

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität München, Campus Großhadern**

Direktor: Prof. Dr. Burkhard Göke

**Der Beitrag von GLP-1 und GIP zu der Enteroinsulinären
Achse bei Gesunden und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2
(T2DM)**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

A. Lucianno Guimaraes-Carneiro

aus

Sobral, Brasilien

Jahr

2011

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der
Universität München**

Direktor: Prof. Dr. Burkhard Göke

**Der Beitrag von GLP-1 und GIP zu der Enteroinsulinären
Achse bei Gesunden und Patienten mit Diabetes mellitus
Typ 2 (T2DM)**

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

Lucianno Guimaraes-Carneiro

aus

Sobral, Brasilien

Jahr

2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg Schirra

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Bärbel Otto
Priv. Doz. Dr. Michael Hummel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Mathias Nicolaus

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2011

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jörg Schirra, der das Projekt nicht nur von Anbeginn mit großem Engagement und Interesse begleitet hat, sondern auch durch zahlreiche Diskussionen und Interpretationen und nicht zuletzt durch seine geduldige Korrektur der Arbeit wichtige Beiträge zum Gelingen des Projektes geleistet hat.

Ein spezieller Dank für die Überlassung der Arbeit gilt dem Ärztlichen Direktor des Klinikum der Universität München - Großhadern - Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Göke, in dessen Klinischer Forschungsgruppe diese Arbeit möglich wurde.

Ohne die Zusammenarbeit mit Frau Rita Schinkmann und Frau Silke Knopp wäre das Projekt nicht möglich gewesen. Sie standen mir bei allen Versuchen mit Rat und Tat zur Seite. Ich danke Dr. Mathias Nicolaus, der mir bei Schwierigkeiten während der Versuchsdurchführung jederzeit hilfreich zur Verfügung stand.

Meinen Eltern danke ich für das grenzenlose Vertrauen und für ihre moralische und finanzielle Unterstützung. Ganz besonders danke ich meine Verlobte Walderlane Viana, für ihr Verständnis, ihren Rückhalt, der ich diese Arbeit widme, von ganzem Herzen.

Abkürzungen

ANOVA	analysis of variance
ARH	acute reaction to hyperglycemia
AUC	Area under the curve
BMI	Body Mass Index
Bw	body weight
CRU	Clinical Research Unit
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
ILMA	Immuno-Luminiszenz-Assay
i.v.	intravenös
JCEM	Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
GGT	Gammaglutamyltransferase
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
GIP	Glukose-dependent insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glukagon-like Peptide 1
GLP-2	Glukagon-like Peptide 2
HbA1c	Glykohämoglobin
HBs-Ag	Hepatitis-B surface antigen
HCV-Ak	Hepatitis C-Antikörper
HIV	Human immunodeficiency virus
LDH	Lactatdehydrogenase
MW	Mittelwert
n	Nummer
NaCl	Natriumchlorid
ROI	Radioimmunoassay
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SRH	Sustained reaction to hyperglycemia (steady state)
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
2. Ziel der Studie.....	12
3. Material und Methoden	13
3.1. Genehmigungsverfahren und Einverständniserklärung.....	13
3.2 Experimentelles Design und Vorgehensweise	13
3.1.1 Einschlusskriterien für T2DM	15
3.1.2 Ausschlusskriterien für T2DM	15
3.1.3 Einschlusskriterien für Gesunde	16
3.1.4 Ausschlusskriterien für Gesunde	17
3.1.5 Experimentelles Design.....	19
3.1.6 Praktische Versuchsdurchführung.....	19
3.2 Probenaufbereitung und Analysen	23
3.3. Auswertung und Statistik:.....	24
4. Ergebnisse	26
4.1. Wirkung von Exendin(9-39) während der Nüchternperiode und während duodенaler Nährstoffperfusion (vor hyperglykämischem Clamp)	27
4.2. Wirkung von Exendin(9-39) während der duodenalen Nährstoffperfusion unter isoglykämischer Hyperglykämie	29
4.2.1 Blutglukosekonzentration und Glukoseverbrauch	29
4.2.2 Insulin, C-Peptid und Inkretineffekt	33
4.2.3 Plasmakonzentrationen von Glukagon	40
4.2.4 Plasmakonzentrationen von GLP-1(7-36) und GIP	41
5. Diskussion.....	45
5.1. Enteroinsulinäre Achse: Insulin und Inkretineffekt.....	46
5.2. Enteroinsulinäre Achse: Sekretion von GLP-1 und GIP.	52

