, Oral Whey Test
PACAP	hypofyzární adenylátcyklázu aktivující polypeptid, Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PDCAAS	stravitelnost bílkovin s ohledem na jejich aminokyselinové složení, Protein Digestibility Corrected Amino Acids Score
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, Phosphatidylinositol 4,5-bisPhosphate
PKA	proteinkináza A, Protein Kinase A
PKC	proteinkináza C, Protein Kinase C
PLC	fosfolipáza C, PhosphoLipase C
QUICKI	index inzulínové senzitivity, QUantitative Insulin sensitivity ChecK Index
RRP	rychle uvolnitelná granula, Readily Releasable Pool
SEM	střední chyba průměru, Standard Error of the Mean
SER	hladké endoplazmatické retikulum, Smooth Endoplasmatic Reticulum
SGP	rezervní inzulínová granula, Storage-Granule Pool
TAG	triacylglycerol, TriAcylGlyceride
TDP	časově-závislé posílení, Time-Dependent Potentiation
VIP	vazoaktivní intestinální peptid, Vasoactive Intestinal Peptide
WHO	Světová zdravotnická organizace, World Health Organisation
WMA	Světová lékařská asociace, World Medical Association
WPC	syrovátkový proteinový koncentrát, Whey Protein Concetrates
WPC80	syrovátkový proteinový koncentrát 80, Whey Protein Concentrate WPC 80
WPH	syrovátkový proteinový hydrolyzát, Whey Protein Hydrolysate
WPI	syrovátkový proteinový izolát, Whey Protein Isolate

1. Úvod

V listopadu 1920 kanadský lékař Frederick Grant Banting formuloval hypotézu, ve které předpokládal získání in vivo biologicky aktivního výtažku tzv. vnitřní sekrece slinivky břišní. Poprvé tak byl izolován zvířecí extrakt s přímým hypoglykemizujícím účinkem a s nutností purifikace pro užití v klinické praxi. Hypotéza byla potvrzena a brzy poté byl výtažek označen jako inzulín. Frederick Grant Banting a John James Rickard Macleod byli oceněni za objev inzulínu a kauzální léčbu diabetu v roce 1923 Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu. O finanční odměnu se dále rozdělili s těmi, kteří měli obrovský podíl na projektu, tedy se studentem medicíny Charlesem Bestem a chemikem Jamesem Collipem.

Od objevení inzulínu uplynulo více než devadesát pět let a současně více než devadesát pět let intenzivního vědeckého výzkumu ve snaze pochopit fyziologii a patofyziologii hormonu, jenž má zásadní postavení v regulaci metabolismu. I přes rozsáhlé znalosti v této oblasti, zůstává stále mnoho otázek nezodpovězených a předpokládá se, že další výzkum by mohl vést k významnému posunu v léčbě prediabetu a diabetu.

Tato práce si klade za cíl ukázat možnosti užití mléčných respektive syrovátkových bílkovin k testování inzulínové sekrece u zdravých jedinců a u pacientů s diabetes mellitus 2. typu v běžné klinické praxi. Původní myšlenka zabývat se testováním stimulované inzulínové sekrece vycházela z poznatku, že testování sekreční kapacity řady jiných hormonů se osvědčilo a je nepostradatelnou součástí klinické endokrinologie. Testování sekreční kapacity β -buněk pomocí stimulované inzulínové sekrece však zatím chybí v oficiálních doporučených postupech péče o pacienty s diabetes mellitus 2. typu. Stanovení sekreční kapacity β -buněk tak zůstává především doménou výzkumných laboratoří zaměřených na oblast energetického metabolismu, fyziologie a patofyziologie β -buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní.

2. Poznámky k inzulínové sekreci

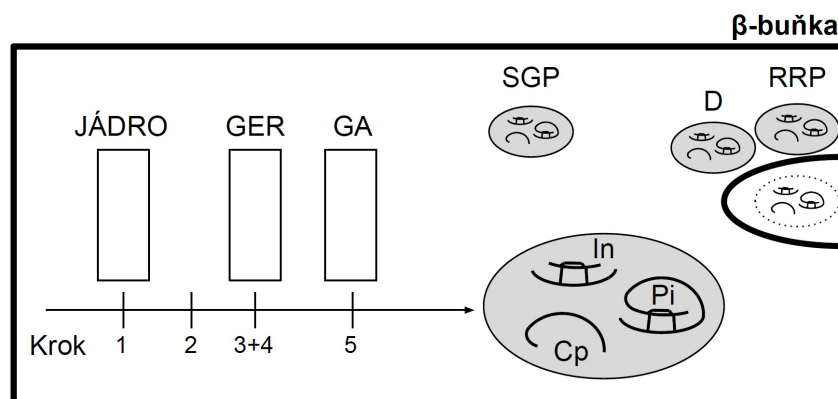
2.1 Inzulín a C-peptid

Inzulín je společně s tzv. spojovacím peptidem (C-peptid, Connecting-peptid) syntetizován, skladován a procesem exocytózy uvolňován z β -buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní do krevního oběhu (obrázek 1).

Inzulín je polypeptidový hormon, jehož název vychází z latinského slova „insula“ ostrov a je složen z 51 aminokyselin seskupených do dvou řetězců - A (21 aminokyselin) a B (30 aminokyselin) spojených dvěma disulfidickými můstky včetně jednoho disulfidického můstku přímo uvnitř řetězce A. C-peptid je polypeptid složený z 31 aminokyselin.

C-peptid i inzulín jsou oba součástí jejich prekurzorů preproinzulínu a proinzulínu. Stanovení hladiny C-peptidu je v porovnání se stanovením samotného inzulínu u jedinců se zachovalými ledvinnými funkcemi přesnějším ukazatelem vlastní inzulínové sekrece (Eaton et al. 1980). Důvodů, proč je hladina C-peptidu lepším ukazatelem inzulínové sekrece, je několik:

- 1) C-peptid je secernován z β -buňky v ekvimolárním množství jako inzulín,
- 2) prvním průchodem játry je vstřebáno pouze 12 % C-peptidu v porovnání s 50-80 % inzulínu (Horwitz et al. 1975; Duckworth et al. 1998) a
- 3) C-peptid má v krevním oběhu delší biologický poločas (cca 30 minut) než inzulín (5 minut).



Obrázek 1 Syntéza inzulínu a C-peptidu včetně jejich uskladnění v sekrečních granulech β -buňky. Biosyntéza inzulínu a C-peptidu začíná v jádře aktivací transkripce genetické informace pro syntézu inzulínu (chromozóm 11p15) do informační jednovláknové nukleotidové kyseliny (mRNA, messenger RiboNucleic Acid; krok 1). Dále se molekula mRNA dostává z jádra přes cytoplazmu (krok 2) na ribozomy drsného endoplazmatického retikula (GER, Granular Endoplasmatic Reticulum), kde dochází k translaci mRNA do molekuly preproinzulínu (krok 3). V GER dále vzniká molekula proinzulínu (krok 4). Následně je proinzulín transportován do Golgiho aparátu

(GA, Golgi Apparatus), kde se tvoří sekreční granula (Rorsman et al. 2000) obsahující již samotný inzulín (In; v podobě hexamerů vázaných k zinečnatým iontům), samotný C-peptid (Cp) a menší množství biologicky inaktivního proinzulínu (Pi; v podobě hexamerů vázaných k zinečnatým iontům; krok 5). Sekreční granula dělíme na tzv. rezervní (SGP, Storage-Granule Pool), která jsou přítomna v cytoplazmě (> 95 %), a tzv. rychle uvolnitelná (RRP, Readily Releasable Pool), která jsou připojena k plazmatické membráně β -buňky (Rorsman et al. 2000; Bratanova-Tochkova et al. 2002). Podskupinu RRP granul tvoří tzv. ukotvená (docked) granula. Exocytóza sekrečních granul je složitý, přesně regulovaný proces (Kelly 1990; Ashcroft et al. 1994), na kterém se účastní řada bílkovin (Aslamy a Thurmond 2017).

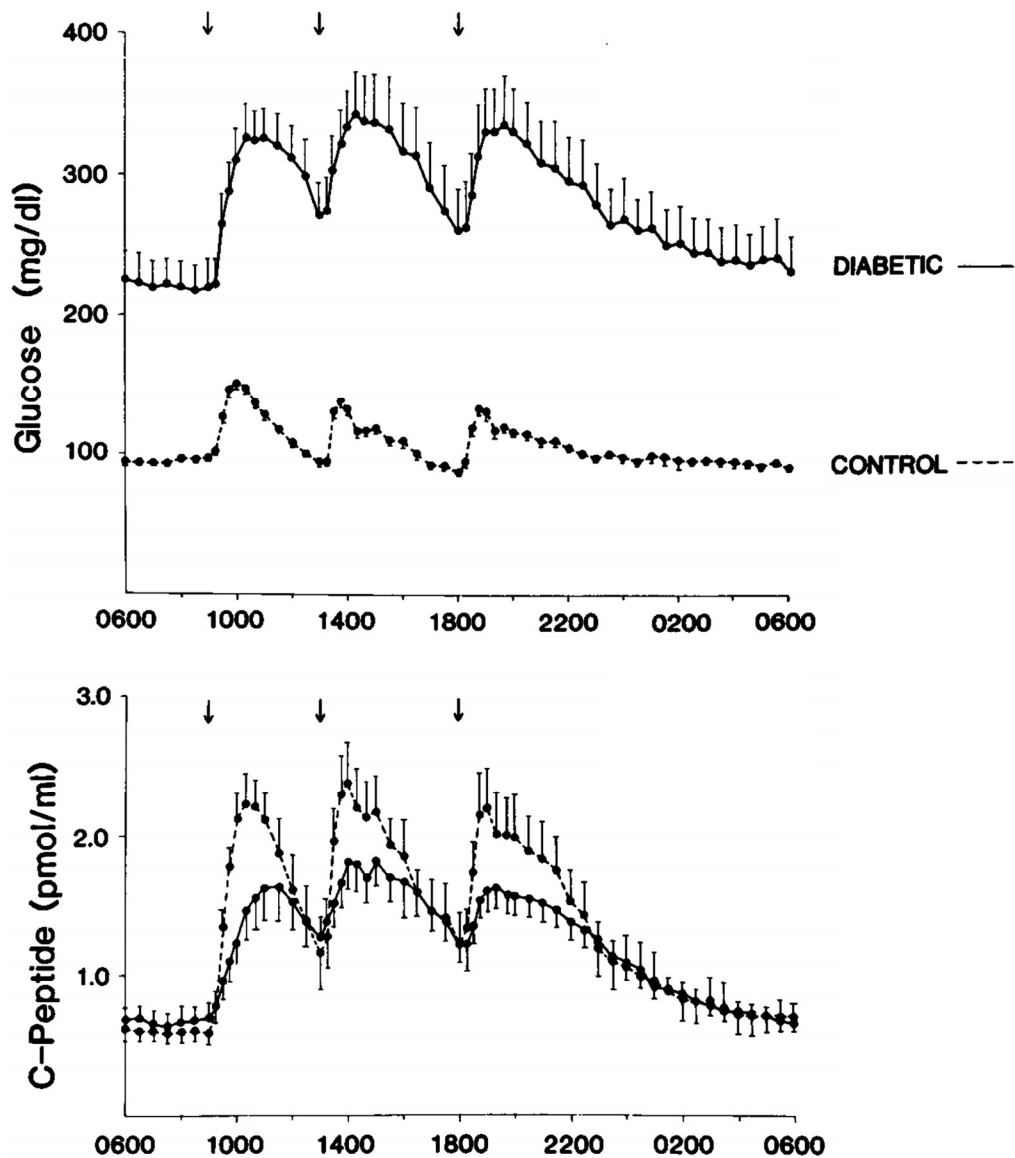
2.2 Bazální inzulínová sekrece

Bazální inzulínová sekrece je inzulínová sekrece při hladinách glykémie nalačno. Stanovení bazální inzulínové sekrece by mělo být provedeno s odstupem 10 až 12 hodin od poslední stravy (Monnier 2000). Uvádí se, že bazální inzulínová sekrece má přibližně 50 % podíl na celkové pulzní inzulínové sekreci uvolněné za 24 hodin (graf 1). Její úlohou je potlačení lipolýzy, proteolýzy, glykogenolýzy a glukoneogeneze tkáněmi závislými na inzulínu nalačno.

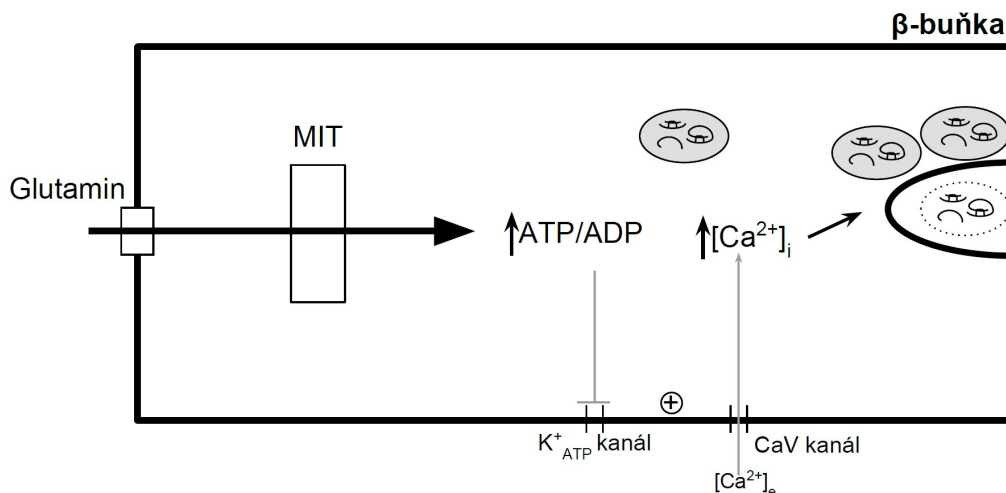
Molekulární mechanismy, které se účastní na bazální inzulínové sekreci, tj. za podmínek normoglykémie nalačno, nejsou v literatuře často uváděné. Studie Kellyové et al. (2002) např. ukazuje glutaminolýzu jako mechanismus zodpovědný za bazální inzulínovou sekreci (obrázek 2) a současně uvádí, že hladina glykémie pod 5 mmol/l nevede ke stimulované inzulínové sekreci.

V minulém století byl Richardem N. Bergmanem et al. (1981) popsán úzký vztah mezi bazální inzulínovou sekrecí, inzulínovou rezistencí (IR, Insulin Resistance) neboli sníženou inzulínovou senzitivitou (IS, Insulin Sensitivity) a hladinou glykémie nalačno (graf 2). Od té doby je doporučeno tyto tři faktory posuzovat společně.

Poměrně zavádějící je tedy široké rozpětí referenčních hodnot inzulínu (3 – 25 uU/ml) a C-peptidu (268 - 1274 pmol/l) nalačno pro všechny věkové kategorie uvedené firmou Siemens pro analyzátor Advia Centaur XP uveřejněné v laboratorní příručce Ústavu laboratorní diagnostiky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze. Je zřejmé, že jsou do referenčních hodnot zařazeny i hodnoty tzv. hyperinzulinémie nalačno (Polonsky et al. 1988).

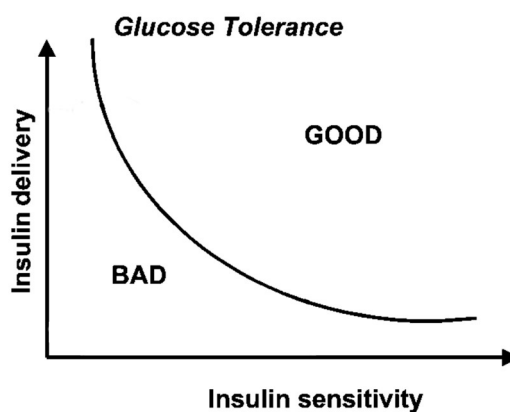


Graf 1 Grafické znázornění průměrného (\pm SEM) 24hodinového profilu bazální a stimulované inzulínové sekrece u zdravých jedinců (Control) a u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Diabetic). Pacienti s diabetes mellitus 2. typu měli v porovnání se zdravými jedinci průměrně nižší stimulovanou C-peptidovou sekreci po perorálním stimulu (šipky ukazují podání stravy). Výsledky vycházely ze studie, do které bylo zařazeno bez ohledu na hmotnost 16 zdravých jedinců a 14 neuspokojivě kompenzovaných pacientů s diabetes mellitus 2. typu s trváním diabetu $6,1 \pm 1,4$ ($\bar{x} \pm$ SEM) roku. Převzato z přehledu Polonského et al. (1988).



Obrázek 2 Glutaminolýza.

Na obrázku je schematicky znázorněn mechanismus účastnící se bazální inzulínové sekrece dle Kellyové et al. (2002). V mitochondriích (MIT, MITochondria) β -buňky dochází enzymem glutamátdehydrogenáza k oxidativní deaminaci glutamátu na α -ketoglutarát a nikotinamidadeninnukleotidfosfát. Následně vzniklý zvýšený poměr adenosin trifosfátu (ATP, Adenosine TriPhosphate) ke adenosindifosfátu (ADP, Adenosine DiPhosphate) blokuje ATP-senzitivní draslíkový kanál (K^+ ATP kanál, ATP-sensitive potassium channel) lokalizovaný v cytoplazmatické membráně. Tím dochází k její depolarizaci a otevření napěťově-závislého vápníkového kanálu (CaV, Voltage-gated Calcium channel). CaV vstupují extracelulárně lokalizované vápenaté ionty ($[Ca^{2+}]_e$, extracellular Calcium ions) do buňky a zvyšují intracelulární koncentraci vápenatých iontů ($[Ca^{2+}]_i$, intracellular Calcium ions), což vede k exocytóze sekrečních granul do krevního oběhu.



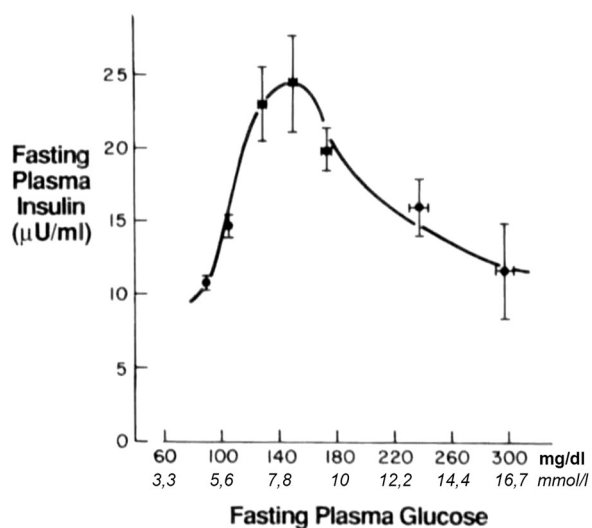
Graf 2 Vztah mezi bazální inzulínovou sekrecí (Insulin delivery), inzulínovou senzitivitou (Insulin sensitivity) a glukózovou tolerancí (Glucose Tolerance). Z grafu vyplývá, že pokud bude mít jedinec sníženou inzulínovou senzitivitu (tj. zvýšenou inzulínovou rezistenci) a dojde ke snížené inzulínové sekreci, vznikne porucha glukózového metabolismu (BAD) a naopak. Převzato z přehledové práce Ahréna a Paciniho (2004).

Dle hladiny postprandiální glykémie (trvající 2 - 4 hodiny po podání stravy) a hladiny glykémie nalačno můžeme jedince s hyperinzulinémií a IR rozdělit do 4 skupin (Ahrén a Pacini 2004):

- 1) bez poruchy glukózového metabolismu (v časovém průběhu dochází nejprve k postprandiální kompenzatorní hyperinzulinémii a poté k kompenzatorní hyperinzulinémii nalačno; Katz et al. 2000),
- 2) s hraniční glykemií nalačno (nekompenzatorní hyperinzulinémie nalačno, kompenzatorní postprandiální hyperinzulinémie; Abdul-Ghani et al. 2006),
- 3) s poruchou glukózové tolerance (kompenzatorní lačná a nekompenzatorní postprandiální hyperinzulinémie; Abdul-Ghani et al. 2006) a
- 4) s diabetes mellitus 2. typu (nekompenzatorní hyperinzulinémie nalačno i postprandiální s progresí do kvantitativní inzulínové deficience; viz graf 3).

Dlouhotrvající hyperinzulinémie (nalačno i postprandiálně) dále prohlubuje IR a dochází ke zhoršování β -buněčné funkce.

U jedinců bez poruchy glukózového metabolismu byla nalezena silná pozitivní korelace mezi vypočítaným „zlatým standardem“ IR (přehled metod stanovení IR uvádí tabulka 1) a hladinou inzulínu/C-peptidu nalačno (Katz et al. 2000). U pacientů s diabetes mellitus 2. typu je v porovnání se zdravými jedinci obecně nižší korelace mezi různými metodami stanovení IR.



Graf 3 Grafické znázornění vztahu mezi průměrnou hladinou inzulínu nalačno a hladinou glykémie nalačno u neobézních zdravých jedinců, pacientů s prediabetem a pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Z hladin normoglykémie do hladin hyperglykémie (přibližně 7,8 mmol/l) dochází k úměrnému vzestupu inzulínu nalačno (od 10 uU/ml do 25 uU/ml). Pokud jsou hladiny glykémie nalačno vyšší než 7,8 mmol/l dochází k postupnému poklesu hladin inzulínu nalačno. Převzato z přehledu DeFronza et al. (1992).

Tabulka 1 Přehled nejčastěji užívaných metod stanovení IR.

Metoda		Kritérium inzulínové rezistence (IR)	Korelace s HEC (Z - zdraví, D - pacienti s diabetes mellitus 2. typu)	Autor metody
HEC (SI _{clamp})	Hyperinzulinemický euglykemický klemp	Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp SI _{clamp} ≤ 6,3 mg · kg ⁻¹ · min ⁻¹ · mU ⁻¹ · l ⁻¹ (McAuley et al. 2001)		DeFronzo et al. 1979
mFSIVGTT (S _{MM})	Modifikovaný intravenózní glukózový toleranční test s častými odběry žilní krve	Modified Frequently Sampled Intra Venous Glucose Tolerance Test S _{MM} < 5 · 10 ⁻⁴ · min ⁻¹ · uU ⁻¹ · ml ⁻¹	Z (r = 0,82, p < 0,0006), D (r = 0,51, p < 0,02) (Katz et al. 2000)	Bergman et al. 1979, modifikace - Finegood et al. 1990
DI	Dispoziční index	Disposition Index DI < 286 ± 162 uU · mg · ml ⁻¹ · kg ⁻¹ · min ⁻¹ (Weyer et al. 1999)		Bergman et al. 1981
OGIS ₁₂₀	Index inzulínové senzitivity stanovený po perorálním podání glukózy	Oral Glucose Insulin Sensitivity OGIS ₁₂₀ < 362 ± 11 ml · min ⁻¹ · m ²	Z (r = 0,59, p < 0,01), D (r = 0,49, p < 0,01)	Mari et al. 2001
HOMA-IR	index inzulínové rezistence	HOMeostatic Model Assessment – Insulin Resistance HOMA-IR > 2 (Hedblad et al. 2000)	Z (r = 0,49, p < 0,01) (Hedblad et al. 2000)	Matthews et al. 1985
QUICKI	Index inzulínové senzitivity	QUAntitative Insulin sensitivity Check Index QUICKI < 0,331	Z (r = 0,49, p < 0,01), D (r = 0,7, p < 0,004)	Katz et al. 2000
ISI _{comp}	index Matsudy	Matsuda Index ISI _{comp} < 2,5	Z (r = 0,66, p < 0,0005) (Stumvoll et al. 2000), D (r = 0,54, p < 0,001) (Gutch et al. 2015)	Matsuda a DeFronzo 1999
DIO	Orální dispoziční index	Oral disposition index DIO < 1,24		Utzschneider et al. 2009

Mezi další indexy inzulínové rezistence patří např.: Stumvoll index (Stumvoll et al. 2000), Caderholm index (Caderholm a Wibell 1990), Avignon index (Avignon et al. 1999), Gutt index (Gutt et al. 2000), Belfiore index (Belfiore et al. 1996), McAuley index (McAuley et al. 2001), Bennett index (Anderson et al. 1995)

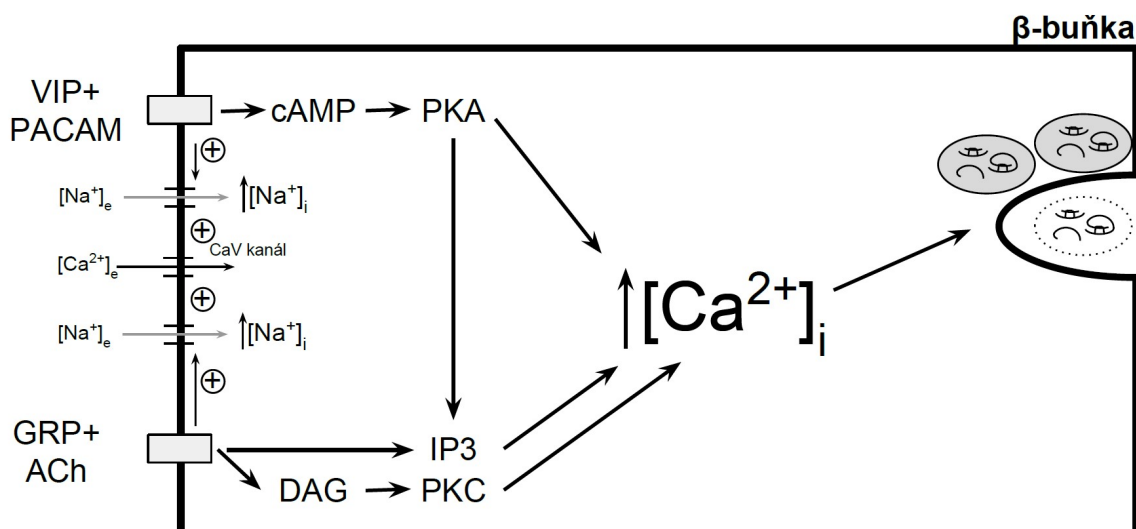
2.3 Stimulovaná inzulínová sekrece po perorálním stimulu

Stimulovaná inzulínová sekrece neboli na potravě závislá inzulínová sekrece je dána akutním vzestupem hladiny inzulínu/C-peptidu v žilní krvi na podnět stimulující látky (graf 1). Její hlavní úlohou je transport glukózy do tkání citlivých na inzulín, stimulace lipogeneze, proteosyntézy a syntézy glykogenu.

Celková inzulínová sekrece po perorálním stimulu se sestává ze tří částečně se překrývajících fází – cefalické, gastrointestinální a substrátové. Cefalická fáze je zprostředkována parasympatickým nervovým systémem a neuropeptidy, gastrointestinální fáze je dána sekrecí inkretinových hormonů a poslední substrátová fáze inzulínové sekrece je dána přímým účinkem nutrientů na β -buňky.

2.3.1 Cefalická fáze inzulínové sekrece

Cefalická neboli preabsorpční fáze inzulínové sekrece (CPIR, Cephalic-Phase Insulin Release; Ahrén a Holst 2001) je důležitou součástí stimulované inzulínové sekrece. V roce 1982 popsali CPIR Berthoud a Jeanrenaud při krmení potkanů. Potrava u nich vyvolala v nezávislosti na dosažení fundu žaludku (před vagotomií) zvýšenou inzulínovou sekreci. CPIR vzniká jako odpověď na nadprahové smyslové stimuly prostřednictvím nervového reflexního oblouku. Chuťové receptory v dutině ústní vedou vzruch do mozku přes nucleus a tractus solitarius, retikulární formaci, parabrachiální nucleus a dorzální motorický nucleus vagu. β -buňky jsou pak eferentně aktivovány jednak elektrickou aktivací a jednak neurotransmitery z nervových zakončení parasympatických nervů (Marty et al. 2007). CPIR je majoritně zprostředkována cholinergními a minoritně non-cholinergními mechanismy (obrázek 3) autonomního nervového systému (Ahrén 2000; Gilon a Henquin 2001).



Obrázek 3 Cefalická fáze inzulínové sekrece.

Acetylcholin (ACh, AcetylCholine) vazbou na muskarinový membránový receptor spřažený s G proteinem aktivuje fosfolipázu C (PLC, PhosphoLipase C), která štěpí membránový fosfolipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na inositol-1,4,5-trifosfátu (IP3, Inositol-1,4,5-triPhosphate) a 1,2-diacylglycerol (DAG, 1,2-DiAcylGlycerol). Vazbou IP3 na vápníkové kanály hladkého endoplazmatického retikula (SER, Smooth Endoplasmatic Reticulum) dochází k uvolnění vápenatých iontů do cytoplazmy β -buňky a ke zvýšené $[Ca^{2+}]_i$. Jako reakce na pokles vápenatých iontů v SER, dochází k otevření CaV a ke vstupu $[Ca^{2+}]_e$ do buňky. Zvýšená $[Ca^{2+}]_i$ vede k exocytóze sekrečních granul do krevního oběhu. DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC, Protein Kinase C), která zesiluje inzulínovou sekreci. Dále otevírá sodíkový kanál v cytoplazmatické membráně, což vede ke zvýšené intracelulární koncentraci sodíku ($[Na^+]_i$, intracellular Natrium ions) s následnou depolarizací membrány a otevřením CaV se zvýšením $[Ca^{2+}]_i$. Upraveno dle přehledové práce Gilona a Henquina (2001).

Non-cholinergní mechanismy inzulínové sekrece aktivují vazbou vazoaktivního intestinálního polypeptidu (VIP, Vasoactive Intestinal Polypeptide) a hypofyzárního polypeptidu aktivujícího adenylylcyklázu (PACAP, Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) aktivují přes své receptory spřažené s G proteinem adenylylcyklázu (AC, Adenylate Cyclase). AC katalyzuje syntézu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP, Cyclic Adenosine MonoPhosphate). cAMP aktivuje proteinkinázu A (PKA, Protein Kinase A), která 1) zvyšuje $[Na^+]_i$ s následnou depolarizací plazmatické membrány, čímž se otevírá CaV a zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$, 2) bloádou K^+_{ATP} kanálu se otevírá CaV se zvýšením $[Ca^{2+}]_i$ a 3) zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ přes IP3. Polypeptid uvolňující gastrin (GRP, Gastrin Releasing Peptide) aktivuje 1) PLC, 2) fosfolipázu D a 3) AC. Upraveno dle přehledové práce Ahréna (2000).

2.3.2 Gastrointestinální fáze inzulínové sekrece

V roce 1906 upozornila práce Benjaminina Moora et al. na hormony, které stimulují sekreci inzulínu (Kim a Egan 2008). Tyto hormony byly v roce 1929 nazvány La Barrem inkretiny (Intestine seCRETion InsuliN; Kim a Egan 2008). Inkretinové hormony společně s nervovým systémem představují nedílnou součást systému označovaného jako „enteroinzulární osa“ (Burcelin et al. 2007). Takzvaný „inkretinový efekt“ je označení pro stimulovanou inzulínovou sekreci vyvolanou inkretinovými hormony po perorálním stimulu (Elrick et al. 1964; Nauck et al. 1986).

Mezi inkretinové hormony řadíme glukózo-dependentní inzulinotropní polypeptid (GIP, Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide) secernovaný ze specializovaných enteroendokrinních K buněk v proximální části tenkého střeva (Brown a Dryburgh 1971) a glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1, Glucagon Like Peptide-1), který je secernován L buňkami lokalizovanými v distální části tenkého střeva – v ileu a v tlustém střevě (Polak 1973; Buchan et al. 1979). Pouze izopeptidy GLP-1(7-37) a GLP-1(7-36)amid zvyšují inzulínovou sekreci (Mojsov et al. 1987).

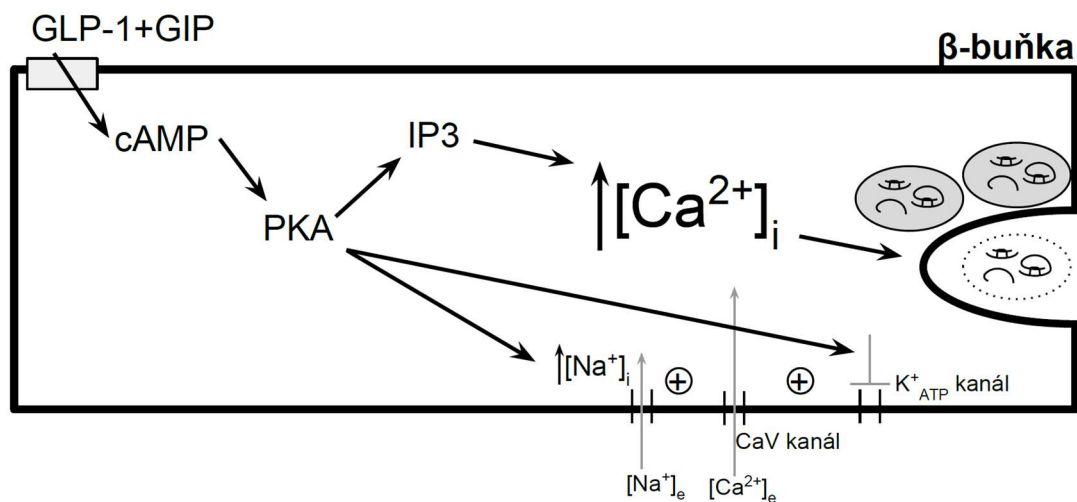
Uvolnění GIP z K buněk proximální části tenkého střeva a GLP-1 z L buněk distální části tenkého střeva se může uskutečnit jednak přímým účinkem živin (glukóza, mastné kyseliny a aminokyseliny) ve střevě (Drucker 1998) nebo nepřímým mechanismem přes hormonální či nervovou stimulaci jejich buněčných receptorů (Rocca a Brubaker 1999).

Inkretinové hormony stimulují inzulínovou sekreci přes své receptory lokalizované v cytoplazmatické membráně β -buněk a zvyšují $[Ca^{2+}]_i$ z vnitřních i z vnějších zdrojů (obrázek 4).

2.3.3 Substrátová fáze inzulínové sekrece

Tato fáze je dána přímým účinkem složek stravy (glukóza, mastné kyseliny a aminokyseliny) na β -buňky.

Pokud jsou ke glukóze podány mastné kyseliny či aminokyseliny tj. neglukózové stimuly, dochází k tzv. zesílení glukózou stimulované inzulínové sekrece (GSIS, Glucose-Stimulated Insulin Secretion). Tento jev je popisován jako tzv. potenciace inzulínové sekrece neboli synergické zvýšení inzulínové sekrece (Floyd et al. 1970; Nilsson et al. 2004).

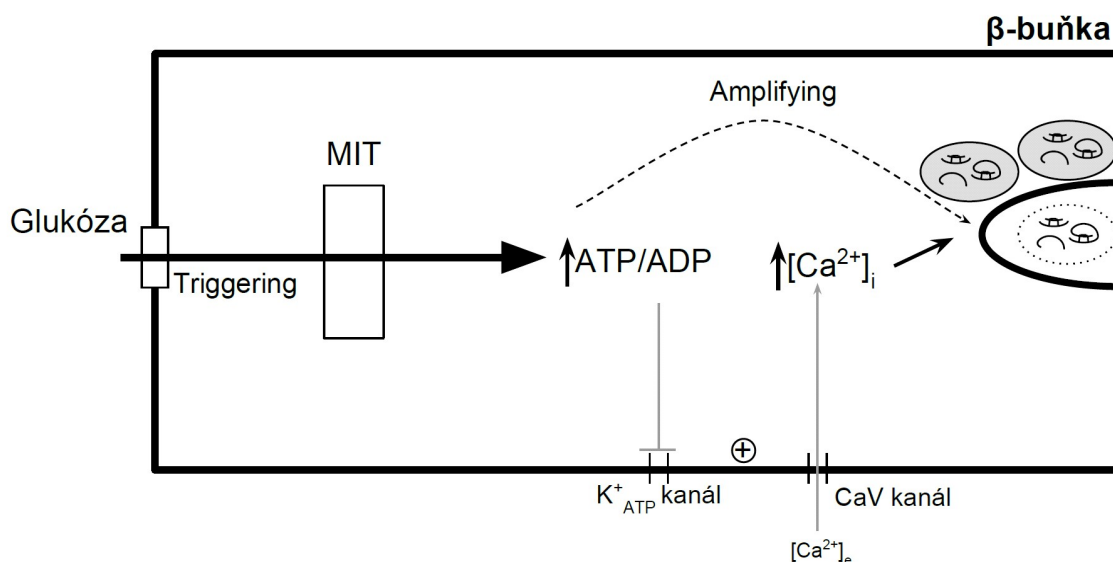


Obrázek 4 Gastrointestinální fáze inzulínové sekrece.

GIP a GLP-1 se váží na své receptory spřažené s G proteinem v plazmatické membráně a aktivují AC. cAMP aktivuje PKA, která 1) zvyšuje $[Na^+]_i$ s následnou depolarizací plazmatické membrány, čímž se otevírá CaV a zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$, 2) blokadou K^+_{ATP} kanálu se otevírá CaV se zvýšením $[Ca^{2+}]_i$ a 3) zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ přes IP3. Upraveno dle přehledové práce Kima a Egana (2008).

Glukózou stimulovaná inzulínová sekrece

U zdravých jedinců dochází po podání glukózy v porovnání s výsledky po podání samotného tuku či bílkoviny k nejvýraznějšímu vzestupu inzulínové sekrece. Pod pojmem GSIS (obrázek 5) je zahrnuta jak spuštěná (triggering) tak posílená (amplifying) signální dráha (Aizawa et al. 1998; Henquin 2000).



Obrázek 5 Glukózou stimulovaná inzulínová sekrece.

Glukóza vstupuje do buňky facilitovanou difúzí přes glukózový transportér 2. Následně dochází k oxidativní glykolýze glukózy enzymy lokalizovanými nejprve v cytosolu a poté v mitochondriích (MIT, MITochondria). Následně vzniklý zvýšený poměr ATP/ADP uzavírá K^+_{ATP} kanál.

Tím dochází k depolarizaci plazmatické membrány a k otevření CaV vedoucí ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. Tato signální dráha se označuje jako tzv. spuštěná (triggering).

Glukóza stimuluje inzulínovou sekreci také tzv. zesílenou (amplifying) signální dráhou tedy v nezávislosti na uzavření K^+_{ATP} kanálu. Tato signální dráha je aktivována různými metabolity nutrientů – adeninovými a guaninovými nukleotidy (Henquin 2000), změnou koncentrace ATP/ADP (Henquin 2000), cAMP (Renström et al. 1997), PKA a PKC (Aizawa et al. 1998), glycerinaldehydem a 2-ketoizokaproátem (Aizawa et al. 1998), aktivitou kalmodulin-závislé proteinkinázy 2 (Kajio et al. 2001) atd. Upraveno dle přehledu Aizawy et al. (1998) a Henquina (2000).

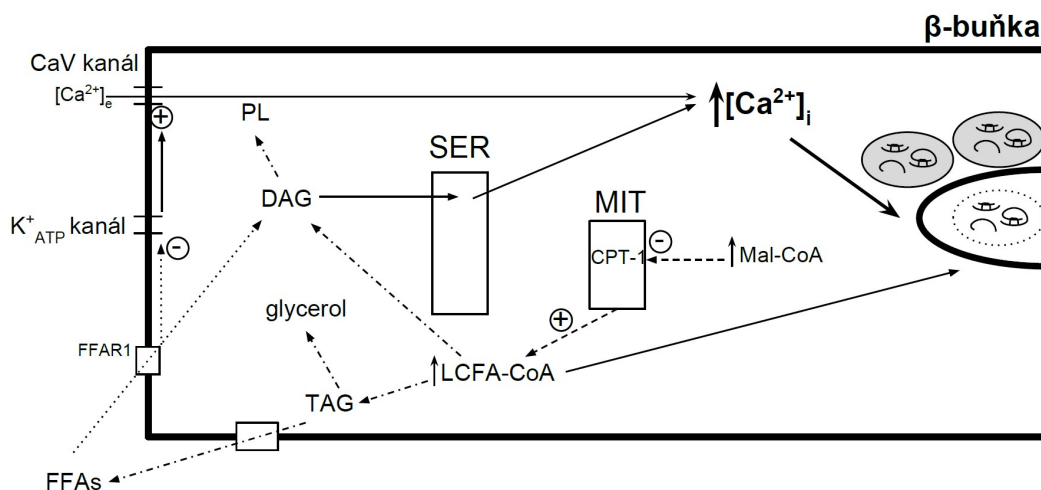
Komatsu et al. (1997) uvádí, že pravděpodobně posílená signální dráha se účastní na tzv. časově-závislém posílení inzulínové sekrece (TDP, Time-Dependent Potentiation). TDP byla pozorována nejen po podání glukózy, ale i po podání jiných sekretagog (Grill 1982; Zawulich 1988) a dochází při ní k přetrvávající (až několika hodinové) inzulínové sekrece již bez závislosti na přímém působení inzulínových sekretagog (Grodsky et al. 1969). TDP zesiluje inzulínovou sekreci vyvolanou různými signálními drahami a závisí mj. na časovém intervalu mezi expozicemi či na délce expozice a koncentraci stimulační látky (Grill a Rundfeldt 1979; Nesher a Cerasi 2002).

Mastnými kyselinami stimulovaná inzulínová sekrece

V přehledové práci Nolan et al. (2006) popisuje tři metabolické signální dráhy, kterými volné mastné kyseliny (FFAs, Free Fatty Acids) zesilují GSIS. Intracelulární metabolismus FFAs je podstatou prvních dvou úzce kooperujících metabolických cest. Třetí metabolická dráha je dána přímým účinkem FFAs na membránový receptor (obrázek 6).

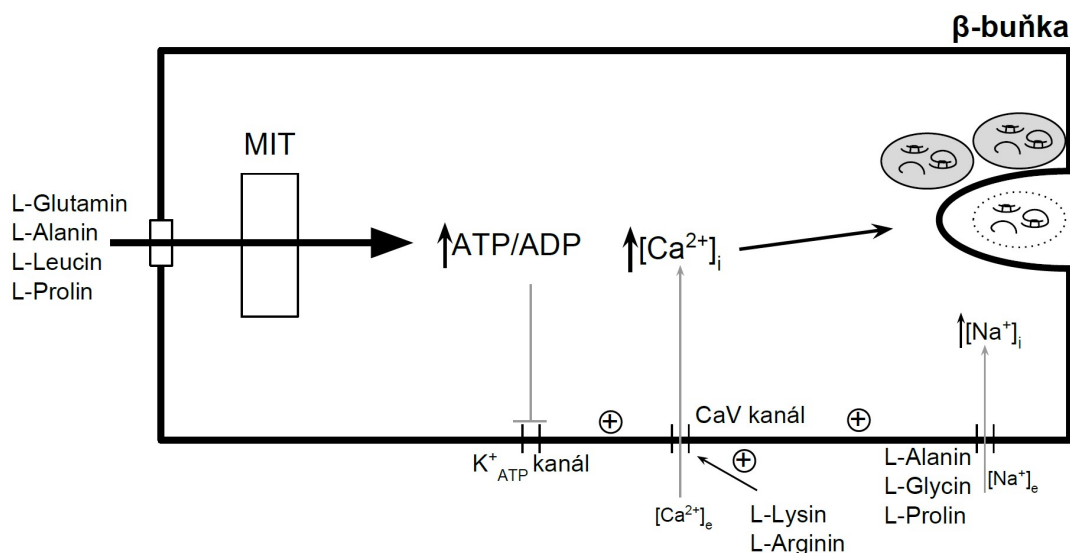
Aminokyselinami stimulovaná inzulínová sekrece

Od druhé poloviny 20. století je známo, že bílkoviny stimulují inzulínovou sekreci (Floyd et al. 1966). Perorálně či intravenózně podané jednotlivé aminokyseliny nebo jejich směsi v různé míře stimulují inzulínovou sekreci (obrázek 7). Perorálně podané aminokyseliny zesilují GSIS přímým působením na β -buňky a přes aktivaci inkretinových hormonů (van Loon 2007).



Obrázek 6 Mastnými kyselinami stimulovaná inzulinová sekrece.

První signální dráha (čárkovaná čára) je označena jako „Mal-CoA/LCFA-CoA“. Principem této metabolické dráhy je intracelulární zvýšení koncentrace malonyl-koenzymu A (Mal-CoA, Malonyl-Coenzyme A). Mal-CoA inhibuje oxidaci FFAs v mitochondriích (MIT, MITochondria) karnitin palmitoyl transferázou 1 (CPT-1, Carnitine PalmitoylTransferase 1) a dochází tak v cytosolu β -buňky ke zvýšené koncentraci esterů koenzymů mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCFA-CoA, Long-Chain Fatty Acyl-CoA). Zvýšené koncentrace LFCA-CoA se dále účastní na procesu inzulinové sekrece přímo či jako součást druhé signální dráhy. Druhá signální dráha (čerchovaná čára) je označována jako „TG/LCFA-CoA“. LCFA-CoA jsou esterifikovány s glycerol-3-fosfátem na komplexní lipidy resp. triacylglyceroly (TAG, TriAcylGlyceride), diacylglyceroly (DAG, DiAcylGlycerol) a fosfolipidy (PL, PhosphoLipides), které následně podléhají lipolýze. Třetí mechanismus (tečkovaná čára) je dán aktivací membránového receptoru FFAR1. Vysvětlivky: SER (hladké endoplazmatické retikulum, Smooth Endolasmatic Reticulum). Upraveno dle Nolana et al. (2006).



