UNIVERZITA KARLOVA

3. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

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

MUDr. Elena Wildová

2018

Školitel: Prof. MUDr. Michal Anděl, Csc.

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady:

Fyziologie a patofyziologie člověka, Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školicí pracoviště:

Univerzita Karlova, Ústav výživy 3. lékařské fakulty, Centrum výzkumu výživy, metabolismu a diabetu, II. interní klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

Autor:

MUDr. Elena Wildová

Školitel:

Prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Obsah

Souhrn **4**

1. Úvod **6**

2. Hypotézy a cíle práce **6**

3. Studie I. Zhodnocení stimulované inzulínové sekrece u zdravých jedinců **6**

3.1 Subjekty a metody 6
3.2 Výsledky 8
3.3 Diskuze 12

4. Studie II. Zhodnocení stimulované inzulínové sekrece u pacientů s diabetes mellitus 2. typu **12**

4.1 Subjekty a metody 12
4.2 Výsledky 14
4.3 Diskuze 15

5. Závěry **16**

6. Literatura **17**

7. Seznam publikací doktoranda **19**

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/m^2) pacientů s diabetes mellitus 2. typu s uspokojivou kompenzací a se zachovalou inzulínovou sekrecí (průměrný C-peptid nalačno byl 0,94 ± 0,07 nmol/l; $\bar{x}$ ± 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 $iAUC_{0\text{-}180}$) 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 i 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 ± 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 $iAUC_{0-180}$ 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 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.

1. Úvod

Östmanová et al. (2001) u zdravých jedinců 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 – kaseinů a syrovátkových bílkovin. Z mléčných bílkovin jsou dle Nilssona et al. (2004) nejvýznamnějším inzulínovým sekretagogem syrovátkové bílkoviny.
Po podání syrovátkových bílkovin je inzulínová sekrece dána především přímým účinkem hlavně větvených aminokyselin na β-buňku Langerhansových ostrůvků pankreatu (Boirie et al. 1997; Nilsson et al. 2004) a v menší míře přímou aktivací inkretinových hormonů (Nilsson et al. 2004; Salehi et al. 2012; Gojda et al. 2017) - glukózo-dependentního inzulinotropního polypeptidu (GIP, Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide) a glukagonu podobného peptidu 1 (GLP-1, Glukagon-Like Peptid-1).

2. 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 gykémii.

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 (resp. C-peptidovou) sekrecí, a zda lze předpokládat užití syrovátkových bílkovin v klinické praxi jako nového stimulačního testu inzulínové sekrece.

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

3.1 Subjekty a metody

Klinická studie (cross-over) byla uskutečněna na Oddělení klinické fyziologie 2. interní kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze, 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 účastníci studie 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.).

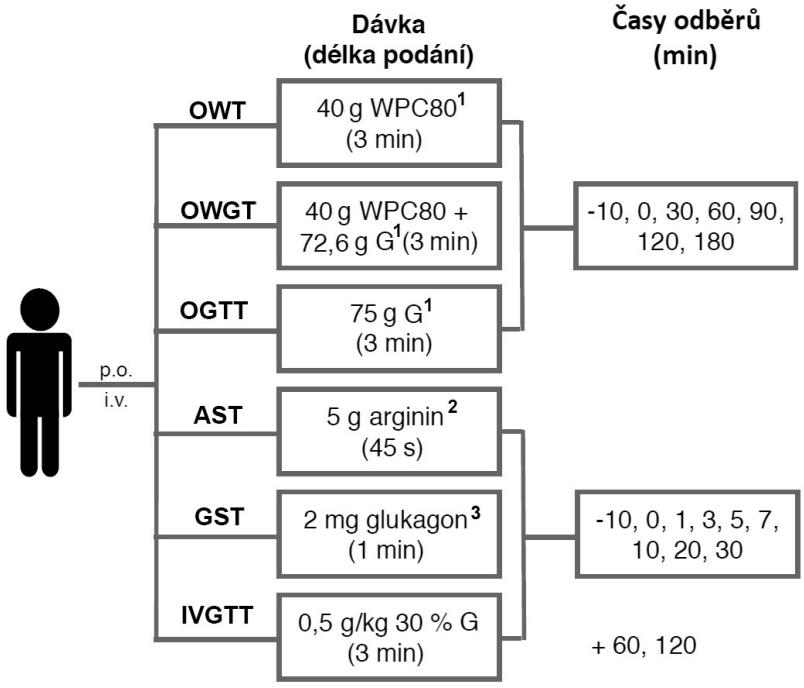
Charakteristika zdravých jedinců
Do studie bylo zařazeno osm zdravých neobézních (BMI: 17 – 25,9 kg/m^2) jedinců (7 mužů a 1 žena, ve věkovém rozmezí 20 – 26 let) bez akutního či chronického onemocnění či laktózové intolerance.