5.3. Enteroinsulinäre Achse: Sekretion von Glukagon.....	54
6. Zusammenfassung.....	57
7. Literaturverzeichnis	59

1. Einleitung

Unmittelbar nach Nahrungsaufnahme kommt es zu einer Stimulation der Insulinproduktion, noch bevor dies durch steigende Glukosewerte im Blut verursacht wird. Verantwortlich hierfür sind die in der Schleimhaut des Duodenums gebildeten Inkretinhormone, welche die β -Zellen im Inselorgan der Pankreas glukoseabhängig zu einer verstärkten Sekretion von Insulin veranlassen [1]. Nach der Nahrungsaufnahme ist bei Stoffwechselgesunden ein biphasischer Verlauf der Insulinsekretion feststellbar: Der erste "Insulinpeak" hat seine Spitze nach drei bis fünf Minuten und dauert nur ca. zehn Minuten "First Phase". Danach schließt eine zweite Phase „second Phase“ an, die so lange anhält, wie eine Hyperglykämie besteht. Die erste Phase besteht aus den gespeicherten Insulinmolekülen, die zweite Phase vor allem aus neu gebildetem Insulin. Die Ausschüttung von Insulin, die auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist, wird als Inkretineffekt bezeichnet. Verantwortlich hierfür sind im Wesentlichen zwei Inkretinhormone, das Glukagon-like-peptide 1 (GLP-1) sowie das Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). Sie sind Teil eines hormonellen Systems, welches an der Regulation des Glukosestoffwechsels beteiligt ist. Bei T2DM ist der Inkretineffekt deutlich vermindert. Die Inkretine GLP-1 und GIP spielen wahrscheinlich bei der Pathogenese des T2DM eine wichtige Rolle. So wurde bereits eine verminderte Glukosetoleranz aufgrund einer Störung der Inkretinregulierung festgestellt noch bevor die Krankheit manifest wurde [2]. Eine genaue Kenntnis der Inkretineffekte und deren Veränderungen unter den Bedingungen des T2DM ist daher auch gerade im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten von Bedeutung. Bislang ist jedoch noch nicht endgültig geklärt, wie die Regulationsmechanismen im Einzelnen wirken, welche Bedeutung sie im Rahmen der gesamten Glukosehomöostase haben und welche Funktionen GLP-1 und GIP im Einzelnen dabei wahrnehmen.

Bei der Pathogenese des T2DM spielen Insulinresistenz und eine Dysfunktion der pankreatischen β -Zellen eine Rolle [3]. Insulinresistenz äußert sich dabei vor allem in einer verminderten Reaktion der Zielorgane auf physiologisch normale Insulinkonzentrationen (relativer Insulinmangel). In der Leber wird dabei die Hemmung der Glukoneogenese gestört. Gleichzeitig vermindert sich auch die Glukoseaufnahmerate der Muskulatur [3]. Die Abweichungen vom gesunden Stoffwechsel liegen vor allem darin, dass die Glukoseabbauwege wie Oxidation oder Glycogenbildung behindert sind [3]. Zusätzlich wird die Glukoneogenese durch höhere Glukagongehalte, aber auch durch eine Insulinresistenz der Leberzellen und ein vermehrtes Auftreten von freien Fettsäuren durch eine verstärkte Lipolyse angeregt. [4]. Dieses

Ungleichgewicht der Stoffwechsellage wird zunächst durch eine Hyperinsulinämie erfolgreich kompensiert. Erst im Laufe der Zeit kommt es zu einer Erschöpfung der β -Zellen und damit auch zu einem absoluten Insulinmangel.

Bei Gesunden ist GLP-1, welches in den intestinalen L-Zellen gebildet wird, ein wichtiger Faktor des Inkretineffekts. Neben der Stimulation der Insulinsekretion hat GLP-1 weitere wichtige physiologische Funktionen. So wird durch GLP-1 gleichzeitig die Glukagonsekretion unterdrückt [5], die Magenentleerung verzögert [6] und die Glycogenbildung in Leber und Muskelgewebe gesteigert [7]. Außerdem fördert GLP-1 über das Hypothalamus-System das Sättigungsgefühl [8]. GLP-1 erhöht darüber hinaus nicht nur die Ausschüttung von Insulin, sondern verstärkt im Tiermodell zusätzlich die Effektivität des Insulins im Hinblick auf die Verlagerung von Glukose in das Zellinnere und die Glukoneogenese [9]. Eine Stimulation der Insulinsensitivität beim Menschen ist jedoch umschritten.