Obrázek 7 Aminokyselinami stimulovaná inzulinová sekrece.

Aminokyseliny stimulují inzulinovou sekreci několika mechanismy: 1) samotnou depolarizací plazmatické membrány (l-lysin, l-arginin), 2) zvýšením $[Na^+]_i$ s následnou depolarizací plazmatické membrány (l-alanin, l-glycin, l-prolin) a 3) zvýšeným poměrem ATP/ADP (l-leucin, l-prolin, l-glutamin, l-alanin). Upraveno dle Liu et al. (2012).

Dle schopnosti endogenní biosyntézy dělíme aminokyseliny na esenciální a neesenciální. Ve vztahu k metabolismu glukózy dělíme aminokyseliny na glukogenní a neglukogenní neboli ketogenní. L-aspartát, l-arginin, l-serin, l-histidin, l-cystein, l-glutamin, l-metionin, l-valin, l-glutamát, l-prolin, l-glycin, l-alanin jsou zástupci glukogenních aminokyselin, které se metabolizují na α -ketoglutarát, pyruvát, oxalacetát, fumarát nebo sukcinyl-CoA a účastní se glukoneogeneze tj. biosyntézy glukózy. L-leucin a l-lysin jsou neglukogenní aminokyseliny, které se metabolizují na acetyl-koenzym A a acetoacetát. L-isoleucin, l-threonin, l-tryptofan, l-fenylalanin a l-tyrosin se také metabolizují na acetyl-koenzym A a acetoacetát (Brosnan 2003).

Větvené aminokyseliny (BCAAs, Branched Chain Amino Acids) patří mezi nejvíce inzulinotropní aminokyseliny (Nilsson et al. 2004). Mezi BCAAs patří esenciální l-leucin, l-isoleucin a l-valin. Perorálně i intravenózně podaný l-leucin je označován za nejvýznamnější inzulinové sekretagogum mezi BCAAs (Fajans et al. 1963; Floyd et al. 1963). L-leucin stimuluje inzulinovou sekreci i při hladinách normoglykémie (Gao et al. 2003) v zásadě třemi metabolickými dráhami: 1) oxidativní dekarboxylací α -ketoisokaproátu a 2) glutaminolýzou respektive allosterickou aktivací glutamátdehydrogenázy (Liu et al. 2003). Obě metabolické dráhy jsou součástí mitochondriálního metabolismu za vzniku acetyl-koenzymu A, acetoacetátu, adenosintrifosfát a citrátu. Třetí mechanismus aktivovaný l-leucinem se podílí na regulaci proteosyntézy včetně biosyntézy inzulínu přes rapamycin-senzitivní serin/threonin kinázu (Xu G. et al. 2001).

2.4 β -buněčná dysfunkce

Pacienti s diabetes mellitus 2. typu jsou charakterizováni chronickou hyperglykemií. Při rozvoji diabetu 2. typu je většinou nejprve přítomna postprandiální hyperglykémie a až poté hyperglykémie nalačno. Dle přehledové práce DeFronza (2009) přispívá ke vzniku hyperglykémie u pacientů s diabetes mellitus 2. typu těchto osm složek:

- 1) zvýšená endogenní produkce glukózy,
- 2) zvýšená sekrece glukagonu,
- 3) β -buněčná dysfunkce,
- 4) snížení inkretinového efektu,
- 5) zvýšená lipolýza,
- 6) zvýšená reabsorpce glukózy v ledvinách,
- 7) zvýšená inzulinová rezistence a

8) dysfunkce neurotransmiterů.

Je známo, že β -buněčná dysfunkce je primární poruchou vedoucí (při přítomné inzulínové rezistenci) k manifestaci diabetes mellitus 2. typu.

2.5 Stimulační testy inzulínové sekrece

V metabolických studiích je test běžně definován konkrétní podanou látkou (včetně jejího množství a délky podání) a odběrem biologického materiálu (většinou žilní krve) ke stanovení hladin analytů (inzulín/C-peptid, glykémie) v jednotlivých časových intervalech.

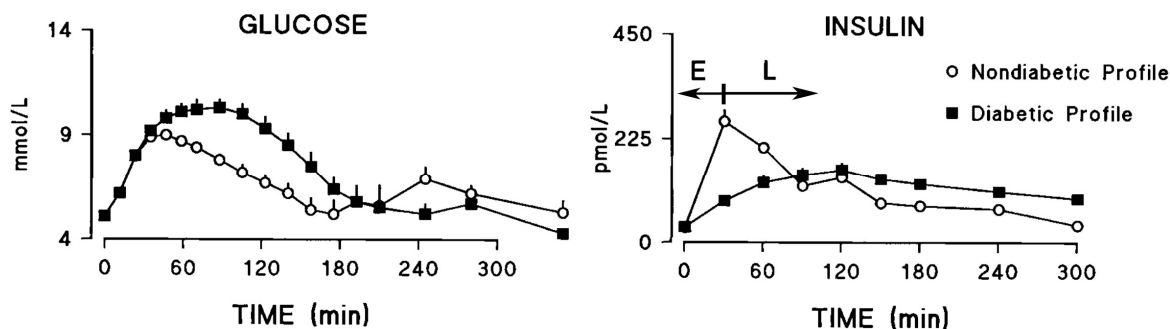
Před provedením testu musí být v první řadě rozhodnuto, zda je jeho absolvování pro pacienta bezpečné. Zpočátku tedy musí být zhodnoceny tzv. absolutní a relativní kontraindikace testu. Například testy s podáním glukózy či glukagonu jsou hyperglykemizující a u pacientů s diabetes mellitus 2. typu mohou vést k dekompenzaci diabetu s nutností podání exogenního inzulínu. Test by dále neměl absolvovat jedinec s akutním onemocněním či s poruchou ledvinných funkcí.

Pokud je rozhodnuto, že test bude proveden, je nutné absolvovat tzv. přípravu před testem, tak aby byly zachovány standardní podmínky provedení testu. Často je v literatuře užívána příprava, která je doporučena před provedením orálního glukózového tolerančního testu (OGTT, Oral Glucose Tolerance Test; de Veegt et al. 1998). Tedy tři dny před uskutečněním testu by měla být podávána strava s minimálním obsahem 150 g sacharidů za den a měla by být vynechána extrémní fyzická zátěž. Před vlastním testem by mělo být zajištěno minimálně osmihodinové lačnění včetně vynechání kouření. Před podáním testované látky je doporučováno zajistit minimálně 20 minut klidu na lůžku či vsedě. Během testu by měl být jedinec v klidu. V tabulce 2 jsou znázorněny základní charakteristiky jednotlivých testů užívaných často v experimentálních pracích.

Mezi nejčastěji užívané perorální testy patří OGTT a test založený na podání smíšené stravy (MMTT, Mixed Meal Tolerance Test). Výsledek testu inzulínové sekrece po podání perorálního stimulu je závislý na několika proměnných – na funkci nervového systému, na funkci gastrointestinálního traktu (na motilitě jícnu, na rychlosti vyprazdňování žaludku, na motilitě střeva, na trávení a na vstřebávání živin v gastrointestinálního traktu, na účinku inkretinů), na zastoupení nutrientů v krevním oběhu a tedy na vlastním účinku substrátů na β -buňku. Každý z těchto faktorů tak může ovlivnit inzulínovou sekreci. Po perorálním podání stimulu se cefalická, gastrointestinální a substrátová fáze inzulínové sekrece promítá do dvou fází tzv. časně a pozdní fáze inzulínové sekrece (graf 4).

Tabulka 2 Přehled nejčastěji užívaných testů inzulinové sekrece.

Zkratka testu	Název testu	Dávka stimulační látky (délka podání)	Časy odběrů (inzulin/C-peptid, glukóza)	Reference	Nežádoucí účinky		
p.o.	Orální glukózový toleranční test	Oral Glucose Tolerance Test	75 g glukózy + 300 ml vody (3-5 minut)	-10 (lačná hodnota), 0 (po podání glukózy), 30, 60, 90, 120, 150, 180 min	Pettitt et al. 1980; WHO 1985	nauzea, zvracení, hyperglykémie, tromboflebitida	
	Test se smíšenou stravou	Mixed Meal Tolerance Test	6 ml/kg (max. 360ml) nutriční Boost® (Nestlé; 5 minut) 200 ml nutriční Fresubin Energy drink® (Fresenius Kabi; 30 minut) 100 g chleba (45 g sacharidu), 1 žervé nebo 1 lučina, popř. 125 g nízkotučného tvarohu a 1 vejce (10-15 minut)	-10 (lačná hodnota), 0 (po podání glukózy), 30, 60, 90, 120, 150, 180 min	Greenbaum et al. 2008 Marimussen et al. 2015 Zaccaria et al. 1979	nauzea, zvracení, hyperglykémie, tromboflebitida	
i.v.	Intravenózní glukózový toleranční test	Intravenous Glucose Stimulation Test	Inzulínem upravený FSIVGTT: 50 % roztok 0,3 g glukózy/kg (1 minuta), ve 20. minutě testu je podán intravenózní bolus inzulinu 30 % roztok 0,5 g glukózy/kg (2 - 4 minuty)	-15 (lačná hodnota), - 5 (lačná hodnota), 0 (po podání glukózy), 3, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 32, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 140, 160, 180 min -10 (lačná hodnota), 0 (po podání glukózy), 1, 3 min -10 (lačná hodnota), 0 (po podání glukózy), 1, 3, 5, 7, 10, 30, 60, 120 min	Bergman et al. 1981; Toffolo et al. 1999; Marimussen et al. 2015 Bardet et al. 1989 Chaillous et al. 1996	hyperglykémie, tromboflebitida	
	AST	Arginínový stimulační test	Arginine Stimulation Test	50 % roztok 0,5 g glukózy/kg (30 sekund)	-10 (lačná hodnota), - 5 (lačná hodnota), 0 (po podání glukózy), 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 min	Brändle et al. 2001	nevolnost, zvracení, bolest břicha, alergická reakce, tromboflebitida
				25 % roztok 0,5 g glukózy/kg (3 minut) + kontinuální podání 20 mg glukózy/kg po dobu 60. minut	-10 (lačná hodnota), 0 (po podání glukózy), 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 min	Ikkos a Luft 1957	
				5 g arginin hydrochloridu + 50 ml 0,9 % fyziologického roztoku (45 s)	-5 (lačná hodnota), 0 (po podání argininu), 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 min, podáno při lačné normoglykémii, při glykémii 14 a 25 mmol/l	Ward et al. 1984; Palmer et al. 1975; Larsson a Ahren 1998; Greenbaum et al. 2004 Chaillous et al. 1996	
	GST	Glukagonový stimulační test	Glucagon Stimulation Test	1 g glukagonu (10 sekund)	-10 (lačná hodnota), 0 (po podání argininu), 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30 min	Chaillous et al. 1996	nauzea (až 100 % subjektů), tachykardie, tachypnoe, tromboflebitida
2 g glukagonu + 60 ml 0,9 % fyziologického roztoku (1 minuta)				-10 (lačná hodnota), 0 (po podání glukagonu), 2, 4, 6, 8, 10 min -10 (lačná hodnota), 0 (po podání glukagonu), 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30 min	Faber a Binder 1977; Gottsäter et al. 1992; Greenbaum et al. 2008 Bardet et al. 1989; Chaillous et al. 1996		



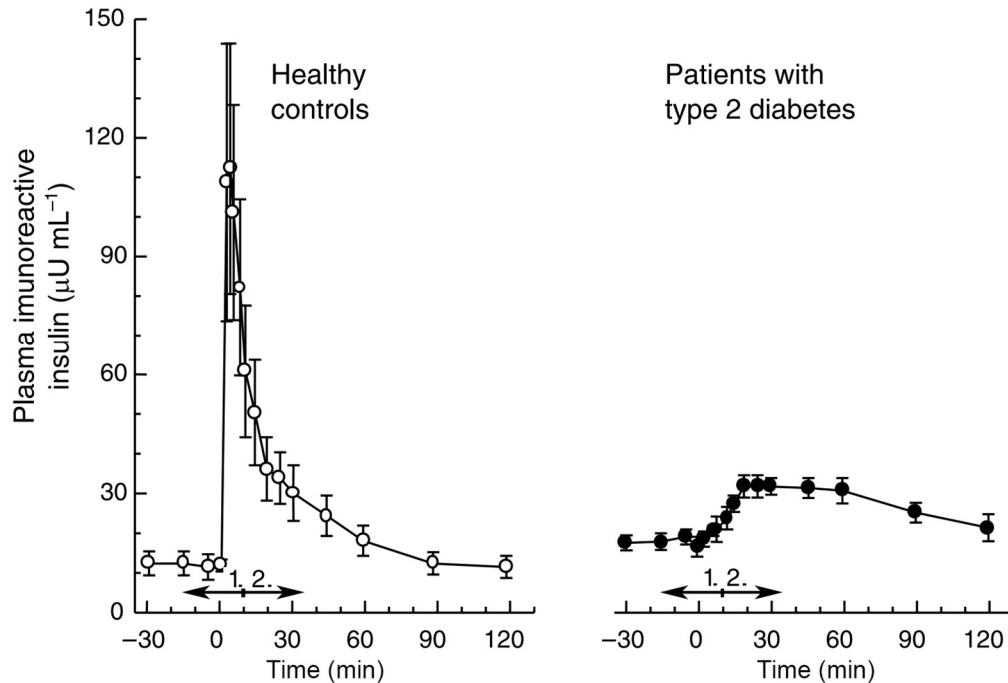
Graf 4 Zhodnocení hladiny glykémie (vlevo) a inzulínové sekrece (vpravo) u neobězních zdravých jedinců (Nondiabetic Profile) a u neobězních pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Diabetic Profile) po podání MMTT.

V grafu je označena tzv. časná (E; do 30. minuty po podání stimulu) a pozdní fáze (L; od 30. do 300. minuty po podání stimulu) inzulínové sekrece. Převzato z práce Basuové et al. (1996).

Mezi nejčastěji užívané intravenózní testy patří intravenózní glukózový toleranční test (IVGTT, IntraVenous Glucose Tolerance Test), argininový stimulační test (AST, Arginin Stimulation Test) a glukagonový stimulační test (GST, Glucagon Stimulation Test). Intravenózní testy obcházejí gastrointestinální trakt, a proto jsou nefyziologickými stimuly inzulínové sekrece a mohou mít více nežádoucích účinků než testy perorální. Vzhledem k většímu množství nežádoucích účinků a nutnosti odběrů v krátkých časových intervalech je nutná přítomnost erudovaného personálu během provedení testu. Po intravenózním podání stimulu se inzulínová sekrece promítá do dvou fází tzv. první a druhé fáze inzulínové sekrece (graf 5). Hovoříme o takzvané bifázické inzulínové sekreci v čase (Curry et al. 1968; Cerasi a Luft 1967). Originální práce autorů Cerasiho a Lufta (1967) se týkala charakteristiky inzulínové sekrece po intravenózním podání glukózy u zdravých jedinců a u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Tato práce je zpracována velmi precizně a s jejími závěry lze více než souhlasit i dnes. E. Cerasi a R. Luft ukázali výraznou individuální variabilitu stimulované inzulínové sekrece po intravenózním podání glukózy u zdravých jedinců i u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Velmi zajímavé a prakticky důležité je zjištění, že jedinci s normální hladinou inzulínu/C-peptidu nalačno, kteří jsou označeni jako „zdraví“ ve vztahu ke glukózovému metabolismu, mohou mít:

- 1) tzv. „fyziologickou“ první i druhou fázi inzulínové sekrece resp. optimální β -buněčnou funkci,
- 2) tzv. „hyperinzulinémií“ tj. troj- a vícenásobné zvýšení první i druhé fáze inzulínové sekrece oproti hodnotě nalačno a

- 3) tzv. „fyziologickou“ druhou fází, ale nedostatečně zvýšenou první fází po intravenózním stimulu glukózou. Třetí skupina dosud zdravých jedinců by měla být považována dle autorů za potenciální diabetiky.



Graf 5 Inzulínová a glykemická odpověď po podání intravenózní glukózy u zdravých jedinců (Healthy controls) a u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Patients with type 2 diabetes).

Průměrná plazmatická hladina glukózy nalačno byla u zdravých jedinců $4,7 \pm 0,2$ mmol/l a u pacientů s diabetes mellitus 2. typu $8,9 \pm 0,6$ mmol/l. V grafu je vyznačena první (1.) a druhá (2.) fáze inzulínové sekrece po intravenózním stimulu. Převzato z práce Bergmana et al. (2002).

I přes individuální charakteristiku stimulované inzulínové sekrece u zdravých jedinců dochází s věkem k přirozenému mírnému snižování stimulované inzulínové sekrece a k sekreci zvýšeného poměru proinzulínu/inzulínu při mírně rostoucí inzulínové rezistenci za podmínek normoglykémie (Fritsche et al. 2002).

Zvyšující se hladina glykémie úměrně zvyšuje první fázi inzulínové sekrece po neglukózovém stimulu (Ward et al. 1984). Maximální potenciace glukózou po podání neglukózového stimulu (5 g argininu) je dosaženo při hladině glykémie 25 mmol/l. Uvádí se, že za těchto podmínek můžeme zhodnotit maximální β -buněčnou sekreční kapacitu u zdravých jedinců.

2.5.1 Časná fáze inzulínové sekrece

Zdraví jedinci

U zdravých jedinců dochází po podání perorálního stimulu k rychlému vzestupu inzulínové sekrece většinou s maximem hodnot v 30. minutě. Časový interval od podání perorálního stimulu do 30. minuty je běžně označován jako časná fáze inzulínové sekrece (Curry et al. 1968; Caumo a Luzi 2004).

Časná fáze inzulínové sekrece je zprostředkována CPIR, gastrointestinální a částečně i substrátovou fází. Jaký je přesný poměr mezi těmito fázemi, není přesně známo. Teff a Engelman (1996) uvádějí, že poměr jednotlivých fází na celkové stimulované inzulínové sekreci po podání perorálního stimulu u zdravých jedinců následující - CPIR (1 – 3 %), gastrointestinální fáze (50 – 70 %) a substrátová fáze (27 – 47 %). CPIR je charakterizována zvýšenými hladinami inzulínu v žilní krvi do 2 minut po stimulu s vrcholem ve 4. minutě a s návratem k hladinám nalačno do 8. až 10. minuty po stimulaci (Berthoud a Jeanrenaud 1982). Gastrointestinální fáze je pozorována především mezi 15. – 30. minutou po perorálním podání stimulu (Roberge et al. 1996), tedy za přítomnosti stimulačních hladin glykémie (Holz a Habener 1992; Tsai et al. 1997). U zdravých jedinců se podílí na gastrointestinální fázi z 80 až 90 % GIP (Gault et al. 2003) a z 10 až 20 % GLP-1. Bylo prokázáno, že ačkoliv jsou hladiny GIP v cirkulaci vyšší než hladiny GLP-1 (Nauck et al. 1993), má GLP-1 vyšší kapacitu stimulovat inzulínovou sekreci než GIP (Elahi et al. 1994). Dále nelze opomenout, že inkretiny jsou extracelulárně štěpeny dipeptidylpeptidázou-4 (DPP-4, DiPeptidyl Peptidase-4; Yaron a Naider 1993), která tak snižuje jejich účinek na receptorech. Časná fáze inzulínové sekrece je dána uvolněním RRP granul.

Časnou fází inzulínové sekrece můžeme zhodnotit:

- 1) Pomocí znalosti hladiny inzulínu/C-peptidu nalačno a v 30. minutě po podání perorálního stimulu.

U zdravých neobézních jedinců byly ve studii Mitrakou et al. (1992) průměrné hodnoty inzulínu nalačno 49 ± 9 pmol/l ($\bar{x} \pm SEM$). Po perorálním podání glukózy (1 g glukózy na hmotnost jedince, maximálně 75 g) byla průměrná hodnota plazmatického inzulínu v 30. minutě 396 ± 42 pmol/l. Zvýšení oproti hodnotě nalačno bylo v 30. minutě tedy více než osminásobné. Průměrně pětkrát vyšší byla inzulínová sekrece po MMTT (energetický obsah: 30 kcal/kg; 50 % sacharidů, 15 % bílkovin a 35 % tuku) v porovnání s hodnotou nalačno (Polonsky et al. 1988).

2) Pomocí výpočtu plochy pod křivkou mezi nultou a 30. minutou (AUC_{0-30} , Area Under the Curve₀₋₃₀) po podání perorálního stimulu (Ahrén a Pacini 2004; Retnakaran 2008) nebo jako inkrementální (přírůstkovou) plochu pod křivkou mezi nultou a 30. minutou ($iAUC_{0-30}$, Incremental Area Under the Curve₀₋₃₀; Retnakaran 2008).

3) Pomocí výpočtu inzulinogenního indexu (IGI, Insulinogenic Index), který koreluje ($r = 88$, $p < 0,01$) s první fází inzulinové sekrece po podání intravenózní glukózy (Kosaka et al. 1996).

Průměrné hodnoty IGI u zdravých jedinců byly $1,28 \pm 0,6 \cdot 10^{-3}$ (Wopereis S. et al. 2017).

4) Pomocí indexu inzulinové sekrece počítané jako $\Delta I_{0-30} / \Delta G_{0-30}$ (Utzschneider et al. 2009).

Průměrné hodnoty indexu inzulinové sekrece u zdravých jedinců byly $105,7 \text{ pmol/mmol}$ (Utzschneider et al. 2009) a $157,7 \pm 9,7 \text{ pmol/mmol}$ (Jensen et al. 2002).

Pacienti s prediabetem a diabetes mellitus 2. typu

Ke snížení časné fáze inzulinové sekrece dochází dle Faercha et al. (2009) již několik let před rozvojem poruchy glukózové tolerance. Časná fáze inzulinové sekrece po podání perorálního stimulu je u pacientů s diabetes mellitus 2. typu snížena nikoliv vymizelá (Ferrannini a Mari 2004).

Uvádí se několik patogenetických mechanismů, které se podílejí na snížení časné fáze inzulinové sekrece u jedinců s předpokládanou genetickou predispozicí (Ward et al. 1984):

- 1) kvantitativní porucha inzulinové sekrece resp. úbytek 40 - 80 % z celkové původní β -buněčné masy (Unger 1995; Prentki et al. 2002; Chang-chen et al. 2008; Oh 2015), např.: defekt inzulinového genu; amylinová depozita; nerovnováha mezi neogenezí, proliferací a buněčnou hypertrofií na jedné straně a mezi apoptózou na straně druhé; glukolipotoxicita respektive oxidační stres; porucha metabolických signálních drah; stres endoplazmatického retikula,
- 2) kvalitativní porucha inzulinové sekrece, např.: ztráta pulzativity (O'Meara et al. 1993; Bergman et al. 2002); zvýšený poměr proinzulín/inzulín v sekrečních granulech (DeFronzo et al. 1992; Larsson a Ahrén 1999; Bergman et al. 2002); nižší $[Ca^{2+}]$; nesprávná fúze granul s buněčnou membránou (Ellison et al. 2008),
- 3) přítomnost inzulinové rezistence (Ward et al. 1984) a
- 4) nedostatečná suprese endogenní tvorby glukózy játry při nedostatečné inzulinové sekreci (Mitrakou et al. 1992).

Je známo, že u pacientů s diabetes mellitus 2. typu je snižená účinnost inkretinových hormonů na β -buňku, která je zřejmě zodpovědná i za poruchu časně fáze inzulínové sekrece (Seino et al. 2010). Hladiny GIP a GLP-1 jsou obecně u pacientů s diabetes mellitus 2. typu sníženy v porovnání se zdravými jedinci. Dle Naucka et al. (1986) je u pacientů s diabetes mellitus 2. typu spoluúčast inkretinů na celkové inzulínové sekreci $36 \pm 8,8 \%$ (oproti 50-70 % podílu na inzulínové sekreci u zdravých jedinců dle Teffa a Engelmana 1996). Více než GIP (Ross et al. 1977; Creutzfeld et al. 1980) je snižená sekrece GLP-1 (Holst a Gromada 2004). Současně je na plazmatické membráně β -buněk snižená koncentrace receptorů pro GIP, ale zachována koncentrace receptorů pro GLP-1 (Holst a Gromada 2004), čehož se využívá při léčbě analogy GLP-1. Nelze opomenout, že účinnost inkretinů je snížena štěpením DPP-4 (Yaron a Naider 1993).

U pacientů s poruchou glukózové tolerance je průměrná hladina inzulínu nalačno vyšší a průměrná hladina inzulínu v 30. minutě po podání perorálního stimulu cca o 40 % nižší v porovnání se zdravými jedinci.

V práci Mitrakou et al. (1992) byly zjištěny průměrné hodnoty inzulínu nalačno 75 ± 23 pmol/l u neobězních pacientů a 126 ± 31 pmol/l u obězních s poruchou glukózové tolerance. Po perorálním podání glukózy (1g glukózy na hmotnost jedince, maximálně 75 g) byla průměrná hodnota plazmatického inzulínu v 30. minutě 244 ± 35 pmol/l u neobězních pacientů a 279 ± 29 pmol/l u obězních pacientů s poruchou glukózové tolerance. U neobězních pacientů byl vzestup do 30. minuty průměrně trojnásobný a u obězních pacientů s poruchou glukózové tolerance průměrně dvojnásobný.

Průměrná hodnota IGI u pacientů s prediabetem byla $0,27$ mU/l/mg/dl (Oka et al. 2012).

Průměrná hodnota $\Delta I_{0-30}/\Delta G_{0-30}$ byla u prediabetiků $77,9 \cdot 10^{-3}$ (Utzschneider et al. 2009).

Po perorální podání stejného množství glukózy byla u pacientů s diabetes mellitus 2. typu pozorována nižší inzulínové odpovědi než u zdravých jedinců (Nauck et al. 1986; Rosetti et al. 1990; Bergman et al. 2002). Pravděpodobně se jedná o sniženou odpověď β -buňky na glukózový stimul. Na druhou stranu u neglukózového stimulu nedochází u těchto pacientů k tak výraznému snížení inzulínové sekrece (Ward et al. 1984; Prentki et al. 2002).

Průměrné hodnoty IGI u pacientů s diabetes mellitus 2. typu byly $0,26 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$ (Wopereis et al. 2017). Průměrné hodnoty $\Delta I_{0-30}/\Delta G_{0-30}$ byly u pacientů s diabetes mellitus 2. typu $57,5 \pm 7,3 \cdot 10^{-3}$ (Jensen et al. 2002).

2.5.2 Pozdní fáze inzulínové sekrece

Zdraví jedinci

Stimulovaná inzulínová sekrece po podání perorálního stimulu v časovém intervalu od 30. minuty do návratu k hodnotě inzulínu/C-peptidu nalačno (v intervalu přibližně do 120. či 180. minuty) je označována jako pozdní fáze inzulínové sekrece (Curry et al. 1968; Caumo a Luzi 2004). Tato fáze je podmíněna jednak účinkem inkretinů, jejichž uvolnění pokračuje i mezi 90. a 120. minutou po podání perorálního stimulu (Roberge et al. 1996), a jednak především substrátovou fází (Rehfeld a Stadil 1973) inzulínové sekrece. Během této fáze dochází k mobilizaci nově syntetizovaných granul, která se přes SGP a RRP granula uvolňují z β -buněk. Pozdní fáze inzulínové sekrece po perorálním stimulu se často nestanovuje. *Spíše se stanovuje celková inzulínová sekrece po podání stimulační látky například jako průměrná $iAUC_{0-120}$.*

Pacienti s prediabetem a diabetes mellitus 2. typu

Dle charakteru pozdní fáze inzulínové sekrece můžeme velmi zjednodušeně pacienty s diabetes mellitus 2. typu rozdělit do dvou skupin a to na pacienty se „zachovalou“ stimulovanou inzulínovou sekrecí a na pacienty s „vyhaslou“ stimulovanou inzulínovou sekrecí. První skupina pacientů má dle hladin inzulínu/C-peptidu určitým způsobem zachovalou sekreční schopnost β -buněk a tedy po perorálním podání stimulační látky u nich dochází k uvolnění inzulínu/C-peptidu do žilní krvi. U druhé skupiny pacientů nedochází po stimulu k výraznému vzestupu inzulínové sekrece (tj. maximální hladina inzulínu/C-peptidu po podání stimulu nedosahuje dvojnásobku hladiny nalačno). Pacienti se zachovalou stimulovanou sekrecí dosahují maximální hladiny inzulínu/C-peptidu nejdříve po 60. minutě po podání perorálního stimulu. U pacientů s vyhaslou stimulovanou inzulínovou sekrecí nevede substrátová fáze k výrazné sekreci inzulínu/C-peptidu tak, aby byla zajištěna normoglykémie nalačno. U těchto pacientů je méně pravděpodobné, že budou mít perorální antidiabetika typu inzulínových sekretagog léčebný efekt.

Průměrně 2 až 2,5krát byla zvýšena inzulínová sekrece po MMTT v porovnání s lačnou hodnotou u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Polonsky et al. 1988). Pozdní fáze inzulínové sekrece po perorálním stimulu se často nestanovuje.

2.5.3 První fáze inzulínové sekrece

Zdraví jedinci

Bifázická inzulínová sekrece po intravenózním podání glukózy vzniká přímým vlivem stimulačních hladin glykémie v závislosti na koncentraci podané glukózy a délce působení

v žilní krvi. Větší množství inzulínu/C-peptidu je uvolněno při druhé fázi inzulínové sekrece (Straub et al. 1998). Inzulínová sekrece po intravenózním podání glukózy má proto celkově rychlý průběh, ale množství uvolněného inzulínu je u zdravých jedinců celkově nižší v porovnání s podáním stejného množství glukózy perorálně (Nauck et al. 1986).

První fáze je někdy označována jako akutní inzulínová odpověď (AIR, Acute Insulin Response), která vzniká po rychlém intravenózním podání výrazného množství glukózy. Pokud je podání glukózy pomalé či její koncentrace je nízká dochází ke vzniku monofázické inzulínové sekrece (Grodsky 1972).

Dle Bergmana (1989) se první fáze inzulínové sekrece podílí z 38 % na celkové inzulínové sekreci u zdravých jedinců. První fáze inzulínové sekrece po podání glukózy je dána uvolněním RRP granul (Henquin et al. 2002). Vyplavování těchto granul může trvat i více než 5 minut po začátku stimulace glukózou (Rorsman et al. 2000). První fáze začíná 1 až 3 minuty po intravenózním podání glukózy, dosahuje maxima mezi 3. a 5. minutou (Ward et al. 1984) a trvá typicky do 10 minut (Rorsman et al. 2000; Shibasaki et al. 2007; Fu et al. 2013).

Dle Cerasiho (1975) může nastat u zdravých jedinců:

- 1) tzv. „fyziologická“ první fáze inzulínové sekrece (tj. od dvoj- po trojnásobek lačných hodnot),
- 2) tzv. „hyperinzulinémií“ tj. troj- a vícenásobné zvýšení první fáze inzulínové sekrece oproti hodnotě nalačno.

Po AST byla průměrná hladina první fáze inzulínové sekrece při normoglykémii počítána jako průměrná hodnota mezi 2. - 5. minutou po podání 5 g argininu po odečtením bazální hodnoty $AIR_{normoglykémie} = 338 \pm 189 \text{ pmol/l}$ (Kahn et al. 2001; Ahrén a Larsson 2002). Na hladině glykémie 14 byla průměrná hodnota první fáze inzulínové sekrece $AIR_{14} = 880 \pm 499 \text{ pmol/l}$ a na hladině glykémie 25 mmol/l byla $AIR_{25} = 1056 \pm 617 \text{ pmol/l}$. Průměrná AUC_{0-10} byla $1083,2 \pm 132,5 \text{ pmol/l} \cdot \text{min}$ (Brändle et al. 2001). Po podání 1 g glukagonu (Viltsbøll et al. 2000) bylo pozorováno maximum hodnot mezi 6. - 10. minutou s absolutní hodnotou $360 \pm 39 \text{ pmol/l}$. Po IVGTT došlo k maximu ve 3. minutě s průměrnou hladinou 350 pmol/l , tedy k pětinasobnému zvýšení. Maximální hodnota inzulínové sekrece vyvolaná glukózou byla $326,4 \pm 41,6 \text{ pmol/l}$ (DeFronzo et al. 1979).

Pacienti s prediabetem a diabetes mellitus 2. typu

U pacientů s prediabetem a diabetes mellitus 2. typu není první fáze inzulínové sekrece po podání intravenózního stimulu přítomna (Cerasi a Luft 1967; Pfeifer et al. 1981; DeFronzo et al. 1992). Ztráta první fáze inzulínové sekrece je u nediabetiků prvním ukazatelem β -buněčné

dysfunkce (Simpson et al. 1968; Cerasi et al. 1972; Weir 1982; Calles-Escadon et al. 1987; Luzi a DeFronzo 1989; Hosker et al. 1989; Leahy 1990).

Porucha první fáze inzulínové sekrece byla zjištěna, pokud nebyla dostatečně zvýšena $[Ca^{2+}]_i$ (Henquin et al. 2002) a pokud byla přítomna porucha exocytózy s celkově nižším množstvím SGP granul (Rorsman et al. 2000; Ostenson et al. 2006; Ohara-Imaizumi et al. 2007).

2.5.4 Druhá fáze inzulínové sekrece

Zdraví jedinci

Druhá fáze je závislá na hladině stimulující glykémie a délce jejího působení. Druhá fáze může trvat od 10. minuty až několik hodin. Druhá fáze inzulínové sekrece se podílí z 62 % na celkové inzulínové sekreci u zdravého jedince a je během ní vyplaveno v průměru dvakrát více inzulínu než v 1. fázi inzulínové sekrece (Bergman et al. 1989).

Druhá fáze inzulínové sekrece je dána především zesílením GSIS (Aizawa et al. 1998) a dále přídatným mechanismem nazvaným TDP (Gunawardana et al. 2004). Druhá fáze je zprostředkována mobilizací nově syntetizovaných granul, která se přes SGP a RRP granula uvolňují z β -buněk (Kelly 1990; Taguchi et al. 1995; Aizawa et al. 1998; Henquin et al. 2002). *Po IVGTT byla u zdravých jedinců průměrná hodnota druhé fáze inzulínové sekrece $444,5 \pm 20,1$ pmol/l (DeFronzo et al. 1979).*

Pacienti s prediabetem a diabetes mellitus 2. typu

Jak již bylo uvedeno, u pacientů s diabetes mellitus 2. typu je v porovnání se zdravými jedinci snižená celková inzulínová sekrece. Mezi jednotlivými pacienty se však hladina stimulované inzulínové sekrece liší a je tedy nutné ji posuzovat individuálně (Cerasi 1975).

Inzulínová sekrece je u pacientů s diabetes mellitus 2. typu ovlivněna pomalou mobilizací nově syntetizovaných granul, čímž dochází k jejich pomalému doplňování a následně i pomalému uvolňování z β -buňky. Přehledová práce Rorsmana et al. (2000) ukazuje, že defekt v sekreci inzulínu je zapříčiněn poruchou v glukózovém metabolismu β -buňky, kdy glukóza-6-fosfát je zpětně přeměněna na glukózu. Dochází tak k nižšímu poměru ATP/ADP, což vede jednak k poruše spuštěné signální dráhy GSIS, ale i k pomalé mobilizaci a doplňování RRP granul včetně vyšší koncentrace proinzulínu v granulech.

Stejně jako po perorálním podání stimulu můžeme pacienty s diabetes mellitus 2. typu rozdělit do dvou skupin dle hladin inzulínu/C-peptidu po intravenózním podání glukózy na skupinu se zachovalou a s vyhaslou stimulovanou inzulínovou sekrecí.

2.6 Obnova β -buněčné funkce

Zhodnocení β -buněčné funkce je užitečné i z hlediska sledování účinnosti terapeutických zásahů s cílem obnovit inzulínovou sekreci.

Řada studií prokázala, že lze do určité míry úzkou metabolickou kompenzací s cílem normoglykémie u některých pacientů s diabetes mellitus 2. typu docílit parciální obnovy první a druhé fáze inzulínové sekrece. Pozitivní vliv na zlepšení β -buněčné funkce má snížení tělesné hmotnosti (Ward et al. 1984; Dela et al. 2004) a farmakoterapie, např. deriváty sulfonylurey (Korytkowski 2002), thiazolidindiony (Bergman et al. 2002; Gastadelli et al. 2006), inhibitory DPP-4 (Sjöstrand et al. 2014), analogy GLP-1 (Egan et al. 2002; Retnakaran 2014), glifloziny (Polidori et al. 2014) či exogenní podání inzulínu (Harrison et al. 2012).

3. Poznámky k syrovátkovým bílkovinám

3.1 Mléko

Z hlediska obecného vnímání prospěšnosti potravin je základním předpokladem vhodný obsah energie a živin s minimem nežádoucích účinků na lidský organismus. Pozitivní i negativní účinky jsou tak hodnoceny po krátkodobém nebo dlouhodobém podávání. Z pohledu prospěšnosti má mléko a mléčné výrobky své podporovatele i odpůrce z řad laické i odborné veřejnosti. Společností pro výživu České republiky a stejně tak i evropskými odbornými společnostmi je doporučováno podávání mléka a mléčných výrobků dětem, těhotným a kojícím ženám a v neposlední řadě seniorům. Dle statistických údajů Českého statistického úřadu (zveřejněno 30. 11. 2017) činila v roce 2016 spotřeba kravského mléka v České republice 58,6 litru na obyvatele a jeho spotřeba meziročně neklesá.

Mezinárodní mlékárenská federace (IDF, International Dairy Federation) uvádí, že nelze jednoduše uvést přesné zastoupení jednotlivých složek různých druhů mlék. Závisí totiž velmi na plemenu živočišného druhu, věku, stravě, pohybové aktivitě, stupni tvorby a vylučování mléka z mléčné žlázy a počtu porodů zvířat. Zajímavé jsou však údaje o průměrném zastoupení hlavních živin v jednotlivých druzích známých mlék (tabulka 3). Velmi obdobné složení hlavních živin má mléko kozí, od dromedára a kravské. Průměrné zastoupení tuku je více než dvojnásobně zvýšené v losím, buvolím, ovčím a jačím mléku v porovnání s obsahem tuku v mléku kravském. Vyšší obsah tuku má také mléko mateřské a od dvouhrbého velblouda. Kobydí a oslí mléko je nízkotučné s vyšším obsahem laktózy. Losí mléko obsahuje třikrát více mléčných bílkovin, než má mléko kravské. Vyšší obsah bílkovin je také zastoupen v mléce ovčím, buvolím a jačím.

Zdá se, že krátkodobé i dlouhodobé podávání mléka a mléčných výrobků má pozitivní vliv na jednotlivé složky metabolického syndromu resp. na hladinu lipoproteinu o vysoké denzitě (HDL, High Density Lipoproteins), na hladinu triacylglycerolu, na hladinu glykémie, na krevní tlak a na centrální obezitu (Pfeuffer et al. 2007; Tremblay a Gilbert 2009; Kim a Kim 2017). V přehledové práci Riceová et al. (2011) ukazuje, že právě mléčný tuk, vitamín D, vápník, hořčík a syrovátkové bílkoviny patří mezi ty složky mléka, které pozitivně ovlivňují jednotlivé rizikové faktory metabolického syndromu. V tabulce 4 jsou shrnuty prokázané pozitivní účinky syrovátkových bílkovin na rizikové faktory metabolického syndromu.

Tabulka 3 Přehled průměrného zastoupení hlavních živin v jednotlivých druzích známých mlék.

Mléko	Mléčná bílkovina	Mléčný sacharid	Mléčný tuk	vápník (g)	Obsah vody	Energie
Kravské (1, 2)	3,33 %	5,40 %	3,33 %	0,13	87,69 %	67 kcal
Mateřské (1)	1,03 %	6,89 %	4,38 %	0,03	87,50 %	70 kcal
Kozí (1)	3,33 %	4,58 %	2,92 %	0,13	86,50 %	58 kcal
Ovčí (1)	5,98 %	5,36 %	7,00 %	0,19	80,70 %	108 kcal
Velbloudí - jednohrbý (2)	3,10 %	4,30 %	3,20 %	0,11	89,00 %	56 kcal
Velbloudí - dvouhrbý (2)	3,90 %	4,20 %	5,00 %	0,15	84,80 %	76 kcal
Buvolí (2)	4,00 %	4,40 %	7,40 %	0,19	83,00 %	99 kcal
Jačí (3)	5,20 %	4,80 %	6,80 %	0,29	82,60 %	89 kcal
Kobylí (2)	1,90 %	6,60 %	1,60 %	0,10	89,00 %	46 kcal
Oslí (2)	1,60 %	6,40 %	0,70 %	0,09	91,00 %	50 kcal
Losí (2)	10,50 %	2,60 %	8,60 %	0,28	76,80 %	129 kcal

Obsah ve 100ml

(1) USDA 2016

(2) Medhammer et al. 2012

(3) Li et al. 2010

Tabulka 4 Přehled pozitivních účinků syrovátkových bílkovin na jednotlivé rizikové faktory metabolického syndromu.

Vliv syrovátkových bílkovin na rizikový faktor	Mechanismus účinku	Reference	
Snížení tělesné hmotnosti	Snížení tukové hmoty	Baer et al. 2011; Frestedt et al. 2008	
	Navození sytosti	zvýšení cholecystokininu	Bowen et al. 2006
		zvýšení GLP- 1	Veldhorst et al. 2009
		snížení ghrelinu	Kasim-Karacas et al. 2007
		aminokyselinový profil	Veldhorst et al. 2009
Snížení triacylglycerolu	Snížení energetického příjmu	Akhavan et al. 2010	
	Zvýšená termogeneze	Acheson et al. 2011	
	Preferenční tvorba svalů (leucin)	Boirie et al. 1997; Pennings et al. 2011	
Snížení krevního tlaku	Snížená produkce chylomikronů, jejich zvýšená clearance, stimulace lipoproteinové lipázy	Mortensen et al. 2009; Pal et al. 2010	
Snížení krevního tlaku	Peptidy syrovátky (tzv. laktokiny) jako inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu	Pal et al. 2010	
Snížení inzulínové rezistence	Zvýšená inzulínová sekrece, snížená glykémie	Pal et al. 2010	
Snížení glykémie	Snížení tukové hmoty	Belobrajdic et al. 2004	
	Zvýšená inzulínová sekrece	Mortensen et al. 2009; van Loon et al. 2003	
Snížení oxidačního stresu	Zvýšená rychlost vyprazdňování žaludku	Akhavan et al. 2010	
	Zvýšení glutathionu	Zavorsky et al. 2007; Hamad et al. 2011	

3.2 Mléčné bílkoviny

Mléčné bílkoviny tvoří heterogenní skupinu proteinů a peptidů, které rozdělujeme na kaseiny a syrovátkové bílkoviny. Poměr obou hlavních mléčných bílkovin se mezi jednotlivými druhy mlék liší (viz výše). Je však známo, že v kravském mléce je průměrné zastoupení kaseinu 80 % a syrovátkových bílkovin 20 %. Více syrovátkových bílkovin je obsaženo v mléce mateřském (80 %), kobyším (46 %), oslím (41,2 %) a jačím (40 %).

Kaseiny sestávají z α S1- (32 %), α S2- (8 %), β - (28 %), κ - (12 %) frakce a tvoří takzvané micely, což jsou útvary s hydrofobní jádrem a hydrofilním povrchem (FAO 2013). Syrovátkové bílkoviny jsou obsaženy v takzvané syrovátce, tekutině, která vzniká po vysrážení kaseinu z mléka při výrobě sýrů. Syrovátkové bílkoviny jsou ve vodě rozpustné globulární bílkoviny složené (Adams a Broughton 2016) z α -laktalbuminu (3,7 %), β -laktoglobulinu (9,8 %), glykomakropeptidu (3 %) a zbylých 3,5 % tvoří dalších složky (imunoglobulin, bovinní sérový albumin, chymosin, laktoferin, lysozym, laktoperoxidáza a růstové faktory). Kromě syrovátkových bílkovin je v syrovátce zastoupen mléčný tuk (průměrně 0,1 %), laktóza (průměrně 4,9 %), minerály a vitamíny.