Testy stimulované C-peptidové sekrece

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).

V randomizovaném pořadí bylo provedeno celkem šest testů C-peptidové sekrece. Tři dny před provedením testů 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, poté byl do periferní žíly dobrovolníka za aseptických kautel zaveden žilní katetr s trojcestným kohoutem (Gottsätter et al. 1992). Mezi zavedením periferního katetru a prvním krevním odběrem uplynulo dalších 20 minut. Dávky jednotlivých testů včetně časů odběrů jsou popsány na obrázku 1. Syrovátkové bílkoviny byly podány ve formě ochuceného nápoje (0,05 g aspartam, 0,4 g vanilkový extract, 0,4 g jahodové aroma) ze syrovátkového proteinového koncentrátu (Volactive UltraWhey80 (WPC80); DVN, Hoogeveen, Holandsko), který obsahoval dle výrobce 81 % syrovátkových bílkovin, 6 % laktózy a 6 % tuku. Průměrný obsah větvených aminokyselin byl 17,5 %.

Analyty byly stanoveny na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze. Plazmatická glykémie byla stanovena pomocí fotometrické detekce reakcí s hexokinázou (Passey et al. 1977) v analyzátoru Konelab (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finsko). Sérový C-peptid byl stanoven pomocí oboustranné chemiluminiscenční imunometrické metody na pevné fázi (Kao et al. 1992) v analyzátoru Immunolite 2000 immunoassay system (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, Spojené státy americké).



Obrázek 1 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 (50 ml 0,9 % fyziologického roztoku); [3] roztok 60 ml 0,9 % fyziologického roztoku).

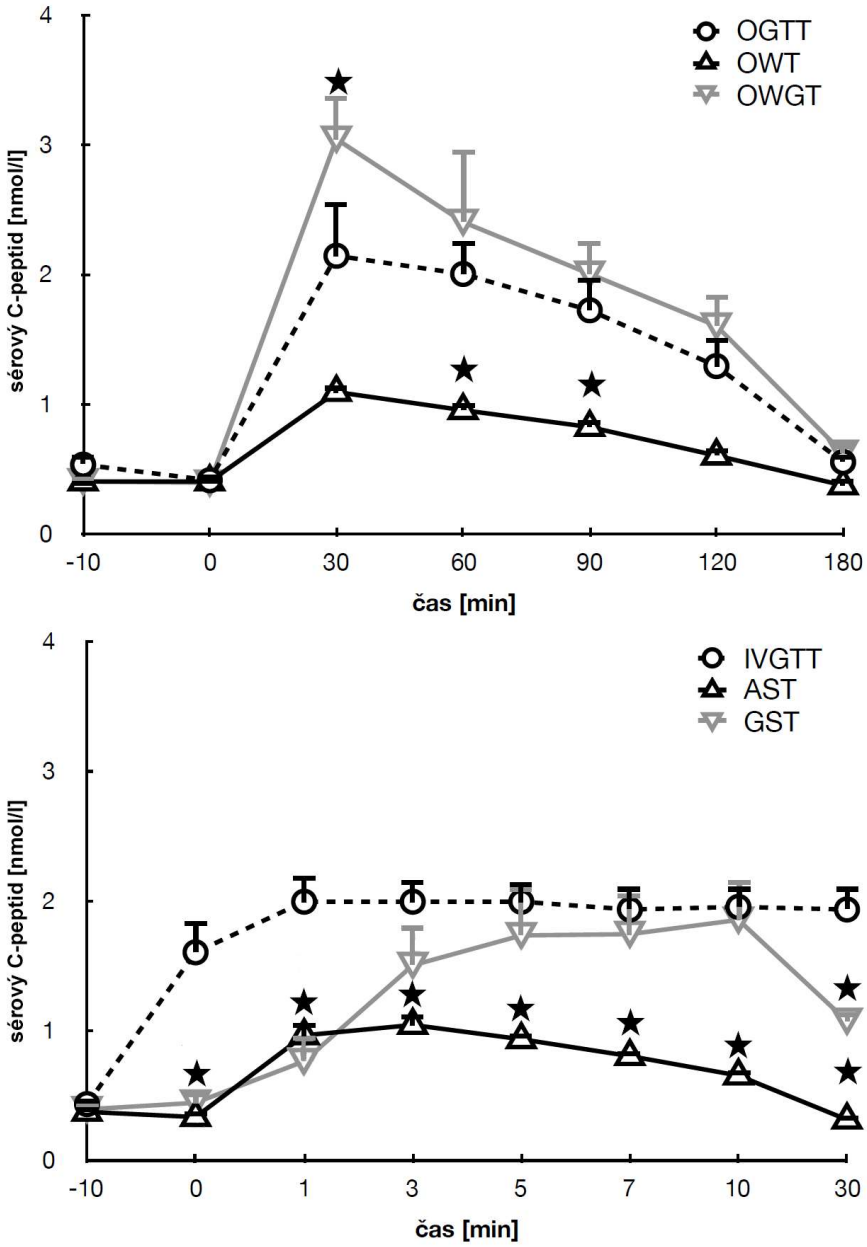
Statistika a výpočty
Ke kvantitativnímu zhodnocení hladiny sérového C-peptidu a plazmatické glykémie po podání jednotlivých stimulačních látek byla užita metoda výpočtu "přírůstkové" plochy pod křivkou (iAUC, incremental Area Under the Curve). iAUC odpovídala koncentraci C-peptidu a glykémie v časovém 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 ± 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.

