

Doktorandka MUDr. Elena Wildová se zaměřila v dizertační práci na posouzení účinku syrovátkových proteinů na stimulaci sekrece inzulínu a porovnává je s dosud standardně užívaným orálním glukózovým tolerančním testem (OGTT). Vyšla ze známých publikovaných výsledků, že aminokyseliny vedle glukózy též stimulují sekreci inzulínu. Syrovátkové proteiny a zejména větvené aminokyseliny vedou po perorálním podání k sekreci inzulínu jednak přímo, jednak méně výrazně i cestou inkretinových hormonů. Cílem práce bylo prokázat, zda by bylo možno použít syrovátkové proteiny v testu zjišťujícím sekreci inzulínu, a to jednak u zdravých osob a jednak u diabetiků 2. typu se zachovalou sekrecí inzulínu. V pozitivním případě by pak bylo možno test využít jako alternativu k běžně užívanému OGTT. Doktorandka si položila dvě hypotézy, jednak zda syrovátkové bílkoviny vedou k významné stimulaci inzulínu u zdravých osob srovnatelné s jinými testy sekrece, jednak zda u diabetiků 2. typu vede použití syrovátkových proteinů k sekreci srovnatelné s účinkem OGTT a současně zda přitom nedojde ke vzestupu glykémie na rozdíl od stimulace glukózou.

Struktura dizertační práce

V úvodní části přináší práce základní poznatky o fyziologické sekreci inzulínu, tedy o bazální sekreci a sekreci stimulované, při níž se uplatňují tři fáze, cefalická, gastrointestinální a substrátová. Autorka vysvětluje stručně mechanismy stimulace sekrece inzulínu glukózou, aminokyselinami a mastnými kyselinami. Dále charakterizuje časnou a pozdní fázi sekrece inzulínu a ukazuje rozdíly v první a druhé fázi sekrece mezi zdravými osobami a diabetiky 2. typu. Další část je věnována mléčným bílkovinám se zaměřením na dosavadní poznatky o syrovátkových bílkovinách a aminokyselinách a jejich fyziologickému působení na sekreci inzulínu u zdravých jedinců a u diabetiků 2. typu. Tyto poznatky pak autorka využívá ve dvou následujících částech, kde se věnuje vlastnímu provedení testů u zdravých osob a u diabetiků 2. typu (viz dále). Výsledky pak diskutuje v kontextu s dosavadními publikacemi ve světové literatuře a dochází v závěru ke stanovisku o možném využití navrženého testu v klinické praxi. Všechny dosažené výsledky se promítly do dvou originálních článků publikovaných ve *Physiological Research*, které jsou vedle dvou dalších přehledových sdělení přílohou dizertační práce.

Po formální stránce má práce bez příloh 99 stran textu, 212 citací literatury, 2 originální práce v časopise s IF *in extenso* a 2 přehledové práce publikované v českém časopise. Součástí je též přehled o aktivní účasti doktorandky na kongresech či jiných odborných akcích s přednáškami či postery.

Zhodnocení dosažených výsledků

V první výsledkové kapitole provedla doktorandka u osmi zdravých dobrovolníků celkem šest testů stimulace inzulínové sekrece, tři perorální a tři intravenózní. Vedle standardního OGTT byla použita stimulace syrovátkovým nápojem (OWT) a dále kombinací glukózy a syrovátky (OWGT). Podrobný popis metod je uveden v originálním článku, v dizertaci jsou zmíněny základní informace. Z nitrožilních testů byl proveden argininový stimulační test (AST), glukagonový stimulační test (GST) a jako referenční byl hodnocen nitrožilní glukózový

toleranční test (IVGTT). U všech testů byly hodnoceny jednak glykemie ve stanovených intervalech (u perorálních testů v čase -10, 0, 30, 60, 90, 120 a 180 min, u nitrožilních testů v čase -10, 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 a 30 min), jednak sekrece inzulínu byla hodnocena z dosažených koncentrací C-peptidu v séru ve stejných intervalech. Doktorandka zdokumentovala v porovnání se standardním OGTT signifikantně nižší stimulační odpověď po podání jen syrovátkového nápoje, a to jak v dosažených koncentracích C-peptidu (o 57 %) ve 30. minutě, tak menší plochou pod křivkou C-peptidu (AUC) (o 64 %). Naproti tomu podání glukózy se syrovátkovými proteiny (OWGT) vedlo ke zvýšení sekrece – koncentrace C-peptidu ve 30. minutě o 63 % a o 36 % v AUC.

Ze srovnání tří intravenózních testů vplynuly rozdíly jak v sekreci hodnocené C-peptidem, kdy IVGTT podmiňuje vrchol již na konci 1. minuty, kdežto vrchol stimulace po argininu je za 3 minuty a po glukagonu za 10 minut. Zásadní rozdíl je v koncentracích glukózy, neboť glykemie vrcholí ihned po aplikaci glukózy, kdežto její vzestup po argininu a glukagonu je u zdravých jedinců minimální. Také odpovědi C-peptidu a glykemie vyjádřené plochami pod křivkou ukazují statisticky významné rozdíly mezi třemi stimulačními podněty.