Syrovátka a syrovátkové bílkoviny začaly být až ve 20. století ceněnou složkou stravy. V současné době patří mezi takzvané funkční potraviny, které jsou zdraví prospěšné od dětství až po stáří jedince. Kromě sušené syrovátky se můžeme setkat i s klasickou tekutou kyselou či sladkou formou syrovátky, která se získává jako vedlejší produkt při výrobě mléčných výrobků (sýra a tvarohu) ultrafiltrací. Takzvanou mikrofiltrací se syrovátka může získat také z mléka před výrobou sýru. Ze sušené syrovátky se vyrábějí tři podtypy výrobků s vysokým obsahem biologicky aktivních peptidů a proteinů: 1) syrovátkový proteinový koncentrát (WPC, Whey Protein Concentrate) s obsahem bílkovin v rozmezí 35 až 80 %, laktózy 10 - 55 % a tuku 2 - 10 %, 2) syrovátkový proteinový izolát (WPI, Whey Protein Isolate) a 3) syrovátkový proteinový hydrolyzát (WPH, Whey Protein Hydrolysate) s obsahem bílkovin 85-90 % (někdy i více) a s nižším obsahem laktózy (0,5 %) a tuku (0,5 %) než obsahuje WPC.

Nutriční hodnota bílkoviny je posuzována dle zastoupení esenciálních aminokyselin, jejího trávení a vstřebání v gastrointestinálním traktu a dle biologické dostupnosti jednotlivých aminokyselin. Od roku 1989 experti světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organisation) a potravinářské a zemědělské organizace spojených národů (FAO, Food and Agriculture Organization) srovnávají nutriční hodnotu bílkovin pomocí několika technik (FAO 2013). Zlatým standardem v určování nutriční hodnoty bílkovin je skórovací systém takzvané stravitelnosti bílkovin s ohledem na jejich aminokyselinové složení (PDCAAS,

Protein Digestibility Corrected Amino Acids Score). Dle PDCAAS má mléko respektive kaseiny a syrovátkové bílkoviny hodnotu 1 a tedy jsou označeny za bílkoviny s vysokou nutriční kvalitou společně s bílkovinou vaječného bílku. Je však nutné uvést, že u daného jedince se může hodnota PDCAAS lišit například ve vztahu k věku jedince, k vlastnímu trávení a vstřebání v tenkém střevě či v závislosti na dalších neovlivnitelných faktorech (Hoffman a Falvo 2004).

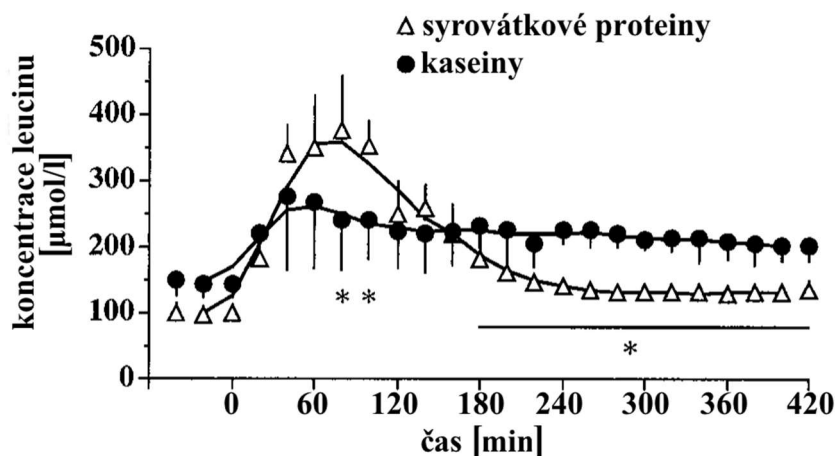
Je známo, že mléčné bílkoviny obsahují více esenciálních aminokyselin než bílkoviny rostlinné. Vzhledem k tomu, že mají kaseiny a syrovátkové bílkoviny vysokou nutriční hodnotu, nelze předpokládat významný rozdíl v jejich obsahu esenciálních aminokyselin. Boirie et al. (1997) uvedl průměrné zastoupení esenciálních aminokyselin v kaseinech (39,6 %) a v syrovátkových bílkovinách (39,2 %), z nichž větvených aminokyselin (BCAAs, Branched Chain Amino Acids) bylo v kaseinech obsaženo 20,1 % a v syrovátkových bílkovinách 23,1 % (tabulka 5). V kaseinech bylo průměrné zastoupení leucinu 9 % (tj. 44,7 % z BCAAs) a v syrovátkových bílkovinách 12,5 % (tj. 53 % z BCAAs; Boirie et al. 1997; Pennings et al. 2011). Dle rešeršní práce Hulmiho et al. (2010) je ve WPI průměrná koncentrace esenciálních aminokyselin 49,2 %, z nichž je 24,2 % BCAA (v 50,4 % BCAAs je zastoupen leucin).

Tabulka 5 Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých aminokyselin v syrovátkových bílkovinách a v kaseinech (Boirie et al. 1997).

	kaseiny syrovátkové bílkoviny			kaseiny syrovátkové bílkoviny	
Esenciální aminokyseliny			Semiesenciální aminokyseliny		
Fenylalanin	3,0 %	3,8 %	Arginin	2,1 %	2,2 %
Isoleucin	5,2 %	4,3 %	Histidin	1,6 %	2,2 %
Leucin	9,0 %	12,2 %			
Lysin	8,9 %	5,9 %	Neesenciální aminokyseliny		
Threonin	5,7 %	4,1 %	Alanin	7,7 %	4,1 %
Valin	5,9 %	6,6 %	Glycin	3,0 %	2,8 %
Methionin	1,9 %	2,3 %	Kyselina asparagová	12,0 %	6,5 %
			Kyselina glutamová	18,2 %	21,5 %
			Prolin	7,2 %	12,8 %
			Serin	5,8 %	5,0 %
			Tyrosin	2,8 %	3,7 %

Z výše uvedených prací nebyl shledán významný rozdíl v aminokyselinovém složení (včetně BCAAs) mezi kaseiny a syrovátkovými bílkovinami. Na druhou stranu byly popsány významné rozdíly po podání kaseinů a syrovátkových bílkovin v aminokyselinovém profilu v plazmě. Boirie et al. (1997) vysvětluje rozdíl v aminokyselinovém profilu v plazmě u zdravých neobězných jedinců odlišnou rychlostí trávení a vstřebávání kaseinů a syrovátkových bílkovin.

Ve své práci označuje kaseiny za „pomalé“ a syrovátkové bílkoviny za „rychlé“ bílkoviny. Bylo tedy zjištěno, že kaseiny jsou pomaleji tráveny a vstřebávány v porovnání se syrovátkovými bílkovinami. Po jejich podání byl pozorován pomalý vzestup aminokyselin v plazmě, celkově nižší plazmatické koncentrace aminokyselin, které ale přetrvávaly až 7 hodin. Po podání syrovátkových bílkovin byl popsán rychlý a výrazný vzestup aminokyselin v plazmě, celkově vyšší plazmatické koncentrace aminokyselin trvaly do 3 hodin (graf 6). Hladina některých aminokyselin (threonin, leucin, isoleucin, lysin a methionin) byla ve 100. minutě po podání syrovátkových bílkovin významně ($p < 0,05$) vyšší než po podání kaseinů. Calbet a Holst (2004) naopak uvádějí, že rozdíl mezi vyprazdňováním žaludku je u obou frakcí mléčných bílkovin nesignifikantní.



Graf 6 Průměrné hladiny plazmatické koncentrace leucinu v čase po podání kaseinů a syrovátkových bílkovin, signifikantní rozdíly na hladině významnosti 0,05 jsou označeny hvězdičkou (*), $n = 16$ zdravých dobrovolníků. Upraveno dle Boirieho et al. (1997).

3.3 Syrovátkové bílkoviny a inzulínová sekrece u zdravých jedinců

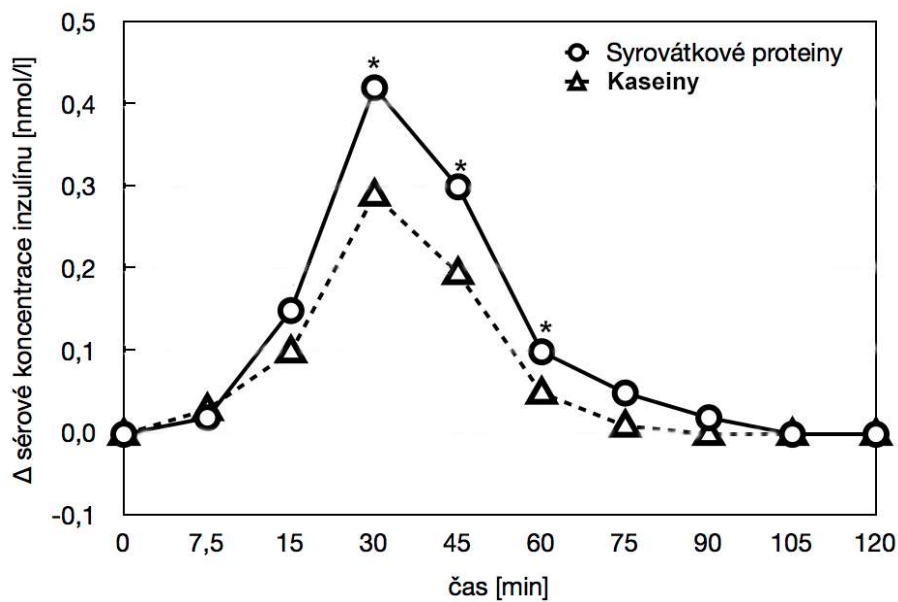
Östmanová et al. (2001) ukázala, že podání kravského mléka a mléčných výrobků vede k vyšší stimulované inzulínové sekreci než by odpovídalo jejich obsahu sacharidů. Z tohoto hlediska byly zkoumány nesacharidové složky mléka a bylo zjištěno, že se jedná o vliv hlavních mléčných bílkovin a to především syrovátkových bílkovin. Stimulovaná inzulínová sekrece nebyla významně ovlivněna přítomností laktózy (Östman et al. 2001) či tuku (Hoyt et al. 2005) v syrovátce.

Před 13 lety byla v prestižním americkém časopise pro klinickou výživu uveřejněna studie švédských autorů (Nilsson et al. 2004), jejíž výsledky vyzdvihly syrovátkové bílkoviny do popředí zájmu mnoha vědeckých týmů především pro jejich schopnost vyvolat výraznou inzulínovou sekreci u zdravých neobézních jedinců. V současné době má článek více než 350 citací. Studie ukázala, že právě syrovátkové bílkoviny vedou v porovnání s ostatními bílkovinami k nejméně výraznější inzulínové sekreci.

Ve studii Nilssona et al. (2004) bylo testováno 28 g sušené syrovátky od firmy Arla Foods Ingredients (Viby, Dánsko) a ačkoliv v metodách nebyl upřesněn název výrobku lze předpokládat, že se jednalo o WPC s obsahem 18,2 g (tj. 65 %) syrovátkových bílkovin, 5,6 g (tj. 20 %) laktózy a 4,2 g (tj. 15 %) tuku. Dle uvedeného množství zastoupených aminokyselin v syrovátce bylo celkové množství podaných bílkovin 17,861 g (tj. 63,6 %). BCAAs byly obsaženy přibližně v 25,2 %. Aby bylo ve studii zajištěno shodné zastoupení sacharidů a bílkovin mezi pokrmy (syrovátka, sušené odstředěné mléko, treska, sýr, pokrm s vysokým a s nízkým obsahem lepku a chléb jako reference), muselo být k 28 g syrovátky ještě přidáno 19,4 g laktózy. Sušená syrovátka s přídavkem laktózy byla následně rozpuštěna v 550 ml vody a nápoj byl účastníky studie vypit během 12 minut. Z grafického znázornění (graf 7) je patrné, že již po několika minutách po podání sušené syrovátky inzulínová sekrece strmě stoupala až do 30. minuty, kde dosáhla svého maxima (průměrná změna oproti hodnotě nalačno byla 420 pmol/l). Po 30. minutě následoval pokles inzulínové sekrece s návratem k hodnotě nalačno přibližně po 105. minutách po podání nápoje. Autoři nehodnotili inzulínovou rezistenci. Pokud se však podíváme na množství uvolněné inzulínové sekrece po podání syrovátky vypočítané jako "přírůstková" plocha pod křivkou (iAUC, incremental Area Under the Curve) mezi 0. a 90. minutou byla její hodnota rovna $15,2 \pm 1,6$ mmol . min/l, tedy o 90 % vyšší ($p < 0,05$) než po podání reference a o 52 % vyšší ($p > 0,05$) než po podání 51,3 g sušeného odstředěného mléka (25 g laktózy, 18,2 g bílkovin a 8 g tuku). Jistě se uplatňuje vliv potenciace na inzulínovou sekreci. Ve studii Gunnerudové et al. (2013) byl prokázán vztah mezi inzulínovou sekrecí (průměrná absolutní hodnota v 30. minutě po podání byla 0,2, 0,24 a 0,27 nmol/l) a dávkou syrovátkových bílkovin (4,5 g, 9 g a 18 g). Pokud byly syrovátkové bílkoviny (9 a 4,5 g) přidány k snídani tvořící pečivo, šunku a máslo byla celková inzulínová sekrece vyšší a glykemie nižší ve srovnání s výsledky po podání samotného pečiva, šunky a másla (Gunnerud et al. 2012).

Dle studie Nilssona et al. (2004) je inzulínotropní účinek syrovátkových bílkovin dán jednak jejich aminokyselinovým složením, rychlostí vzestupu koncentrace aminokyselin v plazmě a jejich přímým účinkem na β -buňky a zároveň i aktivací inkretinových hormonů (minoritně).

U zdravých jedinců byla nalezena pozitivní korelace ($p < 0,05$) mezi stimulovanou inzulínovou sekrecí a plazmatickou hladinou leucinu ($r = 0,67$, $p = 0,003$), valinu ($r = 0,63$, $p = 0,005$), lysinu ($r = 0,62$, $p = 0,005$) a isoleucinu ($r = 0,58$, $p < 0,001$; Nilsson et al. 2004). Dále leucinu ($p < 0,003$), fenylalaninu ($p < 0,02$) a thyrosinu ($p < 0,0001$; van Loon et al. 2000). Leucinu, argininu a lysinu (Floyd et al. 1966), isoleucin, leucin, lysin, threonin a valin (u všech: $r > 0,494$; $P < 0,009$; Gunnerud et al. 2013).



Graf 7 Průměrné (\pm SEM) změny sérové hladiny inzulínu odečtené od hladiny inzulínu nalačno po podání syrovátkových bílkovin a kaseinů, $n = 12$ zdravých jedinců. * označuje statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$). Upraveno dle Nilssona et al. (2004).

Ve studii Nilssona et al. (2004) byla po podání syrovátkových bílkovin pozorována vyšší hladina GIP než GLP-1 ($p < 0,05$). V porovnání s ostatními pokrmy (sušené odstředěné mléko, treska, sýr, pokrm s vysokým obsahem lepku, pokrm s nízkým obsahem lepku, chléb) nebylo toto zvýšení výrazné. Hall et al. (2003) popisuje po podání syrovátkových bílkovin signifikantně vyšší koncentrace GIP a GLP-1 než po podání kaseinů. Ve studii Akhavanové et al. (2014) bylo ukázáno taktéž téměř shodné zvýšení GIP a GLP-1 po podání stejného množství glukózy a syrovátkových bílkovin. Je dále zajímavé, že na myším modelu Gunnarsson et al. (2006) ukázal, že syrovátkové bílkoviny mohou prodloužit účinek inkretinů tím, že inhibují přímo DPP-4 zřejmě v proximální části tenkého střeva. Tulipano et al. (2011) taktéž na myším modelu ukázal, že pravděpodobně peptid nazvaný beta-laktosin A (IPA,

Izoleucin-Prolin-Alanin) získaný hydrolýzou β -laktoglobulinu má charakter DPP-4 inhibitoru, která zvyšuje hladinu GIP.

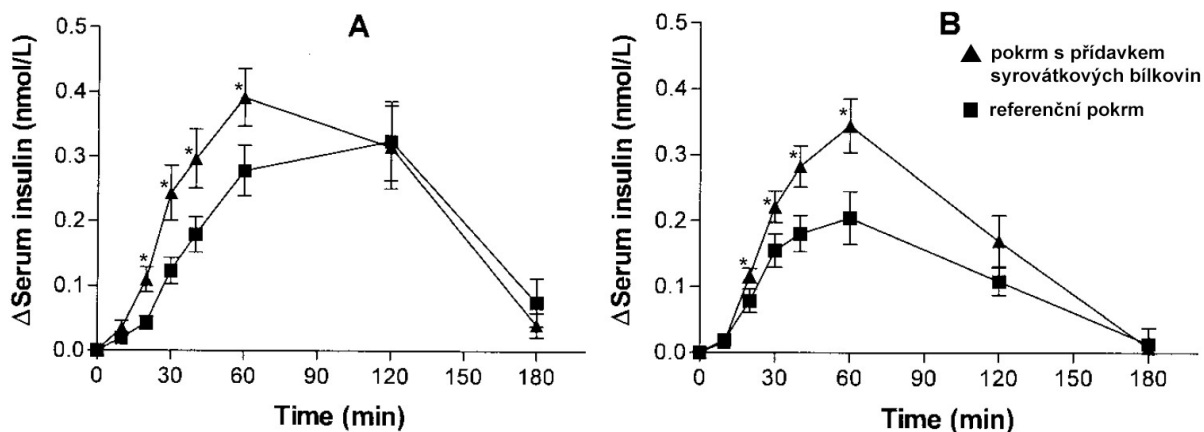
Ačkoliv všechny testované pokrmy ve studii Nilssona et al. (2004) obsahovaly shodné množství sacharidů, po podání syrovátky a sušeného odstředěného mléka byly hladiny glykémie nižší. Nilsson et al. (2004) toto vysvětluje nízkým obsahem laktózy, nízkým obsahem glukogenních aminokyselin a účinkem zvýšené inzulínové sekrece po jejich podání. Změna hodnot glykémie po podání syrovátky a sušeného odstředěného mléka byla do 1 mmol/l v porovnání s hodnotou glykémie nalačno.

3.4 Syrovátkové bílkoviny a inzulínová sekrece u pacientů s diabetes mellitus 2. typu

V roce 2005 byl publikován článek Frida et al. hodnotící účinek syrovátkových bílkovin na inzulínovou sekreci a postprandiální glykémii u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Do studie bylo zařazeno celkem 14 neobézních pacientů s diabetes mellitus 2. typu a s glykovaným hemoglobinem v rozmezí 4,3-7,7 mmol/mol. Během jednoho dne byly každému pacientovi podány dva pokrmy s odstupem 4 hodin – první pokrm byl ve formě snídaně a druhý ve formě obědu. Snídaně a oběd s přidavkem syrovátkových bílkovin obsahoval celkem 50 g sacharidů (z toho 5,3 g laktózy). Snídaně obsahovala celkem 29,8 g bílkovin (z toho 18,2 g syrovátkových bílkovin) a oběd obsahoval celkem 28,6 g bílkovin (z toho 18,2 g syrovátkových bílkovin). Sušené syrovátkové bílkoviny byly podány formou nápoje (Arla Food, Stockholm, Švédsko). Jako referenční pokrmy byly označeny pokrmy bez přidavku syrovátkových bílkovin, tj. snídaně obsahovala pečivo a šunku a oběd obsahoval bramborovou kaši, masové koule a šunku. V článku nebyla zhodnocena inzulínová rezistence ani uvedeny průměrné koncentrace inzulínu nalačno.

Po podání snídaně s přidavkem syrovátkových bílkovin byla zjištěna o 68 % vyšší inzulínová sekrece a o 9 % nižší postprandiální glykémie ($p < 0,05$) počítána jako $iAUC_{0-60}$ v porovnání s referencí. Stimulovaná inzulínová sekrece tedy snížila postprandiální hladinu glykémie o 20 %. Zajímavé výsledky ale byly ukázány po podání oběda s přidavkem syrovátkových bílkovin (respektive druhého pokrmu podaného s odstupem 4 hodin). Stimulovaná inzulínová sekrece byla po podání oběda s přidavkem syrovátkových bílkovin průměrně o 50 % vyšší a to signifikantně ve 20., 30., 40. a 60. minutě (graf 8). Absolutní hodnota inzulínové sekrece byla přibližně o 0,4 nmol/l vyšší v maximu tj. v 60. minutě po podání. Časná fáze po podání obou pokrmů byla snížena. Výrazný efekt přidavku syrovátkových bílkovin k druhému pokrmu lze vysvětlit pravděpodobně sníženou odpovědí β -buněk na glukózu po relativně krátkém

časovém intervalu 4 hodin u pacientů s diabetes mellitus 2 typu (Polonsky et al. 1996), neboť inzulínová sekrece po druhém pokrmu bez přidavku syrovátkových bílkovin dosáhla celkově nižších hodnot. Tessari et al. (2007) také potvrzuje vyšší inzulínovou sekreci po podání syrovátkových bílkovin v porovnání s kaseiny u pacientů s diabetes mellitus 2. typu.



Graf 8 Průměrné (\pm SEM) změny sérové hladiny inzulínu odečtené od hladiny inzulínu nalačno po podání snídaně (A) a obědu (B) s přidavkem a bez přidavku syrovátkových bílkovin (reference), $n = 14$ pacientů s diabetes mellitus 2. typu. * označuje statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$). Upraveno dle Frida et al. (2005).

Ve studii Frida et al. (2005) dosahovaly hladiny GIP nesignifikantně vyšších hodnot po podání obou pokrmů s přidavkem syrovátkových bílkovin v porovnání s referencí. Nebyly však nalezeny změny v hladinách GLP-1 po podání testovaných pokrmů a reference. Je tedy zřejmé, že u pacientů s diabetes mellitus 2. typu hraje důležitou roli přímá aktivace β -buněk aminokyselinami. Dle klinické studie Manderse et al. (2006) byla u pacientů s diabetes mellitus 2. typu nalezena silná pozitivní korelace mezi stimulovanou inzulínovou sekrecí a plazmatickou hladinou leucinu ($r = 0,43$, $p < 0,001$), cysteinu ($r = -0,27$, $p < 0,04$), lysinu ($r = 0,43$, $p < 0,001$), methioninu ($r = 0,27$, $p < 0,04$), prolinu ($r = 0,33$, $p < 0,01$).

Klinická studie Ma et al. (2009) ukázala, že podání 55 g syrovátkových bílkovin buď 30 minut před podáním hlavní stravy s obsahem sacharidů (jako přidavek k hovězí polévce) nebo jako přidavek k hlavní stravě s obsahem sacharidů (brambory) vede k vyšší inzulínové sekreci a k celkově nižší hladině postprandiální glykémie v porovnání s referencí bez přidavku syrovátkových bílkovin. Výše uvedené studie tedy naznačují, že přidání syrovátkových bílkovin k diabetické dietě může vést ke zlepšení glykemického profilu. Proto lze uvažovat o přidavku syrovátkových bílkovin k běžné diabetické dietě (Ma et al. 2009; Mortensen et al. 2012; Jakubowitz et al. 2014; Clifton et al. 2014; Ma et al. 2015).

4. Hypotézy a cíle práce

V práci budou ověřeny následující hypotézy:

- H1: Podání syrovátkových bílkovin vede k významné inzulínové (resp. C-peptidové) sekreci u zdravých jedinců srovnatelné s ostatními experimentálně užívanými stimulačními testy.
- H2: Podání syrovátkových bílkovin vede k významné inzulínové (resp. C-peptidové) sekreci i u pacientů s diabetes mellitus 2. typu ve srovnání s orálním glukózovým tolerančním testem a zároveň nezvyšuje postprandiální glykémii.

Cíl práce

Cílem práce je ověřit, zda lze zhodnotit β -buněčnou funkci po perorálním podání syrovátkových bílkovin u zdravých jedinců i u pacientů s diabetes mellitus 2. typu se zachovalou inzulínovou (respektive C-peptidovou) sekrecí, a zda lze předpokládat užití syrovátkových bílkovin v klinické praxi jako nového stimulačního testu inzulínové sekrece.

Východiska k uskutečnění studií

- 1) Dosud není ustanoven žádný ze stimulačních testů inzulínové sekrece k užití v klinické praxi jako ukazatel β -buněčné funkce u zdravých jedinců i pacientů s diabetes mellitus 2. typu.
- 2) Perorální podání bílkovin stimuluje inzulínovou sekreci a nevede k hyperglykémii. Bílkoviny jsou přirozenou součástí stravy, a proto lze předpokládat jejich dobrou toleranci.

5. Studie I. Zhodnocení stimulované inzulínové sekrece u zdravých jedinců

5.1 Materiál a metody

Klinická studie (cross-over) byla uskutečněna na Oddělení klinické fyziologie 2. interní kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, které je součástí Centra pro výzkum výživy, metabolismu a diabetu 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Studie byla schválena etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a byla uskutečněna v souladu s principy Helsinské deklarace Světové lékařské asociace (WMA, World Medical Association) přijaté v červnu 1964 v Helsinkách. Účastníci studie byli plně informováni o průběhu jednotlivých testů, o možných komplikacích a před zahájením studií podepsali podrobný informovaný souhlas. S osobními údaji bylo nakládáno v souladu s platnými zákony České republiky o ochraně osobních údajů (Zákon č. 101/2000 Sb.).

5.1.1 Charakteristika zdravých jedinců

Do studie bylo zařazeno osm zdravých neobézních (BMI (Body Mass Index): 17 – 25,9 kg/m²) jedinců (7 mužů a 1 žena, ve věkovém rozmezí 20 – 26 let) z řad studentů 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Dobrovolníci neměli žádné akutní ani chronické onemocnění včetně laktóзовé intolerance či onemocnění ledvin a neužívali žádné medikamenty.

5.1.2 Testy stimulované C-peptidové sekrece

V randomizovaném pořadí bylo od listopadu 2010 do května 2011 testováno osm zdravých nekuřáků celkem šestkrát během jednoho měsíce. Vždy byl podán jeden ze šesti (tři perorálních a tři intravenózních) stimulačních testů C-peptidové sekrece. Tři dny před plánovanými testy nebyla omezena běžná pohybová aktivita (vyjma extrémní tělesné zátěže) a byla doporučena běžná dieta (vyjma pití kávy a alkoholu). Testy byly provedeny po 12 hodinovém lačnění vždy v 8 hodin ráno. Před vlastním zahájením testu dodrželi všichni jedinci minimálně 20 minut klidu na lůžku. Následně byl do periferní žíly dobrovolníka za aseptických kautel zaveden žilní katetr s trojcestným kohoutem. Mezi zavedením periferního katetru a prvním krevním odběrem uplynulo dalších 20 minut.

Do klinické studie byly zařazeny tři perorální testy C-peptidové sekrece s podáním

- 1) samotné glukózy (OGTT, Oral Glucose Tolerance Test; reference pro perorální testy),
- 2) samotných syrovátkových bílkovin (OWT, Oral Whey Test) a

- 3) glukózy se syrovátkovými bílkovinami (OWGT, Oral Whey Glucose Test), ve kterém bylo shodné množství sacharidů jako v OGTT.

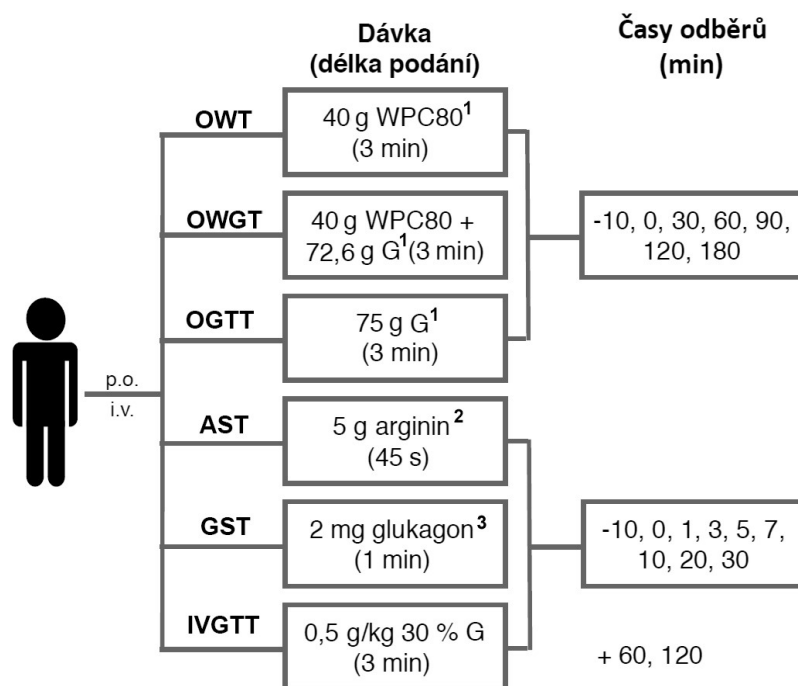
Dále byly do studie zařazeny tři intravenózní testy C-peptidové sekrece s podáním

- 1) samotné glukózy (IVGTT, IntraVenous Glucose Tolerance Test; reference pro intravenózní testy),
- 2) argininu (AST, Arginin Stimulation Test) a
- 3) glukagonu (GST, Glucagon Stimulation Test).

Jednotlivé dávky námi užitých intravenózních testů byly v práci Chaillousové et al. (1996) zhodnoceny jako dobře porovnatelné ve vztahu ke stimulované inzulínové resp. C-peptidové sekreci za podmínek normoglykémie. Dávky jednotlivých testů včetně časů odběrů jsou zobrazeny na obrázku 7.

Syrovátkové bílkoviny byly podány ve formě ochuceného nápoje ze syrovátkového proteinového koncentrátu 80 (Volactive UltraWhey80 (WPC80); DVN, Hoogeveen, Holandsko) obsahující dle výrobce 81 % syrovátkových bílkovin, 6 % laktózy a 6 % tuku. Průměrný obsah větvených aminokyselin (BCAAs, Branched Chain Amino Acids) uvedený výrobcem byl 23 %. Naše analýza pomocí kapilární elektroforézy (HP^{3D} CE systém; Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) ukázala 17,5 % zastoupení BCAAs. Neenergetické dochucení nápoje bylo zajištěno ve Výzkumném ústavu mlékárenském v Praze pomocí 0,05 g aspartamu (NutraSweet: The NutraSweet Company, Chicago, Spojené státy americké), 0,4 g vanilkového extraktu (RAPS-CZ, Praha, Česká republika) a 0,4 g jahodového aromatu (AFFRAI 0005, RJP International, Praha, Česká republika).

Ke zhodnocení inzulínové sekrece jsme užili koncentraci sérového C-peptidu, protože v porovnání se stanovením samotného inzulínu je u jedinců s normálními ledvinnými funkcemi přesnějším ukazatelem vlastní inzulínové sekrece (Eaton et al. 1980). Odběr žilní krve ke stanovení sérového C-peptidu a plazmatické glykémie byl proveden v čase mínus 10 minut ($t = -10$; lačná hodnota), dále těsně po podání stimulační látky (čas 0) a v dalších časových intervalech (obrázek 7). Po podání perorálních testů byl katetr použit pouze k odběru vzorků. U intravenózních testů byl stejný katetr použit pro podání látky a po úpravě kohoutu katetru i pro odběr vzorků (Gottsäter et al. 1992). Po každé manipulaci byl katetr propláchnut 10 ml 0,9 % fyziologického roztoku.



Obrázek 7 Schéma testů podaných ve studii I.

Vysvětlivky: **p.o.** = perorální testy; **i.v.** = intravenózní testy; **OWT** = test s podáním samotných syrovátkových bílkovin; **OWGT** = test s podáním glukózy a syrovátkových bílkovin (test s celkovým obsahem 75 g sacharidů); **OGTT** = orální glukózový toleranční test s podáním glukózy (reference pro perorální testy); **AST** = argininový stimulační test s podáním argininu; **GST** = glukagonový stimulační test s podáním glukagonu; **IVGTT** = intravenózní glukózový toleranční test s podáním glukózy (reference pro intravenózní testy); **WPC80** = syrovátkový proteinový koncentrát 80; **G** = glukóza;
¹ nápoj (300ml vody); ² roztok (50ml 0,9 % fyziologického roztoku); ³ roztok 60ml 0,9 % fyziologického roztoku).

Žilní krev byla odebrána do zkumavek (S-Monovette; Sarstedt, Nümbrecht, Německo) a analyty byly stanoveny na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze. Nesrážlivá žilní krev ke stanovení plazmatické glykémie byla odebrána do zkumavek s obsahem fluoridu sodného a kyseliny ethylendiamintetraoctové. Glykémie byla stanovena pomocí fotometrické detekce reakcí s hexokinázou (Passey et al. 1977) v analyzátoru Konelab (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finsko). Limit detekce glykémie byl 0,1 mmol/l. Srážlivá žilní krev ke stanovení sérového C-peptidu byla odebrána do zkumavek bez aditiva. Z důvodu plánovaného stanovení C-peptidu po měsíci od jeho získání, byly krevní vzorky nejprve “zmraženy na ledu” v minus 21 stupních Celsia, poté 15 minut centrifugovány

přístrojem 3000 G (Jouan BR4i, DJB Labcare, Buckinghamshire, Spojené království Velké Británie a Severního Irska) a nakonec byly zmrazeny na minus 80 stupňů Celsia po dobu 32 dnů před vlastní analýzou. Stanovení C-peptidu bylo provedeno pomocí oboustranné chemiluminiscenční imunometrické metody na pevné fázi (Kao et al. 1992) v analyzátoru Immulite 2000 immunoassay system (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, Spojené státy americké). Limit detekce byl stanoven na 0,17 - 2,32 nmol/l, limit senzitivity byl 0,017 nmol/l. Dále byly zvoleny koeficienty inter- a intraesejové variability pod 6 %.

5.1.3 Statistika a výpočty

Ke kvantitativnímu zhodnocení hladiny sérového C-peptidu a plazmatické glykémie po podání jednotlivých stimulačních látek byla užita metoda výpočtu “přírůstkové” plochy pod křivkou (iAUC, incremental Area Under the Curve). iAUC odpovídala koncentraci (C-peptidu či glykémie) v časovém průběhu vypočítaná lichoběžníkovou metodou (trapezoidal rule), od které byla odečtena hodnota nalačno resp. hladina analytů v čase mínus 10 minut ($t = -10$ min). Pro porovnání perorálních a intravenózních testů byly iAUC jednotlivých testů normalizovány na jednotku času (iAUC/min) podle Greenbaumové et al. (2008). Data byla vyhodnocena pomocí oboustranného Studentova t-testu s následnými post hoc testy pro srovnání meziskupinových diferencí vzhledem k referenci (glukóza perorálně podaná k perorálním testům a glukóza intravenózně podaná k intravenózním testům). Předpoklady pro provedení t-testu byly ověřeny pomocí Fisherova testu shodnosti rozptylu a Kolmogorova-Smirnova testu normality. Srovnání variability C-peptidové odpovědi mezi stimulačními testy bylo provedeno pomocí testu poměru pravděpodobnosti s použitím variačních koeficientů popsaných Verrillem a Johnsonem (2007).

Všechna data byla uváděna jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM, Standard Error of the Mean). Všechny statistické hypotézy byly testovány na hladině významnosti 0,05 pomocí statistického softwaru MATLAB (2011b, Mathworks, Natick, MA, USA) s Bonferroniho korekcemi pro mnohočetné porovnávání.

Jednotky použité pro plazmatickou glykémii byly v mmol/l a pro sérový C-peptid v nmol/l. Všichni jedinci měli normální glukózový metabolismus. Průměrná lačná glykémie byla $4,33 \pm 0,06$ mmol/l. Průměrná hodnota glykémie ve druhé hodině po OGTT byla $4,26 \pm 0,4$ mmol/l. Dále jedinci měli normální index inzulinové senzitivity vypočítaný dle dat z OGTT (OGIS₁₂₀, Oral Glucose Insulin Sensitivity₁₂₀) dle Mariové et al. (2001)

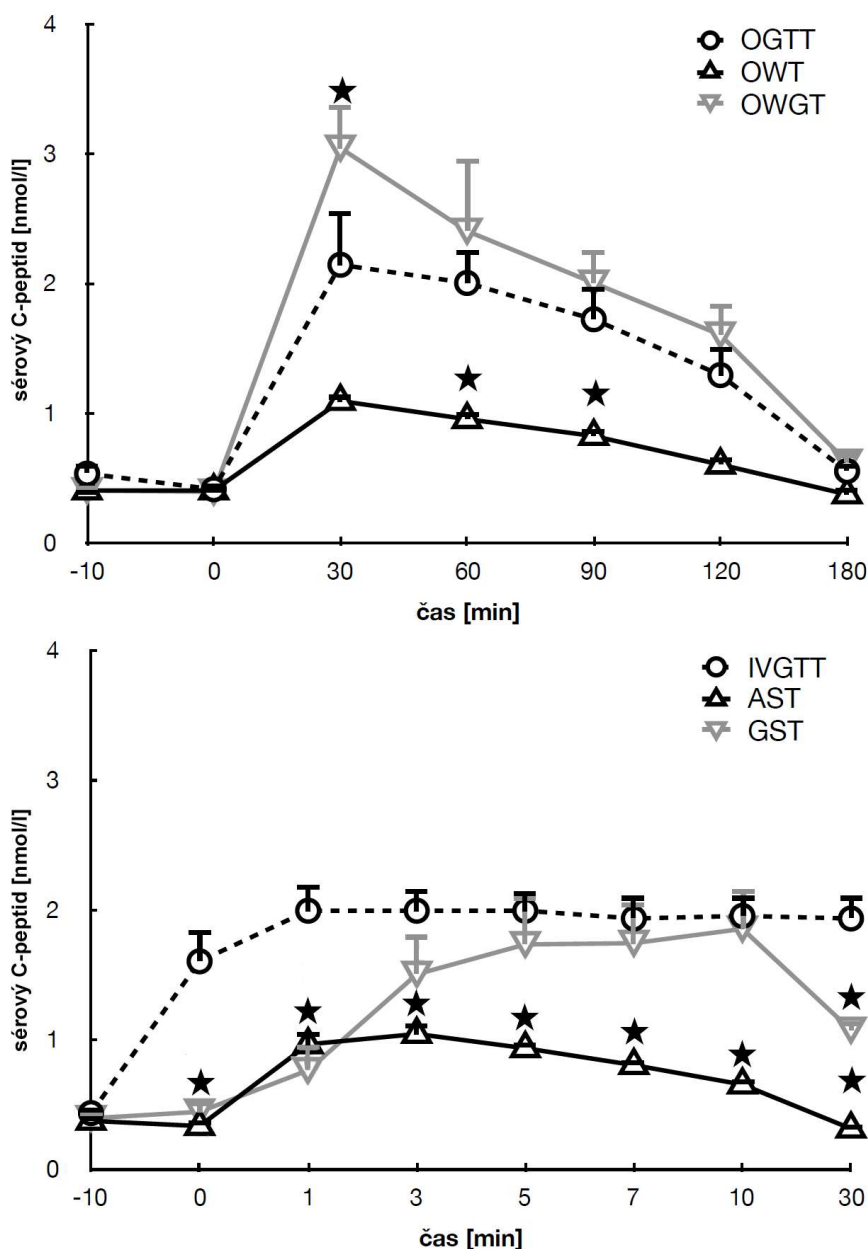
$463 \pm 22 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, jehož hodnoty korelují s HOMA indexem (Matthews et al. 1985) a s výsledky hyperinzulinemického euglykemického klempu (DeFronzo et al. 1979).

5.2 Výsledky

5.2.1 C-peptidová odpověď (Graf 8)

Průměrná lačná sérová hladina C-peptidu byla $0,43 \pm 0,02 \text{ nmol/l}$. U zdravých jedinců měla stimulovaná C-peptidová sekrece podobný průběh v čase s maximem hodnot v 30. minutě po podání perorálního stimulu. Hodnota maxima byla po podání glukózy (OGTT, reference) $1,61 \pm 0,39 \text{ nmol/l}$. Maximum po OWT bylo o 57 % nižší a po OWGT o 63 % vyšší než po OGTT ($p < 0,05$). Po dosažení maxima hodnot následoval pozvolný pokles hladiny C-peptidové sekrece k hodnotě nalačno. Po OWT a OGTT byl dosažen návrat k hodnotě nalačno mezi 120. - 180. minutou, po OWGT bylo dosaženo hodnoty nalačno až po 180. minutě. Po OWT byla absolutní hladina sérové C-peptidové sekrece nižší ($p < 0,05$) v 60. a v 90. minutě ve srovnání s referencí. Po OWGT byla absolutní hodnota C-peptidu vyšší ($p < 0,05$) v 30. minutě než po OGTT.

Po intravenózním podání glukózy (IVGTT, reference) bylo dosaženo maxima průměrných hodnot v 1. minutě (absolutní hodnoty: $1,56 \pm 0,17 \text{ nmol/l}$) s délkou trvání bez výrazného poklesu do 30. minuty. Dosažené maximum po AST bylo o 57 % nižší než po IVGTT s maximem ve 3. minutě po podání. Po GST bylo maximum hodnot o 6 % nižší než po IVGTT. Po AST, GST a IVGTT byl dosažen návrat k hodnotě nalačno do 20 minut, po 30. a po 120. minutě. Nižších hladin sérového C-peptidu ($p < 0,05$) bylo dosaženo v celém průběhu AST v porovnání s referencí. GST měl podobné hladiny C-peptidu jako reference kromě časů v 0., 1. a 30. minutě, ve kterých byly hladiny nižší ($p < 0,05$).



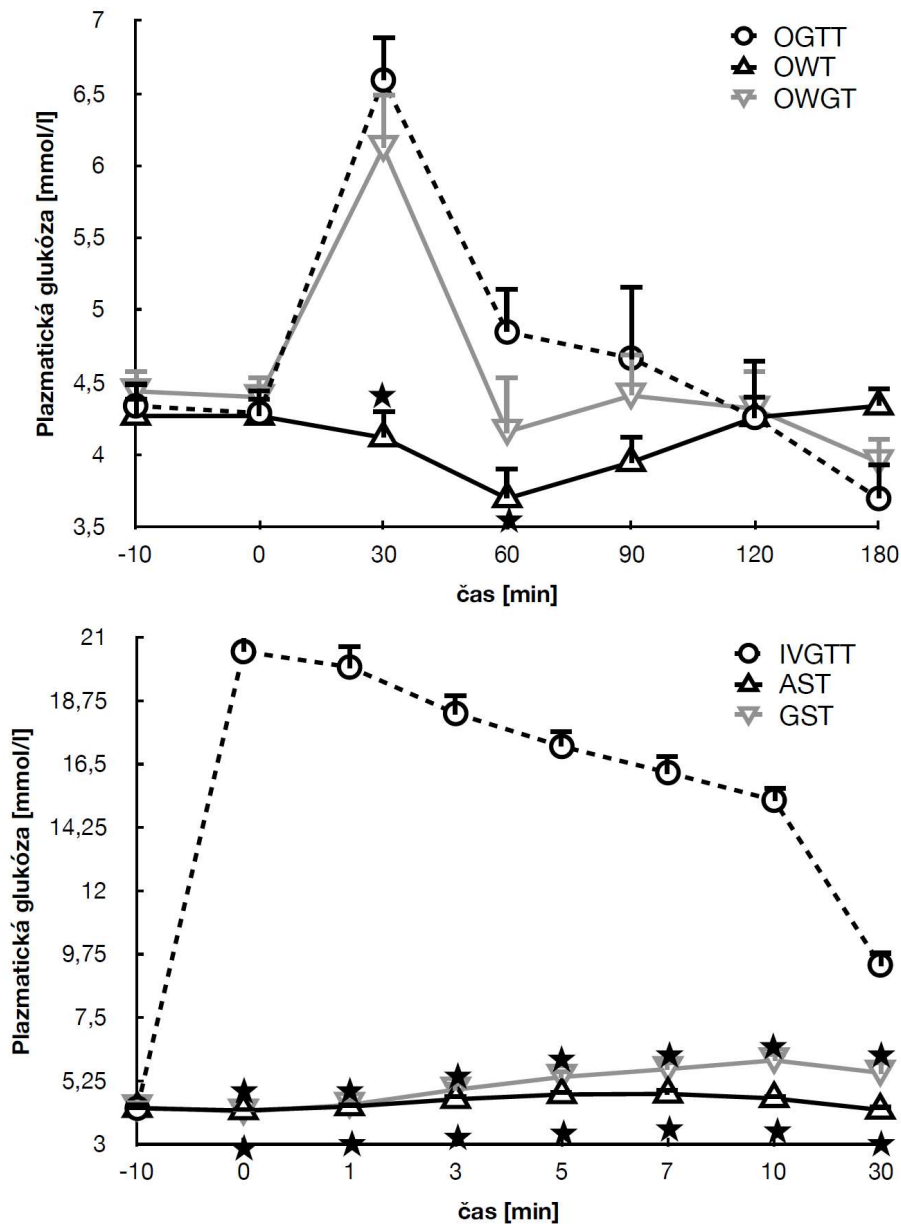
Graf 8 Sérová koncentrace C-peptidu po provedení A) perorálních (OWGT, OWT, OGTT - reference) a B) intravenózních testů (AST, GST, IVGTT - reference) u zdravých jedinců (n = 8). * označuje hodnoty významně odlišné od reference (p < 0,05).