3.2 Výsledky

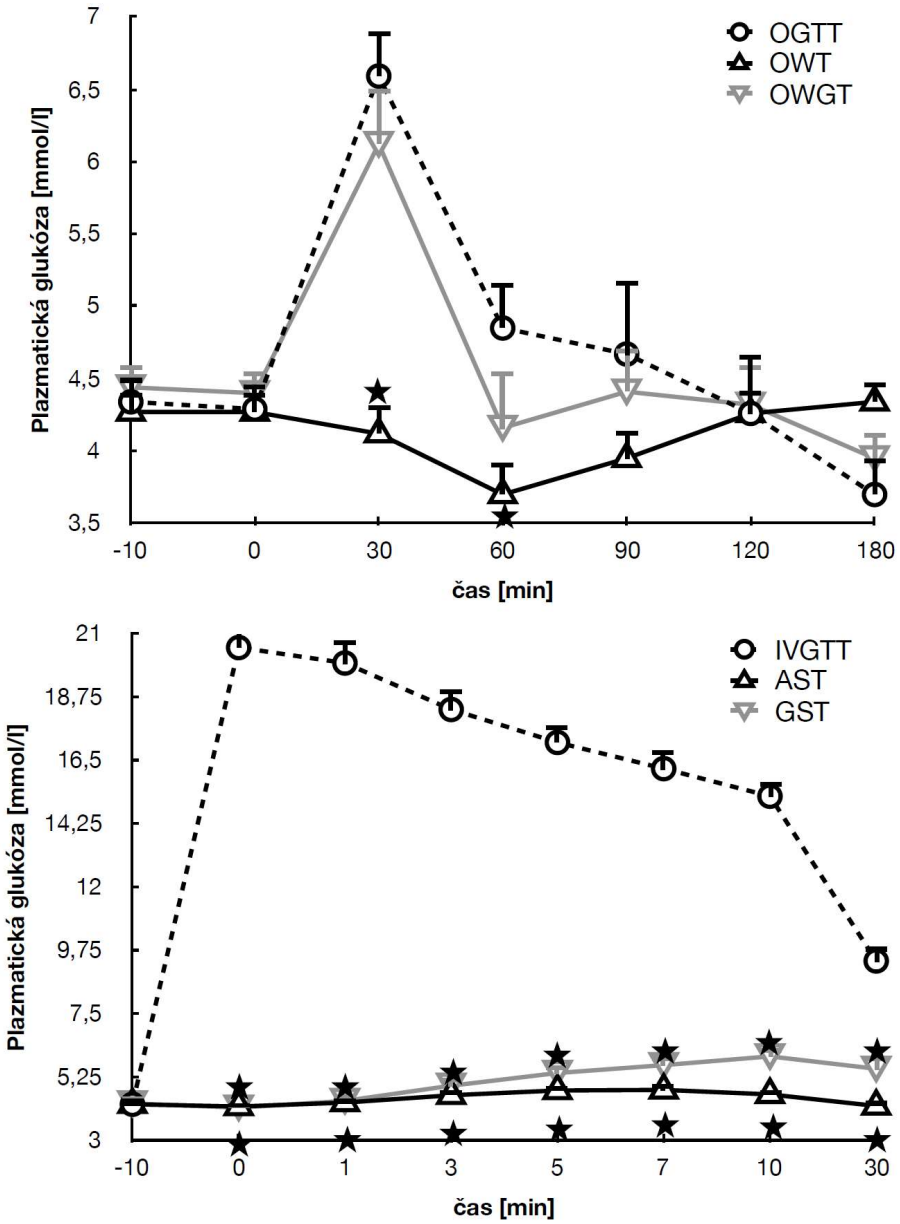
Jednotky užité pro plazmatickou glykémii byly v mmol/l a pro sérový C-peptid v nmol/l. Všichni jedinci měli normální glukózový metabolismus. Průměrná lačná glykémie byla 4,33 ± 0,06 mmol/l ($\bar{x}$ ± SEM). Průměrná hodnota glykémie ve druhé hodině po OGTT byla 4,26 ± 0,4 mmol/l. Dále jedinci měli normální index inzulínové senzitivity vypočítaný dle dat z OGTT ($OGIS_{120}$, Oral Glucose Insulin Sensitivity$_{120}$) dle Mariové et al. (2001) 463 ± 22 ml.min-1.m-2, jehož hodnoty korelují s HOMA indexem (Matthews et al. 1985) a s výsledky hyperinzulinemického euglykemického klempu (DeFronzo et al. 1979).