Von Bedeutung ist, dass die Einflüsse von GLP-1 auf den Glukosestoffwechsel auch bei Patienten mit T2DM wirksam sind [10]. Dies macht man sich schon länger bei der Therapie mit oralen Antidiabetika zunutze [11]. So wurde zwar auch eine geringere GLP-1-Plasmakonzentration bei Diabetespatienten im Vergleich zu Gesunden gefunden [12], neuere Ergebnisse weisen aber darauf hin, dass GLP-1 beim T2DM nicht reduziert ist [13, 14]. Widersprüchliche Ergebnisse sind dabei möglicherweise auf unterschiedliche Versuchsbedingungen im Hinblick auf die Art und Weise der Kalorienzufuhr, der Kalorienmenge und den eingestellten Plasmaglukosewerten zurückzuführen. Über diese Faktoren sind vielfältige Einflüsse denkbar, insbesondere da die physiologischen Wirkungen von GLP-1 auch über das cholinerge System [15] und die Hypothalamus - Hypophysen – Nebennierenrinden - Achse [16] wirken.

In diesem Zusammenhang sind auch die so genannten Exendine, die eine dem GLP-1 ähnliche Struktur aufweisen, aus therapeutischer Sicht, aber auch im Rahmen weiterer Forschung von besonderer Bedeutung. So hat Exendin-4, das zum nativen GLP-1 zu etwa 53 % homolog ist und ebenfalls an den GLP-1-Rezeptor bindet, ähnliche funktionelle Eigenschaften. Darüber hinaus besitzt es eine längere Halbwertszeit als GLP-1, da es nicht durch das Enzym Dipeptidyl-Peptidase-4 (DPP-4) abgebaut wird. Im Rahmen einer Substitutionstherapie macht man sich die antidiabetischen Eigenschaften von Exendin-4 bei Diabetikern des Typs 2 zunutze [17]. Exendin (9-39), ein verkürztes Derivat von Exendin-4

vermag aufgrund seiner Struktur zwar an GLP-1-Rezeptoren zu binden, aktiviert diese aber nicht. Hierdurch stellt es einen effektiven, kompetitiv spezifisch wirkenden Antagonisten zu GLP-1 dar [18]. Daher bietet sich Exendin (9-39) an, um experimentell zwischen dem durch GLP-1 und den durch andere glukosewirksame intestinale Peptide (vor allem GIP) induzierten Inkretineffekt, zu unterscheiden [19].

GIP ist das zweite Hormon der Darmschleimhaut, das wesentlich am Inkretineffekt beteiligt ist. GIP wird in den K-Zellen der duodenalen Mucosa gebildet. Auslöser dafür ist die Anwesenheit von Glukose, Fetten und auch Proteinen im Darmlumen [20]. GIP vermag ebenfalls die Sekretion von Insulin zu steigern [21] und wie GLP-1, hat GIP auch eine anti-apoptotische Wirkung auf die β -Zellen des Inselorgans [22]. Im Gegensatz zu GLP-1 hat GIP jedoch keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Magenentleerung [21]. Auch das Gefühl von Hunger und Durst wird durch GIP nicht beeinflusst [21]. Andererseits wurde bei normalgewichtigen Patienten eine Zunahme der Rückveresterung von Fettsäuren im subkutanen Fettgewebe bei leichter Hyperglykämie nachgewiesen [23]. GIP zeigte auch keinen Effekt auf den Energiehaushalt, den Abbau von Triglyceriden und Fettsäuren [24]. Es scheint aber dennoch einen Effekt auf die Gewichtszunahme bei hochkalorischer Kost und einen Schutzfaktor gegen Insulinresistenz zu besitzen [25].

T2DM führt offensichtlich zu keiner verminderten GIP-Ausschüttung, allerdings scheint bei Diabetikern die Wirkung von synthetischem GIP auf die Insulinsekretion deutlich geringer zu sein als bei GLP-1 [10]. Insbesondere wird berichtet, dass GIP ähnlich wie GLP-1 eine kurzfristige Insulinausschüttung nach oraler Glukoseaufnahme auslöst. Im Gegensatz zu GLP-1 hat GIP aber bei Diabetespatienten keinen Effekt auf die weitere Insulinsekretion [26]. Dagegen wurde gegenüber der GLP-1-Wirkung eine durch GIP hervorgerufene verstärkte Insulinbildung in Inselzellen bei Gesunden wie auch Diabetikern gefunden [27]. Insgesamt liegen aber zu wenige Informationen vor, um die Ursache des verminderten Inkretineffekts bei Diabetikern des Typs 2 befriedigend zu erklären [28]. Hierbei wird insbesondere die Frage diskutiert, ob ein verminderter Inkretineffekt beim Diabetes Typ 2 eine Folge oder die Ursache des Krankheitsgeschehens ist [29]. Die Rolle von endogenem GLP-1 und GIP ist unbekannt.