5.2.2 Glykemická odpověď (Graf 9)

Průměrná hodnota plazmatické glukózy nalačno byla $4,33 \pm 0,06$ mmol/l.

Průměrné maximum hodnot glykémie bylo dosaženo po OGTT v 30. minutě ($2,25 \pm 0,24$ mmol/l) oproti hodnotě nalačno. Ačkoliv po OGTT a OWGT byl podobný průběh glykemické odpovědi po dobu 60. minut (s návratem k hodnotě nalačno mezi 90. až 120. minutou), bylo po OWGT o 25 % nižší maximum v 30. minutě než po OGTT. Po OWT byla

v 60. minutě hodnota glykémie o 13 % nižší než hodnota nalačno, nebyla však přítomna hypoglykemie. Glykémie byla po OWT v 30. a 60. minutě nižší ($p < 0,05$) ve srovnání s OGTT.



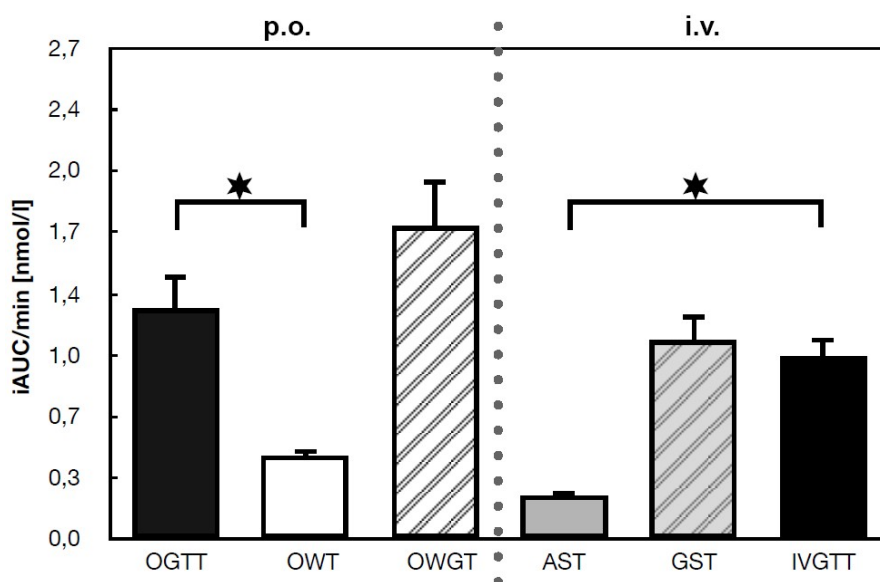
Graf 9 Plazmatická koncentrace glykémie po provedení A) perorálních (OWGT, OWT, OGTT - reference) a B) intravenózních testů (AST, GST, IVGTT - reference) u zdravých jedinců ($n = 8$). * označuje hodnoty významně odlišné od reference ($p < 0,05$).

Po IVGTT byla maximální hodnota glykémie $16,23 \pm 0,92$ mmol/l po odečtení hodnoty nalačno. Po AST a GST bylo maximum glykémie o 97 % nižší po dobu 7 minut a o 88 % nižší po dobu 20 minut ve srovnání s referencí. Hladina glykémie se vrátila k hodnotě nalačno

mezi 10. a 20. minutou (AST), po 30. minutě (GST) a mezi 60. a 120. minutou (IVGTT). Průměrná hladina glykémie byla nižší ($p < 0,05$) během celého testu po AST a GST v porovnání s referencí.

5.2.3 C-peptidová odpověď - iAUC/min (Graf 10)

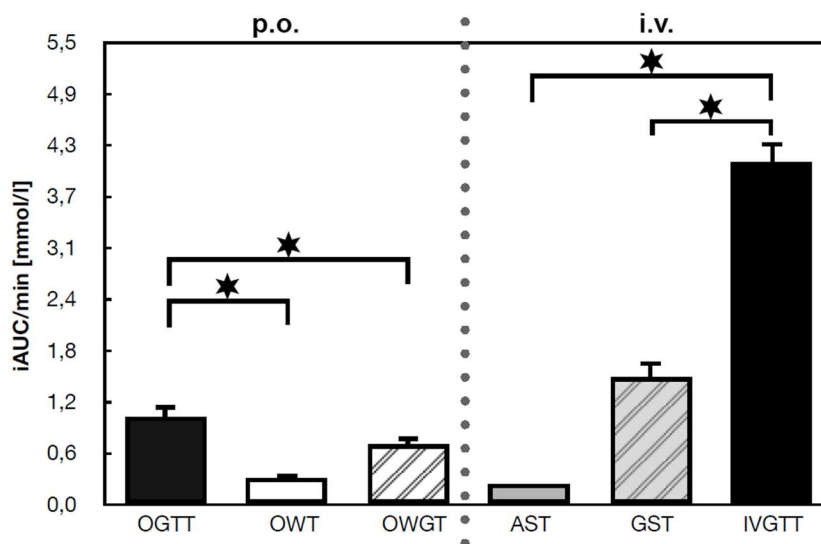
Průměrná C-peptidová odpověď vypočítaná jako iAUC/min byla po OGTT $1,27 \pm 0,19$ nmol/l a po IVGTT $1,00 \pm 0,10$ nmol/l. Po OWT a OWGT byla iAUC/min o 64 % nižší ($p < 0,05$) a o 36 % vyšší ve srovnání s referencí. Individuální variabilita iAUC/min C-peptidové odpovědi byla po OWT nižší ($p < 0,05$) než po OGTT a OWGT. iAUC/min byla po AST o 76 % nižší ($p < 0,05$) a po GST o 9 % vyšší v porovnání s referencí. Pokud bylo srovnáno iAUC/min po AST a OWT, bylo OWT o 93 % vyšší než po AST.



Graf 10 iAUC/min pro sérový C-peptid po podání všech testů u zdravých jedinců ($n = 8$). * označuje hodnoty významně odlišné od reference ($p < 0,05$).

5.2.4 Glykemická odpověď - iAUC/min (Graf 11)

Průměrná glykemická odpověď (iAUC/min) byla po OGTT $1,04 \pm 0,13$ mmol/l a po IVGTT $4,08 \pm 0,22$ mmol/l. Po OWT a OWGT byla iAUC/min o 71 % nižší ($p < 0,05$) a o 32 % nižší ($p < 0,05$) než po referenci. Po AST a GST byla iAUC/min o 94 % nižší ($p < 0,05$) a o 63 % nižší ($p < 0,05$) než po referenci.



Graf 11 iAUC/min pro plazmatickou glykémii po podání všech testů u zdravých jedinců (n = 8). * označuje hodnoty významně odlišné od reference (p < 0,05).

5.2.5 Tolerance testů

Samotné syrovátkové bílkoviny a syrovátkové bílkoviny s glukózou byly dobře tolerovány všemi zdravými jedinci. Po perorálním podání samotné glukózy byla u 14 % jedinců přítomna přechodná nauzea. Po intravenózním podání glukózy byla zjištěna přechodná tachykardie u poloviny dobrovolníků. Podání glukagonu způsobilo u všech jedinců přechodná nauzea, tachykardie a návaly horka.

5.3 Diskuze

Po podání perorálního testu závisí celková inzulínová sekrece včetně jejího průběhu v čase na druhu živiny (aminokyselina, tuk či glukóza) a na její dávce. Perorálně podaná látka stimuluje inzulínovou sekreci aktivací několika překrývajících se mechanismů – nervovou stimulací, funkcí gastrointestinálního traktu (motilitou jícnu, rychlostí vyprazdňování žaludku, motilitou střeva, trávením a vstřebáváním živin do krevního oběhu včetně aktivace inkretinových hormonů) a nakonec vlastním účinkem živiny na β -buňku Langerhasových ostrůvků slinivky břišní. Ve shodě s dosavadními poznatky o stimulované inzulínové sekreci u zdravých jedinců jsme ukázali, že po podání samotné glukózy, samotných syrovátkových bílkovin a kombinace glukózy se syrovátkovými bílkoviny dochází k maximální hodnotě C-peptidu v 30. minutě, což odpovídá „fyziologické“ časně fázi inzulínové sekrece dle průběhu

stimulované inzulínové sekrece (Curry et al. 1968; Basu et al. 1996; Caumo a Luzi 2004). Po perorálnom podaní glukózy (OGTT) bolo zvýšenie C-peptidu v 30. minútach viac než 4,5násobok hodnoty nalačno, čo je v súhlase s výsledkami Polonského et al. (1988) a Mitrakou et al. (1992). Po podaní samotných syrovátkových bielkovín (OWT) bolo zvýšenie C-peptidu v 30. minútach o 2,5násobok vyššie než hodnota nalačno pri nestimulačných hladinách glykémie a je teda odrazom účinku syrovátkových bielkovín na β -buňku (účinku aminokyselín a inkretinových hormónov). U zdravých jedincov patrí už celá desaťročná glukóza k nejsilnejším stimulačným látkam inzulínovej sekrece, syrovátkové bielkoviny však vedú v porovnaní s glukózou tiež k dobre hodnotiteľnej inzulínovej sekrecii. Podanie kombinácie glukózy a syrovátkových bielkovín s celkovým obsahom 75 g sacharidov v nápoji (OWGT) nevedlo na rozdiel od štúdií Floyda et al. (1970) a Nilssona et al. (2004) k synergickému zvýšeniu inzulínovej sekrece. Celková inzulínová sekrece bola po podaní glukózy a syrovátkových bielkovín v podstate dána súčtom inzulínovej sekrece po jednotlivých stimuloch.

C-peptidová sekrece po intravenóznom stimule (glukóza, arginín a glukagon) je závislá iba na dávke stimulačnej látky. Typicky prítomná bifázická odpoveď po podaní intravenózných testov (Cerasi a Luft 1967; Curry et al. 1968; Grodsky et al. 1972) nebola pozorovaná, pretože bolo podané väčšie množstvo roztoku relatívne pomaly a navyše sme dle Gottsäter et al. (1992) užili k odberom iba jeden trojcestný katetr. Výsledky po OWT boli srovnateľné i s intravenóznymi často experimentálne užívanými testami. Celková inzulínová sekrece po OWT bola vyššia (0,46 nmol/l; $p < 0,05$) než po provedení AST (0,24 nmol/l) za podmienok normoglykémie. Medzi neglukózovými testami (OWT, AST) bola zistená silná lineárna korelácia. Po OWT bol ďalej zistený signifikantne nižší rozptyl hodnôt než po AST v nezávislosti na veľkosti dávky.

Po OWT nebol pozorovaný vzostup postprandiálnej glykémie predovšetkým z troch dôvodov. Za prvé za nízke percentuálne zastúpenie glukogenných aminokyselín (Gannon a Nuttall 2010), za druhé za nízke zastúpenie laktózy (Östman et al. 2001) a za tretie za nízke zastúpenie tuku (Hoyt et al. 2005).

Pokiaľ sme hodnotili jednotlivé výsledky u všetkých testovaných jedincov, bola zrejme individuálna β -buněčná odpoveď po jednotlivých stimuloch. Lze teda predpokladať, že opakovaním testu inzulínovej sekrece u dosiaľ zdravých jedincov, bude možné včasne detekovať prípadnú poruchu stimulovanej inzulínovej sekrece skôr, než bude prítomná lačná hyperinzulinémia či dokonca lačná hyperglykémia v kontexte s prítomnou inzulínovou rezistenciou u geneticky predisponovaných jedincov k diabetu (Calles-Escandon et al. 1987; Ahrén a Pacini, 2004). Primárna prevencia porúch glukózového metabolizmu (prediabetu a diabetu 2. typu) je veľmi žiaducou vecou vysokou incidenciou týchto porúch v našej populácii. A práve porucha stimulovanej

inzulínové sekrece je dle řady prací první přítomnou známkou β -buněčné dysfunkce vedoucí k prediabetu a diabetes mellitus 2. typu (Simpson et al. 1968; Cerasi et al. 1972; Weir 1982; Calles-Escadon et al. 1987; Luzi a DeFronzo 1989; Hosker et al. 1989; Leahy J. L. 1990). Zdá se, že poruchu β -buněčné funkce lze do jisté míry obnovit snížením tělesné hmotnosti (Ward et al. 1984; Dela et al. 2004) či dietou s omezením sacharidů.

Naše klinická studie ukázala, že jednorázové podání 40 g syrovátkových bílkovin vede k hodnotitelné stimulované C-peptidové sekreci u zdravých jedinců a současně nevede k vzestupu postprandiální glykémie. Provedení OWT tak bylo spojeno s podáním přirozeného perorálního stimulu, s minimem nežádoucích účinků, se snadným zhodnocením inzulínové sekrece a s minimálním vzestupem glykémie po podání testu.

6. Studie II. Zhodnocení stimulované inzulínové sekrece u pacientů s diabetes mellitus 2. typu

6.1 Materiál a metody

Klinická studie (cross-over) byla uskutečněna na Oddělení klinické fyziologie 2. interní kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, které je součástí Centra pro výzkum výživy, metabolismu a diabetu 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Studie byla schválena etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a byla uskutečněna v souladu s principy Helsinské deklaráce Světové lékařské asociace (WMA, World Medical Association) přijaté v červnu 1964 v Helsinkách. Účastníci studie byli plně informováni o průběhu jednotlivých testů, o možných komplikacích a před zahájením studií podepsali podrobný informovaný souhlas. S osobními údaji bylo nakládáno v souladu s platnými zákony České republiky o ochraně osobních údajů (Zákon č. 101/2000 Sb.).

6.1.1 Charakteristika pacientů s diabetes mellitus 2. typu

Do studie bylo zařazeno šestnáct pacientů s minimálně 5 let trvajícím diabetes mellitus 2. typu (6 mužů a 10 žen ve věkovém rozmezí 56 až 80 let věku), s indexem tělesné hmotnosti v kategorii nadváhy (BMI (Body Mass Index): 26,4 – 29,8 kg/m²) a se zachovalou C-peptidovou sekrecí nalačno (0,94 ± 0,07 nmol/l; rozmezí hodnot: 0,39 – 1,33 nmol/l). Pacienti dodržovali režimová opatření (diabetická dieta s obsahem 250 g sacharidů za den s pravidelnou pohybovou aktivitou) a užívali pouze metformin jako perorální antidiabetickou terapii.

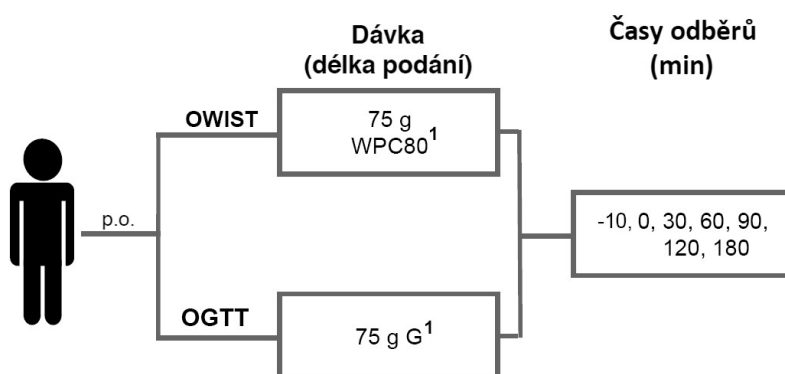
Pacienti s diabetes mellitus 2. typu byly nekuřáci a netrpěli laktózovou intolerancí. Vstupně nebylo zjištěno žádné akutního či chronického onemocnění ledvin či jiné akutní onemocnění.

6.1.2 Testy stimulované C-peptidové sekrece

V randomizovaném pořadí bylo od dubna 2013 do začátku roku 2014 testováno šestnáct pacientů s diabetes mellitus 2. typu celkem dvakrát s odstupem jednoho měsíce. Vždy byl podán jeden ze dvou perorálních stimulačních testů C-peptidové sekrece. Tři dny před podáním testů nebyla omezena běžná pohybová aktivita (kromě extrémní) ani dieta (kromě pití kávy a alkoholu). Testy byly provedeny po minimálně 8 hodinovém lačnění v 8 hodin ráno. Před vlastním zahájením testu dodrželi všichni pacienti s diabetes mellitus 2. typu minimálně 20 minutový klid na lůžku. Následně byl do periferní žíly za aseptických kautel zaveden žilní

katetr. Mezi zavedením periferního katetru a prvním krevním odběrem uplynulo dalších 20 minut.

Do klinické studie byly zařazeny dva perorální testy C-peptidové sekrece 1) jeden s obsahem syrovátkových bílkovin (OWIST) a 2) jeden s podáním glukózy (OGTT). Hodnoty sérové C-peptidové sekrece a plazmatické glykémie po OGTT byly užity jako reference. Dávky jednotlivých testů včetně časů odběrů jsou zobrazeny na obrázku 8. Surovátkové bílkoviny ze syrovátkového proteinového koncentrátu (WPC 80, viz výše) byly dochuceny stejně jako v předchozí studii. Průměrný obsah BCAAs uvedený výrobcem byl 23 %. Naše analýza pomocí kapilární elektroforézy HP^{3D} CE systém (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) ukázala 20,1 % zastoupení BCAA (tedy o něco vyšší než v první studii).



Obrázek 8 Schéma testů podaných ve studii II. Vysvětlivky: **p.o.** = perorální testy; **OWIST** = test s podáním samotných syrovátkových bílkovin ve formě syrovátkového proteinového koncentrátu 80 (WPC80); **OGTT** = orální glukózový toleranční test s podáním glukózy (reference); **G** = glukóza; ¹ nápoj (300ml vody).

Ke zhodnocení inzulínové sekrece jsme užili koncentraci sérového C-peptidu, protože v porovnání se stanovením samotného inzulínu je u jedinců s normálními ledvinnými funkcemi přesnějším ukazatelem vlastní inzulínové sekrece (Eaton et al. 1980). Odběr žilní krve ke stanovení sérového C-peptidu a plazmatické glykémie byl proveden po zavedení žilního katetru (t = - 10 minut, lačná hodnota), dále těsně po podání stimulační látky (t = 0) a v dalších časových intervalech (obrázek 8).

Žilní krev byla odebrána do zkumavek (S-Monovette; Sarstedt, Nümbrecht, Německo) a analyty byly stanoveny na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady stejně jako v první studii (viz výše).

6.1.3 Statistika a výpočty

Statistické srovnání hladin postprandiální glykémie a C-peptidové odpovědi po OWIST a OGTT bylo provedeno pomocí oboustranného Studentova t-testu. Předpoklady pro provedení t-testu byly ověřeny pomocí Fisherova testu shodnosti rozptylu a Kolmogorova–Smirnova testu normality. Personův korelační koeficient byl použit pro ověření závislosti mezi dvojicí skupin hodnot.

Všechny statistické hypotézy byly testovány na hladině významnosti 0,01 pomocí statistického softwaru R verze 2.14.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Rakousko) s Bonferroniho korekcemi pro mnohočetné porovnávání.

Výpočet iAUC byl proveden pomocí lichoběžníkové metody v různých časových intervalech. Pro sérový C-peptid byla vypočítána iAUC pro několik časových úseků - iAUC₀₋₃₀ (časná fáze inzulínové resp. C-peptidové sekrece), iAUC₀₋₉₀ (inzulínová resp. C-peptidová sekrece do 90. minuty), iAUC₀₋₁₈₀ (celková inzulínová resp. C-peptidová sekrece), iAUC₃₀₋₁₈₀ (pozdní inzulínová resp. C-peptidová sekrece). Pro plazmatickou glykémii byla zhodnocena iAUC₀₋₁₈₀. Z důvodu nevýrazného vzestupu glykémie po OWIST nebylo možné užít běžně užívané indexy např. orální dispoziční index (Utzschneider et al. 2009), neboť do výpočtu je zahrnut vzestup glykémie do 30. minuty.

Časná fáze inzulínové sekrece je často hodnocena pomocí tzv. inzulínogenního indexu (IGI (InsulinoGenic Index) = $C_{30}-C_{(-10)}/G_{30}-G_{(-10)}$) resp. dle hladin sérového C-peptidu a plazmatické glykémie v časech -10 (lačná hodnota) a v čase 30 po podání (Wareham et al. 1995). Pro nevýrazný vzestup glykémie po podání syrovátkových bílkovin jsme tedy užili upravenou ale také často užívanou formu IGI (Tura et al. 2006) $IGI = C_{30}-C_0/G_{30}$ (C_{30} - C-peptidové sekrece v 30. minutě; $C_{(-10)}$ - lačná hladina C-peptidu; G_{30} - plazmatické glykémie v 30. minutě).

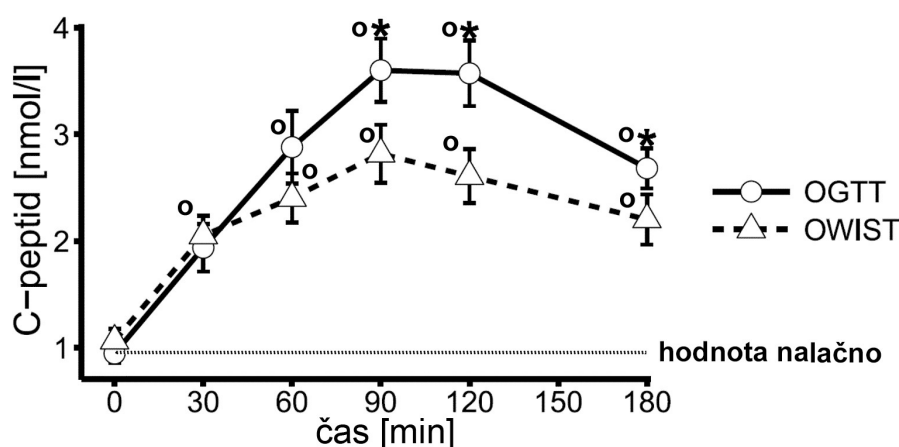
Jednotky použité pro plazmatickou glykémii byly v mmol/l a pro sérový C-peptid v nmol/l. Absolutní hodnota glykovaného hemoglobinu byla menší než 58 mmol/mol. Inzulínová rezistence byla dle HOMA2 IR $2,42 \pm 0,23$ dle Levyho et al. (1998).

6.2 Výsledky

6.2.1 C-peptidová odpověď (Graf 12)

Průměrná lačná hodnota C-peptidové sekrece byla $0,94 \pm 0,07$ nmol/l. Stimulovaná C-peptidová sekrece měla u pacientů s diabetes mellitus 2. typu po obou testech celkově podobný průběh s maximem hodnot v 90. minutě po jejich podání. Hodnota maxima byla

po OGTT $3,72 \pm 0,30$ nmol/l. Maximum po OWIST bylo o 22 % nižší než po OGTT ($p < 0,05$). Od 90. minuty po OWIST následoval plynulý pokles hladiny C-peptidové sekrece k hodnotě nalačno. Po OGTT byl zjištěn pokles hladin C-peptidové sekrece po 120. minutě, která ale nedosáhla hodnoty nalačno ani po 180. minutě. Absolutní koncentrace sérové C-peptidové sekrece byly nižší ($p < 0,01$) v 90., 120. a 180. minutě po OWIST v porovnání s OGTT. Výsledky po podání obou testů měli zcela stejný průběh v prvních 30 minutách, ve kterých se hodnotí první fáze inzulínové sekrece.



Graf 12 Absolutní hodnoty sérové koncentrace C-peptidu po provedení perorálních testů (OWIST, OGTT - reference) u pacientů s diabetes mellitus 2. typu ($n = 16$).

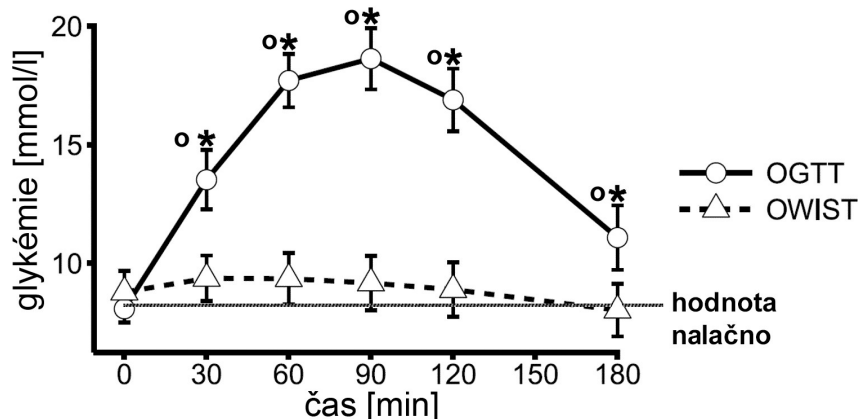
* označuje hodnoty významně odlišné od reference ($p < 0,01$).

o označuje hodnoty významně odlišné od hodnoty C-peptidu nalačno ($p < 0,01$).

6.2.2 Glykemická odpověď (Graf 13)

Průměrná hodnota plazmatické glukózy nalačno byla $8,11 \pm 0,57$ mmol/l. Maximální hladina glykémie byla po OGTT $19,1 \pm 1,33$ mmol/l, s poklesem po 90. minutě po podání bez dosažení hodnoty nalačno v průběhu testu.

Po OWIST nedošlo k významnému vzestupu postprandiální glykémie ($p < 0,01$), ale ani ke vzniku hypoglykémie.



Graf 13 Absolutní hodnota plazmatické koncentrace glykémie po provedení perorálních testů (OWIST, OGTT - reference) u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (n = 16).

* označuje hodnoty významně odlišné od reference ($p < 0,01$).

o označuje hodnoty významně odlišné od glykémie nalačno ($p < 0,01$).

6.2.3 β -buněčná funkce a glykemická odpověď u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Tabulka 6)

Průměrná plazmatická hladina glykémie nalačno byla menší než 10 mmol/l. Podání glukózy zvýšilo průměrně 2,1krát glykémii nalačno. Po OWIST nedošlo k významnému vzestupu glykémie. Po OWIST byla celková C-peptidová odpověď ($iAUC_{0-180}$) o 32 % nižší než po podání glukózy. Časná fáze inzulínové sekrece ($iAUC_{0-30}$) byla podobná u obou testů. IGI pozitivně koreloval mezi oběma testy ($p < 0,01$) a průměrně byl o 47 % vyšší po OWIST než po OGTT. Mezi pozdními fázemi inzulínové sekrece ($iAUC_{30-180}$) nebyly nalezeny korelace. Po OWIST byly zjištěny vyšší hodnoty inzulínové sekrece než po OGTT. Dále byla zjištěna pozitivní korelace ($r = 0,94$; $p = 0,0002$) mezi $iAUC_{0-90}$ a $iAUC_{0-180}$ u obou testů.

Tabulka 6 Hodnoty C-peptidové sekrece a plazmatické glukózy nalačno a po OGTT a OWIST. Sloupec $\Delta\%$ obsahuje průměrnou procentuální změnu mezi OGTT (reference) a OWIST. * označuje hodnoty významně odlišné od reference ($p < 0,01$). Vysvětlivka: IGI = inzulinogenní index.

	OGTT	OWIST	$\Delta\%$
Plazmatická glukóza - nalačno [mmol/l]	8,11 \pm 0,57	8,13 \pm 0,54	0 %
Plazmatická glukóza - 120min [mmol/l]	16,89 \pm 1,32	8,89 \pm 1,15	-47 %*
C-peptid - nalačno [nmol/l]	0,94 \pm 0,07	0,92 \pm 0,11	2 %
C-peptid - max. [nmol/l]	3,72 \pm 0,30	2,91 \pm 0,27	-22 %*
C-peptid - iAUC ₀₋₃₀ [nmol.min/l]	15,00 \pm 2,70	15,20 \pm 2,10	1 %
C-peptid - iAUC ₀₋₉₀ [nmol.min/l]	128,40 \pm 18,30	97,90 \pm 10,40	-24 %
C-peptid - iAUC ₃₀₋₁₈₀ [nmol.min/l]	324,50 \pm 37,00	214,80 \pm 21,10	-34 %*
C-peptid - iAUC ₀₋₁₈₀ [nmol.min/l]	339,50 \pm 38,90	230,00 \pm 21,90	-32 %*
Plazmatická glukóza - iAUC ₀₋₁₈₀ [mmol.min/l]	1251,00 \pm 109,40	89,30 \pm 29,70	-92 %*
IGI [10^{-3}]	0,56 \pm 0,12	0,82 \pm 0,13	47 %*

6.2.4 Tolerance testů

Samotné syrovátkové bílkoviny byly dobře tolerovány všemi jedinci. Po perorálně podané samotné glukóze musela být u tří pacientů korigována podáním exogenního inzulínu indukovaná hyperglykémie. Osm pacientů s diabetes mellitus 2. typu popisovalo nápoj s glukózou za příliš sladký a s odporem jej vypili.

6.3 Diskuze

Odborná veřejnost zabývající se diabetem každoročně aktualizuje svá doporučení pro klinickou praxi zakládající se na nejnovějších poznatcích vycházejících z klinických studií. Zaměřuje se především na rozšiřující se znalosti v oblasti etiopatogeneze diabetu se snahou o jeho kauzální terapii.

Zhodnocení β -buněčné funkce resp. stimulem indukované inzulínové či C-peptidové sekrece jako důležité znalosti k nastavení a k následnému zhodnocení terapie diabetu v doporučeních zatím není, i přestože řada klinických studií ukazuje výhody jejího stanovení jak u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Kramer et al. 2013) tak u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (Greenbaum et al. 2008).

Znalost β -buněčné funkce, na rozdíl od znalosti hodnoty inzulínu či C-peptidu nalačno (Meier et al. 2009), by mohla být klíčová k nastavení a sledování efektivní a striktně individualizované terapie u pacienta s diabetes mellitus 2. typu.

Problém se stanovením stimulované inzulínové sekrece je především ten, že je ovlivněna řadou faktorů. Za podmínek například nepřiměřeně vysoké fyzické zátěže, přítomnosti akutního onemocnění, chronického snížení ledvinných funkcí či dekompenzace diabetu není vyšetření inzulínové/C-peptidové sekrece vhodné. Je tedy nutné vyčkat na případnou úpravu (pokud lze) faktorů ovlivňující inzulínovou sekreci.

Cílem by měla být obnova funkce β -buňky resp. zachování inzulínové sekrece a tedy i zlepšení glykemického profilu včetně nižších hladin glykovaného hemoglobinu (Steffes et al. 2003). Ukazuje se, že díky vhodné terapeutické intervenci může zůstat β -buněčná funkce u pacientů s diabetes mellitus 2. typu řadu měsíců, let i desetiletí stabilní (Harrison et al. 2012) či se dokonce zlepšit (Polidori et al. 2014; Retnakavan et al. 2014), což může modifikovat postupně se zhoršující inzulínovou sekreci. Zachování β -buněčné funkce - časně i pozdní fáze inzulínové sekrece - u pacientů s diabetes mellitus 2. typu je nejčastěji spojováno s terapií GLP-1 analogy (Retnakaran et al. 2014), DPP-4 (Sjöstrand et al. 2014), thiazolidindiony (Gastadelli et al. 2007), glifloziny (Polidori et al. 2014) či exogenním podáním inzulínem (Harrison et al. 2012).

Z našich výsledků je patrné, že oba perorálně podané stimuly vedly u dobře kompenzovaných pacientů s diabetes mellitus 2. typu k charakteristickému průběhu stimulované C-peptidové sekrece s maximem v 90. minutě se znatelným snížením časně fáze inzulínové sekrece (Utzschneider et al. 2009). Celková stimulovaná C-peptidová sekrece po OWIST byla dobře hodnotitelná, i když o 32 % nižší než po OGTT. Byla ale nalezena lineární závislost mezi oběma testy při hodnocení IGI (Wareham et al. 1995). IGI je běžně užívaný a senzitivní ukazatel k hodnocení časně fáze inzulínové sekrece po podání glukózy (Kahn et al. 2001; Tura et al. 2006), protože dobře koreluje s akutní inzulínovou sekrecí resp. s první fází inzulínové sekrece po provedení IVGTT (Kosaka et al. 1996). $iAUC_{0-180}$ korelovalo s $iAUC_{0-90}$ po podání obou testů, proto se zdá být pouze 90 minutové trvání testu dostačující u pacientů s diabetes mellitus 2. typu.

Naše studie ukázala, že u dobře kompenzovaných pacientů s diabetes mellitus 2. typu se zachovalou inzulínovou sekrecí byla stimulována C-peptidová sekrece minimálně dvojnásobná v porovnání s lačnou hodnotou (Kahn et al. 2001).

Dále nebyla nalezena korelace výsledků po OWIST a OGTT s pozdní fází inzulínové sekrece ($iAUC_{30-180}$), která je dána především přímým účinkem substrátů se spoluúčastí působení inkretinových hormonů (Herzberg-Schäfer et al. 2010). Tento výsledek naznačuje, že u našich pacientů s diabetes mellitus 2. typu byl glukózový stimulus silnějším sekretagogem inzulínové

sekrece než sérové hladina větvených aminokyselin s předpokládaným minoritním působením inkretinových hormonů (Frid et al. 2005).

Provedení OWIST nevedlo k vzestupu postprandiální glykémie v porovnání s výrazně hyperglykemizujícím OGTT, což je u diabetiků žádoucí.

Naše klinická studie ukázala, že jednorázové podání 75 g syrovátkových bílkovin ***vede k hodnotitelné časně i pozdní fázi stimulované C-peptidové sekrece u pacientů s diabetes mellitus 2. typu a současně nevede k vzestupu postprandiální glykémie.*** Provedení OWIST tak bylo spojeno s podáním přirozeného perorálního stimulu, s minimem nežádoucích účinků, se snadným zhodnocením inzulínové sekrece a s minimálním vzestupem glykémii po podání testu. OWIST tak může být vhodným nástrojem ke zhodnocení stimulované C-peptidové sekrece.

7. Závěry, zhodnocení cílů a hypotéz práce

Podání samotných syrovátkových bílkovin vedlo k významné C-peptidové sekreci u zdravých jedinců i u pacientů s diabetes mellitus 2. typu bez současného zvýšení postprandiální glykémie. Obě hypotézy jsme tedy ověřili. Test se syrovátkovými bílkovinami byl pro zdravé jedince i pro pacienty s diabetes mellitus 2. typu dobře tolerován a byl dobře hodnotitelný. Srovátkové bílkoviny jsou dobře dostupná surovina, navíc je možné zajistit jejich vhodné dochucení a lze je i snadno připravit ve formě nápoje. Případné nežádoucí účinky mohou být předpokládány při odběru krve, při kterém se může vytvořit hematoma či tromboflebitida v místě vpichu.

Obě studie ukázaly, že podání syrovátkových bílkovin je dobrým stimulem pro sekreci inzulínu/C-peptidu. Zdánlivá nevýhoda spojená s nižší celkovou stimulovanou C-peptidovou sekrecí po OWIST (o 32 % v porovnání s OGTT) je vyvážena faktem, že při OWIST nedochází k významnému vzestupu postprandiální glykémie. To umožňuje provedení vyšetření sekrece C-peptidu v běžné ambulantní praxi.

Z výše zmíněných důvodů lze navrhnout užití syrovátkových bílkovin jako nového testu inzulínové sekrece v klinické praxi. Je však nutné rozšířit skupinu subjektů a ověřit reprodukovatelnost testu.

8. Souhrn

ÚVOD: Mléko a mléčné bílkoviny mají vyšší inzulinogenní index než index glykemický. Tato vlastnost je přisuzována především syrovátkovým bílkovinám. Cílem práce bylo zhodnotit C-peptidovou odpověď po podání syrovátkových bílkovin u zdravých jedinců (studie 1) a u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (studie 2) ve srovnání s ostatními často experimentálně užívanými stimulačními testy.

METODOLOGIE: Do studie 1 bylo zařazeno osm zdravých neobézních jedinců (BMI 17 - 25,9 kg/m²) ve věkovém rozmezí 20 až 26 let. Každý jedinec podstoupil celkem šest testů C-peptidové sekrece v průběhu jednoho měsíce. Tři testy byly perorální s podáním 1) samotné glukózy (OGTT – reference pro perorální testy), 2) samotných syrovátkových bílkovin (OWT) a 3) glukózy se syrovátkovými bílkovinami (OWGT). Zbylé tři testy byly intravenózní s podáním: 1) samotné glukózy (IVGTT – reference pro intravenózní testy), 2) argininu (AST) a 3) glukagonu (GST). Do studie 2 bylo zařazeno šestnáct neobézních (BMI 26,4 - 29,8 kg/m²) pacientů s diabetes mellitus 2. typu s uspokojivou kompenzací a se zachovalou inzulínovou sekrecí (průměrný lačný C-peptid byl $0,94 \pm 0,07$ nmol/l; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) ve věkovém rozmezí 56 až 80 let. Každý jedinec podstoupil celkem dva testy perorální s odstupem jednoho měsíce: test s podáním 1) samotné glukózy (OGTT – reference pro perorální testy) a 2) samotných syrovátkových bílkovin (OWIST).

VÝSLEDKY: Studie 1 ukázala, že celková C-peptidová sekrece (iAUC/min) po OWT byla o 93 % vyšší ($p < 0,05$) než po AST a současně o 64 % nižší ($p < 0,05$) než po OGTT (reference). Po OWT byla zjištěna nižší ($p < 0,05$) individuální variabilita v porovnání s výsledky po OWGT a OGTT. Celková C-peptidová sekrece po OWGT byla o 36 % vyšší než po OGTT. Po OWT nebyl prokázán vzestup postprandiální glykémie, což bylo jeho zásadní výhodou. Studie 2 ukázala shodný průběh C-peptidové sekrece po OWIST a OGTT s maximem v 90. minutě. Celková C-peptidová sekrece vyjádřená jako iAUC₀₋₁₈₀ po OWIST byla o 32 % nižší ($p < 0,01$) než po OGTT. Maximální hodnota C-peptidu po OWIST byla o 22 % nižší než po OGTT. Po OWIST nedošlo k vzestupu postprandiální glykémie.

ZÁVĚR: Uvedené klinické studie naznačují, že podání samotných syrovátkových bílkovin vede k významnému zvýšení inzulínové resp. C-peptidové sekrece (včetně nižší individuální variability po jejich podání) u zdravých jedinců a u pacientů s diabetes mellitus 2. typu bez současného zvýšení postprandiální glykémie. Test se syrovátkovými bílkovinami byl zdravými jedinci i pacienty s diabetes mellitus 2. typu dobře tolerován, dobře hodnotitelný a proto lze uvažovat o jeho zavedení do klinické praxe u diabetiků.

Summary

INTRODUCTION: Milk and milk proteins have higher insulinogenic index than glycemic index. This feature is mainly attributed to whey proteins. The main goal of this thesis was to evaluate a C-peptide response after administration of whey proteins in healthy individuals (study 1) and in patients with type 2 diabetes mellitus (study 2) in comparison to other experimental stimulation tests.

METHODS: Eight young, healthy (7 males, 1 female; aged 20-26 years), non-obese (BMI: 17 - 25.9 kg/m²) participants with normal glucose tolerance were enrolled for study 1. Each individual underwent six C-peptide secretion tests in total. Three secretion tests measured C-peptide response to orally administered substances: whey proteins only (OWT), whey proteins with glucose (OWGT) and glucose only (OGTT, reference); while the other three secretion tests measured C-peptide response to intravenously administered substances: arginine (AST), glucagon (GST) and glucose (IVGTT, reference). Sixteen overweight (BMI 26,4 - 29,8 kg/m²) patients with type 2 diabetes mellitus, good glycemic control and with preserved fasting serum C-peptide levels ($0,94 \pm 0,07$ nmol/l) were enrolled for study 2. Two oral stimulation tests - one with 75 g of glucose (OGTT) and the other with 75 g of whey proteins (OWIST) - were used for assessing serum C-peptide and plasma glucose levels in each participant.

RESULTS: Study 1 showed that the C-peptide secretion (iAUC/min) stimulated by OWT was greater by 93 % ($p < 0,05$) than the C-peptide response after AST and 64 % smaller ($p < 0,05$) than response after OGTT. OWT also showed lower variability ($p < 0,05$) in C-peptide responses compared to OWGT and OGTT. The highest total C-peptide response was induced by OWGT (36 % higher than after OGTT). OWT consistently increased C-peptide concentrations, while not increasing glucose levels. In study 2, both oral tests induced similar pattern of C-peptide secretion, with a peak at 90 min. The serum C-peptide peak concentration after OWIST was 22 % lower than in OGTT. Similarly, the C-peptide iAUC₀₋₁₈₀ were 32 % lower in the OWIST than in the OGTT ($p < 0,01$). Contrary to OGTT the OWIST did not cause a significant increase of glycaemia ($p < 0,01$).

CONCLUSION: Findings from both studies indicate that administration of whey proteins leads to significant increase of C-peptide/insulin secretion in both healthy individuals and in patients with type 2 diabetes mellitus, while not increasing glycemic levels. As whey protein tests were also well-tolerated by both groups of individuals, whey protein tests might be a useful tool in estimation of stimulated serum C-peptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus.

9. Literatura

- [AUTOŘI NEUVEDENI]. Český statistický úřad, spotřeba potravin – 2016 [cit. 2018-2-21]. URL:<<https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2016>>.
- [AUTOŘI NEUVEDENI]. Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* [online]. 1985, **727**, 1-113.
- [AUTOŘI NEUVEDENI]. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAQ Expert Consultation. *FAO Food Nutr Pap* [online]. 2013, **92**, 1-66.
- [AUTOŘI NEUVEDENI]. United States Department of Agriculture (USDA), Food Composition Databases) [cit. 2018-2-21]. URL:<<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>>.
- [AUTOŘI NEUVEDENI]. Ústav laboratorní diagnostiky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze, Laboratorní příručka [cit. 2018-2-21]. URL:<https://www.fnkv.cz/lab/lp_uld/HVEZDAVARI.htm>.
- ABDUL-GHANI, MA, D TRIPATHY a RA DEFRONZO. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care* [online]. 2006, **29**(5), 1130-9. DOI: 10.2337/diacare.2951130.
- ADAMS, RL, KS BROUGHTON. Insulinotropic Effects of Whey: Mechanisms of Action, Recent Clinical Trials, and Clinical Applications. *Ann Nutr Metab* [online]. 2016, **69**(1), 56-63. DOI: 10.1159/000448665.
- AHRÉN, B a G PACINI. Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta cell function in clinical studies. *Eur J Endocrinol* [online]. 2004, **150**(2), 97-104. DOI: 10.1530/eje.0.1500097.
- AHRÉN, B a H LARSSON. Quantification of insulin secretion in relation to insulin sensitivity in nondiabetic postmenopausal women. *Diabetes* [online]. 2002, **51**(1), S202-11. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S202>.
- AHRÉN, B a JJ HOLST. The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanisms and is important for postprandial glycemia. *Diabetes* [online]. 2001, **50**(5), 1030-8.
- AHRÉN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* [online]. 2000, **43**(4), 393-410.
- ACHESON, KJ, A BLONDEL-LUBRANO, S OGUEY-ARAYMON, et al. Protein choices targeting thermogenesis and metabolism. *Am J Clin Nutr* [online]. 2011, **93**(3), 525-34. DOI: 10.3945/ajcn.110.005850.

- AIZAWA, T, M KOMATSU, N ASANUMA, et al. Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell. *Trends Pharmacol Sci* [online]. 1998, **19**(12), 496-9.
- AKHAVAN, T, BL LUHOVYY, S PANABI, et al. Mechanism of action of pre-meal consumption of whey protein on glycemic control in young adults. *J Nutr Biochem* [online]. 2014, **25**(1), 36-43. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.08.012.
- ANDERSON, RL, RF HAMMAN, PJ SAVAGE, et al. Exploration of simple insulin sensitivity measures derived from frequently sampled intravenous glucose tolerance (FSIGT) tests. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Am J Epidemiol* [online]. 1995, **142**(7), 724-32.
- ASHCROFT, FM, P PROKS, PA SMITH, et al. Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* [online]. 1994, **55**, 54-65.
- ASLAMY, A a DC THURMOND. Exocytosis proteins as novel targets for diabetes prevention and/or remediation? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [online]. 2017, **312**(5), R739-R752. DOI: 10.1152/ajpregu.00002.2017.
- AVIGNON, A, C BOEGNER, D MARIANO-GOULART, et al. Assessment of insulin sensitivity from plasma insulin and glucose in the fasting or post oral glucose-load state. *Int J Obes Relat Metab Disord* [online]. 1999, **23**, 512-7. DOI: 10.1038/sj.ijo.0800864.
- BAER, DJ, KS STOTE, DR PAUL, et al. Whey protein but not soy protein supplementation alters body weight and composition in free-living overweight and obese adults. *J Nutr* [online]. 2011, **141**(8), 1489-94. DOI: 10.3945/jn.111.139840.
- BARDET, S, C PSQUAL, D MAUGENDRE, et al. Inter and intra individual variability of acute insulin response during intravenous glucose tolerance tests. *Diabetes Metab* [online]. 1989, **15**(5), 224-32.
- BASU, A, A ALZAID, S DINNEEN, et al. Effects of a change in the pattern of insulin delivery on carbohydrate tolerance in diabetic and nondiabetic humans in the presence of differing degrees of insulin resistance. *J Clin Invest* [online]. 1996, **97**(10), 2351-61. DOI: 10.1172/JCI118678.
- BELFIORE, F, S IANNELLO, G VOLPICELLI. Insulin sensitivity indices calculated from basal and OGTT-induced insulin, glucose, and FFA levels. *Mol Genet Metab* [online]. 1998, **63**(2), 134-41. DOI: 10.1006/mgme.1997.2658.
- BELOBRAJDIC, DP, GH MCINTOSH a JA Owens. A high-whey-protein diet reduces body weight gain and alters insulin sensitivity relative to red meat in wistar rats. *J Nutr* [online]. 2004, **134**(6), 1454-8.