C-peptidová odpověď (Graf 1)
Průměrná sérová hladina C-peptidu nalačno byla 0,43 ± 0,02 nmol/l. Hodnota maxima po perorálním podání glukózy (OGTT, reference) byla 1,61 ± 0,39 nmol/l po odečtení hodnoty nalačno. Dosažené maximum hodnot v 30. minutě po OWT bylo o 57 % nižší a po OWGT o 63 % vyšší než po OGTT ($p < 0,05$). Maximální hodnota po intravenózním podání glukózy (IVGTT, reference) byla 1,56 ± 0,17 nmol/l po odečtení hodnoty nalačno. Dosažené maximum hodnot po AST bylo o 57 % nižší a po GST o 6 % nižší než po IVGTT ($p < 0,05$).

Glykemická odpověď (Graf 2)
Průměrná hodnota plazmatické glukózy nalačno byla 4,33 ± 0,06 mmol/l. Hodnota maxima po perorálním podání glukózy (OGTT, reference) byla 2,25 ± 0,24 mmol/l po odečtení hodnoty nalačno. Dosažené maximum hodnot v 30. minutě po OWGT bylo o 25 % nižší než po OGTT ($p < 0,05$). Po OWT nedošlo k vzestupu glykémie. V 60. minutě po OWT byla hodnota glykémie o 13 % nižší než hodnota nalačno, nebyla však přítomna hypoglykémie.
Hodnota maxima po intravenózním podání glukózy (IVGTT, reference) byla 16,23 ± 0,92 mmol/l mmol/l po odečtení hodnoty nalačno. Dosažené maximum hodnot po AST bylo o 97 % nižší po dobu prvních 7 minut a o 88 % nižší po dobu 20 minut ve srovnání s IVGTT.