Glukagon ist das zweite Hormon, welches im Zusammenspiel mit Insulin die Glukosehomöostase im Blut aufrechterhält. Es wird in den α -Inselzellen der Pankreas gebildet und stellt mit seinen physiologischen Wirkungen einen Gegenspieler des Insulin dar, indem es die Glukogenese und die Glukolyse reguliert. Es ist bekannt, dass auch die Sekretion von

Glukagon durch GLP-1 und GIP beeinflusst wird [30]. GLP-1 vermindert die Aktivität der α -Zellen, wobei dieser Effekt von der Plasmaglukosekonzentration abhängig ist [30]. Während die Glukagonausschüttung im hyperglykämischen Zustand von synthetischem GLP-1 besonders gehemmt wird, kann der Effekt bei Glukosekonzentrationen von weniger als etwa 4 mmol/l nicht mehr nachgewiesen werden [31]. GLP-1 interagiert also nicht mit der durch die Hypoglykämie induzierten Glukagon-Stimulation. Der Wirkmechanismus ist im Wesentlichen eine parakrine Hemmung der A-Zellen durch Somastostatin, dessen Sekretion aus den D-Zellen durch GLP-1 stimuliert wird, daneben wird heute auch die direkte Wirkung von GLP-1 auf die A-Zellen diskutiert. GIP vermag die Glukagonbildung in Abhängigkeit von der Blutglukosekonzentration hingegen eher zu stimulieren [32]. Anders als beim GLP-1 liegen hier allerdings widersprüchliche Berichte vor, insbesondere was die Abhängigkeit dieses Effekts von der Glukosekonzentration angeht. Während ein stimulierender Effekt von GIP auf die Glukagonausschüttung bei Nichtdiabetikern unter physiologischen Glukosekonzentrationen gefunden wurde [32], konnte dies sowohl bei Diabetikern des Typs 1 als auch bei Gesunden unter hyperglykämischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden [33]. Unter Verwendung des GLP-1-Rezeptor Antagonisten (Ex 9-39) konnte gezeigt werden, dass endogenes GLP-1 nicht nur die postprandiale Glukagonsekretion hemmt, sondern auch eine Hemmung der Glukagonsekretion durch die A-zellen im nüchternen Zustand bewirkt.

2. Ziel der Studie

Aus den bisherigen Ausführungen geht hervor, dass hinsichtlich der Beteiligung des GLP-1 am Inkretineffekt, der Glukosehomöostase und der Pathophysiologie des T2DM erheblicher Informationsbedarf besteht. Es ist daher das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle von GLP-1 bei der Glukoseregulation durch die Hormone Insulin und Glukagon genauer zu untersuchen. Von besonderem Interesse ist die Frage nach einem GLP-1-unabhängigen Inkretineffekt, der somit durch GIP bedingt sein sollte. Dabei standen bei den durchzuführenden Untersuchungen im Wesentlichen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Quantifizierung des durch GLP-1 induzierten Inkretineffekts bei Gesunden und Diabetikern des Typs 2,
2. Bestimmung der kurzfristigen und nachhaltigen Wirkung der Inkretineffekte auf die Glukoseregulation und die hierfür relevanten Hormone,
3. Klärung der Frage, welche Auswirkung der veränderte Inkretineffekt auf die Pathophysiologie beim T2DM hat,
4. Untersuchung der Glukagonsekretion sowie deren Regulation durch GLP-1 im Zustand der Hyperglykämie bei Gesunden und Diabetikern des Typs 2.

3. Material und Methoden

3.1. Genehmigungsverfahren und Einverständniserklärung

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Projektnummer 073/04 genehmigt. Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte genehmigte die Studie unter der Vorlagennummer 4022386. Die Studie wurde vom Bundesamt für Strahlenschutz unter der Nummer Z5 – 22462/2-2005-043 vom 09.11.2005 zur Anwendung radioaktiver Stoffe oder ionisierender Strahlung am Menschen in der medizinischen Forschung bewilligt. Die Studie wurde von der DFG mit der Genehmigungsnummer 527/5-2 unterstützt.

Es handelt sich um eine randomisierte, einfach-blinde, unizentrische, Placebo-kontrollierte, single-dose Studie im Crossover Design, die 3 Versuchstage für die Patienten beinhaltete. Jeder Studienteilnehmer gab nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung seine schriftliche Einverständniserklärung ab.

3.2 Experimentelles Design und Vorgehensweise

Die Studie wurde an insgesamt 24 Probanden (Siehe Tabelle 1) durchgeführt, von denen zwölf Probanden gesund waren und zwölf einen T2DM aufwiesen. Die Gruppe der Gesunden bestand aus sieben männlichen und fünf weiblichen Personen, das Durchschnittsgewicht betrug 86,22 kg (\pm 17,14). Die Gruppe der Diabetes-Probanden bestand aus sechs männlichen und sechs weiblichen Personen, das Durchschnittsgewicht betrug 81,05 kg (\pm 14,33). Im Rahmen einer Voruntersuchung im Zusammenhang mit einer entsprechenden Anamnese wurde der gesundheitliche Status jedes einzelnen Probanden ermittelt.