- BERGMAN, RN, DT FINEGOOD a SE KAHN. The evolution of beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* [online]. 2002, **32**(3), 35-45. DOI: 10.1046/j.1365-2362.32.s3.5.x.
- BERGMAN, RN, LS PHILLIPS a C COBELLI. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man: measurement of insulin sensitivity and beta-cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose. *J Clin Invest* [online]. 1981, **68**(6), 1456-67. DOI: 10.1172/JCI110398.
- BERGMAN, RN, YZ IDER, CR BOWDEN, et al. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* [online]. 1979, **236**(6), E667-77.
- BERGMAN, RN. Lilly lecture 1989. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes* [online]. 1989, **38**(12), 1512-27. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.38.12.1512>.
- BERTHOUD, HR a B JEANRENAUD. Sham feeding-induced cephalic phase insulin release in the rat. *Am J Physiol* [online]. 1982, **242**(4), E280-5.
- BOIRIE, Y, M DANGIN, P GACHON, et al. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* [online]. 1997, **94**(26), 14930-5. DOI: 10.1073/pnas.94.26.14930.
- BOWEN, J, M NOAKES a PM CLIFTON. Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 2006, **91**(8), 2913-9.
- BRÄNDLE, M, R LEHMANN, FE MALY, et al. Diminished insulin secretory response to glucose but normal insulin and glucagon secretory responses to arginine in a family with maternally inherited diabetes and deafness caused by mitochondrial tRNA(LEU(UUR)) gene mutation. *Diabetes Care* [online]. 2001, **24**(7), 1253-8. DOI: 10.2337/diacare.24.7.1253.
- BRATANOVA-TOCHKOVA, TK, H CHENG, S DANIEL, et al. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* [online]. 2002, **51**(1), S83-90.
- BROSNAN, JT. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr* [online]. 2003, **133** (6 Suppl 1), 2068S-2072S.
- BROWN, JC a JR DRYBURGH. A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence. *Can J Biochem* [online]. 1971, **49**, 867-872. DOI: <https://doi.org/10.1139/o71-122>.

- BUCHAN, AM, JM POLAK, E SOLCIA, et al. Localisation of intestinal gastrin in a distinct endocrine cell type. *Nature* [online]. 1979, **277**(5692), 138-40.
- BURCELIN, R, PD CANI, C KNAUF. Glucagon-like peptide-1 and energy homeostasis. *J Nutr* [online]. 2007, **137**(11), 2534S-2538S.
- CALBET, JA a JJ HOLST. Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. *Eur J Nutr* [online]. 2004, **43**(3), 127-39. DOI: 10.1007/s00394-004-0448-4.
- CALLES-ESCANDON, J a DC ROBBINS. Loss of early phase of insulin release in humans impairs glucose tolerance and blunts thermic effect of glucose. *Diabetes* [online]. 1987, **36**(10), 1167-72. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.36.10.1167>.
- CAUMO, A a L LUZI. First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 2004, **287**(3), E371-85. DOI: 10.1152/ajpendo.00139.2003.
- CEDERHOLM, J a L WIBELL. Insulin release and peripheral sensitivity at the oral glucose tolerance test. *Diabetes Res Clin Pract* [online]. 1990, **10**(2), 167-75. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-8227\(90\)90040-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0168-8227(90)90040-Z).
- CERASI, E a R LUFT. The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)* [online]. 1967, **55**(2), 278-304. DOI: 10.1530/acta.0.0550278.
- CERASI, E, R LUFT a S EFENDIC. Decreased sensitivity of the pancreatic beta cells to glucose in prediabetic and diabetic subjects: A glucose dose-response study. *Diabetes* [online]. 1972, **21**(4), 224-34. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.21.4.224>.
- CERASI, E. Mechanisms of glucose stimulated insulin secretion in health and in diabetes: some re-evaluations and proposals. *Diabetologia* [online]. 1975, **11**(1), 1-13.
- CLIFTON, PM, C GALBRAITH a L COLES. Effect of a low dose whey/guar preload on glycemic control in people with type 2 diabetes--a randomised controlled trial. *Nutr J* [online]. 2014, **13**, 103. DOI: 10.1186/1475-2891-13-103.
- CREUTZFELDT, W, M TALAULICAR, R EBERT, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide (GIP) release by insulin and glucose in juvenile diabetes. *Diabetes* [online]. 1980, **29**(2), 140-5. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.29.2.140>.
- CURRY, DL, LL BENNETT a GM GRODSKY. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* [online]. 1968, **83**(3), 572-84. DOI: 10.1210/endo-83-3-572.
- DE VEGT, F, JM DEKKER, CD STEHOUWER, et al. The 1997 American Diabetes Association criteria versus the 1985 World Health Organization criteria for the diagnosis

- of abnormal glucose tolerance: poor agreement in the Hoorn Study. *Diabetes Care* [online]. 1998, 21(10), 1686-90.
- DEFRONZO, RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* [online]. 2009, 58(4), 773-95. DOI: 10.2337/db09-9028.
- DEFRONZO, RA, JD TOBIN a R ANDRES. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* [online]. 1979, 237(3), E214-23.
- DEFRONZO, RA, RC BONADONNA a E FERRANNINI. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* [online]. 1992, 15(3), 318-68. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.15.3.318>.
- DELA, F, ME VON LINSTOW, KJ MIKINES, et al. Physical training may enhance beta-cell function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 2004, 287(5), E1024-31. DOI: 10.1152/ajpendo.00056.2004.
- DRUCKER, DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* [online]. 2006, 3(3), 153-65.
- DUCKWORTH, WC, CD SAUDEK, A GIOBBIE-HURDER, et al. The Veterans Affairs Implantable Insulin Pump Study: effect on cardiovascular risk factors. *Diabetes Care* [online]. 1998, 21(10), 1596-602.
- EATON, RP, RC ALLEN, DS SCHADE, et al. Prehepatic insulin production in man: kinetic analysis using peripheral connecting peptide behavior. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 1980, 51(3), 520-8.
- EGAN, JM, AR CLOCQUET a D ELAHI. The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 2002, 87(3), 1282-90. DOI: 10.1210/jcem.87.3.8337.
- ELAHI, D, M MCALLON-DYKE, NK FUKAGAWA, et al. The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects. *Regul Pept* [online]. 1994, 51(1), 63-74. DOI: 10.1016/0167-0115(94)90136-8.
- ELIASSON, L, F ABDULKADER, M BRAUN, et al. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol* [online]. 2008, 586(14), 3313-24. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.155317.
- ELRICK, H, L STIMMLER, CJ HLAD, et al. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 1964, 24, 1076-82.

- FABER, OK a C BINDER. C-peptide response to glucagon. A test for the residual beta-cell function in diabetes mellitus. *Diabetes* [online]. 1977, **26**(7), 605-10.
- FAERCH, K, K BORCH-JOHNSEN, JJ HOLST, et al. Pathophysiology and aetiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance: does it matter for prevention and treatment of type 2 diabetes? *Diabetologia* [online]. 2009, **52**, 1714-1723.
- FAJANS, SS, RF KNOFF, JC FLOYD, et al. The experimental induction in man of sensitivity to leucin hypoglycemia. *J Clin Invest* [online]. 1963, **42**(2), 216-29.
- FERRANNINI, E a A MARI. Beta cell function and its relation to insulin action in humans: a critical appraisal. *Diabetologia* [online]. 2004, **47**(5), 943-56. DOI: 10.1007/s00125-004-1381-z.
- FINEGOOD, DT, IM HRAMIYAK a J DUPRE. A modified protocol for estimation of insulin sensitivity with the minimal model of glucose kinetics in patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 1990, **70**(6), 1538-49. DOI: 10.1210/jcem-70-6-1538.
- FLOYD, JC, S FAJANS, S PEK, et al. Synergistic Effect of Essential Amino Acids and Glucose upon Insulin Secretion in Man. *Diabetes* [online]. 1970, 19(2): 109-115. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.19.2.109>.
- FLOYD, JC, SS FAJANS, JW CONN, et al. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* [online]. 1966, **45**(9), 1487-502. DOI: 10.1172/JCI105456.
- FLOYD, JC, SS FAJANS, RF KNOFF, et al. Evidence that insulin release is the mechanism for experimentally induced leucine hypoglycemia in man. *J Clin Invest* [online]. 1963, **42**, 1714-9.
- FRESTEDT, JL, JL ZENK, MA KUSKOWSKI, et al. A whey-protein supplement increases fat loss and spares lean muscle in obese subjects: a randomized human clinical study. *Nutr Metab (Lond)* [online]. 2008, **5**, 8. DOI: 10.1186/1743-7075-5-8.
- FRID, AH, M NILSSON, JJ HOLST, et al. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* [online]. 2005, **82**(1), 69-75.
- FRITSCHKE, A, A MADAUS, N STEFAN, et al. Relationships among age, proinsulin conversion, and beta-cell function in nondiabetic humans. *Diabetes* [online]. 2002, **51**(1), S234-9. DOI: 10.2337/diabetes.51.2007.S234.
- FU, Z, ER GILBERT a D LIU. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev* [online]. 2013, **9**(1), 25-53.

- GANNON, MC a FQ NUTTALL. Amino acid ingestion and glucose metabolism--a review. *IUBMB Life* [online]. 2010, **62**(9), 660-8. DOI: 10.1002/iub.375.
- GAO, Z, RA YOUNG, G LI, et al. Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* [online]. 2003, **144**(5), 1949-57.
- GASTADELLI, A, E FERRANNINI, Y MIYAZAKI, et al. Thiazolidinediones improve beta-cell function in type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 2007, **292**(3), E871-83. DOI: 10.1152/ajpendo.00551.2006.
- GAULT, VA, FP O'HARTE, P HARRIOTT, et al. Effects of the novel (Pro3)GIP antagonist and exendin(9-39)amide on GIP- and GLP-1-induced cyclic AMP generation, insulin secretion and postprandial insulin release in obese diabetic (ob/ob) mice: evidence that GIP is the major physiological incretin. *Diabetologia* [online]. 2003, **46**(2), 222-30.
- GILON, P a JC HENQUIN. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* [online]. 2001, **22**(5), 565-604.
- GOTTSÄTER, A, M LANDIN-OLSSON, P FERNLUND, et al. Pancreatic beta-cell function evaluated by intravenous glucose and glucagon stimulation. A comparison between insulin and C-peptide to measure insulin secretion. *Scand J Clin Lab Invest* [online]. 1992, **52**(7), 631-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/00365519209115506>.
- GREENBAUM, C, K SEIDEL a C PIHOKER. The case for intravenous arginine stimulation in lieu of mixed-meal tolerance tests as outcome measure for intervention studies in recent-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care* [online]. 2004, **27**(5), 1202-4. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.27.5.1202>.
- GREENBAUM, CJ, T MANDRUP-POULSEN, PF MCGEE, et al. Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of beta-cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes. *Diabetes Care* [online]. 2008, **31**(10), 1966-71. DOI: 10.2337/dc07-2451.
- GRILL, V a M RUNDDELDT. Effects of priming with D-glucose on insulin secretion from rat pancreatic islets: increased responsiveness to other secretagogues. *Endocrinology* [online]. 1979, **105**(4), 980-7.
- GRILL, V. Nutrient-induced priming of insulin and glucagon secretion. Effects of alpha-ketoisocaproic acid. *Endocrinology* [online]. 1982, **110**(3), 1013-7.
- GRODSKY, GM, D CURRY, H LANDAHL, et al. Further studies on the dynamic aspects of insulin release in vitro with evidence for a two-compartmental storage system. *Acta Diabetol Lat* [online]. 1969, **6**(1), 554-78.

- GRODSKY, GM. A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling. *J Clin Invest* [online]. 1972, **51**(8), 2047-59.
- GUNAWARDANA, SC, YJ LIU, MJ MACDONALD, et al. Anaplerotic input is sufficient to induce time-dependent potentiation of insulin release in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 2004, **287**(5), E828-33.
- GUNNARSSON, PT, MS WINZELL, CF DEACON, et al. Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. *Endocrinology* [online]. 2006, **147**(7), 3173-80. DOI: 10.1210/en.2005-1442.
- GUNNERUD, UJ, C HEINZLE, JJ HOLST, et al. Effects of pre-meal drinks with protein and amino acids on glycemic and metabolic responses at a subsequent composite meal. *PLoS One* [online]. 2012, **7**(9), e44731. DOI: 10.1371/journal.pone.0044731.
- GUNNERUD, UJ, EM ÖSTMAN a IM BJÖRCK. Effects of whey proteins on glycaemia and insulinaemia to an oral glucose load in healthy adults; a dose-response study. *Eur J Clin Nutr* [online]. 2013, **67**(7), 749-53. DOI: 10.1038/ejcn.2013.88.
- GUTCH, M, S KUMAR, S RAZI, et al. Assessment of insulin sensitivity/resistance. *Indian J Endocrinol Metab* [online]. 2015, **19**(1), 160-4. DOI: 10.4103/2230-8210.146874.
- GUTT, M, CL DAVIS, SB SPITZER, et al. Validation of the insulin sensitivity index (ISI(0,120)): comparison with other measures. *Diabetes Res Clin Pract* [online]. 2000, **47**(3), 177-84. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(99\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(99)00116-3).
- HALL, WL, DJ MILLWARD, SJ LONG, et al. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr* [online]. 2003, **89**(2), 239-48. DOI: 10.1079/BJN2002760.
- HAMAD, EM, SH TAHA, AG ABOU DAWOOD, et al. Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats. *Lipids Health Dis* [online]. 2011, **10**, 57. DOI: 10.1186/1476-511X-10-57.
- HARRISON, LB, B ADAMS-HUET, P RASKIN, et al. β -cell function preservation after 3.5 years of intensive diabetes therapy. *Diabetes Care* [online]. 2012, **35**(7), 1406-12. DOI: 10.2337/dc11-2170.
- HEDBLAD, B, P NILSSON, L JANZON, et al. Relation between insulin resistance and carotid intima-media thickness and stenosis in non-diabetic subjects. Results from a cross-sectional study in Malmo, Sweden. *Diabet Med* [online]. 2000, **17**, 299-307. DOI: 10.1046/j.1464-5491.2000.00280.x.

- HENQUIN, JC, N ISHIYAMA, M NENQUIN, et al. Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes* [online]. 2002, **51**(1), S60-7. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S60>.
- HENQUIN, JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* [online]. 2000, **49**(11), 1751-60. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1751>.
- HERZBERG-SCHÄFER, S, M HENI, N STEFAN, et al. Impairment of GLP1-induced insulin secretion: role of genetic background, insulin resistance and hyperglycaemia. *Diabetes Obes Metab* [online]. 2012, **14**(3), 85-90. DOI: [10.1111/j.1463-1326.2012.01648.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2012.01648.x)
- HOFFMAN, JR a MJ FALVO. Protein - Which is Best? *J Sports Sci Med* [online]. 2004, **3**(3), 118-30.
- HOLST, JJ a J GROMADA. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 2004, **287**(2), E199-206.
- HOLZ, GG a JF HABENER. Signal transduction crosstalk in the endocrine system: pancreatic beta-cells and the glucose competence concept. *Trends Biochem Sci* [online]. 1992, **17**(10), 388-93.
- HORWITZ, DL, JI STARR, ME MAKO, et al. Proinsulin, insulin, and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. *J Clin Invest* [online]. 1975, **55**(6), 1278-83. DOI: [10.1172/JCI108047](https://doi.org/10.1172/JCI108047).
- HOSKER, JP, AS RUDENSKI, MA BURNETT, et al. Similar reduction of first- and second-phase B-cell responses at three different glucose levels in type II diabetes and the effect of gliclazide therapy. *Metabolism* [online]. 1989, **38**(8), 767-72.
- HOYT, G, MS HICKEY a L CORDAIN. Dissociation of the glycaemic and insulinaemic responses to whole and skimmed milk. *Br J Nutr* [online]. 2005, **93**(2), 175-7. DOI: <https://doi.org/10.1079/BJN20041304>.
- HULMI, JJ, CM LOCKWOOD, JR STOUT. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutr Metab (Lond)* [online]. 2010, **7**, 51. DOI: [10.1186/1743-7075-7-51](https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-51).
- CHAILLOUS, L, V ROHMER, D MAUGENDRE, et al. Differential beta-cell response to glucose, glucagon, and arginine during progression to type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Metabolism* [online]. 1996, **45**(3), 306-14. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495\(96\)90283-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495(96)90283-8).

- CHANG-CHEN, KJ, R MULLUR a E BERNAL-MIZRACHI. Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* [online]. 2008, **9**(4), 329-43. DOI: 10.1007/s11154-008-9101-5.
- IKKOS, D a R LUFT. On the intravenous glucose tolerance test. *Acta Endocrinol (Copenh)* [online]. 1957, **25**(3), 312-34. DOI: 10.1530/acta.0.0250312.
- JAKUBOWICZ, D, O FROY, B AHRÉN, et al. Incretin, insulinotropic and glucose-lowering effects of whey protein pre-load in type 2 diabetes: a randomised clinical trial. *Diabetologia* [online]. 2014, **57**(9), 1807-11. DOI: 10.1007/s00125-014-3305-x.
- JENSEN, CC, M CNOP, RL HULL, et al. Beta-cell function is a major contributor to oral glucose tolerance in high-risk relatives of four ethnic groups in the U.S. *Diabetes* [online]. 2002, **51**(7), 2170-8.
- KAHN, SE, B MONTGOMERY, W HOWELL, et al. Importance of early phase insulin secretion to intravenous glucose tolerance in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol Metab* [online]. 2001, **86**(12), 5824-9. DOI: 10.1210/jcem.86.12.8105.
- KAJIO, H, S OLSZEWSKI, PJ ROSNER, et al. A low-affinity Ca²⁺-dependent association of calmodulin with the Rab3A effector domain inversely correlates with insulin exocytosis. *Diabetes* [online]. 2001, **50**(9), 2029-39. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.9.2029>.
- KAO, PC, RL TAYLOR a DW HESER. C-peptide immunochemiluminometric assay developed from two seemingly identical polyclonal antisera. *Ann Clin Lab Sci* [online]. 1992, **22**(5), 307-316.
- KASIM-KARAKAS, SE, WM CUNNINGHAM a A TSODIKOV. Relation of nutrients and hormones in polycystic ovary syndrome. *Am J Clin Nutr* [online]. 2007, **85**(3), 688-94.
- KATZ, A, SS NAMBI, K MATHER, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 2000, **85**(7), 2402-10. DOI: 10.1210/jcem.85.7.6661.
- KELLY, A, C LI, Z GAO, et al. Glutaminolysis and insulin secretion: from bedside to bench and back. *Diabetes* [online]. 2002, **51**(3), S421-6.
- KELLY, RB. Microtubules, membrane traffic, and cell organization. *Cell* [online]. 1990, **61**(1), 5-7.
- KIM, D a J KIM. Dairy consumption is associated with a lower incidence of the metabolic syndrome in middle-aged and older Korean adults: the Korean Genome and Epidemiology Study (KoGES). *Br J Nutr* [online]. 2017, **117**(1), 148-160. DOI: 10.1017/S000711451600444X.

- KIM, W a JM EGAN. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev* [online]. 2008, **60**(4), 470-512.
- KOMATSU, M, T SCHERMERHORN, M NODA, et al. Augmentation of insulin release by glucose in the absence of extracellular Ca²⁺: new insights into stimulus-secretion coupling. *Diabetes* [online]. 1997, **46**, 1928-1938. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.46.12.1928>.
- KORYTKOWSKI, M, A THOMAS, L REID, et al. Glimepiride improves both first and second phases of insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Care* [online]. 2002, **25**(9), 1607-11.
- KOSAKA, K, T KUZUYA, R HAGURA, et al. Insulin response to oral glucose load is consistently decreased in established non-insulin-dependent diabetes mellitus: the usefulness of decreased early insulin response as a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* [online]. 1996, **13**(9 Suppl 6), 109-119.
- KRAMER, CK, B ZINMAN, R RETNAKARAN. Short-term intensive insulin therapy in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* [online]. 2013, **1**(1), 28-34. DOI: [10.1016/S2213-8587\(13\)70006-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70006-8)
- LARSSON, H a B AHRÉN. Glucose-dependent arginine stimulation test for characterization of islet function: studies on reproducibility and priming effect of arginine. *Diabetologia* [online]. 1998, **41**(7), 772-7. DOI: [10.1007/s001250050986](https://doi.org/10.1007/s001250050986).
- LARSSON, H a B AHRÉN. Relative hyperproinsulinemia as a sign of islet dysfunction in women with impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 1999, **84**(6), 2068-74. DOI: [10.1210/jcem.84.6.5717](https://doi.org/10.1210/jcem.84.6.5717).
- LEAHY, JL. Natural history of beta-cell dysfunction in NIDDM. *Diabetes Care* [online]. 1990, **13**(9), 992-1010. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.13.9.992>.
- LEVY, J, AB ATKINSON, PM BELL, DR MCCANCE, et al. Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study. *Diabet Med* [online]. 1998, **15**(4), 290-6. DOI: [10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199804\)15:4<290::AID-DIA570>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199804)15:4<290::AID-DIA570>3.0.CO;2-M).
- LI, H, Y MA, A DONG, et al. Protein composition of yak milk. *Dairy Science & Technology* [online]. 2010, **90** (1), 111–117.
- LIU, YJ, H CHENG, H DROUGHT, et al. Activation of the KATP channel-independent signaling pathway by the nonhydrolyzable analog of leucine, BCH. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 2003, **285**(2), E380-9.
- LIU, Z, PB JEPPESEN, S GREGERSEN, et al. Dose- and Glucose-Dependent Effects of Amino Acids on Insulin Secretion from Isolated Mouse Islets and Clonal INS-1E Beta-Cells. *Endocr J* [online]. 2012, **59**(1), 55-64. DOI: [10.1900/RDS.2008.5.232](https://doi.org/10.1900/RDS.2008.5.232).

- LUZI, L a RA DEFRONZO. Effect of loss of first-phase insulin secretion on hepatic glucose production and tissue glucose disposal in humans. *Am J Physiol* [online]. 1989, **257**(2 Pt 1), E241-6.
- MA, J, DR JESUDASON, JE STEVENS, et al. Sustained effects of a protein 'preload' on glycaemia and gastric emptying over 4 weeks in patients with type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract* [online]. 2015, **108**(2), e31-4. DOI: 10.1016/j.diabres.2015.02.019.
- MA, J, JE STEVENS, K CUKIER, et al. Effects of a protein preload on gastric emptying, glycemia, and gut hormones after a carbohydrate meal in diet-controlled type 2 diabetes. *Diabetes Care* [online]. 2009, **32**(9), 1600-2. DOI: 10.2337/dc09-0723.
- MANDERS, RJ, R KOOPMAN, WE SLUIJSMANS, et al. Co-ingestion of a protein hydrolysate with or without additional leucine effectively reduces postprandial blood glucose excursions in Type 2 diabetic men. *J Nutr* [online]. 2006, **136**(5), 1294-9.
- MARI, A, G PACINI, E MURPHY, et al. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* [online]. 2001, **24**(3), 539-48. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc14-er07a>.
- MARTINUSSEN, C, KN BOJSEN-MØLLER, C DIRKSEN, et al. Immediate enhancement of first-phase insulin secretion and unchanged glucose effectiveness in patients with type 2 diabetes after Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 2015, **15**, 308(6), E535-44. DOI: 10.1152/ajpendo.00506.2014.
- MARTY, N, M DALLAPORTA a B THORENS. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda)* [online]. 2007, **22**, 241-51.
- MATSUDA, M a RA DEFRONZO. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* [online]. 1999, **22**, 1462-1470. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.22.9.1462>.
- MATTHEWS, DR, JP HOSKER, AS RUDENSKI, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* [online]. 1985, **28**(7), 412-9. DOI: 10.1007/BF00280883.
- MCAULEY, KA, SM WILLIAMS, JI MANN, et al. Diagnosing insulin resistance in the general population. *Diabetes Care* [online]. 2001, **24**(3), 460-4. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.24.3.460>.

- MEDHAMMAR, E, R WIJESINHA-BETTONI, B STADLMAYR, et al. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *J Sci Food Agric* [online]. 2012, **92**(3), 445-74. DOI: 10.1002/jsfa.4690.
- MEIER, JJ, BA MENGE, TG BREUER, CA MÜLLER, et al. Functional assessment of pancreatic beta-cell area in humans. *Diabetes* [online]. 2009, **58**(7), 1595-603.
- MITRAKOU, A, D KELLEY, M MOKAN, et al. Role of Reduced Suppression of Glucose Production and Diminished Early Insulin Release in Impaired Glucose Tolerance. *N Engl J Med* [online]. 1992, **326**, 22-29. DOI: 10.1056/NEJM199201023260104.
- MITRAKOU, A, H VUORINEN-MARKKOLA, G RAPTIS, et al. Simultaneous assessment of insulin secretion and insulin sensitivity using a hyperglycemia clamp. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 1992, **75**(2), 379-82. DOI: 10.1210/jcem.75.2.1639939.
- MOJSOV, S, GC WEIR a JF HABENER. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* [online]. 1987, **79**(2), 616-9.
- MONNIER, L. Is postprandial glucose a neglected cardiovascular risk factor in type 2 diabetes? *Eur J Clin Invest* [online]. 2000, **30**(2), 3-11.
- MORTENSEN, LS, J HOLMER-JENSEN, ML HARTVIGSEN, et al. Effects of different fractions of whey protein on postprandial lipid and hormone responses in type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr* [online]. 2012, **66**(7), 799-805. DOI: 10.1038/ejcn.2012.48.
- NAUCK, M, F STÖCKMANN, R EBERT, et al. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* [online]. 1986, **29**, 46-54. DOI: 10.1007/BF02427280.
- NAUCK, MA, E BARTELS, C ORSKOV, et al. Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 1993, **76**(4), 912-7. DOI: 10.1210/jcem.76.4.8473405.
- NAUCK, MA, E HOMBERGER, EG SIEGEL, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 1986, **63**(2), 492-8. DOI: 10.1210/jcem-63-2-492.
- NESHER, R a E CERASI. Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes* [online]. 2002, **51**(1), S53-9.
- NILSSON, M, JJ HOLST a IM BJÖRCK. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *Am J Clin Nutr* [online]. 2007, **85**(4), 996-1004.

- NILSSON, M, M STENBERG, AH FRID, et al. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr* [online]. 2004, **80**(5), 1246-53.
- NOLAN, CJ, MS MADIRAJU, V DELGHINGARO-AUGUSTO, et al. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* [online]. 2006, **55**(2), S16-23. DOI: <https://doi.org/10.2337/db06-S003>.
- OH, YS. Mechanistic insights into pancreatic beta-cell mass regulation by glucose and free fatty acids. *Anat Cell Biol* [online]. 2015, **48**(1), 16-24. DOI: 10.5115/acb.2015.48.1.16.
- OHARA-IMAIZUMI, M, T FUJIWARA, Y NAKAMICHI, et al. Imaging analysis reveals mechanistic differences between first- and second-phase insulin exocytosis. *J Cell Biol* [online]. 2007, **177**(4), 695-705. DOI: 10.1083/jcb.200608132.
- OKA, R, K YAGI, M SAKURAI, et al. Insulin secretion and insulin sensitivity on the oral glucose tolerance test (OGTT) in middle-aged Japanese. *Endocr J* [online]. 2012, **59**(1), 55-64.
- O'MEARA, NM, J STURIS, E VAN CAUTER, et al. Lack of control by glucose of ultradian insulin secretory oscillations in impaired glucose tolerance and in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* [online]. 1993, **92**(1), 262-71.
- OSTENSON, CG, H GAISANO, L SHEU, et al. Impaired gene and protein expression of exocytotic soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor complex proteins in pancreatic islets of type 2 diabetic patients. *Diabetes* [online]. 2006, **55**, 435-440. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db04-1575>.
- ÖSTMAN, EM, HG LILJEBERG ELMSTÅHL a IM BJÖRCK. Inconsistency between glycemic and insulinemic responses to regular and fermented milk products. *Am J Clin Nutr* [online]. 2001, **74**(1), 96-100.
- PAL, S a V ELLIS. The chronic effects of whey proteins on blood pressure, vascular function, and inflammatory markers in overweight individuals. *Obesity (Silver Spring)* [online]. 2010, **18**(7), 1354-9. DOI: 10.1038/oby.2009.397.
- PALMER, JP, RM WALTER a JW ENSINCK. Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagon secretion in normal man. *Diabetes* [online]. 1975, **24**(8), 735-40. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.24.8.735>.
- PASSEY, RB, RL GILLUM, JB FULLER, et al. Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method recommended in the proposed product class standard (1974). *Clin Chem* [online]. 1977, **23**(1), 131-9.

- PENNINGS, B, Y BOIRIE, JM SENDEN, et al. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *Am J Clin Nutr* [online]. 2011, **93**(5), 997-1005. doi: 10.3945/ajcn.110.008102.
- PETTITT, DJ, WC KNOWLER, HR BAIRD, et al. Gestational diabetes: infant and maternal complications of pregnancy in relation to third-trimester glucose tolerance in the Pima Indians. *Diabetes Care* [online]. 1980, **3**(3), 458-64. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.3.3.458>.
- PFEIFER, MA, JB HALTER, JC BEARD, et al. Differential effects of tolbutamide on first and second phase insulin secretion in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* [online]. 1981, **53**(6), 1256-62. DOI: 10.1210/jcem-53-6-1256.
- PFEUFFER, M a J SCHREZENMEIR. Milk and the metabolic syndrome. *Obes Rev* [online]. 2007, **8**(2), 109-18. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2006.00265.x.
- POLAK, JM, AG PEARSE, et al. Secretin cells in coeliac disease. *Gut* [online]. 1973, **14**(11), 870-4.
- POLIDORI, D, A MARI a E FERRANNINI. Canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, improves model-based indices of beta cell function in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* [online]. 2014, **57**(5), 891-901. DOI: 10.1007/s00125-014-3196-x.
- POLONSKY, KS, BD GIVEN, L HIRSCH, et al. Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest* [online]. 1988, **81**(2), 435-41. DOI: 10.1172/JCI113338.
- POLONSKY, KS, BD GIVEN, LT HIRSCH, et al. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* [online]. 1988, **318**(19):1231-9. DOI: 10.1056/NEJM198805123181903.
- PRENTKI, M, E JOLY, W EL-ASSAAD, et al. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* [online]. 2002, **51**(3), S405-13. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S405>.
- REHFELD, JF a F STADIL. The effect of gastrin on basal- and glucose-stimulated insulin secretion in man. *J Clin Invest* [online]. 1973, **52**(6), 1415-26.
- RENSTRÖM, E, L ELIASSON a P RORSMAN. Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* [online]. 1997, **502** (Pt1), 105-18.
- RETNAKARAN, R. Joe Doupe lecture: emerging strategies for the preservation of pancreatic beta-cell function in early type 2 diabetes. *Clin Invest Med* [online]. 2014, **37**(6), E414-20.

- RICE, BH, CJ CIFELLI, MA PIKOSKY, et al. Dairy components and risk factors for cardiometabolic syndrome: recent evidence and opportunities for future research. *Adv Nutr* [online]. 2011, **2**(5), 396-407. DOI: 10.3945/an.111.000646.
- ROBERGE, JN, KA GRONAU a PL BRUBAKER. Gastrin-releasing peptide is a novel mediator of proximal nutrient-induced proglucagon-derived peptide secretion from the distal gut. *Endocrinology* [online]. 1996, **137**(6), 2383-8.
- ROCCA, AS a PL BRUBAKER. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* [online]. 1999, **140**(4), 1687-94.
- RORSMAN, P, L ELIASSON, E RENSTRÖM, et al. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* [online]. 2000, **15**, 72-77.
- ROSS, SA, JC BROWN a J DUPRÉ. Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide following oral glucose in diabetes mellitus. *Diabetes* [online]. 1977, **26**(6), 525-9. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.26.6.525>.
- ROSSETTI, L, A GIACCARI a RA DEFRONZO. Glucose toxicity. *Diabetes Care* [online]. 1990, **13**(6), 610-30.
- SEINO, Y, M FUKUSHIMA, D YABE. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *J Diabetes Investig* [online]. 2010, **1**(1-2), 8-23. DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00022.x.
- SHIBASAKI, T, H TAKAHASHI, T MIKI, et al. Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* [online]. 2007, **104**,19333–19338. DOI: 10.1073/pnas.0707054104.
- SIMPSON, RG, A BENEDETTI, GM GRODSKY, et al. Early phase of insulin release. *Diabetes* [online]. 1968, **17**(11), 684-92. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.17.11.684>.
- SJÖSTRAND, M, K CARLSON, HJ ARNQVIST, et al. Assessment of beta-cell function in young patients with type 2 diabetes: arginine-stimulated insulin secretion may reflect beta-cell reserve. *J Intern Med* [online]. 2014, **275**(1), 39-48. DOI: 10.1111/joim.12116.
- SMALL, M, H COHEN, GH BEASTALL, et al. Comparison of oral glucose loading and intravenous glucagon injection as stimuli to C-peptide secretion in normal men. *Diabet Med* [online]. 1985, **2**(3), 181-3.
- STEFFES, MW, S SIBLEY, M JACKSON, et al. Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* [online]. 2003, **26**(3), 832-6.

- STRAUB, SG, RF JAMES, MJ DUNNE, et al. Glucose activates both K(ATP) channel-dependent and K(ATP) channel-independent signaling pathways in human islets. *Diabetes* [online]. 1998, **47**(5), 758-63. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.5.758>.
- STUMVOLL, M, A MITRAKOU, W PIMENTA, et al. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* [online]. 2000, **23**, 295–301. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.24.4.796>.
- TAGUCHI, N, T AIZAWA, Y SATO, et al. Mechanism of glucose-induced biphasic insulin release: physiological role of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel-independent glucose action. *Endocrinology* [online]. 1995, **136**(9), 3942-8.
- TEFF, KL a K ENGELMAN. Oral sensory stimulation improves glucose tolerance in humans: effects on insulin, C-peptide, and glucagon. *Am J Physiol* [online]. 1996, **270**(6 Pt 2), R1371-9.
- TESSARI, P, E KIWANUKA, M CRISTINI, et al. Slow versus fast proteins in the stimulation of beta-cell response and the activation of the entero-insular axis in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* [online]. 2007, **23**(5), 378-85.
- TOFFOLO, G, WT CEFALU a C COBELLI, C. Beta-cell function during insulin-modified intravenous glucose tolerance test successfully assessed by the C-peptide minimal model. *Metabolism* [online]. 1999, **48**(9), 1162-6. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495\(99\)90132-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495(99)90132-4).
- TREMBLAY, A a JA GILBERT. Milk products, insulin resistance syndrome and type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr* [online]. 2009, **28**(1), 91S-102S.
- TSAI, CH, M HILL a DJ DRUCKER. Biological determinants of intestinotrophic properties of GLP-2 in vivo. *Am J Physiol* [online]. 1997, **272**(3Pt1), G662-8.
- TULIPANO, G, V SIBILIA, AM CAROLI, et al. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides* [online]. 2011, **32**(4), 835-8. DOI: [10.1016/j.peptides.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.002).
- TURA, A, A KAUTZKY-WILLER, G PACINI. Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Res Clin Pract* [online]. 2006, **72**(3), 298-301.
- UNGER, RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* [online]. 1995, **44**(8), 863-70.
- UTZSCHNEIDER, KM, RL PRIGEON, M V FAULENBACH, et al. Oral disposition index predicts the development of future diabetes above and beyond fasting and 2-h glucose levels. *Diabetes Care* [online]. 2009, **32**(2), 335-41. DOI: [10.2337/dc08-1478](https://doi.org/10.2337/dc08-1478).

- VAN LOON, LJ, M KRUIJSHOOP, PP MENHEERE, et al. Amino acid ingestion strongly enhances insulin secretion in patients with long-term type 2 diabetes. *Diabetes Care* [online]. 2003, **26**(3), 625-30. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.26.3.625>.
- VAN LOON, LJ, WH SARIS, H VERHAGEN a AJ WAGENMAKERS. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr* [online]. 2000, **72**(1), 96-105.
- VAN LOON, LJ. Amino Acids as Pharmaco-Nutrients for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents - Medicinal Chemistry* [online]. 2007, **7**(1), 39-48.
- VELDHORST, MA, AG NIEUWENHUIZEN, A HOCHSTENBACH-WAELEN, et al. Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy. *Physiol Behav* [online]. 2009, **96**(4-5), 675-82. DOI: [10.1016/j.physbeh.2009.01.004](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.01.004).
- VERRILL, S a RA JOHNSON. Confidence bounds and hypothesis tests for normal distribution coefficients of variation. *Commun Stat Theory Methods* [online]. 2007, **36**(12), 2187-2206. DOI: <https://doi.org/10.1080/03610920701215126>.
- VILSBØLL, T, T KRARUP, S MADSBAD, et al. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* [online]. 2002, **45**(8), 1111-9. DOI: [10.1007/s00125-002-0878-6](https://doi.org/10.1007/s00125-002-0878-6)
- WARD, WK, DC BOLGIANO, B MCKNIGHT, et al. Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* [online]. 1984, **74**(4), 1318-28. DOI: [10.1172/JCI111542](https://doi.org/10.1172/JCI111542).
- WAREHAM, NJ, DI PHILLIPS, CD BYRNE et al. The 30 minute insulin incremental response in an oral glucose tolerance test as a measure of insulin secretion. *Diabet Med* [online]. 1995, **12**(10), 931.
- WEIR, GC. Non-insulin-dependent diabetes mellitus: interplay between B-cell inadequacy and insulin resistance. *Am J Med* [online]. 1982, **73**(4), 461-4. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(82\)90321-7](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(82)90321-7).
- WEYER, C, C BOGARDUS, DM MOTT, et al. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* [online]. 1999, **104**(6), 787-94. DOI: [10.1172/JCI7231](https://doi.org/10.1172/JCI7231).
- WOPEREIS, S, JHM STROEVE, A STAFLEU, et al. Multi-parameter comparison of a standardized mixed meal tolerance test in healthy and type 2 diabetic subjects: the PhenFlex challenge. *Genes Nutr* [online]. 2017, **12**, 21. DOI: [10.1186/s12263-017-0570-6](https://doi.org/10.1186/s12263-017-0570-6).

- XU, G, G KWON, WS CRUZ, et al. Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic beta-cells. *Diabetes* [online]. 2001, **50**(2), 353-60.
- YARON, A a F NAIDER. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* [online]. 1993, **28**(1), 31-81.
- ZACCARIA, M, E DE PALO, E ZAGO, et al. Metabolic and endocrine responses to a standard mixed meal. A physiologic study. *Acta Diabetol Lat* [online]. 1979, **16**(1), 45-53.
- ZAVORSKY, GS, S KUBOW, V GREY, et al. An open-label dose-response study of lymphocyte glutathione levels in healthy men and women receiving pressurized whey protein isolate supplements. *Int J Food Sci Nutr* [online]. 2007, **58**(6), 429-36.
- ZAWALICH, WS. Time-dependent potentiation of insulin release induced by alpha-ketoisocaproate and leucine in rats: possible involvement of phosphoinositide hydrolysis. *Diabetologia* [online]. 1988, **31**(7), 435-42.

10. Publikace a prezentace výstupů řešení dizertace

Publikace s IF:

WILDOVÁ, E, P KRAML, J POTOČKOVÁ, et al. The assessment of the serum C-peptide and plasma glucose levels by orally administered whey proteins in type 2 diabetes mellitus. *Physiol Res* [online]. 2017, **66** (6), 993-997. IF = 1,461 (PŘÍLOHA 1)

WILDOVÁ, E, P DLOUHÝ, P KRAML, et al. Orally administered whey proteins have comparable effect on C-peptide secretion in healthy subjects as standard C-peptide stimulation tests. *Physiol Res* [online]. 2013, **62**(2), 179-86. IF = 1,461 (PŘÍLOHA 2)

Publikace bez IF:

WILDOVÁ, E a M ANDĚL. Kaseiny a syrovátkové proteiny jsou fyziologickými stimuly inzulinové sekrece. *DMEV* [online]. 2013, **16**(3), 174-180. (PŘÍLOHA 3)

ANDĚL, M, E WILDOVÁ, A BOJAROVÁ, et al. Znalosti o významu GLP-1 změnily možnosti léčby diabetu, jejich využití však může být mnohem širší. *DMEV* [online]. 2011, **14**(1), 15-21. (PŘÍLOHA 4)

Publikace bez IF, které nejsou podkladem dizertační práce:

WILDOVÁ, E, I NĚMEČKOVÁ, J CHRAMOSTOVÁ, et al. Vliv jogurtů s vyšším zastoupením syrovátkových bílkovin na nutriční stav seniorů. *Mlékařské listy* [online]. 2015, **151**, 16-19.

BINDER, M, J DRBOHLAV a E WILDOVÁ. Funkční vlastnosti mléčných bílkovin ve sterilovaných nápojích z technologického a výživového hlediska. *Mlékařské listy* [online]. 2014, **147**, 45-48.

Aktivní účast (postery, přednášky)

WILDOVÁ, E, DLOUHÝ, P, ANDĚL, M. Stimulovaná C-peptidová sekrece u neuspokojivě kompenzovaných diabetiků 2. typu se zachovalou lačnou C-peptidovou sekrecí. Diabetologické dny, Luhačovice, 16.-18. duben 2015, poster (P 25).

- WILDOVÁ, E. Výstupní zpráva grantu na půdě Výzkumného ústavu potravinářského Praha (2011, 2012, 2013, 2014 a 2015), přednáška (30 min).
- WILDOVÁ, E. Testy inzulínové sekrece (2015) – Centrum výzkumu diabetu, metabolismu a výživy 3. LF UK v Praze, přednáška (45 min).
- WILDOVÁ, E, POTOČKOVÁ, J, ANDĚL, M. Syrovátkové proteiny významně zvyšují inzulínovou sekreci u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Diabetologické dny, Luhačovice, 10.-12. duben 2014, poster (P 48).
- WILDOVÁ, E. Sekrece inzulínu po syrovátce u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (2013) – Centrum výzkumu diabetu, metabolismu a výživy 3. LF UK v Praze, přednáška (45 min).
- WILDOVÁ, E, DLOUHÝ, P, RAMBOUSKOVÁ, J, ANDĚL, M. Inzulinogenní index po podání syrovátkových proteinů u zdravých jedinců. Diabetologické dny, Luhačovice, 18.-20. duben 2013, poster (P 51).
- WILDOVÁ, E, DLOUHÝ, P, KRAML, P, RAMBOUSKOVÁ, J, ŠMEJKALOVÁ V, POTOČKOVÁ, J, ANDĚL, M. Srovnání stimulované C-peptidové sekrece po podání samotného syrovátkového koncentrátu a syrovátkového koncentrátu v kombinaci s glukózou s výsledky stimulačních testů u zdravých subjektů, Výživa a zdraví 2012, Teplice, 18.-19. září 2012, přednáška (20 min).
- WILDOVÁ, E, DLOUHÝ, P, KRAML, P, RAMBOUSKOVÁ, J, ŠMEJKALOVÁ V, POTOČKOVÁ, J, ANDĚL, M. Kvantifikace C-peptidové sekrece po podání syrovátkových proteinů v porovnání s výsledky standardních stimulačních testů u zdravých jedinců, Diabetologické dny, Luhačovice, 19.-21. dubna 2012, poster (P 40).
- WILDOVÁ, E. Účinek syrovátkového koncentrátu na C-peptidovou sekreci (2012) – Centrum výzkumu diabetu, metabolismu a výživy 3. LF UK v Praze, přednáška (45 min).
- WILDOVÁ, E. Užití syrovátkového proteinového koncentrátu k charakterizování endogenní sekrece C-peptidu, 3. LF UK Praha, Výživa, potraviny a zdraví 2011, přednáška (20 min).

WILDOVÁ, E, DLOUHÝ, P, RAMBOUSKOVÁ, J, ANDĚL, M. Podání syrovátky vede k významnému zvýšení sekrece C-peptidu, ale nezvyšuje glykémii. Nové možnosti pro testování, Syllabův večer 2013 - od diabetologického výzkumu k diabetologické praxi, Praha, 4. Březen 2013, přednáška (10 min).