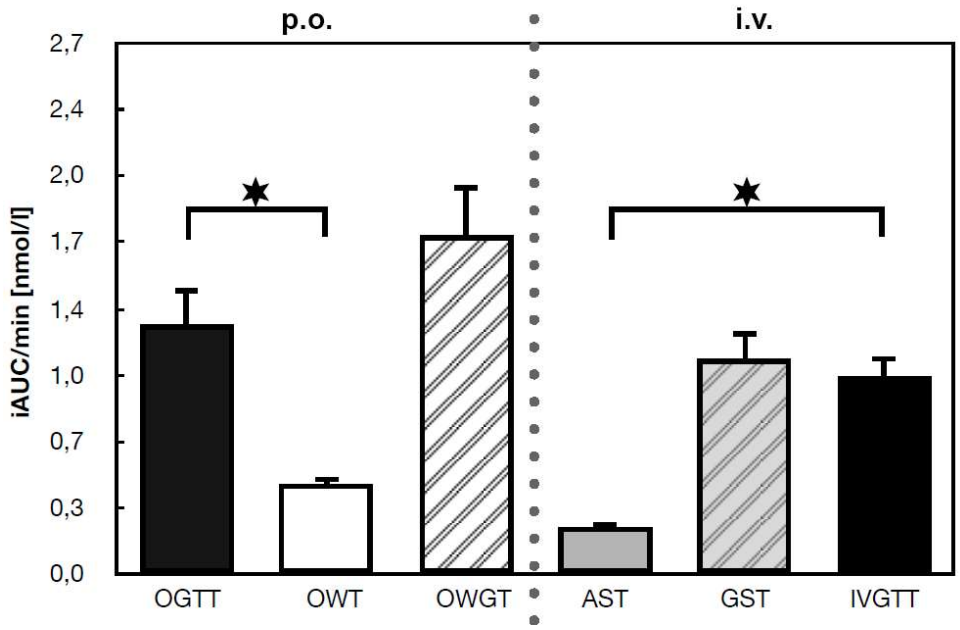
Graf 1 Sérová koncentrace C-peptidu po provedení A) perorálních (OWGT, OWT, OGTT - reference) a B) intravenózních testů (AST, GST, IVGTT - reference) u zdravých jedinců (n = 8). * označuje hodnoty významně odlišné od reference ($p < 0,05$).



Graf 2 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 ($p < 0,05$).

C-peptidová odpověď - iAUC/min (Graf 3)

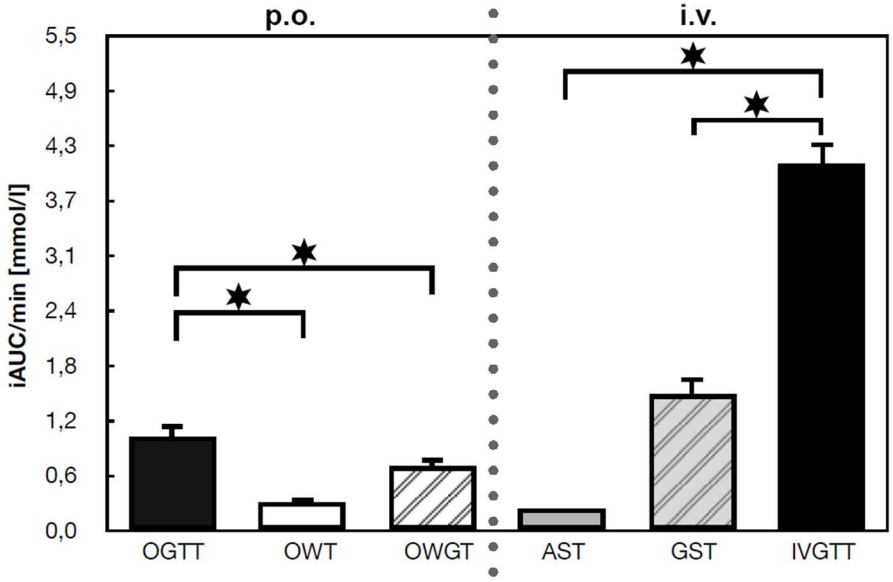
Průměrná C-peptidová odpověď vypočítaná jako iAUC/min byla po OGTT 1,27 ± 0,19 nmol/l a po IVGTT 1,00 ± 0,10 nmol/l. Po OWT byla iAUC/min o 64 % nižší ($p < 0,05$) a po OWGT o 36 % vyšší ve srovnání s OGTT. Individuální variabilita iAUC/min C-peptidové odpovědi byla po OWT nižší ($p < 0,05$) než po OGTT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



Graf 3 iAUC/min pro sérový C-peptid po podání všech testů u zdravých jedinců (n = 8). * označuje hodnoty významně odlišné od reference ($p < 0,05$).

Glykemická odpověď - iAUC/min (Graf 4)

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



Graf 4 iAUC/min pro plazmatickou glykémii po podání všech testů u zdravých jedinců (n = 8). * označuje hodnoty významně odlišné od reference ($p < 0,05$).

Tolerance testů

Samotné syrovátkové bílkoviny a syrovátkové bílkoviny s glukózou byly dobře tolerovány. 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 vyvolalo u všech jedinců přechodnou nauzeu, tachykardii a návaly horka.