Tabelle 1: Probandenübersicht mit Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, BMI und HbA1c

Gesunde						
Versuchscode	Geschlecht	Alter	Größe (m)	Gewicht(KG)	BMI(kg/m ²)	HbA1c
4B1	m	29	1,74	87	28,7	5,3
8B1	w	32	1,6	71,6	28,0	5,0
13B1	w	47	1,585	72	28,7	5,3
18B1	w	56	1,6	67,2	26,3	5,2
21B1	m	30	1,84	95	28,1	5,3
28B1	m	31	1,84	91,8	27,1	4,2
34B1	m	54	1,87	84	24,0	5,3
37B1	m	31	1,8	87	26,9	5,4
42B1	w	40	1,79	85	26,5	4,8
43B1	w	40	1,77	87	27,8	4,8
46B1	m	52	1,9	133	36,8	5,2
47B1	m	51	1,72	74	25,0	5,4
Mittelwert		41,08	1,75	86,22	27,82	5,10

Diabetiker						
Versuchscode	Geschlecht	Alter	Größe (m)	Gewicht(KG)	BMI(kg/m ²)	HbA1c
3A1	w	57	1,59	67	26,5	6,2
20A1	w	65	1,66	77	27,9	5,9
24A1	w	62	1,665	70	25,3	5,7
25A1	m	62	1,8	103	31,8	
29A1	w	54	1,61	98	37,8	8,0
32A1	m	63	1,69	84,6	29,6	5,5
33A1	w	69	1,58	52	20,8	5,5
40A1	m	59	1,87	88	25,2	5,9
49A1	w	64	1,65	88	32,3	6,7
50A1	m	54	1,68	71	25,2	6,4
51A1	m	42	1,85	91	26,6	6,4
53A	m	67	1,73	83	27,7	8,0
Mittelwert		59,83	1,70	81,05	28,06	6,38

3.1.1 Einschlusskriterien für T2DM

Im Einzelnen galten für die Teilnehmer an der Studie dabei folgende Einschlusskriterien:

- männliche oder weibliche Diabetes-Probanden, weibliche Probanden im gebärfähigen Alter jedoch nur bei chirurgischer Sterilisation oder unter Anwendung von zwei sicheren Verhütungsmethoden,
- Möglichkeit eines mindestens einwöchigen Verzichts auf jegliche Diabetesmedikamente, (Die Patienten wurden um sofortige Kontaktaufnahme gebeten, wenn die Glykämie über 200 mg/dl überschreitet, bei der täglichen Selbstmessung)
- Alter: 30-65 Jahre,
- HbA_{1c}: 6,5-10 %,
- BMI < 40 kg/m²,
- Glukosekonzentration im Blut (nüchtern) zwischen 7,0 und 12,2 mmol/l (entsprechend 126-240 mg/dl) bei der Voruntersuchung sowie am ersten Tag der Studie,
- Vorlage der unterschriebenen Einverständniserklärung vor Studienbeginn,
- Fähigkeit, mit den Verantwortlichen zu kommunizieren sowie das Akzeptieren der Vorgaben für die Studie.

3.1.2 Ausschlusskriterien für T2DM

Darüber hinaus galten für die Probanden folgende Ausschlusskriterien:

- Diabetes mellitus Typ 1,
- externe Zufuhr von Insulin innerhalb der letzten drei Monate vor Studienbeginn,
- Einnahme von Thiazolidinedione innerhalb der letzten drei Monate vor Studienbeginn,
- vorliegende Begleiterkrankung oder Komplikationen des Diabetes (z.B. Nephropathien, Orthostasis etc.),
- Triglyceride >5,1 mmol/l (entsprechend >450 mg/dl) innerhalb der letzten vier Wochen vor Studienbeginn,
- Einnahme von systemischen Steroiden oder Schilddrüsenhormonen,
- frühere Operationen im Gastrointestinalbereich,
- Vorliegen einer gastrointestinalen Symptomatik (z.B. Schmerzen, Diarrhoe etc.),
- Teilnahme an einer anderen klinischen Untersuchung innerhalb der letzten vier Wochen vor Studienbeginn,
- Spende oder Verlust von 400 ml Blut oder mehr innerhalb der letzten acht Wochen vor Studienbeginn,

- nicht unerhebliche Erkrankung innerhalb der letzten zwei Wochen vor Studienbeginn,
- Auffälligkeiten im EKG oder familiäre Disposition für eine QT-Verlängerung,
- Hinweise auf eine Arzneimittelunverträglichkeit oder atopische Allergien,
- chirurgische Eingriffe oder Erkrankungen, welche die Absorption, Verteilung, den Metabolismus oder die Ausscheidung von Medikamenten verändern,
- Granulozyten < 1.500/ μ l, Thrombozyten < 100.000/ μ l,
- Beeinträchtigungen des Immunsystems oder positiver HIV-Test,
- Hinweis auf eine Lebererkrankung, gemessen an den Parametern SGOT, SGPT, γ -GT, alkalische Phosphatase und Serumbilirubin,
- positiver Test auf Hepatitis B (HbsAg) oder Hepatitis C,
- Drogen- oder Alkoholmissbrauch innerhalb der letzten zwölf Monate vor Studienbeginn.