Patent na syrovátkový nápoj určený k testování inzulínové sekrece

2011-24789 – nápoj se syrovátkovými proteiny – J. Drbohlav, A. Šalaková, M. Pechačová, M. Binder, M. Anděl, P. Dlouhý, J. Rambousková, E. Wildová, J. Jarmar (č. dokumentu: 22848-UV)

11. Seznam příloh

PŘÍLOHA 1. Originální článek *Physiol. Res.* 2017

PŘÍLOHA 2. Originální článek *Physiol. Res.* 2013

PŘÍLOHA 3. Originální článek *DMEV* 2013

PŘÍLOHA 4. Originální článek *DMEV* 2011

The Assessment of the Serum C-Peptide and Plasma Glucose Levels by Orally Administered Whey Proteins in Type 2 Diabetes Mellitus

E. WILDOVÁ^{1,3}, P. KRAML^{1,3}, J. POTOČKOVÁ^{1,3}, P. DLOUHÝ^{1,2}, M. ANĎĚL^{1,2,3}

¹Center for Research on Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ²Department of Hygiene, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ³Second Department of Internal Medicine University Hospital Královské Vinohrady and Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received September 1, 2016

Accepted June 2, 2017

On-line September 22, 2017

Summary

A personalized antidiabetic therapy is not yet part of the official guidelines of professional societies for clinical practice. The aim of this study was to evaluate the serum C-peptide and plasma glucose levels in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) after oral administration of whey proteins. Sixteen overweight T2DM Caucasians with good glycemic control and with preserved fasting serum C-peptide levels (>200 nmol/l) were enrolled in this study. Two oral stimulation tests – one with 75 g of glucose (OGTT) and the other with 75 g of whey proteins (OWIST) – were administered for assessing serum C-peptide and plasma glucose levels in each participant. Both oral tests induced similar pattern of C-peptide secretion, with a peak at 90 min. The serum C-peptide peak concentration was 2.91 ± 0.27 nmol/l in OWIST, which was 22 % lower than in OGTT. Similarly, the C-peptide $iAUC_{0-180}$ were 32 % lower in the OWIST than in the OGTT ($p < 0.01$). Contrary to OGTT the OWIST did not cause a significant increase of glycemia ($p < 0.01$). Our study showed that the OWIST represents a useful tool in estimation of stimulated serum C-peptide levels in patients with T2DM.

Key words

Stimulated C-peptide secretion • Whey proteins • Oral glucose tolerance test • T2DM

Corresponding author

E. Wildová, Center for Research on Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine of the Charles University in Prague, Ruská 2411/87, 100 00 Prague, Czech Republic. E-mail: elena.wildova@f3.cuni.cz

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic heterogeneous disease characterized by progressive loss of insulin secretion (β -cell dysfunction) in parallel with impaired whole-body insulin sensitivity (American Diabetes Association 2016). It is well established (DeFronzo 1988) that a chronic hyperglycemia is primarily caused by various degrees of impaired insulin sensitivity (insulin resistance) and secondarily by β -cell dysfunction as a manifestation of the progressive loss of the pancreatic islet β -cell followed by a decreasing maximal capacity of insulin secretion. Importantly, progressive decline in insulin secretion is affecting different patients to a different degree (U.K. Prospective Diabetes Study 16 1995, Saisho 2015). Progressive loss of β -cell function is often associated with deterioration of T2DM control, i.e. a higher level of glycated hemoglobin (HbA1c), and therefore with higher risk of long-term complications (DeFronzo 2009). Better understanding of mechanisms driving β -cell dysfunction as well as development of specific test evaluating actual insulin secretion in large number of patients in a routine clinical setting is highly needed. Insulin secretion is often evaluated indirectly in clinical practice and research by studying C-peptide secretion, because its levels are more stable in blood circulation and C-peptide is released from β -cell in pancreas in equimolar amount to insulin.

Several clinical studies showed that knowledge of stimulated serum C-peptide secretion (Meier *et al.*

2009) should be an accurate marker for the treatment decision for each patient at the beginning and during the course of the disease (U.K. Prospective Diabetes Study 16 1995, Wajchenberg 2007). Majority of T2DM patients have: 1) preserved fasting C-peptide levels and at least twice as high postprandial serum C-peptide levels, 2) a preponderance of insulin deficiency and have preserved fasting but reduced postprandial serum C-peptide levels (i.e. C-peptide levels not rising above twice the value of fasting C-peptide; Ratheiser *et al.* 1990), and 3) reduced fasting and postprandial C-peptide levels. It seems that the patients in the two last groups would benefit from early initiation of exogenous therapy with insulin (Harrison *et al.* 2012).

This approach of setting personalized antidiabetic therapy is not yet part of the official guidelines of professional societies for clinical practice (Monnier *et al.* 2006, Robertson 2007, Roy *et al.* 2007, American Diabetes Association 2016). The main reason seems to be the lack of a standardized insulin secretion stimulation test. Insulin secretion stimulation tests frequently used in clinical trials – mixed meal tolerance test (MMTT), oral glucose tolerance test (OGTT) or glucagon stimulation test (GST) – mostly cause hyperglycemia and are time-consuming. In our previous paper, we showed that standard OGTT and orally whey administration had a comparable effect on C-peptide secretion in healthy participants (Wildova *et al.* 2013).

Therefore, the aim of this study was to compare the serum C-peptide and plasma glucose levels after administration of whey protein concentrate (OWIST) and standard OGTT in T2DM patients achieving a good glycemic control. The overarching goal was to define, whether OWIST might represent a tool investigating insulin secretion in a clinical setting.

Methods

Patients

Sixteen overweight Caucasians (6 men and 10 women; aged 56-80 years, BMI (body mass index): 26.4-29.8 kg/m²), with T2DM (Genuth *et al.* 2003), with a glycated hemoglobin (HbA1c) level less than 58 mmol/mol (7.5 %) at the time of recruitment, normal or higher fasting C-peptide secretion (0.39-1.33 nmol/l) and 5 years or longer after diagnosis of T2DM were enrolled in this study. All participants were treated with metformin (500 mg dose per day), had a prescribed diabetic diet and were engaged in regular physical

activity. Additionally, all participants were generally in good health, with no signs or symptoms of any acute diseases, renal insufficiency or lactose intolerance. Insulin resistance by Homa2 IR was 2.42±0.23; mean ± SEM (Levy *et al.* 1998).

Study protocol

We used a controlled cross-over study design to evaluate fasting and stimulated C-peptide secretion after the administration of the whey proteins (OWIST) and glucose alone (OGTT) in patients with T2DM.

OGTT drink contained 75 g oral glucose load (Glukopur; Natura, Hamry u Havlíčkova Brodu, Czech Republic) in 300 ml of water (Small *et al.* 1985).

OWIST drink consisted of 75 g of flavored whey proteins (whey protein concentrate 80, WPC 80) in 300 ml of water so that it had the same dose as OGTT. The WPC 80 was manufactured by Volactive UltraWhey80; DVN, Hoozeveen, the Netherlands and it contained 81 % high-quality nutritional whey proteins, 6 % lactose, 6 % fat, 4 % moisture and 3 % minerals, flavoured with 0.4 g of strawberry aroma AFFRAI 0005 (RJP International, Prague, Czech Republic) and 0.4 g of vanilla extract (RAPS-CZ, Prague, Czech Republic).

The study protocol was designed in accordance to the principles of the Helsinki Declaration and received prior approval by the Ethics Committee of the Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. All participants were fully informed and gave their written consent.

All patients with T2DM underwent both tests after overnight fasting for at least 12 h. They were tested on two different occasions in a random order within a one month period. The tests were carried out in the research unit of the 2nd Department of Internal Medicine at the University Hospital Královské Vinohrady, Prague, Czech Republic. Both of tests were performed at 8 a.m., when a peripheral venous catheter was inserted for obtaining samples of venous blood into the antecubital vein using the aseptic technique. The participants rested quietly on bed during the test. Samples for fasting values of the plasma glucose levels and serum C-peptide measurement were collected at time 0 (just before administration of the OGTT or OWIST). Within 3 min the drink was administered. Other blood samples were collected at 30, 60, 90, 120 and 180 min in a closed blood collection system (S-Monovette; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) after the drink administration. The catheter was flushed with 0.9 % saline after each blood sample draw.

The samples for the serum C-peptide concentration determination were centrifuged for 15 min at 3,000 g Jouan BR4i (DJB Labcare, Buckinghamshire, England) and analyzed using a 2-site immunochemiluminometric assay by the Immunolite 2000 immunoassay system (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, USA). The analytical range of the assay was 0.17-2.32 nmol/l and the lower limit of sensitivity was 0.017 nmol/l. The inter- and intra-assay coefficients of variation (CVs) were less than 6 %. The plasma glucose levels were determined using the hexokinase method by a Konelab Glucose analyzer (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finland). The detection limit was 0.1 mmol/l. Side effects of both OGTT and OWIST were evaluated in regards to hyperglycemia and general tolerance (nausea, vomiting).

Statistics

The incremental area under the curve (iAUC) of glucose and C-peptide in OWIST and OGTT were calculated using the trapezoid rule for both the plasma glucose levels and the serum C-peptide levels. For the serum C-peptide concentration, several iAUCs were calculated: iAUC₀₋₃₀ (the early phase of insulin secretion), iAUC₀₋₉₀ (insulin secretion during a proposed shorter measurement period), iAUC₀₋₁₈₀ (the whole measured insulin secretion), iAUC₃₀₋₁₈₀ (the late phase of insulin secretion). For the plasma glucose level only iAUC₀₋₁₈₀ was calculated.

Statistical comparison between the total C-peptide response and plasma glucose level, relative to the reference was carried out using the two-sided paired Student's t-test (assumptions were tested using Fisher's test of equality of variances and the Kolmogorov-Smirnov normality test). Pearson's product moment correlation was used for testing the association between the paired samples of data values.

All the data in the text are presented as mean \pm SEM. All statistical hypotheses were tested at a significance level of 0.01 using R software (2.14.1, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) with Bonferroni corrections for multiple comparisons.

Modified version of the insulinogenic index (Wareham *et al.* 1995, Tura *et al.* 2006) was calculated as:

$$IGI = C_{30} - C_0 / G_{30}$$

where C_{30} is the serum C-peptide concentration at 30 min, C_0 is the fasting serum C-peptide concentration and G_{30} is the plasma glucose level at 30 min.

Results

C-peptide response

The average fasting level of the serum C-peptide was 0.94 ± 0.07 nmol/l. Both oral tests resulted in a similar shape of the C-peptide response curve, with a peak at 90 min. In the case of OGTT (reference), the serum C-peptide concentration peaked at 3.72 ± 0.30 nmol/l. The serum C-peptide peak concentration was 2.91 ± 0.27 nmol/l in OWIST, which was 22 % lower than in OGTT. Subsequent serum C-peptide concentrations steadily decreased after 90 min (OWIST) and 120 min (OGTT) while not reaching the baseline within the test duration of 180 min. Individual serum C-peptide concentrations after the OWIST were significantly lower ($p < 0.01$) at 90, 120, 180 min than after the OGTT. Both tests induced the same slope of C-peptide curve in the first 30 min (the early phase of insulin secretion). Data are summarized in Figure 1.

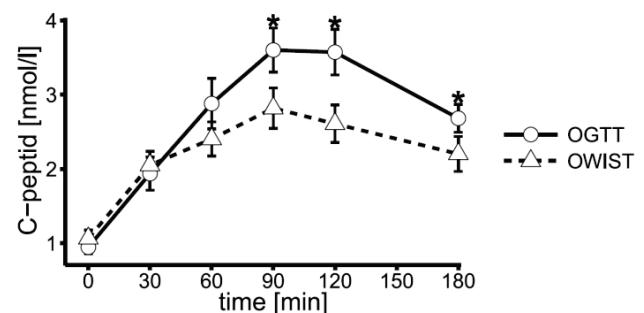


Fig. 1. The absolute values (mean \pm SEM) of the serum C-peptide levels in response to oral tests – OGTT (reference) and OWIST in patients with T2DM (n=16). * indicates values significantly different from the reference ($p < 0.01$).

Glucose response

The average fasting plasma glucose level (baseline) was 8.11 ± 0.57 mmol/l. The OGTT showed a plasma glucose level peak at 19.1 ± 1.33 mmol/l. After 90 min, the curve was steadily decreasing towards the baseline, but not reaching it within the test duration. Contrary to OGTT the OWIST did not cause a significant increase of glycemia ($p < 0.01$). Data are summarized in Figure 2.

The assessment of the C-peptide secretion and glycemic response in patients with T2DM

The average fasting plasma glucose level (baseline) was 8.11 ± 0.57 mmol/l. The administration of the OGTT increased glycemia, on average 2.1 times, on the other hand, the administration of the OWIST did not

induce a glycemia increase (plasma glucose level 8.89 ± 1.15 mmol/l at 120 min). The incremental area under the curve of the whole measured C-peptide response ($iAUC_{0-180}$) was 32 % lower after the OWIST, in comparison to the OGTT. Data are summarized in Table 1.

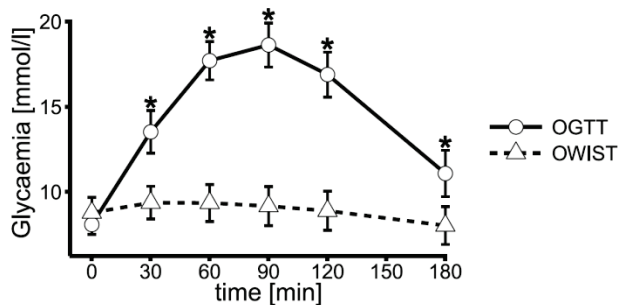


Fig. 2. The absolute values (mean \pm SEM) of the plasma glucose levels in response to oral tests – OGTT (reference) and OWIST in patients with T2DM ($n=16$). * indicates values significantly different from the reference ($p < 0.01$).

The early phase of insulin secretion ($iAUC_{0-30}$) was similar for both the OGTT and the OWIST. The IGI, calculated from the OWIST and OGTT, correlates with each other ($p < 0.01$), while being 47 % higher after the administration of OWIST. No correlation was found between the stimulated late phase insulin secretion ($iAUC_{30-180}$) using the OGTT and OWIST, however the OGTT stimulation achieved a 34 % higher $iAUC_{30-180}$ than the OWIST. Furthermore, a very strong correlation ($r=0.94$; $p=0.0002$) was found between the $iAUC_{0-90}$ and $iAUC_{0-180}$ for both OGTT and OWIST.

Side effects

The OWIST was well-tolerated by all participants. The administration of the OGTT induced nausea in three participants and eight participants complained about the unusual sweet taste of the drink. In two participants, the OGTT induced hyperglycemia had to be managed with insulin administration. No other side effects were observed.

Table 1. Measurements of the fasting and stimulated C-peptide and plasma glucose levels during the OGTT and OWIST.

	OGTT	OWIST	$\Delta\%$
Plasma glucose – fasting [mmol/l]	8.11 ± 0.57	8.13 ± 0.54	0 %
Plasma glucose – 120 min value [mmol/l]	16.89 ± 1.32	8.89 ± 1.15	-47 %*
C-peptide – fasting [nmol/l]	0.94 ± 0.07	0.92 ± 0.11	2 %
C-peptide – peak [nmol/l]	3.72 ± 0.30	2.91 ± 0.27	-22 %*
C-peptide – $iAUC_{0-30}$ [nmol.min/l]	15.00 ± 2.70	15.20 ± 2.10	1 %
C-peptide – $iAUC_{0-90}$ [nmol.min/l]	128.40 ± 18.30	97.90 ± 10.40	-24 %*
C-peptide – $iAUC_{30-180}$ [nmol.min/l]	324.50 ± 37.00	214.80 ± 21.10	-34 %*
C-peptide – $iAUC_{0-180}$ [nmol.min/l]	339.50 ± 38.90	230.00 ± 21.90	-32 %*
Plasma glucose – $iAUC_{0-180}$ [mmol.min/l]	1251.00 ± 109.40	89.30 ± 29.70	-92 %*
IGI [10^{-3}]	0.56 ± 0.12	0.82 ± 0.13	47 %*

The values show mean \pm SEM. The $\Delta\%$ column indicated the mean percentage change between the OGTT (reference) and OWIST. * t-test ($p < 0.01$) OGTT vs. OWIST.

Discussion

International Diabetes Association annually updates its recommendations for clinical practice based on the state-of-the-art findings from clinical trials. Assessment of the β -cell function, i.e. stimulated insulin (C-peptide) secretory response, has not yet been implemented in the official recommendations even though several clinical trials demonstrate its impact on therapy of T2DM (Kramer *et al.* 2013) and sometimes

even in type 1 diabetes mellitus (Greenbaum *et al.* 2008).

Our results demonstrated that the OWIST correctly assessed the stimulated C-peptide secretion (both the early and late phase of insulin secretion) in patients with T2DM. The results indicate that the oral stimulus (both glycemic and non-glycemic) administered to the patients with well-controlled T2DM leads to a characteristic shape of stimulated C-peptide secretion with a peak at 90 min. The administration of OWIST induced C-peptide $iAUC_{0-30}$ that was similar to the

iAUC₀₋₃₀ induced by administration of OGTT. This corresponds with the fact that both whey proteins and glucose activate a cephalic and entero-insular axis in a similar way (Salehi *et al.* 2012). A linear trade-off was found between the OGTT and OWIST values of the IGI that corresponds with the early phase of insulin secretion (Wareham *et al.* 1995). The IGI is commonly used because it highly correlates with the acute insulin response (AIR) during the intravenous glucose tolerance test (Kosaka *et al.* 1996) and is considered a sensitive marker of insulin secretion after glucose stimulus (Tura *et al.* 2006, Kahn *et al.* 2001). It was suggested that the progressive loss of the total β -cell number in the islets of Langerhans first becomes apparent as a disorder of the early phase of the stimulated insulin or C-peptide secretion, followed by a disorder of the late phase (Calles-Escandon and Robbins 1987) with a more pronounced concomitant postprandial hyperglycemia (Del Prato 2003) and unsatisfactory diabetes control. As iAUC₀₋₁₈₀ was highly correlated with iAUC₀₋₉₀ after the administration of both the OGTT and OWIST, it seems that in order to assess the late phase of insulin secretion, a 90-minute-long test is sufficient. However, confirmation on a larger number of patients is needed.

Our study showed that the patients with well-controlled T2DM had their insulin secretion preserved or, more precisely, their stimulated maximum serum C-peptide concentration was at least twice their fasting level (Kahn *et al.* 2001).

The late phase of insulin secretion (iAUC₃₀₋₁₈₀) is primarily regulated by the substrate phase of the insulin

secretion. C-peptide secretion after administration of whey proteins is induced mainly by high level of plasma branched-chain amino acids and to a lesser degree by incretin hormones (Frid *et al.* 2005). A lower C-peptide secretion after OWIST (by 34 %) than after OGTT suggests that in patients with T2DM, the glucose stimulus was a stronger secretagogue than the BCAA in this phase.

In conclusion, we demonstrated that the OWIST is able to sufficiently evaluate the stimulated C-peptide secretion without a concomitant increase of plasma glucose level or hypoglycemia. We assume that the OWIST might prove useful for the evaluation of both the early and late phase of insulin secretion. It seems that the administration of whey proteins as a non-glucose stimulus is suitable for the stimulated insulin secretion testing for other groups of patients with diabetes (diabetes mellitus type 1, gestational diabetes etc.), where increase of plasma glucose after the OGTT is often unacceptable.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The study was supported by the National Agency for Agricultural Research (grant NAZV 101B090) and was conducted in cooperation with the company MILCOM. The authors are grateful for essential help with paper: Jan Polák, M.D. for kind remarks, Ing. Jiří Wild, Ph.D. for the statistical analysis and advice on the statistical presentation and Mr. Harvey Cook for English proofreading.

References

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Standards of medical care in diabetes – 2016 abridged for primary care providers. *Clin Diabetes* **34**: 3-21, 2016.
- CALLES-ESCANDON J, ROBBINS DC: Loss of early phase of insulin release in humans impairs glucose tolerance and blunts thermic effect of glucose. *Diabetes* **36**: 1167-1172, 1987.
- CREUTZFELDT W: The entero-insular axis in type 2 diabetes - incretins as therapeutic agents. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109**: 288-303, 2001.
- DEFRONZO RA: Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* **37**: 667-687, 1988.
- DEFRONZO RA: Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* **58**: 773-795, 2009.
- DEL PRATO S: Loss of early insulin secretion leads to postprandial hyperglycaemia. *Diabetologia* **46**: M2-M8, 2003.
- FRID AH, NILSSON M, HOLST JJ, BJÖRCK IM: Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* **82**: 69-75, 2005.

- GENUTH S, ALBERTI KG, BENNETT P, BUSE J, DEFRONZO R, KAHN R, KITZMILLER J, KNOWLER WC, LEBOVITZ H, LERNMARK A, NATHAN D, PALMER J, RIZZA R, SAUDEK C, SHAW J, STEFFES M, STERN M, TUOMILEHTO J, ZIMMET P; EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26**: 3160-3167, 2003.
- GREENBAUM CJ, MANDRUP-POULSEN T, MCGEE PF, BATTELINO T, HAASTERT B, LUDVIGSSON J, POZZILLI P, LACHIN JM, KOLB H; TYPE 1 DIABETES TRIAL NET RESEARCH GROUP; EUROPEAN C-PEPTIDE TRIAL STUDY GROUP: Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of beta-cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **31**: 1966-1971, 2008.
- GUNNERUD UJ, ÖSTMAN EM, BJÖRK IM: Effects of whey proteins on glycaemia and insulinaemia to an oral glucose load in healthy adults: a dose-response study. *Eur J Clin Nutr* **67**: 749-753, 2013.
- HARRISON LB, ADAMS-HUET B, RASKIN P, LINGVAY I: β -cell function preservation after 3.5 years of intensive diabetes therapy. *Diabetes Care* **35**: 1406-1412, 2012.
- KAHN SE, MONTGOMERY B, HOWELL W, LIGUEROS-SAYLAN M, HSU CH, DEVINENI D, MCLEOD JF, HOROWITZ A, FOLEY JE: Importance of early phase insulin secretion to intravenous glucose tolerance in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 5824-5829, 2001.
- KOSAKA K, KUZUYA T, HAGURA R, YOSHINAGA H: Insulin response to oral glucose load is consistently decreased in established non-insulin-dependent diabetes mellitus: the usefulness of decreased early insulin response as a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* **13**: 109-119, 1996.
- KRAMER CK, CHOI H, ZINMAN B, RETNAKARAN R: Determinants of reversibility of β -cell dysfunction in response to short-term intensive insulin therapy in patients with early type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**: E1398-E1407, 2013.
- LEVY J, ATKINSON AB, BELL PM, MCCANCE DR, HADDEN DR: Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study. *Diabet Med* **15**: 290-296, 1998.
- MARI A, PACINI G, MURPHY E, LUDVIK B, NOLAN JJ: A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* **24**: 539-548, 2001.
- MEIER JJ, MENGE BA, BREUER TG, MÜLLER CA, TANNAPFEL A, UHL W, SCHMIDT WE, SCHRADER H: Functional assessment of pancreatic beta-cell area in humans. *Diabetes* **58**: 1595-1603, 2009.
- MONNIER L, COLETTE C, THUAN JF, LAPINSKI H: Insulin secretion and sensitivity as determinants of HbA1c in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* **36**: 231-235, 2006.
- POLIDORI D, MARI A, FERRANNINI E: Canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, improves model-based indices of beta cell function in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* **57**: 891-901, 2014.
- RATHEISER K, REITGRUBER W, KOMJATI M, BRATUSCH-MARRAIN P, VIERHAPPER H, WALDHAUSL WK: Quantitative and qualitative differences in basal and glucose- and arginine-stimulated insulin secretion in healthy subjects and different stages of NIDDM. *Acta Diabetol Lat* **27**: 197-213, 1990.
- ROBERTSON RP: Estimation of beta-cell mass by metabolic tests: necessary, but how sufficient? *Diabetes* **56**: 2420-2424, 2007.
- ROY MN, BISWAS KB, SIDDIQUA N, ARSLAN MI, ALI L: Determinants of insulin secretion and sensitivity in bangladeshi type 2 diabetic subjects. *Metab Syndr Relat Disord* **5**: 275-281, 2007.
- SAISHO Y: β -cell dysfunction: its critical role in prevention and management of type 2 diabetes. *World J Diabetes* **6**: 109-124, 2015.
- SALEHI A, GUNNERUD U, MUHAMMED SJ, ÖSTMAN E, HOLST JJ, BJÖRCK I, RORSMAN P: The insulinogenic effect of whey protein is partially mediated by a direct effect of amino acids and GIP on β -cells. *Nutr Metab* **9**: 48, 2012.
- SMALL M, COHEN HN, BEASTALL GH, MACCUISH AC: Comparison of oral glucose loading and intravenous glucagon injection as stimuli to C-peptide secretion in normal men. *Diabet Med* **2**: 181-183, 1985.
- TURA A, KAUTZKY-WILLER A, PACINI G: Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Res Clin Pract* **72**: 298-301, 2006.

- U.K. PROSPECTIVE DIABETES STUDY 16: Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease
U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* **44**: 1249-1258, 1995.
- WAJCHENBERG BL: Beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev* **28**: 187-218, 2007.
- WAREHAM NJ, PHILLIPS DI, BYRNE CD, HALES CN: The 30 minute insulin incremental response in an oral glucose tolerance test as a measure of insulin secretion. *Diabet Med* **12**: 931, 1995.
- WILDOVA E, DLOUHY P, KRAML P, RAMBOUSKOVA J, SMEJKALOVA V, POTOCKOVA J, ANDEL M: Orally administered whey proteins have comparable effect on C-peptide secretion in healthy subjects as standard C-peptide stimulation tests. *Physiol Res* **62**: 179-186, 2013.
-

Orally Administered Whey Proteins Have Comparable Effect on C-Peptide Secretion in Healthy Subjects as Standard C-Peptide Stimulation Tests

E. WILDOVÁ^{1,2,3}, P. DLOUHÝ^{1,2}, P. KRAML^{1,3}, J. RAMBOUSKOVÁ^{1,2},
V. ŠMEJKALOVÁ^{1,2,3}, J. POTOČKOVÁ^{1,3}, M. ANĐEL^{1,2,3}

¹Center for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ²Department of Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ³Second Department of Internal Medicine University Hospital Královské Vinohrady and Third Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

Received September 4, 2012

Accepted November 9, 2012

On-line December 13, 2012

Summary

Our study compared total C-peptide secretion after administration of whey proteins and whey proteins in combination with glucose with results of classical tests assessing beta cell function in the pancreas of healthy individuals. Eight young, healthy (7 males, 1 female; aged 20-26 years), non-obese (BMI: 17-25.9 kg/m²) participants with normal glucose tolerance underwent six C-peptide secretion tests. Three secretion tests measured C-peptide response to orally administered substances: whey proteins only (OWT), whey proteins with glucose (OWGT) and glucose only (OGTT); while three secretion tests measured C-peptide response to intravenously administered substances: arginine (AST), glucagon (GST) and glucose (IVGTT). OWT stimulated a greater (93 %, $p < 0.05$) C-peptide response than AST and a 64 % smaller response ($p < 0.05$) than OGTT. OWT also showed lower variability ($p < 0.05$) in C-peptide responses compared to OWGT and OGTT. The greatest total C-peptide response was induced by OWGT (36 % higher than glucose). OWT consistently increased C-peptide concentrations with lower individual variability, while insignificantly increasing glucose levels. Results of this study suggest that both dietology and beta-cells capacity testing could take advantage of the unique property of whey proteins to induce C-peptide secretion.

Key words

Whey proteins • Pancreatic beta cell capacity tests • C-peptide • Blood glucose • Healthy

Corresponding author

E. Wildová, Center for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Ruská 2411/ 87, Prague, CZ 100 00, Czech Republic.
E-mail: elena.wildova@lf3.cuni.cz

Introduction

It has been well established that ingested dietary proteins are the physiological stimuli for insulin secretion and have potential to decrease the plasma glucose levels in healthy individuals (Floyd *et al.* 1966). The magnitude of the insulin response to ingestion of different doses and types of proteins varies; however, whey proteins have unique insulinotropic property (Nilsson *et al.* 2004, Pal and Ellis 2010).

Krezowski *et al.* (1986) showed that, in healthy individuals, an acute oral administration of 50 g of protein from lean beef in combination with glucose resulted in a non-synergic increase in serum insulin and C-peptide release – the incremental area under the curve (iAUC) was 28 % higher than for glucose alone – and reduced the total postprandial glucose response compared to equal amounts of glucose. An orally administered dose of protein given alone elicited a modest increase in insulin secretion (iAUC = 28 % of the glucose response) and had almost no influence on fasting glucose levels. A similar metabolic response was observed in a study by Nilsson *et al.* (2004) after

administration of 18.2 g of whey proteins in combination with carbohydrates in healthy subjects. The insulin iAUC for whey proteins plus a glucose mixture was 90 % higher than the insulin iAUC of glucose alone. A study by Akhavan *et al.* (2010) focused primarily on the effect of pure whey proteins on food intake and pre- and post-meal satiety. However, this study did not examine the effect of whey proteins on insulin secretion over a sufficiently long period of time (Polonsky *et al.* 1988) for a complete evaluation of the total insulin secretion response following an orally administered stimulus.

Therefore we decided to evaluate the effect of pure whey proteins on C-peptide secretion (Polonsky and Rubenstein 1984) relative to C-peptide secretion after glucose only. Furthermore, we focused on the comparison between total C-peptide secretion after pure whey proteins administration and total C-peptide secretion after whey proteins administration in combination with glucose, relative to other insulin secretion tests. These tests are based on intravenous administration (Chaillous *et al.* 1996) of glucose, arginine and glucagon and the oral administration of glucose (Small *et al.* 1985). These tests are currently used in research studies rather than in clinical practice. Since the tests ascertain the maximum C-peptide secretion capacity of the subject's pancreatic beta cells (Chaillous *et al.* 1996), these data can be used to assess the insulinotropic effect of whey proteins and its possible use in clinical practice.

Subjects and Methods

Subjects

Eight healthy young non-obese (body mass index (BMI), range: 17-25.9 kg/m²) Caucasian subjects (7 men and 1 woman aged 20-26 years) were enrolled in this study. None of the participants were taking any drugs or supplements known to interfere with insulin secretion or carbohydrate metabolism. All subjects were in generally good health, with no signs or symptoms of any acute or chronic diseases and no indications of lactose malabsorption.

After evaluation, participants were found to have no disorders of glucose metabolism (based on standard diagnostic criteria expressed in the ADA Expert Committee report (Genuth *et al.* 2003). Five participants (1 female and 4 males) had BMIs under 24.9 kg/m²; the other three males had BMIs (range) of 25.4-25.9 kg/m². None of the subject had any signs of insulin resistance or

any condition associated with insulin resistance (e.g. hypertension, dyslipidemia, polycystic ovary syndrome or acanthosis nigricans); all participants had normal insulin sensitivity index 463±22 ml min⁻¹ m⁻² (Mari *et al.* 2001), which correlated well with the homeostasis model assessment index (Matthews *et al.* 1985).

The study protocol was designed in accordance to the principles of the Helsinki Declaration and received prior approval by the Ethics Committee of the Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. All participants were fully informed and gave written consent.

Tests

We used a controlled cross-over study design to evaluate the effect of whey proteins on the concentration of serum C-peptide and plasma glucose. All participants were tested on 6 different occasions in random order within a one month period. The tests were carried out in the research unit of the Second Department of Internal Medicine at University Hospital Královské Vinohrady, Prague, Czech Republic.

We used three intravenous tests to evaluate C-peptide secretion (Chaillous *et al.* 1996): the glucose-dependent arginine-stimulation test (AST), the glucagon stimulation test (GST) and the intravenous glucose tolerance test (IVGTT). For the AST, 5 g of arginine in 50 ml of 0.9 % saline (Ardeapharma, Ševětín, Czech Republic) were injected as a bolus within 45 s. In case of the GST, 2 mg of glucagon (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) in 60 ml of 0.9 % saline were injected as a bolus within 60 s. Finally for the IVGTT; bolus of 0.5 g per kg of body weight of glucose (using Glucose-30 solution, B/Braun, Melsungen, Germany) was injected within 3 min.

The other three tests for C-peptide secretion evaluation were based on the oral administration of glucose alone (oral glucose tolerance test (OGTT), whey proteins alone (oral whey proteins test (OWT) and whey proteins in combination with glucose (oral whey proteins in combination with glucose test (OWGT)). Substances used in these tests were administered in the form of drinks and were consumed within 3 min. The OGTT was performed using a 75 g oral glucose load (Glukopur; Natura, Hamry u Havlíčkova Brodu, Czech Republic) in 300 ml of water (Small *et al.* 1985). OWT substance consisted of 40 g of flavored whey proteins (Volactive UltraWhey80 (WPC80); DNV, Hoogeveen, the Netherlands) in 300 ml water and OWGT substance

consisted of 40 g of flavored whey proteins (Volactive UltraWhey80 (WPC80); DVN, Hoogeveen, the Netherlands) and 72.6 g of glucose (Glukopur; Natura, Hamry u Havlíčkova Brodu, Czech Republic) in 300 ml water. OWGT had an equivalent amount of carbohydrate (75 g) as OGTT. OGTT and IVGTT results were used as reference values for their respective category (oral vs. intravenous).

All the tests were performed regularly at 8 a.m. after an overnight fast (at least 12 h), except water. Before the tests, participants had unrestricted stable diets (at least 150 g of carbohydrate per day); a minimum of 3 days/week of physical activity was encouraged. Participants were non-smokers and agreed to abstain from alcohol and coffee consumption during the study period. All participants underwent all 6 tests.

A peripheral venous catheter connected with a three-way stopcock was inserted into the antecubital vein using aseptic technique. This set-up enabled intravenous access for the purpose of intravenous stimulation tests and for obtaining samples of venous blood; it also ensured standardized sampling conditions. After stopcock adjustment the same catheter was used for bolus injections and sampling (Gottsäter *et al.* 1992). The catheter was flushed with 0.9 % saline after each blood sample and after administration of intravenous C-peptide stimulants (arginine, glucagon, glucose). The participants rested quietly on beds during the tests.

Whey proteins

The study employed whey protein concentrate 80 (Volactive UltraWhey80 (WPC80); DVN, Hoogeveen, the Netherlands) from a sweet cheese whey source containing 81 % high-quality nutritional whey proteins, 6 % lactose, 6 % fat, 4 % moisture and 3 % minerals. 100 g of WPC80 had an energy value of 1549 kJ or 362 kcal. Average proportion of branched chain amino acids (BCAA) in the whey proteins was (according to the manufacturer) 23 %; however our analysis using capillary electrophoresis and the HP3DCE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) showed a BCAA percentage of only 17.5 %.

Powdered whey proteins were administered as a protein drink flavored with 0.05 g of low-calorie aspartame (NutraSweet: The NutraSweet Company, Chicago, USA), 0.4 g of strawberry aroma AFFRAI 0005 (RJP International, Prague, Czech Republic) and 0.4 g of vanilla extract (RAPS-CZ, Prague, Czech Republic).

Blood samples

Fasting values of plasma glucose and serum C-peptide were taken 10 min after the catheter was inserted and 10 min before administration of secretagogues (time: -10). For the intravenous agents the first venous blood samples were obtained immediately after intravenous stimuli administration (time: 0) (Ward *et al.* 1984). For the oral tests, the first blood sample was taken at 30 min; additional samples were taken at 60, 90, 120, 150 and 180 min. For the AST and GST, the sampling times were 1 min, 3 min, 5 min, 7 min, 10 min, 20 min and 30 min after administration; for the IVGTT, sampling times were 1 min, 3 min, 5 min, 7 min, 10 min, 30 min, 60 min and 120 min after administration.

Venous blood samples of glucose and C-peptide were collected in a closed blood collection system (S-Monovette; Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Glucose was drawn into tubes containing sodium fluoride, while blood for C-peptide testing was drawn into sample tubes without additives.

Blood samples for blood glucose determination were processed immediately after being drawn by the Department of Biochemistry and Pathobiochemistry, Third Faculty of Medicine and University Hospital Královské Vinohrady, Charles University in Prague, Czech Republic. Blood samples for C-peptide determination were immediately cooled on ice to 21 °C and then centrifuged for 15 min at 3000 G (Jouan BR4i, DJB Labcare, Buckinghamshire, England). The samples then were frozen at -80 °C for 32 days until actual laboratory analysis.

Plasma glucose concentrations were determined using the hexokinase method (Passey *et al.* 1977) by a Konelab Glucose analyzer (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finland). The detection limit was 0.1 mmol/l.

Serum C-peptide concentrations were analyzed using a 2-site immunochemiluminometric assay (Kao *et al.* 1992) by an Immunolite 2000 immunoassay system (Diagnostic Products Corporation, Las Angeles, California, USA). The analytical range of the assay was 0.17-2.32 nmol/l and the lower limit of sensitivity was 0.017 nmol/l. The inter- and intra-assay coefficients of variation (CVs) were less than 6 %.

Statistics

To quantify the plasma glucose and the serum C-peptide responses relative to the test substances, the incremental area under the curve (iAUCs) was calculated using the trapezoidal rule and using the initial

fasting value of the respective metabolite as the baseline (i.e. blood sample $t = -10$ min). To allow fair comparisons among tests with different durations, iAUCs were further normalized by the test duration (iAUCs/min) according to Greenbaum *et al.* (2008). The statistical comparison between the total C-peptide response and plasma glucose level, relative to the reference was carried out using the two-sided t-test. Comparisons of C-peptide response variability between stimulation tests were carried out by a likelihood ratio test employing coefficients of variation described by Verrill and Johnson (2007).

All data in the text are presented as means \pm SEMs. All statistical hypotheses were tested at significance level 0.05 using MATLAB software (2011b, Mathworks, Natick, MA, USA).

Results

C-peptide response (Fig. 1)

The average fasting concentration of serum C-peptide was (mean \pm SEM) 0.43 ± 0.02 nmol/l. All oral tests resulted in a similar shape for the C-peptide response curve, with a peak at 30 min. In case of OGTT (reference), the C-peptide concentration peaked at 1.61 ± 0.39 nmol/l above baseline. The result of OWT and OWGT, relative to OGTT, was lower by 57 % and higher by 63 %, respectively. Subsequent concentration decreases reached baseline within 120-180 min (OWT and OGTT) and after 180 min (OWGT). Individual C-peptide concentrations differences were lower ($p < 0.05$) at 60 and 90 min in case of OWT than in case of OGTT. Following OWGT, the C-peptide concentration at 30 min ($p < 0.05$) was the only one, which was higher than OGTT.

IVGTT (reference) resulted in a peak C-peptide concentration of 1.56 ± 0.17 nmol/l above baseline, which occurred 1 min after administration and lasted for 30 min. AST peaked at value lower by 57 % (3 min) compared to IVGTT, while GST produce almost (6 % lower) the same maximum concentration as IVGTT. Subsequent concentration decreases reached baseline before 20 min (AST), after 30 min (GST) and after 120 min (IVGTT). Individual C-peptide concentrations differences were lower ($p < 0.05$) during the whole test period in case of AST compared to IVGTT. GST managed to maintain similar concentrations as IVGTT except for sample times 0, 1 and 30 min, where it was lower ($p < 0.05$) than IVGTT.

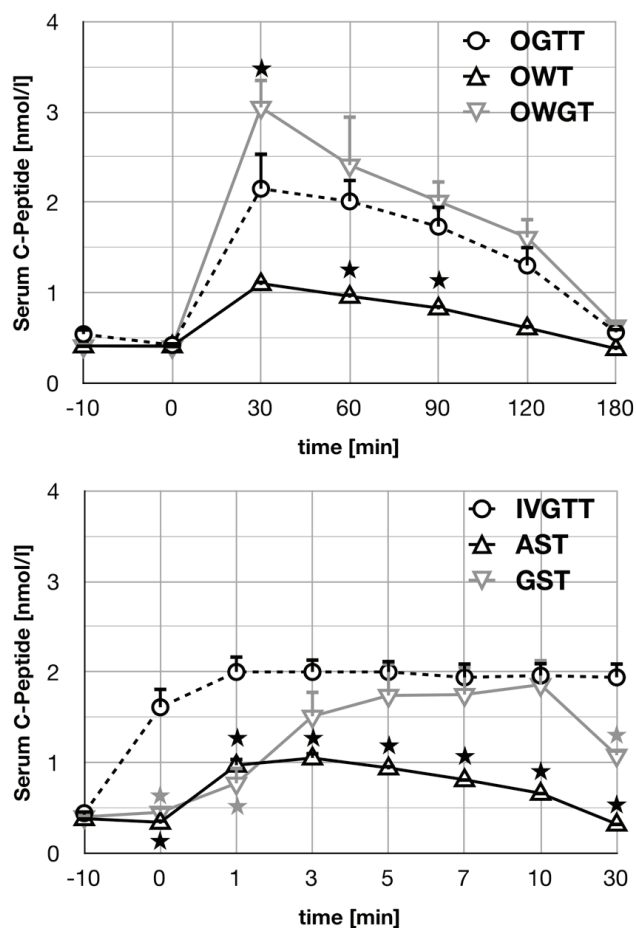


Fig. 1. Mean (\pm SEM) values of serum C-peptide concentration in response to orally administered tests – OGTT (reference), OWT and OWGT – and intravenous tests – IVGTT (reference), AST and GST in healthy subjects ($n=8$). * indicates values significantly different from the reference ($p < 0.05$).

Glucose response (Fig. 2)

The average fasting plasma glucose concentration (baseline) was (mean \pm SEM) 4.33 ± 0.06 mmol/l. Performing OWGT and OGTT induced similar glucose response shaped curves over 60 min with peak concentrations (from baseline) occurring at 30 min. The values steadily decreased until fasting concentrations were reached (between 90-120 min). OGTT showed glucose concentration peak at 2.25 ± 0.24 mmol/l above baseline. Compared to OGTT, the glucose response was 25 % lower after OWGT. OWT lowered glucose concentrations below fasting values for the entire 120 min observation period, the negative peak concentration value occurred at 60 min and was 13 % lower than the fasting glucose value. Individual plasma glucose level differences were lower ($p < 0.05$) at 30 and 60 min in case of OWT relative to OGTT result.

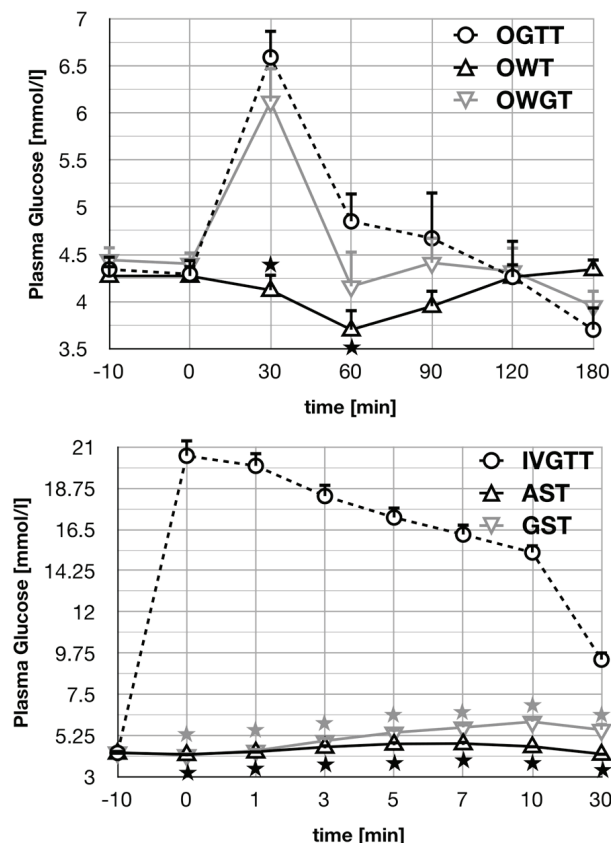


Fig. 2. Mean (\pm SEM) values of plasma glucose concentration in response to orally administered tests – OGTT (reference), OWT and OWGT – and intravenous tests – IVGTT (reference), AST and GST in healthy subjects ($n=8$). * indicates values significantly different from the reference ($p<0.05$).