3.3 Diskuze

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 bílkovinami dochází k maximální hodnotě C-peptidu v 30. minutě, což odpovídá optimálnímu charakteru časné fáze inzulínové sekrece (Curry et al. 1968; Basu et al. 1996; Caumo a Luzi 2004). Po podání samotných syrovátkových bílkovin (OWT) bylo zvýšení C-peptidu v 30. minutě 2,5krát vyšší v porovnání s hodnotou nalačno při nestimulačních hladinách glykémie a je tedy odrazem účinku syrovátkových bílkovin na β-buňku (účinku aminokyselin a inkretinových hormonů). Podání kombinace glukózy se syrovátkovými bílkovinami (s celkovým obsahem 75 g sacharidů v nápoji; OWGT) nevedlo na rozdíl od studií Floyda et al. (1970) a Nilssona et al. (2004) k synergickému zvýšení inzulínové sekrece.
C-peptidová sekrece po intravenózním stimulu (glukóza, arginin a glukagon) je závislá na dávce a délce podání stimulující látky. Celková inzulínové sekrece po OWT byla vyšší (0,46 nmol/l; $p < 0,05$) než po AST (0,24 nmol/l) za podmínek normoglykémie. Mezi neglukózovými testy (OWT, AST) byla zjištěna silná lineární korelace.
Po OWT nebyl pozorován vzestup postprandiální glykémie především ze tří důvodu. Za prvé pro nízké procentuální zastoupení glukogenních aminokyselin (Gannon a Nuttall 2010), za druhé pro nízké zastoupení laktózy (Östman et al. 2001) a za třetí pro nízké zastoupení tuku (Hoyt et al. 2005). 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.

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

4.1 Subjekty a metody

Klinická studie (cross-over) byla uskutečněna na Oddělení klinické fyziologie 2. interní kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze, 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 účastníci studie 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.).

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: 26,4 – 29,8 kg/m^2) a se zachovalou C-peptidovou sekrecí nalačno (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

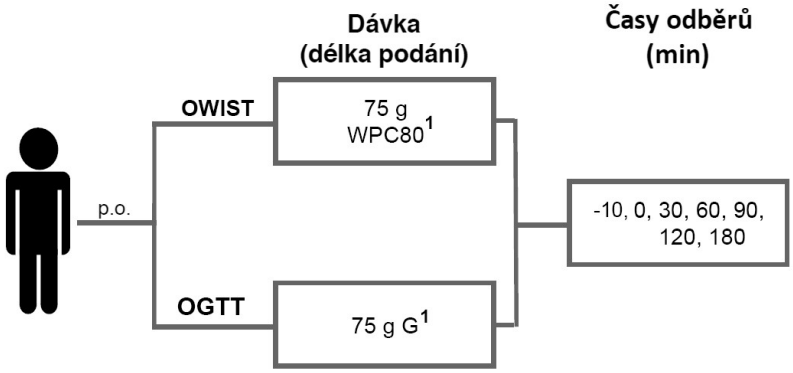
intolerancí. Vstupně nebylo zjištěno žádné akutního či chronického onemocnění ledvin či jiné akutní onemocnění.

Testy stimulované C-peptidové sekrece

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).

V randomizovaném pořadí byly provedeny dva testy C-peptidové sekrece. Tři dny před provedením testů nebyla omezena běžná pohybová aktivita (vyjma extrémní tělesné zátěže) a byla doporučena běžná diabetická dieta (vyjma pití kávy). 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, poté byl do periferní žíly dobrovolníka za aseptických kautel zaveden žilní katetr. Mezi zavedením periferního katetru a prvním krevním odběrem uplynulo dalších 20 minut. Dávky jednotlivých testů včetně časů odběrů jsou zobrazeny na obrázku 2. Syrovátkové bílkoviny byly podány ve formě ochuceného nápoje (0,05 g aspartam, 0,4 g vanilkový extract, 0,4 g jahodové aroma) ze syrovátkového proteinového koncentrátu (Volactive UltraWhey80 (WPC80); DVN, Hoogeveen, Holandsko), který obsahoval dle výrobce 81 % syrovátkových bílkovin, 6 % laktózy a 6 % tuku. Průměrný obsah větvených aminokyselin byl 23 %.