3.1.3 Einschlusskriterien für Gesunde

Im Einzelnen galten für die Teilnehmer an der Studie dabei folgende Einschlusskriterien:

- männliche oder weibliche Gesunden-Probanden, weibliche Probanden im gebärfähigen Alter jedoch nur bei chirurgischer Sterilisation oder unter Anwendung von zwei sicheren Verhütungsmethoden,
- Keine Einnahmen von Medikamenten, die die Magen-Darm-Motilität beeinflusst (z.B. acetaminophen, erythromycin)
- Alter: 30-70 Jahre,
- HbA1c < 6%
- BMI < 40 kg/m²,
- Glukosekonzentration im Blut (nüchtern) zwischen 7,0 und 12,2 mmol/l (entsprechend 126-240 mg/dl) bei der Voruntersuchung sowie am ersten Tag der Studie,
- Vorlage der unterschriebenen Einverständniserklärung vor Studienbeginn,
- Fähigkeit, mit den Verantwortlichen zu kommunizieren sowie das Akzeptieren der Vorgaben für die Studie.

3.1.4 Ausschlusskriterien für Gesunde

- T1DM, Diabetes als ein Ergebnis einer Pankreasverletzung oder sekundäre Formen einer Diabetes (z. B. Cushing, Akromegalie)
- T2DM oder familiäre Vorbelastung von T2DM (Eltern oder Kinder), OGTT Verringerung der Plasma Glukose (PG) > 100mg/dl 120 min>140 mg/dl
 - Starke Begleiterscheinungen oder Komplikationen von Diabetes (z. B. Nephropathie, autonome Dysfunktion, Orthostasis).
 - Verringerung Triglyceride >5.1 mmol/L (>450 mg/dL) während er letzten 4 Wochen.
 - Einnahme von systemischen Steroiden und Schilddrüsenhormonen (unregelmäßige Dosierung).
 - Patienten, die frühere gastrointestinal Operationen hatten (z. B. partielle Darmresektion, partielle Magenresektion).
 - Klinische gastrointestinal Symptome (z. B. Blutungen).
 - Teilnahme an einer klinischen Untersuchung während er letzten 4 Wochen oder länger falls die lokale Versorgung es notwendig machte, vor Medikamenteneinnahme der Studie.
 - Blutspende oder Blutverlust von 400 mL oder mehr während der letzten 8 Wochen vor Medikamenteneinnahme der Studie.
 - Nicht unerhebliche Erkrankung innerhalb der letzten zwei Wochen vor Studienbeginn.
 - Auffälligkeiten im EKG oder familiäre Disposition für eine QT-Verlängerung.
 - Hinweise auf eine Arzneimittelunverträglichkeit oder atopische Allergien und eine bekannte Hypersensibilität gegenüber dem Studien-Medikament oder Medikamenten, die ähnlich wie das Studien-Medikament wirken.
- Chirurgische Eingriffe oder Erkrankungen, welche die Absorption, Verteilung, den Metabolismus oder die Ausscheidung von Medikamenten verändern und die den Studienteilnehmer gefährden könnten. Der Studienleiter musste folgende Faktoren in die Untersuchung miteinbeziehen und überwachen:
 - Frühere Symptome eines entzündlichen Darms, Gastritis, Geschwüre und gastrointestinal oder rektale Blutungen;
 - Frühere große Operationen wie Gastrektomie, Gastroenterostomie oder Darmresektion;
 - Frühere Symptome oder klinischer Befund einer Pankreasverletzung oder Pankreatitis;
 - Frühere Symptome oder das Vorhandensein einer Fehlfunktion der Nieren, die durch abnormale Kreatin- oder Harnstoffwerte belegt sind oder abnormale Harnstoffbestandteile (z. B. Albuminuria)

- Befund einer Harnabflussbehinderung oder andere Probleme der Blasenentleerung;
- Granulozyten $< 1.500/\mu\text{l}$, Thrombozyten $< 100.000/\mu\text{l}$ während des Screening und Baseline.Erhebung;
- Beeinträchtigungen des Immunsystems oder positiver HIV-Test;
- Hinweis auf eine Lebererkrankung, gemessen an den Parametern SGOT, SGPT, γ -GT, alkalische Phosphatase und Serumbilirubin, SGPT muss innerhalb des normalen Bereichs liegen and GGT und alkaline Phosphatase dürfen nicht zweifach über der oberen Grenze des normalen Bereichs liegen, und Serumbilirubin sollte den Wert $27 \mu\text{mol/L}$ (1.6 mg/dL) nicht überschreiten;
- Kein Drogen- oder Alkoholmissbrauch innerhalb der letzten zwölf Monate vor Studienbeginn durch Befunderhebung mittels Labortest während des Screening oder der Baseline Untersuchung.