The peak plasma glucose concentration, in case of IVGTT, was 16.23 ± 0.92 mmol/l above baseline and occurred immediately after administration. AST and GST showed a peak value that was 97 % lower (7 min) and 88 % lower (20 min), respectively, relative to IVGTT result. Subsequent concentration decreases reached baseline between 10 and 20 min (AST), after 30 min (GST) and between 60-120 min (IVGTT). Individual plasma glucose concentrations were lower ($p<0.05$) during the whole test period of both AST and GST relative to IVGTT.

iAUC/min – C-peptide response (Fig. 3)

Average C-peptide *iAUC/min* was (mean \pm SEM) 1.27 ± 0.19 nmol/l and 1.00 ± 0.10 nmol/l for OGTT and IVGTT, respectively. OWT induced an *iAUC/min* value 64 % lower ($p<0.05$) than OGTT (reference), as opposed to OWGT, that reached an *iAUC/min* value 36 % higher (compared to OGTT (reference)). Furthermore for OWT, the variability of the *iAUC/min* C-peptide response was lower ($p<0.05$) than in case of

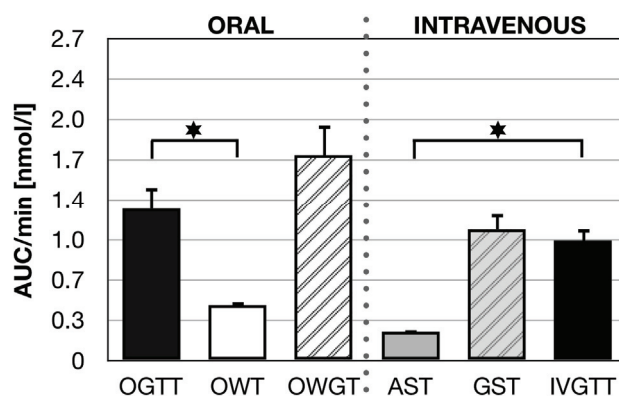


Fig. 3. Mean (\pm SEM) incremental areas under the curve per minute (*iAUC/min*) for serum C-peptide concentration for all tests in healthy subjects ($n=8$). Values from OGTT (black) were taken as a reference for orally administered tests – for intravenous tests the reference was IVGTT values (black). * indicates values significantly different from reference ($p<0.05$).

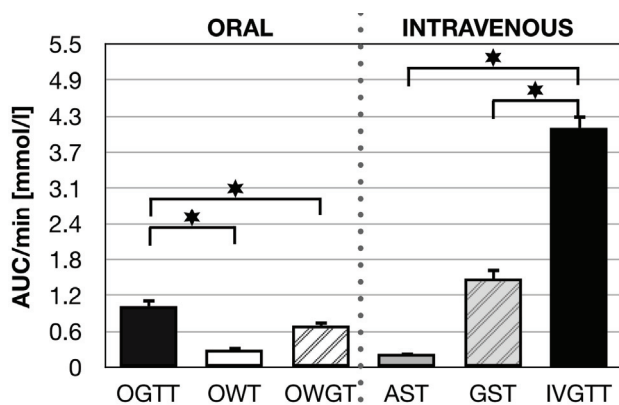


Fig. 4. Mean (\pm SEM) *iAUC/min* for plasma glucose concentration for all tests in healthy subjects ($n=8$). Values from OGTT (black) were taken as a reference for orally administered tests – for intravenous tests, the reference was IVGTT values (black). * indicates values significantly different from the reference ($p<0.05$).

OGTT (reference) as well as in case of OWGT. For the intravenous tests, the *iAUC/min* was 76 % lower ($p<0.05$) for the AST and 9 % higher for the GST compared to IVGTT (reference). When comparing AST and OWT, OWT resulted in an *iAUC/min* value that was 93 % higher than AST.

iAUC/min – glucose response (Fig. 4)

Average glucose *iAUC/min* was (mean \pm SEM) 1.04 ± 0.13 mmol/l and 4.08 ± 0.22 mmol/l for OGTT and IVGTT, respectively. OWT induced an *iAUC/min* value 71 % lower ($p<0.05$) than oral OGTT (reference), a similar situation was also true for OWGT, which reached an *iAUC/min* value that was 32 % lower ($p<0.05$). Relative to the intravenous tests, the *iAUC/min* was

lower for both the AST (94 %; $p < 0.05$) and GST (63 %; $p < 0.05$) compared to IVGTT (reference).

Test tolerance by participants

OGTT caused intermittent nausea in 25 % of participants and 50 % of participants experienced tachycardia during IVGTT. GST caused intermittent nausea, tachycardia and tachypnea in 100 % of participants. OWT, OWGT and AST produced no observed side effects.

Discussion

The results of this study showed that acute oral administration of whey proteins alone and in combination with glucose in healthy participants leads to an increase in total serum C-peptide concentration. These results were comparable with results of other methods often used for the assessment of normal C-peptide secretory responses to oral and intravenous stimuli. The advantage of using these tests is that they allow accurate characterization of both fasting and stimulated C-peptide concentrations and are thus able to detect (early) a progressive loss of function of pancreatic islet beta cells and the subsequent decrease in the maximal capacity of C-peptide secretion. This is important since changes in stimulated C-peptide levels are more obvious than changes in fasting C-peptide levels. The decrease of C-peptide secretion capacity rapidly leads to development of glucose intolerance, caused by an inadequate increase in insulin secretion in relation to insulin resistance (Ahrén and Larsson 2002). Therefore early discovery of C-peptide secretion impairment could be of an importance for the timely introduction of preventive and therapeutic interventions. Faerch *et al.* (2009) reported that impairment usually starts several years before it is possible to classify individuals as abnormally hyperglycemic either in the fasting or post-challenge state.

A consistent increase in the total C-peptide concentration (iAUC/min) was perceived in case of OWT, while postprandial plasma glucose level remained almost unchanged in comparison with the other tests (with the exception of the AST). Our data shows, that after administering 40 g of pure whey proteins (i.e. performing OWT), the iAUC/min for postprandial plasma glucose level (0.30 mmol/l) was comparable with the iAUC/min after intravenous administration of 5 g arginine (0.23 mmol/l), which is an important feature of

non-hyperglycemic tests that evaluate glucose mechanisms in individuals with glucose tolerance disorders. However, we observed different values for the iAUC/min C-peptide response. Whey proteins alone stimulated C-peptide secretion to a higher iAUC/min (0.46 nmol/l; $p < 0.05$) than arginine (0.24 nmol/l).

Whey proteins alone are therefore able to increase C-peptide secretion more than the stimulated plasma glucose level indicates which is consistent with the findings of Nilsson *et al.* (2004). Nilsson *et al.* (2004) further demonstrated that the major reason for the C-peptide secretion increase seems to be the activation of incretin hormones (glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), and glucagon-like peptide-1 (GLP-1); together with the actual rise of plasma amino acid concentrations (especially BCAA), that could have a direct effect on insulin secretion of beta-cells.

Results of this study also showed that whey proteins administered in combination with glucose (as in case of OWGT) stimulated the highest iAUC/min C-peptide response of all tests. OWGT thus preferentially assessed the total C-peptide response of all tests in healthy individuals, while the iAUC/min of glucose concentrations were significantly reduced compared with results using an equivalent amount of glucose. Decreases in plasma glucose concentrations associated with OWGT are a direct physiological consequence of hyperinsulinemia (Floyd *et al.* 1963), which causes the consumption of glucose in peripheral tissues and reduction of endogenous glycogenolysis, resulting in increased glycogen concentrations to avoid hypoglycemia (Gannon and Nutall 2010).

In summary, we examined the properties of whey proteins as a C-peptide secretagogue using established C-peptide stimulation tests. Whey proteins alone consistently increased total C-peptide concentration, without increasing postprandial plasma glucose levels. Forty grams of whey proteins combined with 72.6 g of glucose induced total C-peptide secretion that was 36 % higher than an equivalent amount of glucose, while maintaining significantly lower levels of plasma glucose. Results of this study suggest that both dietology and C-peptide secretion testing might take advantage of the unique property of whey proteins.

Conflict of Interest

Elena Wildová, Pavel Dlouhý, Jolana Rambousková and Michal Anděl cooperate with MILCOM company and Bohušovická mlékárna on different types of research.

This collaboration is granted by research grants. Michal Anděl developed several formulas for enteral nutrition, which are produced by Bohušovická mlékárna. Michal Anděl and Pavel Dlouhý also published the booklets on medical aspects of milk, printed by Potravinářská komora České republiky.

Acknowledgements

The study was supported by the National Agency for Agricultural Research (grant NAZV 101B090) and was

conducted in cooperation with MILCOM company. The authors are grateful to those participating in the study and Ms. Diana Mžyková for her expert technical assistance. The authors would also like to thank Ing. Petr Nováček and Ing. Jiří Wild for statistical analysis and advice on the statistical presentation, Doc. Petr Tůma for amino acid analysis of whey proteins concentrate and Thomas Secrest for language editing of the English version of this study.

References

- AHRÉN B, LARSSON H: Quantification of insulin secretion in relation to insulin sensitivity in nondiabetic postmenopausal women. *Diabetes* **51**: 202-211, 2002.
- AKHAVAN T, LUHOVYY BL, BROWN PH, CHO CE, ANDERSON GH: Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. *Am J Clin Nutr* **91**: 966-975, 2010.
- CHAILLOUS L, ROHMER V, MAUGENDRE D, LECOMTE P, MARÉCHAUD R, MARRE M, GUILHEM I, CHARBONNEL B, SAÏ P: Differential beta-cell response to glucose, glucagon, and arginine during progression to type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Metabolism* **45**: 306-314, 1996.
- FAERCH K, BORCH-JOHNSEN K, HOLST JJ, VAAG A: Pathophysiology and aetiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance: does it matter for prevention and treatment of type 2 diabetes? *Diabetologia* **52**: 1714-1723, 2009.
- FLOYD JC JR, FAJANS SS, KNOPF RF, CONN JW: Evidence that insulin release is the mechanism for experimentally induced leucine hypoglycemia in man. *J Clin Invest* **42**: 1714-1719, 1963.
- FLOYD JC JR, FAJANS SS, CONN JW, KNOPF RF, RULL J: Insulin secretion in response to protein ingestion. *J Clin Invest* **45**: 1479-1486, 1966.
- GANNON MC, NUTTALL FQ: Amino acid ingestion and glucose metabolism – a review. *IUBMB Life* **62**: 660-668, 2010.
- GENUTH S, ALBERTI KG, BENETT P, BUSE J, DEFRONZO R, KAHN R, KITZMILLER J, KNOWLER WC, LEBOVITZ H, LERNMARK A, NATHAN D, PALMER J, RIZZA R, SAUDEK C, SHAW J, STEFFES M, STERN M, TUOMILEHTO J, ZIMMET P: Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26**: 3160-3167, 2003.
- GOTTSÄTER A, LANDIN-OLSSON M, FERNLUND P, GULLBERG B, LERNMARK A, SUNDKVIST G: Pancreatic beta-cell function evaluated by intravenous glucose and glucagon stimulation. A comparison between insulin and C-peptide to measure insulin secretion. *Scand J Clin Lab Invest* **52**: 631-639, 1992.
- GREENBAUM CJ, MANDRUP-POULSEN T, MCGEE PF, BATTELINO T, HAASTERT B, LUDVIGSSON J, POZZILLI P, LACHIN JM, KOLB H, TYPE 1 DIABETES TRIAL NET RESEARCH GROUP; EUROPEAN C-PEPTIDE TRIAL STUDY GROUP: Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of beta-cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **31**: 1966-1971, 2008.
- KAO PC, TAYLOR RL, HESER DW: C-peptide immunochemiluminometric assay developed from two seemingly identical polyclonal antisera. *Ann Clin Lab Sci* **22**: 307-316, 1992.
- KREZOWSKI PA, NUTTALL FQ, GANNON MC, BARTOSH NH: The effect of protein ingestion on the metabolic response to oral glucose in normal individuals. *Am J Clin Nutr* **44**: 847-856, 1986.
- MARI A, PACINI G, MURPHY E, LUDVIK B, NOLAN JJ: A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* **24**: 539-548, 2001.

-
- MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, TURNER RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**: 412-419, 1985.
- NILSSON M, STENBERG M, FRID AH, HOLST JJ, BJÖRCK IM: Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr* **80**: 1246-1253, 2004.
- PAL S, ELLIS V: The acute effects of four protein meals on insulin, glucose, appetite and energy intake in lean men. *Br J Nutr* **104**: 1241-1248, 2010.
- PASSEY RB, GILLUM RL, FULLER JB, URRY FM, GILES ML: Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method recommended in the proposed product class standard (1974). *Clin Chem* **23**: 131-139, 1977.
- POLONSKY KS, RUBENSTEIN AH: C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin. Pitfalls and limitations. *Diabetes* **33**: 486-494, 1984.
- POLONSKY KS, GIVEN BD, VAN CAUTER E: Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* **81**: 442-448, 1988.
- SMALL M, COHEN HN, BEASTALL GH, MACCUISH AC: Comparison of oral glucose loading and intravenous glucagon injection as stimuli to C-peptide secretion in normal men. *Diabet Med* **2**: 181-183, 1985.
- VERRILL S, JOHNSON RA: Confidence bounds and hypothesis tests for normal distribution coefficients of variation. *Commun Stat Theory Methods* **36**: 2187-2206, 2007.
- WARD WK, BOLGIANO DC, MCKNIGHT B, HALTER JB, PORTE D JR: Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* **74**: 1318-1328, 1984.
-

KASEINY A SYROVÁTKOVÉ PROTEINY JSOU FYZIOLOGICKÝMI STIMULY INZULÍNOVÉ SEKRECE

CASEIN AND WHEY PROTEINS ARE THE PHYSIOLOGICAL STIMULI OF THE INSULIN SECRETION

ELENA WILDOVÁ, MICHAL ANDĚL

Centrum pro výzkum diabetu, metabolismu a výživy 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, 2. interní klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

SOUHRN

Hlavní mléčné proteiny – kaseiny a syrovátkové proteiny – jsou vysoce kvalitní bílkoviny, jejichž podání vyvolává inzulinovou sekreci, aniž by vedlo k vzestupu postprandiální glykémie. Předpokládá se, že inzulinovou sekreci zvyšují přímým účinkem některých zejména větvených aminokyselin na β -buňku Langerhansových ostrůvků pankreatu spolu s aktivací inkretinových hormonů. Pro rozdílné složení, trávení a vstřebávání aminokyselin dosahují syrovátkové proteiny ve srovnání s kaseiny vyššího inzulinotropního efektu.

Klíčová slova: syrovátkové proteiny, kaseiny, stimulovaná inzulinová sekrece, zdraví jedinci

SUMMARY

Major milk proteins – casein and whey proteins – are high-quality proteins with unique insulinotropic property that do not increase postprandial blood glucose upon administration. It is believed that these proteins increase insulin secretion by both a direct effect of particularly branched chain amino acids on β -cell of islets of Langerhans in pancreas and also by activation of incretin hormones. However, due to a different amino acid profile and digestion, whey proteins achieve higher insulinotropic effect in comparison with casein proteins.

Key words: whey proteins, casein proteins, stimulated insulin secretion, healthy individuals

ÚVOD

U zdravých jedinců bylo prokázáno, že podání kravského mléka a mléčných výrobků vede k vyšší stimulované inzulinové sekreci, než by odpovídalo jejich obsahu sacharidů (Östman et al., 2001). Z tohoto hlediska byly zkoumány nesa-
charidové složky mléka a bylo zjištěno, že se pravděpodobně jedná o vliv hlavních mléčných proteinů. Ve studii Nilssona et al. (2004) byly syrovátkové proteiny označeny za nejvýznamnější inzulinová sekreatogoga v porovnání s účinkem stejného množství ostatních živočišných či rostlinných proteinů. To, že proteiny, peptidy či aminokyseliny jsou fyziologickými stimuly inzulinové sekrece u zdravých jedinců, je známo už od druhé poloviny minulého století (Floyd et al., 1966). Floyd et al. (1966) ve své práci dále poukázal i na fyziologický vliv proteinů na hladinu postprandiální glykémie, kterou významně nezvyšují, ale nevedou ani k hypoglykémii. Nicméně to, že podání odlišných dávek a typů proteinů či jejich metabolitů vede k různě velké inzulinové odezvě, ukázal až

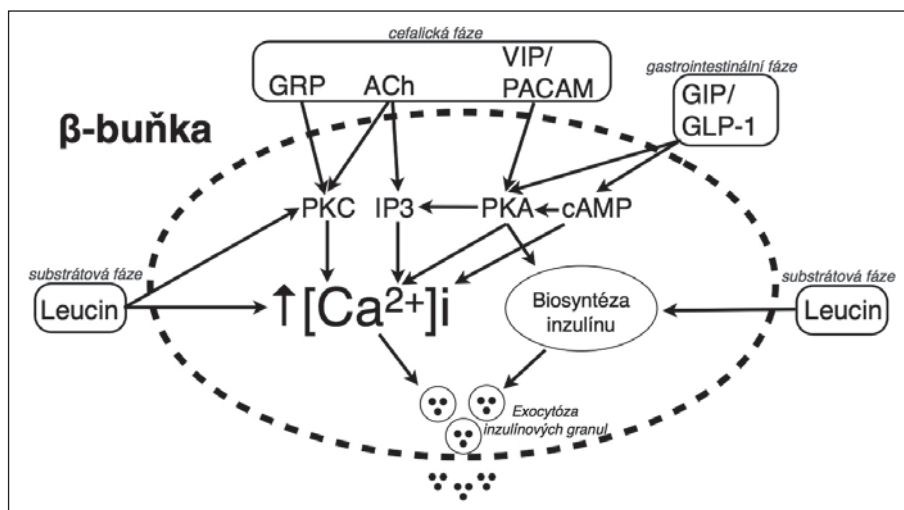
Nilsson et al. (2004) a po něm i Veldhorst et al. (2009) a Pal a Ellis (2010).

Tato přehledová práce se zaměřuje na dosavadní poznatky fyziologického inzulinotropního účinku hlavních mléčných proteinů na β -buňku Langerhansových ostrůvků pankreatu.

STIMULOVANÁ INZULÍNOVÁ SEKRECE U ZDRAVÝCH JEDINCŮ

Inzulinová sekrece β -buňkou Langerhansových ostrůvků pankreatu je komplexní fyziologický proces zahrnující integraci a interakci několika mechanismů. Hovoříme jednak o trvalé tzv. bazální inzulinové sekreci a jednak o stimulované sekreci (Bagdade et al., 1971), která je dána odpovědí na podaný stimulus (obr. 1).

Mechanismy vedoucí ke stimulované inzulinové sekreci se po perorálním stimulu promítají do dvou fází inzulinové sekrece. Hovoříme o takzvané časné a pozdní



Obř. 1: Zjednodušené schéma tří fází (cefalické, gastrointestinální a substrátové) nutrienty stimulované inzulínové sekrece po podání kaseinů a srovnávkových proteinů na úrovni β -buňky. Stimulátory: acetylcholin (ACh), vazoaktivní intestinální polypeptid (VIP), gastrin uvolňující peptid (GRP), polypeptid aktivující pituitární adenylátcyklázu (PACAM), glukózo-dependentní inzulínotropní polypeptid (GIP) a glukagonu podobný peptid-1 (GLP-1). Signální dráhy zprostředkované proteinkinázou C (PKC), inositol-1,4,5-trifosfátem (IP3), proteinkinázou A (PKA) a cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP) jsou přesněji popsány v textu.

fázi stimulované inzulínové sekrece (Curry et al., 1968). Časná fáze je dána uvolněním preformovaných inzulínových granul a trvá do 15–30 minut po podání stravy. Je zprostředkována dvěma částečně se překrývajícími fázemi – cefalickou (Gautam et al., 2006) a gastrointestinální (Roberge et al., 1996). Následující pozdní fáze inzulínové sekrece trvá do 2–3 hodin po podání stravy. Je dána uvolněním nově syntetizovaného inzulínu a je zprostředkována pokračováním cefalické a gastrointestinální fáze a především účinkem substrátové fáze (Rehfeld a Stadil, 1973).

CEFALICKÁ FÁZE STIMULOVANÉ INZULÍNOVÉ SEKRECE

Cefalická fáze inzulínové sekrece vzniká prostřednictvím reflexního oblouku přes nadprahové stimulace zrakových, čichových a chuťových receptorů (přehled Berthoud et al., 1981; Ahrén a Holst, 2001; D'Alessio et al., 2001) před a při podání každého potravního stimulu, tedy i kaseinů či srovnávkových proteinů. Podílejí se na ní cholinergní a non-cholinergní mechanismy autonomního nervového systému (Ahrén a Holst, 2001).

CHOLINERGNÍ MECHANIZMY INZULÍNOVÉ SEKRECE

Cholinergní neboli acetylcholinem (ACh) aktivované mechanismy způsobují exocytózu preformovaných inzulínových granul z β -buňky zvýšením koncentrace intracelulárního vápníku ($[Ca^{2+}]_i$). Toho je v zásadě docíleno dvěma způsoby – uvolněním vápenatých iontů z endoplazmatického retikula β -buňky a jejich vzestupem z extracelulárního prostoru napětově závislými vápníkovými kanály.

Gilon a Henquin (2001) ve své přehledové práci uvádějí, že k uvolnění vápenatých iontů do cytoplazmy buňky dochází vazbou inositol-1,4,5-trifosfátu (IP3) na ligandem

řízené vápníkové kanály endoplazmatického retikula. IP3 vzniká účinkem fosfolipázy C (PLC) na membránový fosfolipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2). PLC je aktivována vazbou ACh na muskarinový receptor M3 spřažený s regulačním Gq proteinem. Další navýšení $[Ca^{2+}]_i$ způsobuje spuštění signální dráhy zprostředkované proteinkinázou C (PKC), ale přesné mechanismy této dráhy dosud nejsou zcela známe.

Původně extracelulárně lokalizované vápenaté ionty se dostávají do β -buňky dvěma mechanismy. Dle výše zmíněných autorů dochází k tzv. kapacitně podmíněnému vstupu iontů do buňky přes napětově nezávislé vápníkové kanály jako reakce na pokles koncentrace vápenatých iontů v endoplazmatickém retikulu. Druhý mechanismus je dán vazbou ACh na M3 receptor s následným otevřením sodíkových kanálů, depolarizací plazmatické membrány s otevřením napětově závislých vápníkových kanálů. Bylo však zjištěno, že tento mechanismus je aktivován až po depolarizaci membrány na glukóze závislých mechanismech inzulínové sekrece, tedy v přítomnosti tzv. stimulačních hladin plazmatické glukózy nad 7 mmol/l (Gilon a Henquin, 2001).

NON-CHOLINERGNÍ MECHANIZMY INZULÍNOVÉ SEKRECE

Pojem non-cholinergní mechanismy je označení pro mechanismy zprostředkované neuropeptidy uvolněné společně s ACh z nervových zakončení. Patří mezi ně vazoaktivní intestinální polypeptid (VIP), gastrin uvolňující peptid (GRP) a polypeptid aktivující pituitární adenylátcyklázu (PACAM).

VIP a PACAM působí přes vazbu na specifické receptory spřažené s G-proteinem aktivující proteinkinázu A (PKA)-dependentní signální dráhu, která bude popsána níže (Jamien et al., 2002). Na myším modelu bylo zjištěno, že vazbou GRP na specifický receptor je aktivována PKC-dependentní

metabolická cesta vedoucí k inzulinové sekreci (Gregersen a Ahrén, 1996). Účinek všech zmíněných neuropeptidů je zesílen při současné aktivaci na glukóze závislých mechanismů (Ahrén a Holst, 2001).

GASTROINTESTINÁLNÍ FÁZE STIMULOVANÉ INZULINOVÉ SEKRECE

Ve své práci popsal Nauck et al. (1986) úzký vztah mezi inkretinovými hormony a inzulinovou sekrecí po perorálním stimulu. V 80. letech minulého století bylo dále zjištěno, že podíl účinku glukózo-dependentního inzulinotropního polypeptidu (GIP) a glukagonu podobnému peptidu-1 (GLP-1) (Ebert a Creutzfeldt, 1987) k inzulinové sekreci je více než 50 % z pohledu celkové nutrienty zprostředkované inzulinové sekrece po podání perorálního stimulu (přehled Burcelin et al., 2007). Tato fáze inzulinové sekrece se označuje jako fáze gastrointestinální.

Uvolnění GIP z K buněk proximální části tenkého střeva a GLP-1 z L buněk distální části tenkého střeva se může uskutečnit jednak přímým účinkem nutrienty (přehled Drucker, 1998) nebo nepřímým mechanismem přes hormonální či nervovou stimulaci (Rocca a Brubaker, 1999). V současné době je ale stále mnoho nejasností ohledně přesných mechanismů nutrienty stimulované sekrece inkretinových hormonů. Současné poznatky naznačují, že aminokyseliny, dipeptidy a tripeptidy vzniklé trávením kaseinů a syrovátkových proteinů v tenkém střevě mohou být přímými stimuly endokrinních buněk střeva secernujících inkretinové hormony, což bylo doloženo silnou korelací mezi vzestupem inkretinových hormonů a přítomností směsí některých esenciálních aminokyselin (leucinu, isoleucinu, lysinu, threoninu a valinu) v plazmě (Nilsson et al., 2004; Salehi et al., 2012). In vitro byla zjištěna stimulace GLP-1 i neesenciální aminokyselinou – glutaminem (Reimer et al., 2004).

Rozdíly ve schopnosti stimulovat inkretinové hormony byly poprvé popsány mezi kaseiny a syrovátkovými proteiny v práci Hallové et al. (2003). U zdravých jedinců byly prokázány vyšší plazmatické hladiny obou inkretinových hormonů po podání syrovátkových proteinů v porovnání s výsledky po podání kaseinů. Kaseiny vyvolaly stejnou plazmatickou hladinu inkretinových hormonů jako perorálně podaná glukóza. Studie Nilssona et al. (2004) a dále Salehiho et al. (2012) ukazují na významné zvýšení především hladin GIP v porovnání s hladinou GLP-1 po podání syrovátkových proteinů u zdravých jedinců. Od 70. let minulého století se vysvětlovaly zvýšené plazmatické hladiny GIP pouze přítomností aminokyselin v zažívacím traktu (Thomas et al., 1976), ale od roku 2006, kdy byla publikovaná studie Gunnarssona et al., se předpokládá, že v proximální části tenkého střeva působí dipeptidy a/nebo tripeptidy vzniklé trávením syrovátkových proteinů jako inhibitory enzymu dipeptidylpeptidázy IV (DPP-4), čímž je zabráněno časnému rozkladu GIP s prodloužením jeho inzulinotropní aktivity. V distální části tenkého střeva je však jejich efekt minimální (Gunnarsson et al., 2006).

MECHANIZMY INZULINOVÉ SEKRECE ZPROSTŘEDKOVANÉ INKRETINOVÝMI HORMONY

Oba inkretinové hormony zvyšují inzulinovou sekreci vazbou na společný specifický membránový receptor spřažený

s G-proteinem za přítomnosti stimulačních hladin glykémie (přehled Baggio a Drucker, 2007). Inzulinovou sekreci zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ včetně interakce s regulátory exocytózy inzulinových granul.

Inkretinové hormony mohou zvyšovat $[Ca^{2+}]_i$ z vnitřních i zevních zdrojů především přes aktivaci PKA-dependentní a v menší míře PKA-independentní signální dráhy (viz níže). Dle přehledové práce Kima a Egana (2008) je PKA aktivována cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP), který vzniká aktivací adenylátcyklázy (AC) po vazbě inkretinových hormonů na membránový receptor. PKA-dependentní signální dráha zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ přes IP3 a současně i otevřením napěťově závislých vápníkových kanálů (přehled Trnka a Anděl, 2001).

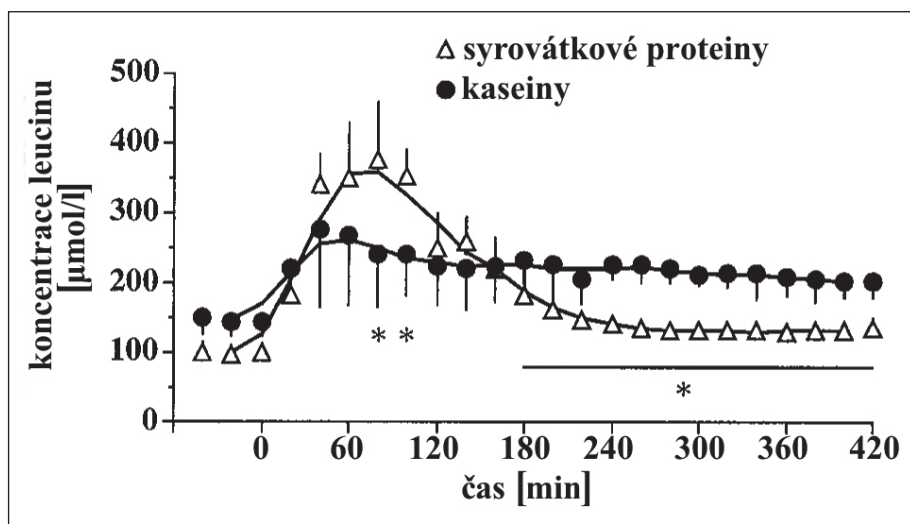
Přímá regulace exocytózy inzulinu může být dle studie Kashimiy et al. (2001) spuštěna vznikem intracelulárního komplexu proteinů Epac, Epac II, Rim2 a Rab3 v nezávislosti na aktivaci PKA, ale v závislosti na cAMP. Tato dráha je tedy označována PKA-independentní signální dráha a také vede ke zvýšené $[Ca^{2+}]_i$ uzavřením adenosintrifosfát-dependentních kanálů (K^+_{ATP} kanálů).

Meyer a Habener (1993), stejně jako Wang et al. (2001), se domnívají, že inkretinové hormony mohou prostřednictvím PKA-dependentní signální dráhy (tedy za předpokladu přítomnosti zvýšené $[Ca^{2+}]_i$) regulovat i biosyntézu inzulinu aktivací transkripčních faktorů CREB (cAMP-response element binding protein) a PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox-1).

SUBSTRÁTOVÁ FÁZE STIMULOVANÉ INZULINOVÉ SEKRECE

Po podání hlavních mléčných proteinů je substrátová fáze inzulinové sekrece dána přímým účinkem aminokyselin na β -buňku. Podání jednotlivých aminokyselin nebo jejich směsí se liší velikostí inzulinotropního efektu. U zdravých jedinců je často hodnocena stimulovaná inzulinová sekrece po podání aminokyselin v kombinaci s glukózou ve vztahu k referenci – samotné glukóze. Bylo totiž zjištěno, že celkový efekt kombinace aminokyselin/y a sacharidu na inzulinovou sekreci je dána součtem účinku obou komponent. Jedná se o takzvaný nesynergický efekt pozorovaný u zdravých jedinců (Rabinowitz et al., 1966).

V 60. letech minulého století bylo zjištěno, že perorální podání jednotlivých aminokyselin (leucinu), směsí několika aminokyselin (argininu, fenylalaninu, lysinu) nebo směsí více aminokyselin (argininu, fenylalaninu, histidinu, isoleucinu, leucinu, lysinu, methioninu, threoninu, tryptofanu, valinu) může u zdravých jedinců vést k významné inzulinové sekreci (Floyd et al., 1966). Z přehledové práce Gannonové a Nuttalla (2010) vyplývá, že některé jednotlivě podané aminokyseliny (alanin, arginin, fenylalanin, glutamin, glutamová kyselina, glycin, isoleucin, leucin, lysin a prolin) jsou považovány za inzulinová sekretagoga u zdravých jedinců. Ze zmíněných aminokyselin byla pozorována nejvyšší inzulinová sekrece po podání fenylalaninu a glycinu. Studie van Loona et al. (2000) ukazuje, že největšího inzulinogenního efektu lze dosáhnout po podání kombinace argininu, fenylalaninu a leucinu. Studie Calbeta and MacLeana (2002) ukazuje úzký vztah mezi plazmatickou koncentrací především argininu, fenylalaninu, isoleucinu, leucinu a valinu. Studie Nilssona et al. (2004) a Petersena et al. (2009) ukazuje především vliv směsí



Obr. 2: Rozdílné hladiny plazmatické koncentrace leucinu v čase po podání 30 g kaseinů a syrovátkových proteinů, signifikantní rozdíly na hladině významnosti 0,05 jsou označeny hvězdičkou (*), n = 16 zdravých dobrovolníků (upraveno z Boirie et al., 1997).

větvených esenciálních aminokyselin (isoleucinu, leucinu a valinu) a dále lysinu a threoninu na inzulínovou sekreci po podání syrovátkových proteinů.

Rychlost postprandiálního vzestupu a délka setrvání vysoké aminokyselinové koncentrace v plazmě se liší mezi kaseiny a syrovátkovými proteiny. Tento rozdíl je dán odlišným trávením a vstřebáváním obou hlavních mléčných proteinů. Kaseiny, čtyři heterogenní fosfoproteiny (α S1, α S2, β , κ) (Ausar et al., 2001), jsou organizovány do submicelární a následně micelární struktury označované jako kaseinová micela. Tato struktura se sráží a následně hydrolyzuje v žaludku, kde přetrvává delší dobu než syrovátkové proteiny. Vlastní vstřebávání aminokyselin, dipeptidů a tripeptidů po podání kaseinů tak probíhá až v tenkém střevě. Z tohoto důvodu dochází po podání kaseinů k pomalému vzestupu a delšímu zvýšení hladin aminokyselin v plazmě ve srovnání se syrovátkovými proteiny (Boirie et al., 1997; Hall et al., 2003). Globulární syrovátkové proteiny, majoritně zastoupené α -laktalbuminem a β -laktoglobulinem, jsou v žaludku štěpeny již přímo na kratší polypeptidy, oligopeptidy a aminokyseliny, které se už zde mohou dostat vstřebáváním do krevního oběhu. Snazší trávení syrovátkových proteinů vede i k jejich rychlejšímu vstřebávání. Jinými slovy syrovátkové proteiny jsou rychleji tráveny, vstřebávány a vedou k celkově vyšším hladinám plazmatické koncentrace aminokyselin s kratším časovým působením (obr. 2) ve srovnání s kaseiny (Boirie et al., 1997; Hall et al., 2003).

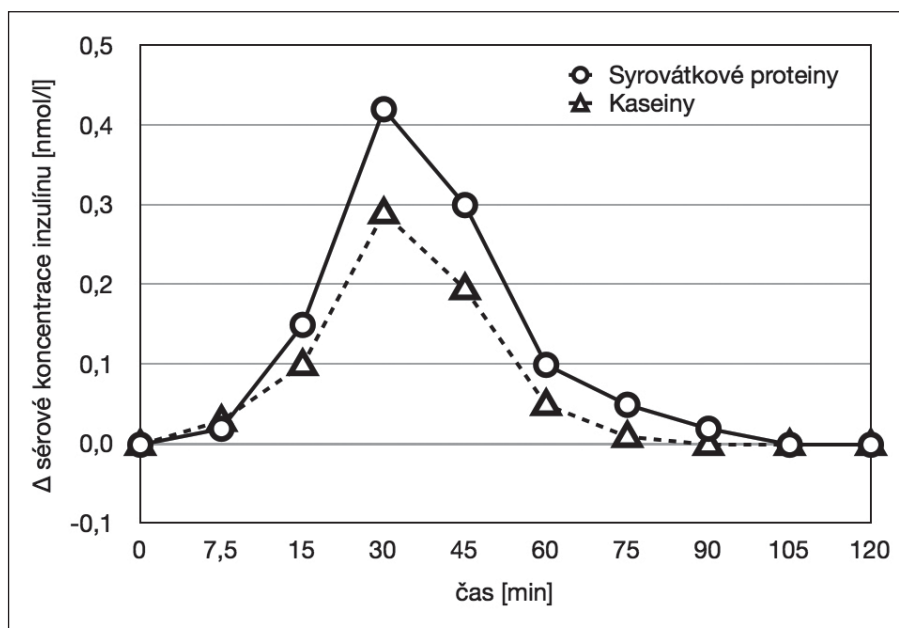
Kromě odlišné fyziologie trávení je udáván i odlišný průměrný obsah aminokyselin a jejich odlišné plazmatické hladiny mezi oběma hlavními mléčnými proteiny (tab. 1). Po podání syrovátkových proteinů byly dále zjištěny vysoké plazmatické hladiny esenciálních aminokyselin (přehled Ha a Zemel, 2003; Hall et al., 2003). Zdá se, že právě bohaté zastoupení větvených aminokyselin (isoleucinu, leucinu a valinu) je pravděpodobně spojeno s vyššími hladinami inkretinových hormonů a tedy i vyšší inzulínovou sekrecí (obr. 3) v porovnání s kaseiny (Nilsson et al., 2004).

MECHANIZMY INZULÍNOVÉ SEKRECE ZPROSTŘEDKOVANÉ LEUCINEM

Vyšší inzulínogenní efekt je připisován směsi aminokyselin než jednotlivým aminokyselinám (Floyd et al., 1966; Nilsson et al., 2004; přehled Gannon a Nuttall, 2010), ale jejich přesné mechanismy dosud nejsou zcela prostudované. Z tohoto hlediska se zaměříme na popis mechanismů po podání

Tab. 1: Průměrný obsah aminokyselin (AMK) ve 100g kaseinů a syrovátkových proteinů podaných ve studii Nilsson et al., 2004.

AMK	syrovátkové proteiny (mg)	kaseiny (mg)
Asp	1848	1249
Thr	1268	665
Ser	1005	1033
Glu	3024	3635
Pro	1148	1823
Gly	395	368
Ala	1053	368
Val	1725	1195
Ile	1016	798
Leu	1764	1652
Tyr	549	963
Phe	652	882
Lys	1596	1414
His	381	522
Arg	437	557



Obr. 3: Průměrné změny sérové hladiny inzulínu ve vztahu k lačné hladině po podání 18,2 g kaseinů a syrovátkových proteinů, n = 12 zdravých dobrovolníků, statisticky významné rozdíly nebyly zjištěny (upraveno z Nilsson et al., 2004).

pouze jedné esenciální aminokyseliny – leucinu, který je prokázáným silným inzulínovým sekretagogem (Floyd et al., 1966).

Leucinem zprostředkované mechanismy inzulínové sekrece jsou ojedinělé oproti ostatním aminokyselinám tím, že se uplatňují i při nízkých hladinách glykémie – stejně jako tomu pravděpodobně je i u bazální sekrece inzulínu (Fajan et al., 1963; Floyd et al., 1966; Gao et al., 2003). V zásadě se jedná o dvě kooperující cesty – přes alfa-ketoisokaproát (KIC) a přes aktivaci glutamátdehydrogenázy (GDH) (Gao et al., 2003).

Obě signální dráhy se podílí na oxidativním metabolismu v mitochondriích β -buňky za vzniku ATP, které uzavírají K^+_{ATP} kanály a vede ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ z extracelulárního prostoru (přehled Henquin et al., 1994). KIC dále zvyšuje koncentraci kyseliny arachidonové a aktivuje PKC-dependentní signální dráhu (MacDonald et al., 2008).

Leucin se spolu s ostatními větvenými esenciálními aminokyselinami dále účastní i biosyntézy inzulínových granúl (Hara et al., 1998). Leucin zvyšuje aktivitu translačních regulátorů v mitochondriích přes serin/threonin kinázu (mTOR)-dependentní a independentní signální dráhu za fyziologických koncentrací plazmatické glykémie (Xu et al., 2001).

ZÁVĚR

Hlavní mléčné proteiny – kaseiny a syrovátkové proteiny – stimulují inzulínovou sekreci, aniž by jejich podání vedlo k významnému vzestupu postprandiální glykémie. Syrovátkové proteiny zvyšují inzulínovou sekreci především snadnějším trávením a rychlým vstřebáváním z gastrointestinálního traktu (Boirie et al., 1997) v porovnání s kaseiny u zdravých jedinců. Z tohoto důvodu by mělo být cílem dalšího výzkumu sledovat vliv dlouhodobého podávání

syrovátkových proteinů na regulaci glykémie jak u zdravých, tak u nemocných jedinců.

LITERATURA

1. Ahrén B, Holst JJ. The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanisms and is important for postprandial glycemia. *Diabetes* 2001; 50(5): 1030-8.
2. Ausar SF, Landa CA, Bianco ID, Castagna LF, Beltramo DM. Hydrolysis of a chitosan-induced milk aggregate by pepsin, trypsin and pancreatic lipase. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65(11): 2412-8.
3. Bagdade JD, Bierman EL, Porte D Jr. Basal and stimulated insulin levels: comparison of insulinogenic effects of oral glucose and intravenous tolbutamide in nondiabetic and diabetic subjects. *Metabolism* 1971; 20(11): 1000-7.
4. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132(6): 2131-57.
5. Berthoud HR, Bereiter DA, Trimble ER, Siegel EG, Jeanrenaud B. Cephalic phase, reflex insulin secretion. Neuroanatomical and physiological characterization. *Diabetologia* 1981; 20: 393-401.
6. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(26): 14930-5.
7. Burcelin R, Cani PD, Knauf C. Glucagon-like peptide-1 and energy homeostasis. *J Nutr* 2007; 137 (11): 2534S-2538S.
8. Calbet JA, MacLean DA. Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. *J Nutr* 2002; 132(8): 2174-82.

9. Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 1968; 83(3): 572-84.
10. D'Alessio DA, Kieffer TJ, Taborsky GJ Jr, Havel PJ. Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-induced insulin secretion in rhesus macaques. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(3): 1253-9.
11. Drucker DJ. Diabetes. Glucagon-like peptides. 1998; 47(2): 159-69.
12. Ebert R, Creutzfeldt W. Gastrointestinal peptides and insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3(1): 1-26.
13. Faerch K, Vaag A, Holst JJ, Hansen T, Jørgensen T, Borch-Johnsen K. Natural history of insulin sensitivity and insulin secretion in the progression from normal glucose tolerance to impaired fasting glycemia and impaired glucose tolerance: the Inter99 study. *Diabetes Care* 2009; 32(3): 439-44.
14. Fajans SS, Knopf RF, Floyd JC, Power L, Conn JW. The experimental induction in man of sensitivity to leucin hypoglycemia. *J Clin Invest* 1963; 42(2): 216-29.
15. Floyd JC Jr, Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. Insulin secretion in response to protein ingestion. *J Clin Invest* 1966; 45(9): 1479-86.
16. Gannon MC, Nuttall FQ. Amino acid ingestion and glucose metabolism--a review. *IUBMB Life* 2010; 62(9): 660-8.
17. Gao Z, Young RA, Li G, Najafi H, Buettger C, Sukumvanich SS, Wong RK, Wolf BA, Matschinsky FM. Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2003; 144(5): 1949-57.
18. Gautam D, Han SJ, Hamdan FF, Jeon J, Li B, Li JH, Cui Y, Mears D, Lu H, Deng C, Heard T, Wess J. A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell Metab* 2006; 3(6): 449-61.
19. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* 2001; 22(5): 565-604.
20. Gregersen S, Ahrén B. Studies on the mechanisms by which gastrin releasing peptide potentiates glucose-induced insulin secretion from mouse islets. *Pancreas* 1996; 12(1): 48-57.
21. Gunnarsson PT, Winzell MS, Deacon CF, Larsen MO, Jelic K, Carr RD, Ahrén B. Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. *Endocrinology*. 2006; 147(7): 3173-80.
22. Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J Nutr Biochem* 2003; 14(5): 251-8.
23. Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr* 2003; 89(2): 239-48.
24. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozłowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* 1998; 273(23): 14484-94.
25. Henquin JC, Gembal M, Detimary P, Gao ZY, Warnotte C, Gilon. Multisite control of insulin release by glucose. *Diabetes Metab* 1994; 20(2): 132-7.
26. Herzberg-Schäfer SA, Staiger H, Heni M, Ketterer C, Guthoff M, Kantartzis K, Machicao F, Stefan N, Häring HU, Fritsche A. Evaluation of fasting state-/oral glucose tolerance test-derived measures of insulin release for the detection of genetically impaired β -cell function. *PLoS One* 2010; 5(12): e14194.
27. Jamen F, Puech R, Bockaert J, Brabet P, Bertrand G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors mediating insulin secretion in rodent pancreatic islets are coupled to adenylate cyclase but not to PLC. *Endocrinology* 2002; 143(4): 1253-9.
28. Kashima Y, Miki T, Shibasaki T, Ozaki N, Miyazaki M, Yano H, Seno S. Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem* 2001; 276(49): 46046-53.
29. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev* 2008; 60(4): 470-512.
30. Macdonald MJ, Hasan NM, Longacre MJ. Studies with leucine, beta-hydroxybutyrate and ATP citrate lyase-deficient beta cells support the acetoacetate pathway of insulin secretion. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780(7-8): 966-72.
31. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 1964; 2(7349): 20-1.
32. Meyer TE, Habener JF. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr Rev* 1993; 14(3): 269-90.
33. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 492-498.
34. Nilsson M, Stenberg M, Frid AH, Holst JJ, Björck IM. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(5): 1246-53.
35. Östman EM, Liljeberg Elmståhl HG, Björck IM. Inconsistency between glycemic and insulinemic responses to regular and fermented milk products. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(1): 96-100.
36. Pal S, Ellis V. The acute effects of four protein meals on insulin, glucose, appetite and energy intake in lean men. *Br J Nutr* 2010; 104(8): 1241-8.
37. Petersen BL, Ward LS, Bastian ED, Jenkins AL, Campbell J, Vukusan V. A whey protein supplement decreases post-prandial glycemia. *Nutr J* 2009; 8: 47.
38. Rabinowitz D, Merimee TJ, Maffezzoli R, Burgess JA. Patterns of hormonal release after glucose, protein, and glucose plus protein. *Lancet* 1966; 2(7461): 454-6.
39. Rehfeld JF, Stadil F. The effect of gastrin on basal- and glucose-stimulated insulin secretion in man. *J Clin Invest* 1973; 52(6): 1415-26.
40. Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, Nicolas-Métral V, Rüegg UT, Macé K. A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 2001; 142(10): 4522-8.
41. Roberge JN, Gronau KA, Brubaker PL. Gastrin-releasing peptide is a novel mediator of proximal nutrient-induced proglucagon-derived peptide secretion from the distal gut. *Endocrinology* 1996; 137(6): 2383-8.
42. Rocca AS, Brubaker PL. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 1999; 140(4): 1687-94.
43. Salehi A, Gunnerud U, Muhammed SJ, Ostman E, Holst JJ, Björck I, Rorsman P. The insulinogenic effect of whey protein is partially mediated by a direct effect of amino acids and GIP on β -cells. *Nutr Metab (Lond)* 2012; 9(1): 48.
44. Scheen AJ. Pathophysiology of insulin secretion. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2004; 65(1): 29-36.