Analyty byly stanoveny na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze. Plazmatická glykémie byla stanovena pomocí fotometrické detekce reakcí s hexokinázou (Passey et al. 1977) v analyzátoru Konelab (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finsko). Sérový C-peptid byl stanoven pomocí oboustranné chemiluminiscenční imunometrické metody na pevné fázi (Kao et al. 1992) v analyzátoru Immunolite 2000 immunoassay system (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, Spojené státy americké).



Obrázek 2 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).

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.

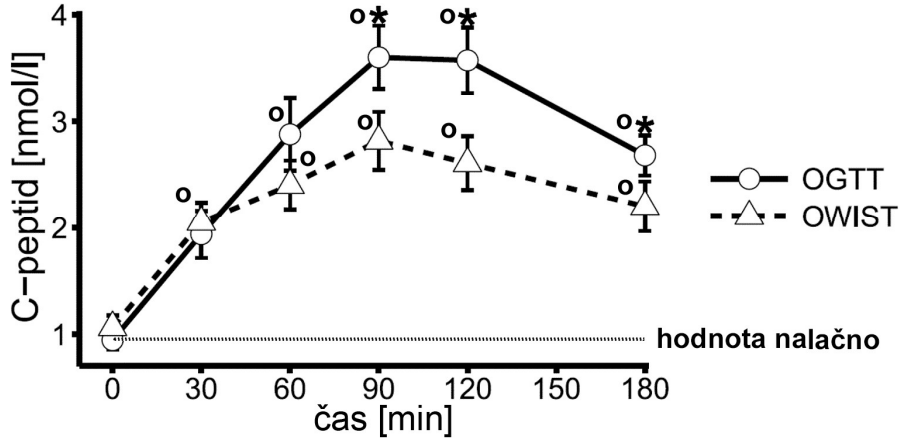
Výpočet iAUC byl proveden pomocí lichoběžníkové metody v různých časových intervalech. Pro sérový C-peptid byla vypočítána iAUC pro několik časových úseků - $iAUC_{0\text{-}30}$ (časná fáze

inzulínové resp. C-peptidové sekrece), $iAUC_{0\text{-}90}$ (inzulínová resp. C-peptidová sekrece do 90. minuty), $iAUC_{0\text{-}180}$ (celková inzulínová resp. C-peptidová sekrece), $iAUC_{30\text{-}180}$ (pozdní inzulínová resp. C-peptidová sekrece). Pro plazmatickou glykémii byla zhodnocena $iAUC_{0\text{-}180}$.
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. inzulinogenního 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).

4.2 Výsledky

Jednotky užité 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 ± 0,23 dle Levyho et al. (1998).

C-peptidová odpověď (Graf 5)
Průměrná hodnota C-peptidové sekrece nalačno byla 0,94 ± 0,07 nmol/l. Hodnota maxima byla po OGTT 3,72 ± 0,30 nmol/l. Dosažené maximum hodnot v 30. minutě po OWIST bylo o 22 % nižší než po OGTT ($p < 0,01$).

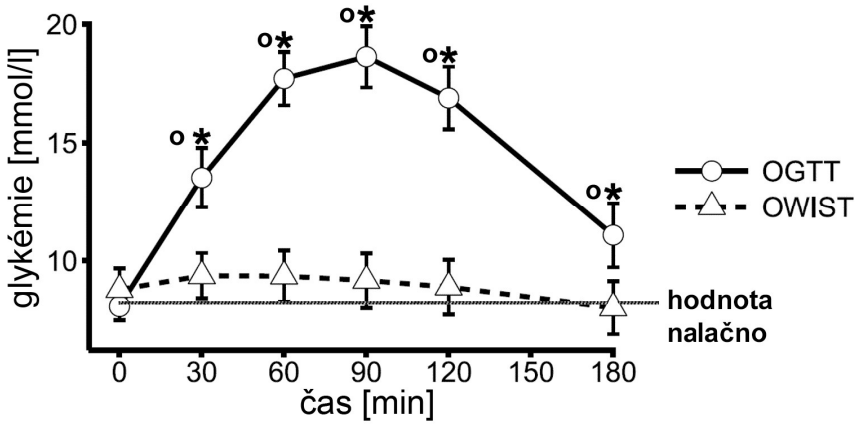


Graf 5 Absolutní hodnoty sérové koncentrace C-peptidu po provedení perorálních testů (OWIST, OGTT - reference) u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (n = 16).
* označuje hodnoty významně odlišné od reference ($p < 0,01$).
o označuje hodnoty významně odlišné od hodnoty C-peptidu nalačno ($p < 0,01$).