Druhá hlavní výsledková kapitola přináší originální výsledky u diabetiků 2. typu. Dva perorální testy (OGTT, OWIST) byly provedeny u 16 diabetiků a podrobný popis je uveden v druhé publikaci otištěné ve *Physiological Research*. Na rozdíl od skupiny zdravých, kde bylo podáno 40 g syrovátkových bílkovin, obsahoval test (OWIST) 75 g těchto bílkovin. Výsledky ukázaly v 90. minutě o 22 % nižší vrchol koncentrace C-peptidu po OWIST než při OGTT, přičemž v prvních 30 minutách byl vzestup C-peptidu u obou testů stejný. Naprosto rozdílné byly glykemie, které při OWIST byly jen mírně ale nesignifikantně zvýšené na rozdíl od výrazného vzestupu při OGTT. Konečně hodnocení inzulínové sekrece pomocí C-peptidu ukázalo o 32 % nižší celkovou odpověď (AUC_{0-180 min}) po podání syrovátkových proteinů než po podání glukózy, naopak inzulínogenní index byl u syrovátkových proteinů (test OWIST) vyšší o 47 % než při OGTT. Vedle toho byla nalezena pozitivní velmi významná korelace sekrečních odpovědí u obou testů.

Obě skupiny vyšetřených, tj. zdraví jedinci a diabetici 2. typu, poskytly velmi hodnotné výsledky, které svědčí o možném klinickém využití syrovátkových proteinů v testu sekrece inzulínu. Testem nelze řešit abnormality glukózového metabolismu ve smyslu prediabetu či diabetu, ale sekreční odpověď B-buňky lze testem velmi dobře postihnout. Zároveň dizertační práce nastolila řadu dalších otázek, které čekají na objasnění.

Dotazy a poznámky k dizertační práci

1. U zdravých osob bylo použito v testu 40 g syrovátkových proteinů, u diabetiků 2. typu 75 g. Proč bylo použito rozdílného množství? Zdraví jedinci pak nemohou být srovnatelnou kontrolní skupinou, což asi ani původně zamýšleno nebylo.
2. V textu dizertační práce (str. 60 i 75) se uvádí individuální variabilita v souvislosti s AUC/min (str.60), resp. OWT vs. OWGT a OGTT. Jak byla vypočtena?
3. Jaký vliv na sekreci inzulínu má složení syrovátkových proteinů? Jak jsou různé vzorky srovnatelné?
4. U studie s diabetiky je uvedeno, že u 3 pacientů bylo nutno korigovat glykémii při OGTT inzulínem. Jak to bylo provedeno a jak to ovlivnilo výsledky sekrece inzulínu?
5. Reprodukovatelnost použitého testu se syrovátkovými proteiny zatím nebyla vyšetřena, jak uvádí autorka, existují o ní údaje z literatury?

Poznámky k textu:

- a) Dizertační práce ve výsledkové části přináší prakticky zjednodušený text obou originálních článků. Některé výsledky mohly být doloženy navíc graficky, což by zvýraznilo získané výsledky. Např. grafické zobrazení vztahu mezi fázemi inzulinové sekrece u OWT a OGTT či OWIST a OGTT apod. Také lineární závislost zmíněnou u inzulinogenního indexu u OGTT a OWIST (viz str. 69) by bylo vhodné dokumentovat graficky.
- b) V českém textu proti původním publikacím jsou některé nepřesnosti v citacích, neboť autorka zmiňuje vlastní výsledky současně s uvedením citace zahraničních autorů (viz str. 71), takže to dělá dojem, že výsledky se týkají uvedené citace. Jedná se však o zřejmý o vyjádření, že dosažené výsledky jsou v souladu s pozorováním jiných autorů.
- c) Na str. 60 v kapitole 5.2.3 a 5.2.4 shodně ve druhých větách by bylo vhodné odlišit odpovědi při OWT a OWGT přímou vazbou snížení nebo zvýšení C-peptidové a glykemické odpovědi k danému testu (např. ...AUC/min nižší o 64 % u OWT, kdežto vyšší o 36 % u OWGT ve srovnání s OGTT. V originální publikaci je to správně.
- d) Místo pojmu „reference“ bych doporučil použít přímé označení daného testu, tj. OGTT nebo IVGTT, neboť pak není úplně jasné, co se referencí míní. Opět v originální publikaci je to správně.
- e) Na str. 58 v kap. 5.2.2. ve druhé větě by mělo být přesnější vyjádření, neboť výsledek uvedený v závorce je rozdíl mezi hodnotou nalačno a hodnotou ve 30. min. V textu však uvedená hodnota je vztažena k průměrnému maximu hodnot glykemie při OGTT dosaženému ve 30. min.
- f) V textu kolísá vyjadřování parametrů mezi pojmy „nalačno“ a „lačný/á“. Je to bohužel obvyklé v rutinní praxi, ale v odborném tisku by mělo být důsledně „nalačno“, neboť „glykemie není lačná“, ale lačný je jedinec.
- g) Na str. 48 je glykovaný hemoglobin uveden s hodnotou 4,3-7,7 mmol/mol, což má být 43-77 mmol/mol.

Závěr: Doktorandka v dizertační práci předkládá výsledky vlastní práce, v níž dokládá, že zvládla jak metodiku, tak odpověděla na formulované hypotézy. Výše uvedené připomínky či poznámky nikterak nesnižují význam práce, mají vést autorku jen k dalším otázkám, resp. k formulování přesného odborného textu. Dizertační práce naplňuje kritéria kladená na doktorské studium, autorka doložila, že je schopna dovést práci do publikace v odborném impaktovaném časopise. Celkově tudíž doporučuji, aby práce byla přeložena k dalšímu řízení, a tedy k obhajobě.

V Praze 30. dubna 2018


Prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.