45. Thomas FB, Mazzaferri EL, Crockett SE, Mekhjian HS, Grue-mer HD, Cataland S. Stimulation of secretion of gastric inhibitory polypeptide and insulin by intraduodenal amino acid perfusion. *Gastroenterology* 1976; 70(4): 523-7.
46. Trnka J, Anděl M. Přehled fyziologie sekrece inzulinu z β -bu-něk pankreatu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, vý-živa* 2001; 4(4): 257-264.
47. van Loon LJ, Saris WH, Verhagen H, Wagenmakers. Plasma in-sulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(1): 96-105.
48. Veldhorst MA, Nieuwenhuizen AG, Hochstenbach-Waelen A, van Vught AJ, Westerterp KR, Engelen MP, Brummer RJ, Deutz NE, Westerterp-Plantenga MS. Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy. *Physiol Behav* 2009; 96(4-5): 675-82.
49. Wang X, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism. *Endocrinology* 2001; 142(5): 1820-7.
50. Xu G, Kwon G, Cruz WS, Marshall CA, McDaniel ML. Meta-bolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2001; 50(2): 353-60.

MUDr. Elena Wildová
Centrum pro výzkum diabetu,
metabolismu a výživy 3. LF UK v Praze
2. interní klinika FNKV a 3. LF UK v Praze
Šrobárova 50
100 34 Praha 10
e-mail: elena.wildova@fnkv.cz

ZNALOSTI O VÝZNAMU GLP-1 ZMĚNILY MOŽNOSTI LÉČBY DIABETU, JEJICH VYUŽITÍ VŠAK MŮŽE BÝT MNOHEM ŠIRŠÍ

KNOWLEDGE ABOUT GLP-1 BASED THERAPIES CHANGED THE POSSIBILITIES OF DIABETES TREATMENT, BUT ITS USE COULD BE MUCH BROADER

MICHAL ANDĚL, ELENA WILDOVÁ, ADÉLA BOJAROVÁ, PAVEL DLOUHÝ, PAVEL KRAML

*Centrum výzkumu diabetu, metabolismu a výživy, 2. interní klinika FNKV
a 3. LF UK a Ústav výživy 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze*

SOUHRN

GLP-1, hormon ze skupiny inkretinů, je po potravním stimulu vyplavován z L-buněk, lokalizovaných především v distálních částech tenkého střeva a v colon ascendens. GLP-1 představuje silný podnět pro sekreci inzulínu z pankreatických β -buněk. Má velmi krátký poločas, protože je brzy po vyplavení ze střeva degradován pomocí enzymu dipeptidylpeptidázy 4 (DPP-4).

Inhibitory DPP-4 a analoga GLP-1 představují základní dvě skupiny léků využívajících inkretinový princip. Na trh byly uvedeny v posledních 3–4 letech. Významné jsou však účinky na GLP-1 na kardiovaskulární systém: mají pozitivně inotropní efekt a přispívají k ochraně endotelu. U hlodavců byla po GLP-1 popsána větší regenerace Langerhansových ostrůvků. V centrálním nervovém systému vede GLP-1 v experimentu zvířat k zlepšení učení a k zlepšení stavu i histologického nálezu u experimentálních zvířat s modely Alzheimerovy choroby či Huntingtonovy chorey. Tyto nálezy dávají naději i na užití inkretinové léčby mimo oblast diabetologie.

Klíčová slova: inkretinová terapie diabetes mellitus 2. typu, GLP-1, kardiovaskulární účinky, účinky na centrální nervový systém

SUMMARY

GLP-1, the incretin family hormone is produced after a meal stimulus by L-cells which are localized predominantly in distal ileum and ascendent colon. GLP-1 is a strong agent stimulating insulin secretion from the pancreatic β cells. Its plasma halftime is very short due to its early degradation by dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4). DPP-4 inhibitors and GLP-1 analogues represent two groups of incretin based antidiabetic drugs which appeared on the pharmaceutical market some 3–4 years ago. Item of importance is the GLP-1 impact on cardiovascular system: positive cardiac inotropic effect and protective effect on arterial endothelium. In rodents, increased islet cell regeneration has been observed after GLP-1 administration. Experiments in animal model further documented a GLP-1 effect on the central nervous system: increased learning ability or improved clinical status as well as histological findings in Alzheimer's disease or Huntington's chorea. These observations give hope for the use of incretin based therapy not only in diabetes.

Key words: incretin based therapy of type 2 diabetes mellitus, GLP-1, cardiovascular effect, central nervous system effect

ÚVOD: OD GLUKAGONU KE GLP-1

Paul Langerhans popsal ve své doktorské práci výskyt do té doby neznámých ostrůvků v pankreatu v roce 1869 (Langerhans, 1869). Po téměř 40 letech našel Lane uvnitř ostrůvků 2 typy buněk, které bychom nyní popsali jako α a β (Lane, 1907). Záhy po fenomenálním objevu inzulínu byl již v roce 1923 objeven glukagon (Murlin a Kimbal, 1923). Konečně,

po druhé světové válce byl popsán enteroglukagon (Sutherland a De Duve, 1948). V roce 1959, krátce po objevu principu radioimunoeseje (RIA) pro inzulín a první RIA vůbec, publikoval Roger Unger úspěšné provedení RIA pro glukagon.

Je zcela pochopitelné, že inzulínu jako hormonu, jehož nedostatek je spojen s diabetem 1. typu a nesubstituován vede ke smrti, byla vždy věnována nesrovnatelně větší pozornost než dalším hormonům Langerhansových ostrůvků.

To má řadu praktických, teoretických i lidských důvodů. Inzulín doslova zachraňuje životy. Je aplikován jen v naší zemi u více než statisíce lidí. Inzulín stojí v plejádě anabolických hormonů téměř osamocen a mezi ostatními anabolickými hormony a signály zcela jistě na špičce hory. Oproti tomu glukagon je jen jedním z mnoha katabolicky působících hormonů, byť v oblasti metabolismu má téměř výsadní postavení. V terapii se dlouho užívá injekční glukagon jako první pomoc u hypoglykémie tehdy, kdy již není možné podat perorálně sacharidy či intravenózně glukózu.

Zatímco deficit inzulínu jasně vede k diabetu, deficit glukagonu, byť existuje například ruku v ruce s deficitem inzulínu u pankreatických diabetů, není v klinické praxi významný. U dospělých nejsou izolované deficity glukagonu popisovány a konečně izolovaný deficit α -buněk Langerhansových ostrůvků je záležitostí extrémně vzácných, ale fatálních novorozeneckých hypoglykemií. Konečně inzulinom, nádor vycházející z β -buněk ostrůvků, není úplnou vzácností, oproti tomu glukagonom je raritou. O podceňování glukagonu nejlépe svědčí citát ze známé Weissbeckerovy německé učebnice fyziologie vydané na počátku sedmdesátých let (Weissbecker, 1973):

„V Langerhansových ostrůvcích se tvoří dva hormony: v β -buňkách životně důležitý hypoglykemizující inzulín a v α -buňkách biologicky a životně bezvýznamný hyperglykemizující glukagon.“

O glukagonu bylo již v sedmdesátých letech dobře známo, že kromě výše uvedených účinků na energetický metabolismus také tlumí motilitu žaludku, snižuje pocit hladu a v myokardu působí pozitivně inotropně. Již tehdy byly také dlouhou dobu známy nálezy o střevním glukagonu – enteroglukagonu a o glucagon-like peptidu-1. Před třiceti lety však byly většinou tyto střevní hormony považovány za méně důležité a o jejich klíčové roli pro sekreci inzulínu se nevědělo.

Jeden z nestorů evropského výzkumu glukagonu, Belgičan Pierre Lefévre v roce 1983 uvedl mezi důvody, které vedou k podceňování glukagonu: *„Na rozdíl od inzulínu, jehož struktura, vlastnosti a byly perfektně rozpracovány v pionýrských pracích Sander a jejich spolupracovníků, „prestíž“ glukagonu je zatížena jeho příbuzenstvím s tzv. glukagonu-podobnými imunoreaktivními látkami (glucagon-like immunoreactive substances), čímž se rozumí skupina nedokonale definovaných imunologicky podobně se chovajících polypeptidů, které jsou přítomny ve střevě, pankreatu a některých dalších orgánech.“* Proto také dle Lefévrea je glukagon tím chudým příbuzným, parent pauvre.

Tak jeden z evropských nestorů výzkumu glukagonu nedocenil význam faktoru, který se nyní terapeuticky uplatňuje při ovlivnění sekrece inzulínu, totiž střevního GLP-1. To však je již další historie, která žije svým vlastním životem.

Glukagon (přehled Anděl a Klimeš, 1986) je proteohormon produkovaný v α -buňkách Langerhansových ostrůvků, který se skládá z 29 aminokyselin, jeho struktura je shodná u lidského, hovězího, vepřového, velbloudího, králíčího a krysího hormonu. Struktura glukagonu je podobná struktuře vasoaktivního intestinálního polypeptidu (VIP) a GIP. C-terminální část molekuly glukagonu je primárně zodpovědná za vazbu na receptor, N-terminální část molekuly a snad i její centrální část zodpovídá za vazbu na receptor a za aktivaci adenylové cyklázy.

Mezi hlavní metabolické účinky glukagonu patří vzestup plazmatických hladin volných mastných kyselin, vzestup gly-

kémie a pokles plazmatických triacylglycerolů. V myokardu má glukagon pozitivní inotropní efekt. V gastrointestinálním traktu tlumí motilitu žaludku a žlučníku. Snižuje pocit hladu. Z terapeutických nadějí, které se týkaly použití glukagonu v klinické medicíně, zůstal glukagon jako důležitý terapeutický prostředek u diabetiků s poinzulinovou hypoglykemií, pokud není možná perorální dodávka sacharózy nebo intravenózní podání glukózy. 1 mg subkutánního glukagonu při hypoglykémii tak představuje jeho současnou klinickou indikaci. Ostatní indikace, u kterých užití glukagonu představovalo extenzi jeho fyziologických vlastností, se neujaly. O jeho podání se uvažovalo při srdečním selhání, u obezity s cílem snížení chuti k jídlu či u akutní pankreatitidy (přehled Anděl, Klimeš et al., 1986).

INKRETINOVÝ PRINCIP

Tento jev spočívá na překvapivém zjištění, že vzestup plazmatické hladiny inzulínu je vyšší po perorálním, než po intravenózním podání glukózy. Schopnost vyplavit inzulín více po perorálním potravním podnětu než po podnětu intravenózním je právě přičítána gastrointestinálním hormonům, v současnosti především tzv. inkretinům. Právě stimulace sekrece inzulínu cestou inkretinů, především pak GLP-1 je zodpovědná za první fázi stimulované postprandiální sekrece inzulínu. Dochází k ní podstatně dříve, než k ostrůvkům mohou přispět vstřebané živiny, dle současných poznatků zodpovědné za druhou fázi stimulované inzulínové sekrece (Nauck et al., 1986).

Účinek inkretinů trvá patrně tak dlouho, jak dlouho je střevo exponováno vstřebaným živinám, tedy zhruba dvě až tři hodiny. Inkretinový účinek má tak zásadní roli v inzulínové odpovědi na potravní podnět. Ačkoliv je tento poznatek známý téměř čtvrt století, teprve před deseti lety se dostal k praktickému užití jednak v terapii, jednak při konceptuálním uvažování o patogenezi diabetu 2. typu.

PRODUKTY PROGLUKAGONOVÉHO GENU

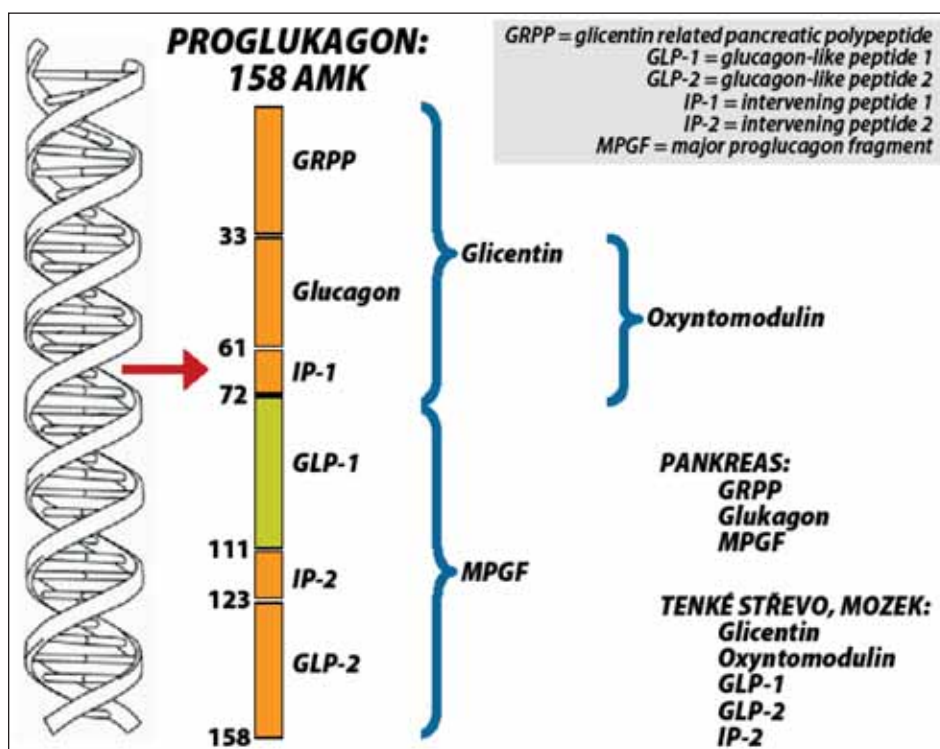
Základní genový produkt společný glukagonu, GLP-1, GLP-2 a dalším proteinům exprimovaným v α -buňkách Langerhansových ostrůvků, střevu či mozku je **proglukagon** (obr. 1). Jeho enzymatickým štěpením prohormonální konvertázou vznikají výše uvedené produkty. GLP-1, tedy glukagon-like peptid-1 má více než padesátiprocentní shodu v aminokyselinové sekvenci s glukagonem.

Vlastní GLP-1 je ve střevě produkován v L-buňkách. Ty jsou lokalizovány od duodena až po kolon, maximum jejich gastrointestinální distribuce je však v terminálním ileu a orálních částech tlustého střeva.

V krevním oběhu cirkuluje GLP-1 ve dvou zkrácených biologicky účinných formách. Většinou, z 80 % se jedná o tzv. 7–36 amidovaný produkt, zhruba 20 % tvoří 7–37 glycinový produkt. Již tyto formy GLP-1 jsou tvořeny v L-buňkách střeva štěpením prohormonální invertázou.

KINETIKA GLP-1

Hladiny GLP-1 nalačno se u zdravých zpravidla pohybují v rozmezí mezi 5–10 pmol/l, postprandiálně pak stoupají na zhruba trojnásobek těchto hodnot (Holst, 2007). Zdá se, že sekrece GLP-1 je však mnohem vyšší, větší část je již zkonsumována ve střevní mikrocirkulaci.



Obr. 1: Produkty proglukagonového genu

Plazmatický poločas GLP-1 je kratičký – zpravidla se udává, že 1–2 minuty (Visbol et al., 2003). K jeho degradaci dochází štěpením dipeptidylpeptidázou-4 (DPP-4), na fragment GLP-1 9–36, který již není inzulínovým sekretagogem. Kromě štěpení GLP-1 pomocí DPP-4 jsou popisovány i další, zřejmě méně významné cesty jeho degradace, jako například štěpení neutrální endopeptidázou. Terminální procesování GLP-1 a následné vyloučení pak probíhá v ledvinách.

DIETNÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ SEKRECI GLP-1

Mezi živiny, nejvíce fyziologicky potencující sekreci GLP-1, patří sacharidy. Méně již podporují sekreci základní složky rostlinných a živočišných tuků. Bylo prokázáno, že oleje s monoenoovými mastnými kyselinami zvyšují sérové hladiny GLP-1 více než satureované mastné kyseliny či triacylglyceroly (Thomsen et al., 1999; Beysen et al., 2002). Jinými slovy – olivový olej zvyšuje hladiny GLP-1 více než máslo. V experimentu bylo prokázáno, že žlučové kyseliny zvyšují sekreci GLP-1 cestou receptoru TGR5 (spojeného s G proteinem) u myších enterokrinních buněčných linií STV-1. Potravní stimulace zvyšuje krevní hladinu GLP-1 bifazicky: k první fázi vzestupu dochází 5–15 minut po požití potravy, druhá má vrchol pozdější, za 30–60 minut po jídle (přehled Holst, 2007).

Protein je obvykle považován za nejméně účinný v sekreci inkretinů ze všech základních živin. Při studiu glykemického a inzulinemického indexu bylo u mléka a některých mléčných výrobků nalezeno, že dochází k neproporčně vyššímu vzestupu inzulinémie, než by odpovídalo obsahu sacharidů (Östman et al., 2001). Byl vysloven předpoklad, že výrobky obsahující syrovátku vedou k většímu vzestupu inzulinu, než by odpovídalo jejich obsahu sacharidů. Při podrobnější analýze vlivu mléčných výrobků obsahujících syrovátku bylo zjištěno, že obsah syrovátky je faktorem, který zvyšuje jak sekreci inzulinu pomocí GLP-1, tak pomocí stimulujících především větvených esenciálních aminokyselin – leucinu,

isoleucinu a valinu (Fajans et al., 1967; Loon et al., 2000; Nilsson et al., 2004). U diabetiků přidání syrovátkových proteinů k sacharidům stimulovalo taktéž inzulínovou sekreci a snížilo postprandiální glykémii (Frid et al., 2005). Při tom bylo nalezeno, že právě po syrovátkových proteinech dochází ze všech testovaných proteinů k nejvyššímu vzestupům sekreci inzulinu stimulujících aminokyselin, tedy leucinu, isoleucinu, valinu, lysinu a threoninu (Fajans et al., 1967; van Loon et al., 2000).

ÚČINKY GLP-1 NA REGENERACI β -BUNĚK LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ

GLP-1 má, přinejmenším v experimentu, protiapoptotický účinek v β -buněkách Langerhansových ostrůvků pankreatu, který je indukovaný zvýšenými hladinami glukózy či volných mastných kyselin a jejich kombinačním působením (Buteau et al., 2004). Přidání GLP-1 do média snížilo buněčnou smrt β -buněk o 20 % (Buteau et al., 2004).

ÚČINKY NA MYOKARD A NA KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM

V kardiomyocytech byly nalezeny receptory pro GLP-1 (Bullock et al., 1996). V experimentu u myší s knockoutovaným receptorem pro GLP-1 byla nalezena jak horší kontraktilita levé komory srdeční, tak také diastolická dysfunkce (Gross et al., 2003). GLP-1 má stejně jako glukagon pozitivní inotropní účinky. To bylo prokázáno u psů s experimentální chronickou kardiální nedostatečností (Nikolaidis et al., 2004) i u pacientů s akutním infarktem myokardu a poruchou systolické funkce léčených angioplastikou, u kterých došlo po GLP-1 k vzestupu ejekční frakce o 10 % (Nikolaidis et al., 2004). Objevily se i návrhy používat glucagon-like peptide-1 u pacientů s levostranným srdečním selháním. Je zajímavé, že podobné návrhy padaly i u glukagonu před více než 30 roky (přehled Anděl a Klimeš et al., 1986).

U pacientů s diabetem 2. typu a ischemickou chorobou srdeční zlepšil GLP-1 parametry endoteliální dysfunkce (Nystrom et al., 2004).

Přestože GLP-1 má na myokard obecně pozitivní účinky, nepředpokládáme v současné době jeho použití z hlediska výhradně kardiologické indikace. Kardiologické studie experimentální i klinické však představují důležitý podpůrný moment při rozhodování o terapii založené na účinku inkretinů.

ÚČINKY GLP-1 NA VYPRAZDŇOVÁNÍ ŽALUDKU A NA ENERGETICKÝ PŘÍJEM

GLP-1 snižuje motilitu žaludku a jeho vyprazdňování. Snižuje také kyselou žaludeční sekreci (Baggio a Drucker, 2007). Tento účinek byl po aplikaci GLP-1 nalezen jak u štíhlých, tak u obézních osob (Verdich et al., 2001). Při i.v. podání GLP-1 v dávkách 0,4, 0,8 a 1,2 pmol/kg/min podaných 30 minut před jídlem s pokračováním po dobu 240 min byla nalezena inhibice žaludečního vyprazdňování, která korespondovala s podanou dávkou hormonu (Nauck et al., 1997). Celková data získaná v devíti studiích v celkem 147 pozorováních prokázala, že infuze GLP-1 vedla k redukci ad libitum energetického příjmu v průměru o 11,7 % (Verdich et al., 2001). GLP-1 vede také k redukci pocitu sytosti, což lze částečně vysvětlit účinkem na motilitu žaludku, částečně i účinky dalšími (Verdich et al., 2001).

Objevily se rovněž zprávy o zrychlené adaptaci zbytku tenkého střeva po rozsáhlé resekcii po podání GLP-1.

ÚČINKY GLP-1 NA CENTRÁLNÍ NERVOVÝ SYSTÉM

GLP-1 zvyšuje pocit sytosti, snižuje chuť k jídlu, snižuje příjem potravy, a tedy i příjem energetických substrátů, a u zvířecích modelů vede k neuroprotekcí a zlepšení učení a paměti (Turton, Bloom et al., 1996; Baggio a Drucker, 2007). GLP-1 je syntetizován i mozgovém kmeni a transportován podél axonů do různých oblastí mozku, včetně hypothalamu. Periferní podání GLP-1 významně snižuje glukózový metabolismus v hypothalamu a mozgovém kmeni u lidí (Alvarez et al., 2005). Infuze agonisty GLP-1 receptoru exendinu (5–39) vedla u krys ke snížení neurotoxicity navozené infúzí β -amyloidu (Oka et al., 2000). Infuze exendinu u krys s mutací genu pro Huntingtonovu chorobu také snížila množství Huntingtonových agregátů v mozku a pankreatu. Dle autorů je však otázkou, zda šlo o přímé efekty přes receptor pro GLP-1, nebo nepřímé účinky cestou metabolického ovlivnění (Martin et al., 2009). Exendin 4 v experimentu u dospělých hlodavců dále stimuloval neurogenezi v subventrikulární zóně a indukoval zlepšení nálezu u experimentální Parkinsonovy choroby (Bertilson et al., 2008). Z hlediska předpokládané aktivity GLP-1 je zajímavé, že GLP-1 je promotorem nervového růstového faktoru u buněčné linie odvozené od feochromocytomu u P 12 buněk (Perry et al., 2002). Nejen to: GLP-1 snížil endogenní hladiny beta-amyloidového peptidu (Abeta) a chránil hippokampální neurony před smrtí způsobenou Abetou a železem (Perry et al., 2003). Neuroprotektivní účinek GLP-1 je snad zprostředkován cestou antiapoptotických signálů ve specifických neuronech (Perry et al., 2002).

Receptor pro GLP-1 byl nalezen jako důležitý v mechanismech učení i v neuroprotekcí (During et al., 2003). Signalizace receptoru GLP-1 v CNS zvyšuje sekreci inzulínu v β -buňkách ostrůvků, zvyšuje svalovou periferní rezistenci

a usnadňuje tak ukládání glukózy do jaterního glykogenu (Knauf et al., 2005).

PRINCIPY TERAPIE DIABETU ZALOŽENÉ NA INKRETINECH

Terapií diabetu založené na inkretinovém principu se budeme zabývat jen velmi stručně – není základním cílem tohoto sdělení a ostatně bylo o ní toho v posledních dvou letech napsáno i v české literatuře hodně, včetně přehledu monografického (Haluzík a Svačina, 2010).

Historicky se první pokusy ovlivnit diabetes extrakty z gastrointestinálního traktu datují do počátku dvacátého století. V roce 1906 byla publikována práce popisující snahu léčit diabetes extrakty z duodenální sliznice (More, Edie a Abram, 1906). O dvacet let později prováděl La Barre s kolegy experimenty, během kterých podávali intravenózně sekretin psům. Při tom došlo k hypoglykémii. Bylo uzavřeno, že sekretin má dva aktivní principy: **inkretin**, ovlivňující vnitřní sekreci pankreatu, a **excretin**, ovlivňující zevní sekreci (Zunz a Le Barre, 1929; La Barre a Strill, 1930). Teprve však znalost o přesných mechanismech sekrece, kinetiky a účinku GLP-1 včetně znalosti jeho odbourávání vedly k experimentálnímu a posléze klinickému užití inkretinové terapie. Tento princip, vypracovaný v osmdesátých letech minulého století, zkoušený v letech devadesátých se stal na počátku jedenadvacátého století nejvýznamnější inovací v léčbě diabetu.

První podrobný článek pojednávající o antidiabetickém účinku GLP-1 je téměř dvacet let starý (Gutniak et al., 1992). Přitom se brzy ukázalo, že výhody GLP-1 u diabetiků jsou spojeny nejen se stimulací sekrece inzulínu, ale také s inhibicí sekrece glukagonu, s tlumením motility žaludku a jeho pomalejšího vyprazdňování, s tlumením pocitu hladu a potenciálně i s regenerací β -buněk ostrůvků (Ahren, 1998; Kiefeler a Hasener, 1999).

V zásadě máme dvě základní farmakologické možnosti, jak s využitím znalostí inkretinového mechanismu zvýšit sekreci inzulínu. První je spojena s podáním agonistů receptorů GLP-1, druhá je spojena s bloádou rozkladu GLP-1 dipeptidylpeptidázou 4. Výhodou prvního přístupu je simulace fyziologického principu, nevýhodou je injekční podání peptidu. Výhodou druhého přístupu je především možnost perorální formy podání, nevýhodou všeobecná inhibice DPP-4, která má mnohem větší spektrum účinku než jen účinek na GLP-1.

Agonisté receptorů GLP-1

Mezi tyto již na trhu dostupné látky patří exenatid a liraglutid, injekčně dvakrát nebo jednou denně podávané peptidy. Mezi jejich základní výhody patří kromě poklesu HbA1c také omezení chuti k jídlu a pokles tělesné hmotnosti, tedy základních mechanismů podílejících se na metabolických problémech u diabetu 2. typu.

Inhibitory dipeptidylpeptidázy 4

Tyto látky inhibují enzym DPP-4, který kromě účinků na GLP-1 rozkládá respektive inaktivuje ještě řadu dalších enzymů, včetně některých spojených s imunitní funkcí.

Mezi látky, které jsou v současnosti dostupné na trhu, patří původní sitagliptin, a dále vildagliptin a konečně recentně se objevující saxagliptin.

Léčba diabetu založená na ovlivnění inkretinového principu představuje relativně nový do léčby založený princip. Dosavadní zkušenosti jsou zpravidla velmi pozitivní, účinek i bezpečnost inkretinových léků však musí být prokázány na

velkých skupinách a jejich dlouhodobých sledováních (Nauck, 2008). Pozitivní účinky inkretinových léků na kardiovaskulární systém, pocit hladu a v experimentu i na funkce CNS dávají tušit ať již možnosti pro jejich mnohem širší využití i mimo diabetologii, či alespoň podpůrné argumenty pro jejich užití u nemocných s diabetem 2. typu. Významný je efekt agonistů receptorů GLP-1 na pokles hmotnosti u obézních diabetiků. Pokles hmotnosti byl však také pozorován u nediabetiků po liraglutidu. O perspektivách tohoto principu léčení nejen u obézních diabetiků, ale i u obézních bez diabetu se v současné době diskutuje (Svačina, 2010).

RIZIKA A OMEZENÍ INKRETINOVÉ LÉČBY

Terapie zapořená na inkretinovém principu je všeobecně velmi dobře tolerovaná. Krátká praktická zkušenost s těmito léky zatím vede k převaze pozitivních, často až nadšených ocenění. Přesto je nutné zmínit některé, byť spíše okrajové kritické hlasy. Jejich přehled podali Butler et al. (2010). V experimentu vede podávání jak exenatidu, tak sitagliptinu k chronické pankreatitidě a k proliferaci duktálních pankreatických buněk. Ojedinele byly popsány případy akutní pankreatitidy i u lidí léčených exenatidem, liraglutidem či sitagliptinem. Podle Buttlera by pak výskyt chronické pankreatitidy po těchto léčících mohl představovat i zvýšené riziko karcinomu pankreatu (Buttler et al., 2010). Podrobnější přehled této problematiky padává Haluzík (2010). Uzavírá však, že dle současných poznatků je léčba založená na inkretinovém principu jak účinnou, tak bezpečnou.

Exenatid nesmí být podáván po jídle. S ohledem na snížení motility GIT může být snížena i resorpce jiných léků z gastrointestinálního traktu. To může vadit zejména tam, kde je požadavek na rychlou resorpci. Exenatid se, stejně jako liraglutid, neužívá pro léčbu diabetiků 1. typu. Při kombinaci s metforminem nevzniká riziko hypoglykémie, naopak při eventuální kombinaci s deriváty sulfonylurey je nutné nemocného o možné hypoglykémii a jejich příznacích zpravit.

Literatura o vedlejších účincích a potenciálních rizicích *liraglutidu* odpovídá pozdějšímu uvedení tohoto agonisty glukagon-like-peptidu 1 na trh. Její zkrácený přehled podali Parks a Rosenbraugh (2010) v *New England Journal of Medicine*. Z dat získaných u hlodavců vyplývá, že u nich došlo po liraglutidu k zvýšenému riziku fokální neoplázie C-buněk štítné žlázy a k nádorům C-buněk. Hyperplázie C-buněk se považuje za prekancerózu vedoucí k medulárnímu karcinomu štítné žlázy. Tato data lze však jen složitě převést z experimentu na hlodavcích do lidské patologie. Pokud byly sledovány hladiny kalcitoninu u osob léčených liraglutidem oproti kontrolním nemocným, byla u osob léčených liraglutidem nalezena o mírně častěji vyšší hladina kalcitoninu, ale jeho hodnoty byly zcela v normálním rozmezí. FDA uzavřela, že karcinom z C-buněk štítné žlázy u hlodavců představuje pro lidi jen malé riziko, protože u hlodavců byly použity mnohem větší dávky agonistů receptoru GLP-1, než se předpokládají u lidí (Parks a Rosenbraugh, 2010). Stejně jako po sitagliptinu a exenatidu byly popsány případy pankreatitidy u pacientů léčených liraglutidem (7 případů z 4257 pacientů na liraglutidu proti 1 případu nemocných z kontrolní skupiny). I v této oblasti je třeba dalšího sledování. U liraglutidu nebyly prokázány žádné vedlejší kardiovaskulární účinky.

Ve firemní dokumentaci *sitagliptinu* je uvedeno, že po dávkách více než 67násobných oproti dávkám u člověka byl u hlodavců nalezen abnormální vývoj řezáků. V expe-

rimitech u hlodavců po více než padesátinásobné dávce sitagliptinu byla nalezena hepatotoxicita a renální toxicita. U psů, při dávkách větších 23× než při podání u lidí byl nalezen třes, ataxie, dýchání s otevřenými ústy a zvýšené slinění. U dávek 23× vyšších, než jsou dávky u člověka používané, došlo u experimentálních zvířat k mírné degeneraci kosterního svalu. Tyto účinky nebyly nalezeny, pokud se podávala 6× větší dávka sitagliptinu, než se používá v klinické praxi. Při expozici potkanů dávce sitagliptinu 58× vyšší, než je běžná terapeutická dávka u člověka, došlo k výskytu jaterních adenomů a karcinomů. Podle firemní dokumentace, odkud byly tyto údaje převzaty, vzhledem k velkému prostoru z hlediska bezpečnosti nejsou tyto neoplastické změny považovány za významné pro člověka.

Po *saxagliptinu* byly v experimentu u opic pozorovány vředové a nekrotické kožní léze na končetinách. Přestože takové léze nebyly pozorovány při klinických zkouškách, upozorňuje výrobce, že nejsou zkušenosti s diabetiky, kteří mají kožní změny. Výrobce saxagliptinu také upozorňuje na fakt, že s lékem nejsou zkušenosti u imunokompromitovaných nemocných, například po transplantaci orgánů.

Mezi nejčastější vedlejší účinky analog receptorů pro GLP-1 patří nauzea, nadýmání, říhání, vzácně atypické chutě, dále pak malátnost, ospalost a bolesti hlavy. Úbytek váhy je u analog receptorů GLP-1 vítaným účinkem.

Po sitagliptinu jsou také popisovány vzácně ospalost, či bolesti v epigastriu, častěji pak nauzea. Potřeba ukončit léčbu nemocných sitagliptinem pro vedlejší účinky byla jen v 0,8 % všech případů.

Po saxagliptinu byly popsány častější nauzea a zvracení.

S ohledem na inhibici DPP-4 je po terapii gliptiny popisován častější výskyt nezávažných infekcí horních cest dýchacích. Dlouhodobé sledování však zatím v této oblasti pochopitelně provedeno nebylo. Podobně je u saxagliptinu popisován kromě infekcí horních cest dýchacích také zvýšený výskyt infekcí močových, gastritis a sinusitis. Častější jsou i bolesti hlavy.

Hodnotíme-li vedlejší účinky inkretinové terapie, nemůžeme tak činit bez kontextu komplikací diabetu a vedlejších účinků ostatních typů antidiabetické léčby. Podle Parksové a Rosenbraugh (2010) *FDA uznává, že všechny produkty schválené pro léčbu diabetu 2. typu, včetně těch, které jsou dlouhou dobu na trhu, přinášejí rizika*. Proto, abychom byli schopni tato rizika podrobněji hodnotit, je nutné podrobné sledování v období po schválení příslušnými orgány.

KONTRAINDIKACE POUŽITÍ INKRETINOVÝCH TERAPEUTIK

Těhotenství a kojení

Pro inhibitory DPP-4 ani pro analogy receptorů GLP-1 není dostatek dat o bezpečnosti při podávání v těhotenství. Proto se nesmí tyto preparáty během těhotenství užívat. Protože zatím nejsou k dispozici žádná data o inkretinové terapii u kojících matek, je léčba jak inhibitory DPP-4, tak analogy receptorů GLP-1 kontraindikována nejen v těhotenství, ale také u kojících matek. U fertálních žen je před plánovaným otěhotněním potřeba přípravy založené na účinku inkretinů vysadit a nahradit v těhotenství povolenou antidiabetickou léčbou.

Renální postižení a insuficience

Sitagliptin se nedoporučuje podávat u pacientů se středně těžkou a těžkou renální insuficiencí, včetně pacientů v konečných stádiích selhání ledvin. Toto doporučení bylo stanoveno proto, že s podáváním sitagliptinu v těchto situ-

acích není dost zkušeností. Podobné varování je ve firemní dokumentaci saxagliptinu. Pro exenatid výrobce přímo uvádí clearance kreatininu menší než 30 ml/s jako kontraindikaci.

Postižení jater

U pacientů s mírnou až střední jaterní insuficiencí není nutné omezit dávkování sitagliptinu. Sitagliptin se nedoporučuje podávat tehdy, je-li Child-Pugh skóre vyšší než 9, tedy u nemocných s těžkou jaterní insuficiencí, zejména proto, že o jeho podávání u těchto nemocných nejsou k dispozici žádná relevantní data.

Hypersenzitivita

Inhibitory DPP-4 by neměly být podávány u osob, které měly projevy hypersenzitivity na inhibitory DPP-4.

Poděkování: Práce byla podporována výzkumným záměrem MSM 00216220814 „Prevence, diagnostika a terapie diabetes mellitus, metabolických a endokrinních postižení organismu“. Za grafické práce děkují autoři paní Janě Potočkové.

LITERATURA

- Ahrén B. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. Review. *Bioassays* 20, 1998, 642-651.
- Alvarez E, Martínez MD, Roncero I, Chowen JA, García-Cuartero B, Gispert JD, Sanz C, Vázquez P, Maldonado A, de Cáceres J, Desco M, Pozo MA, Blázquez E. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem.* 92, 2005, 798-806.
- Anděl M, Klimeš I et al. Glukagon: fyziologie, patofyziologie a klinika, Avicenum, 1986, 262 s.
- Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132, 2007, 2131-2157.
- Bertilsson G, Patrone C, Zachrisson O, Andersson A, Danneus K, Heidrich J, Kortessmaa J, Mercer A, Nielsen E, Rönnholm H, Wikström L. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 86, 2008, 326-38.
- Beysen C, Karpe F, Fielding A, Clark A, Levy JC, Frayn KN. Interaction between specific fatty acids, GLP-1 and insulin secretion in humans. *Diabetologia.* 45, 2002, 1533-41.
- Bullock BP, Heller RS, Habener JF. Tissue distribution of messenger Ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 137, 1996, 2968-2978.
- Buteau J, El-Assad W, Rhodes CJ et al. Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity. *Diabetologia,* 47, 2004, 806 - 815
- Buttler PC, Dry S, Elshoff RR. GLP-1 based therapy for diabetes: what you do not know can hurt you. *Diabetes care* 33, 2010, 453-455.
- Buttler PC, Matveyenko AV, Dry S, Bhushan A, Elshoff RR. Glucagon-like peptide-1 therapy and exocrine pancreas: innocent bystander or friendly fire. *Diabetologia,* 53, 2010, 1-6.
- During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat. Med.* 2003 1173-1179.

- Fajans SS, Floyd JC Jr, Knopf F, Conn FW. Effect of amino acids and proteins on insulin secretion in man. *Recent Prog Horm Res.* 1967, 23, s. 617-62.
- Frid AH, Nilsson M, Holst JJ, Björck IM. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* 82, 2005, 69-75.
- Gross R, You X, Baggio LL et al. Cardiac function in mice lacking the glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology,* 144, 2003, 2242-2252.
- Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahrén B, Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N.Engl.J. Med.,* 326, 1992, 1316-1322.
- Haluzík M, Svačina Š. Inkretinová léčba diabetu Mladá fronta, Praha 2010, 135 s.
- Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.* 87, 2007, 1409-1439.
- Holst JJ. Pharmacology of GLP-1 based therapies. *Brit. J. Diab. Vasc. Dis.* 8, 2008, S13-18.
- Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev.:* 6, 1999, 876-913.
- Kimball CP, Murlin JR. Aqueous extracts of pancreas. III. Some precipitation reactions of insulin. *J. Biol. Chem.,* 58, 1923, 337-346.
- Langerhans P. Contribution to the microscopic anatomy of pancreas (Doctorarbeit), Berlin 1869, translated by H. Morrison, Baltimore, Johns Hopkins Hosp Press, 1937.
- La Barre J, Stil EU. Studies on physiology of secretin III. Further studies on the effects of secretin on blood sugar. *Am.J.Physiol.* 91, 1930, 649-653.
- Lane MA. The cytological characters of the areas of Langerhans islets. *Amer. J. Anat.* 7, 1907, 409-422.
- Lefebvre PJ. ústní sdělení, 1983.
- Liljeberg Elmstahl H, Björck I. Milk as a supplement to mixed meals may elevate postprandial insulinaemia. *Eur. J. Clin. Nutr.,* 55, 2001, 994-999.
- Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun..* 329, 2005, 386-390.
- Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Grémeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C, Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J. Clin. Invest.* 115, 2005, 3554-3563.
- Martin B, Golden E, Carlson OD, Pistell P, Zhou J, Kim W, Frank BP, Thomas S, Chadwick WA, Greig NH, Bates GP, Sathasivam K, Bernier M, Maudsley S, Mattson MP, Egan JM. Xendin-4 improves glycemic control, ameliorates brain and pancreatic pathologies, and extends survival in a mouse model of Huntington's disease. *Diabetes,* 58, 2009, 318-328.
- More B, Edie ES, Abram JH. On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membráně. *Bio-Chemical Journal,* 1, 1906, 28-38.
- Nauck MA, Niederreichholz U, Ettler R et al. Glucagon-like peptide-1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 273, 1997, 981-988.
- Nauck MA, Weber I, Bach I, Richter S, Orskov C, Holst JJ, Schmiegel W.: Normalization of fasting glycaemia by intravenous GLP-1 ([7-36 amide] or [7-37]) in type 2 diabetic patients. *Diabet. Med.,* 15, 1998, 937-945.

32. Nauck M. The modulating effects of GLP-1 in type 2 diabetes. *Br.J. Diabetes Vasc. Dis.* 8, 2008, Suppl 2., S1-2.
33. Nikolaidis LA, Elahi Herntosz T et al. Recombinant glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing – induced dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 110, 2004, 955-961.
34. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*, 109, 2004, 962–965.
35. Nilsson M, Steinberg M, Frid AH, Holst JJ, Björck IM. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr.* 2004 Nov, 80(5), s. 1246-53.
36. Nyström T, Gutniak MK, Zhang Q, et al. Effects of glucagon –like peptide – 1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am. J.Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, 2004, E 1209–E 1215.
36. Oka J, Suzuki E, Kondo Y. Endogenous GLP-1 is involved in beta-amyloid protein-induced memory impairment and hippocampal neuronal death in rats. *Brain Res.*, 878, 2000, 194-198.
37. Östman EM, Liljeberg Elmastahl HG, Björck IM. Inconsistency between glycemic and insulinemic responses to regular and fermented milk products. *Am J Clin Nutr.* 74, 2001, 96-100.
39. Parks M, Rosebraugh C. Weighing risks and benefits of Liraglutide – The FDA’s Review of a New Antidiabetic Therapy. *N.Engl. J. Med.*, 2010, electronic vision, February 22, 2010.
40. Perry T, Lahiri DK, Chen D, Zhou J, Shaw KT, Egan JM, Greig NH. A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: a promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells. *J. Pharmacol. Exp- Ther.* 2002, 958-966.
41. Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Greig NH. Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002,881-888.
42. Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, Chen D, Mattson MP, Egan JM, Greig NH. Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (Abeta) levels and protects hippocampal neurons from death induced by Abeta and iron. *J Neurosci Res.* 72, 2003, 603-12.
43. Sutherland EW, De Duwe C. Origin and distribution of the hyperglycemic - glycogenolytic factor of the pancreas. *J. Biol. Chem.* 175, 1948, 663-74.
44. Svačina Š. GLP – 1 agonisté v léčbě obezity. In: Haluzík, M., Svačina, Š.: *Inkretinová léčba diabetu Mladá fronta, Praha 2010*, s. 113-122.
45. Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T, Holst JJ, Fenselau S, Schrenzeimer J. Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 69, 1999, 1135-1143.
46. Turton MD, O’Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature.*379, 1996, 69-72.
47. Unger RH, Eisentraut Anna M, Mc Call MS, Keller S, Lanz HC, Madison LL. Glucagon antibodies and their use for immunoassay of glucagon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102, 1959, 621-623.
48. van Loon LJ, Kruishoop M, Verhagen H, Saris WH, Wagenmakers AJ. Ingestion of protein hydrolysate and amino acid-carbohydrate mixtures increases postexercise plasma insulin responses in men. *J Nutr.* 130, 2000., 2508-2513.
49. Verdich C, Flint A, Gutzwiller JP et al. Metaanalysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 86, 2001, 4382-4389.
50. Vilsbøll T, Agersø H, Krarup T, Holst JJ. Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *J. Clin Endocrinol Metab.* 88, 2003,220-224.
51. Zunz E, La Barre J. Contributions a l’étude des variations physiologiques de la secretion interne du pancreas: relations entre les secretions externe et interne du pancreas. *Arch.Int.- Physiol. Biochim.*31, 1929, 20-24.

Další informace, zejména o rizicích a vedlejších účincích jsou výtahem z firemní dokumentace sitagliptinu, vildagliptinu a saxagliptinu, exenatidu a liraglutidu.

*prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.
2. interní klinika FNKV a 3. LF UK
Šrobárova 50
100 34 Praha 10
e-mail: michal.andel@lf3.cuni.cz*