3.1.5 Experimentelles Design

Die Studie wurde randomisiert und unter Placebokontrolle an allen Probanden in gleicher Weise durchgeführt. Alle 24 Probanden wurden an je drei Versuchstagen unterschiedlichen Behandlungen unterzogen (s. Tabelle 2). Dabei erhielt jeder Proband an zwei Tagen über eine Duodenalsonde ein Ernährungssubstrat (Glukose + Lipid: Siehe 2.13) Die duodenale Perfusion wurde zur Vermeidung der Interaktion mit der Magenentleerung benutzt, die durch GLP-1 beeinflusst werden kann. Darunter wurde ein identischer Stimulus zur Freisetzung der Inkretinhormone gewährleistet. Die duodenale Perfusion wurde so dosiert, dass sich eine Brennwertzufuhr von 2,03 kcal/min ergab. Parallel dazu wurde an einem der beiden Tage i.v. 600 pmol/kg/min Exendin (9-39), am anderen physiologische Kochsalzlösung intravenös verabreicht (s. Tabelle 1). Am dritten Tag wurde als Kontrolluntersuchung sowohl über die Duodenalsonde wie auch i.v. lediglich physiologische Kochsalzlösung (Placebo) verabreicht. 60 min nach Start der intravenösen Infusion (Exendin(9-39) oder NaCl 0.9%) und 30 min nach Start der duodenalen Mahlzeitperfusion wurde an allen Tagen durch intravenöse Infusion von Glukose 20% eine stabile Hyperglykämie von 180 mg/dl induziert und aufrecht erhalten (isoglykämischer hyperglykämischer Clamp). Zwischen den einzelnen Versuchstagen wurde jeweils eine Pause von mindestens zwei Tagen eingehalten. Die Versuche starteten jeweils morgens und dauerten etwa vier Stunden.

Tabelle 2: Behandlungen der Probanden an den drei Versuchstagen

Tag	Zufuhr über Intraduodenalsonde	i.v. Infusion
1	2,03 kcal/min	600 pmol/kg/min Exendin (9-39)
2	2,03 kcal/min	physiologische Kochsalzlösung
3	physiologische Kochsalzlösung	physiologische Kochsalzlösung

Die oben beschriebene Glukose-Clamp-Technik diente der Quantifizierung der Insulinsekretion. Die Insulin-bzw. C-Peptid-Differenz zwischen den Tagen mit duodenaler Mahlzeitperfusion (Tag 1 bzw. Tag 2) und dem isoglykämischen Kontrollexperiment unter Nüchternbedingungen (Tag 3) entspricht dem Inkretineffekt.

3.1.6 Praktische Versuchsdurchführung

Am Morgen eines jeden Versuchstages wurde für die Verabreichung von Exendin (9-39) und Glukoselösung jeweils eine Venenverweilkanüle in einer Ellenbogenvene angelegt.

Eine weitere Verweilkanüle, die der Blutentnahme diente, wurde in einer Handrückenvene des kontralateralen Arms angelegt. Zehn Minuten vor jeder Blutentnahme wurde jeweils die ‚Heated-Hand‘-Technik angewandt, um das Blut zu arterialisieren. Dabei wurde die Hand jeweils mit einem sensorkontrollierten Biothermostaten und einer mit diesem Sensor verbundenen Infrarotlampe auf exakt 40 °C erhitzt.

Die Vorgehensweise und der zeitliche Ablauf ist in Abbildung 1 grafisch dargestellt. Während der Versuche wurde der Blutglukosespiegel mit Hilfe der sog. Glukose-Clamp-Technik für 180 Minuten auf 10 mmol/l (entsprechend 180 mg/dl) eingestellt und konstant gehalten (s. Abbildung 1). Erreicht wurde dies durch eine Glukose-Grundinfusion, auf die eine variabel einstellbare Infusion einer 20%-igen Glukoselösung folgte. Die genaue Einstellung der Glukoseinfusionsrate wurde dabei mit Hilfe einer servokontrollierten negativen Feedback-Formel durchgeführt, wie es von DeFronzo et al.[34], beschrieben wurde. Der Proband war jeweils mit einer in der Geschwindigkeit regelbaren Infusionspumpe verbunden, an welcher die berechneten Infusionsraten eingestellt wurden. Als Berechnungsgrundlage dienten die Blutglukosekonzentrationen, welche im Abstand von jeweils fünf Minuten bestimmt wurden.