Glykemická odpověď (Graf 6)
Průměrná hodnota plazmatické glukózy nalačno byla 8,11 ± 0,57 mmol/l. Maximální hladina glykémie po OGTT byla 19,1 ± 1,33 mmol/l. Po OWIST nedošlo k významnému vzestupu postprandiální glykémie ($p < 0,01$), ale ani ke vzniku hypoglykemie.

β-buněčná funkce a glykemická odpověď u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Tabulka 1)
Průměrná plazmatická hladina glykémie nalačno byla menší než 10 mmol/l. Po OWIST nedošlo k významnému vzestupu glykémie. Po OWIST byla celková C-peptidová odpověď ($iAUC_{0\text{-}180}$)

o 32 % nižší než po podání glukózy. Dále byla zjištěna pozitivní korelace (r = 0,94; p = 0,0002) mezi $iAUC_{0\text{-}90}$ a $iAUC_{0\text{-}180}$ u obou testů.



Graf 6 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).

Tabulka 1 Hodnoty C-peptidové sekrece a plazmatické glukózy nalačno a po OGTT a

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

OWIST. Sloupec Δ% obsahuje průměrnou procentuální změnu mezi OGTT (reference) a OWIST. * označuje hodnoty významně odlišné od reference (p < 0,01). Vysvětlivka: IGI = inzulinogenní index.

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

4.3 Diskuze

Zhodnocení β-buněčné funkce, na rozdíl od znalosti hodnoty inzulínu/C-peptidu nalačno, by mohlo být klíčové k nastavení a sledování efektivní a striktně individualizované terapie u pacienta s diabetes mellitus 2. typu (Meier 2009; Kramer et al. 2013). 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 vhodné vyčkat na úpravu faktorů ovlivňujících inzulínovou sekreci. Cílem léčby diabetes mellitus 2. typu 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.
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 časné 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 časné 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). $iAUC_{0\text{-}180}$ korelovalo s $iAUC_{0\text{-}90}$ po podání obou testů, proto se zdá být pouze 90 minutové trvání testu dostačující u pacientů s diabetes mellitus 2. typu.
Dále nebyla nalezena korelace výsledků po OWIST a OGTT s pozdní fází inzulínové sekrece ($iAUC_{30\text{-}180}$), 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 časné 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.

5. Závěry

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, nevedl k nežádoucím účinkům a byl dobře hodnotitelný. Syrovátkové 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 hematom či tromboflebitída v místě vpichu. Z důvodu dobře hodnotitelné inzulínové sekrece po podání 40 g syrovátkových bílkovin (empirické stanovení dávky) u zdravých jedinců jsme zvolili 75 g syrovátkových bílkovin u pacientů s diabetes mellitus 2. typu, abychom zajistili stejné množství obou testovaných látek. Podání syrovátkových bílkovin je dobrým stimulem pro sekreci inzulínu/C-peptidu využitelný v klinické praxi. Zdánlivá nevýhoda spojená s nižší celkovou stimulovanou C-peptidovou sekrecí po podání OWIST (o 32 % v porovnání s OGTT) je významně 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.

6. Literatura

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

GOJDA, J, R STRAKOVÁ, A PLÍHALOVÁ, et al. Increased Incretin But Not Insulin Response after Oral versus Intravenous Branched Chain Amino Acids. *Ann Nutr Metab* [online]. 2017, **70**(4):293-302. DOI: 10.1159/000475604.

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, 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.

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.

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

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.

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.

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.

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-insulindependent diabetes mellitus. *Diabet Med* [online]. 1996, **13**(9 Suppl 6), 109-119.

KRAMER, CK, B ZINMAN a 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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

SALEHI, A, U GUNNERUD, SJ MUHAMMED, et al. The insulinogenic effect of whey protein is partially mediated by a direct effect of amino acids and GIP on β-cells. *Nutr Metab (Lond)* [online]. 2012, **9**(1), 48. DOI: 10.1186/1743-7075-9-48.

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.

TURA, A, A KAUTZKY-WILLER a 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.

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.

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.
WAHREN, J, K EKBERG, J JOHANSSON, et al. Role of C-peptide in human physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 2000, **278**(5), E759-68.
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.

7. Seznam publikací doktoranda

1) publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertace

a) 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

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

b) bez IF

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

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.

2) publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace

b) bez IF

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