Jeder Versuchstag begann mit einer 30-minütigen nüchternen Phase (Minute -90 bis -60 in Abbildung 1). Die i.v. Verabreichung von Exendin (9-39) bzw. physiologischer Kochsalzlösung zur Kontrolle wurde eine Stunde vor der Fixierung der Glukosekonzentration auf 10 mmol/l gestartet (Minute -60 in Abbildung 1) und über 180 Minuten aufrecht erhalten.

Die Nahrungszufuhr über die Duodenalsonde begann eine halbe Stunde vor der Fixierung der Blutglukosewerte auf 10 mmol/l (Minute -30 in Abbildung 1) und wurde bis zum Ende des Untersuchungstages (180. Minute) aufrecht erhalten (s. Abbildung 1). Als intraduodenale Nahrung diente eine Lösung bestehend aus 235,6 ml Lipovenös (20 %) und 37,5 g Glukosemonohydrat, die auf 900 ml Leitungswasser aufgefüllt wurden. Diese Lösung verfügte über einen Brennwert von 0,675 kcal/ml und wurde mit einer Geschwindigkeit von 3ml/min (2,03kcal/min) infundiert. Die Positionierung der Sonde wurde zum Teil durch eine Röntgenaufnahme oder durch Manometrie kontrolliert (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Strahlenbelastung

Gesunde			Diabetiker		
Code	Geschlecht	Strahlenbelastung	Code	Geschlecht	Strahlenbelastung
4B	m	0.078 mSv	3A	w	0.312 mSv
5B	w	0.023 mSv	20A	w	0.005 mSv
6B	w	0.034 mSv	24A	w	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
8B	w	0.017 mSv	25A	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
13B	m	0.013 mSv	29A	w	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
18B	m	0.004 mSv	32A	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
21B	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>	33A	w	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
28B	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>	40A	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
34B	w	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>	49A	w	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
37B	w	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>	50A	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
42B	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>	51A	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
43B	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>	53A	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>
46B	m	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>			
47B	w	<i>durch Manometrie Kontrolliert</i>			

3.2 Probenaufbereitung und Analysen

Das Blut wurde in eisgekühlten EDTA-Monovetten gesammelt, welche 350 µl Trasylo1 (entsprechend 500 KIE/ml Blut) und 350 µl einer 3 mmol Diprotin A - Lösung zum Schutz des GIP enthielten. Die Röhrchen wurden sofort nach der Blutgewinnung 15 Minuten bei 5.000 Upm zentrifugiert, das Plasma in Eppendorf-Cups mit einem Volumen von 300 µl überführt und bis zur weiteren Aufbereitung für die einzelnen Messungen bei -20 °C eingelagert.

Die Blutglukosekonzentration des arterialisierten Blutes wurde mittels Glukoseoxidasemethode bestimmt. Dazu wurde ein Glukoseanalysator der Firma Bayer Vital GmbH, Contour®, Basel 4002, Switzerland.

Synthetisch in pharamzeutischer Qualität hergestelltes Exendin(9-39)amid wurde kommerziell von der Firma Clinalfa Products (Läufelfingen, Schweiz) erworben (Product Number C-S-280). Der Peptidgehalt von Exendin (9-39) betrug 100% bei einer Peptidreinheit von 99.5%.

Die Bestimmung der Immunreaktivität von bioaktivem GLP-1(7-36) wurde nach Alkoholextration des Plasmas durch einen Sandwich-Immuno-Lumineszenz-Assay (ILMA) unter Verwendung eines Capture-Antikörpers und eines Detectio-Antikörpers gemessen. Alle Antikörper stammen von BioPorto Diagnostics A/S, Grusbakken 8, DK-2820 Gentofte, Denmark.. Der Assay wurde von Gerald Spöttl, Medizinische Klinik II, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern, entwickelt. Er kreuzreagiert zu 1005 mit GLP-1(7-36)amid, nicht aber mit GLP-1(7-37)amid, GLP-1(9-37)amid, GLP-2(1-33)amid, GIP(3-42)amid, Glucagon(1-29)amid und Exendin(9-39)amid (jeweils nicht messbar). Die lower detection limit ist 0.4 pM mit einem linearen Anstieg der RLU (relative light units) von 0.4-50 pM.

Die Messung der Plasmaimmunoreaktivitäten von Insulin und C-Peptid erfolgten ebenfalls mit hoch-spezifischen und –sensitiven Sandwich-Immuno-Lumineszenz-Assay (ILMA). Kommerzielle Kits für Glukagon (Ria, Glukagon RIA Kit, human, Linco Research (Cat. # GL-32K)) und GIP (ELISA, Human GIP (total) ELISA Kit, Linco Research (Cat. # EZHGIP-54K)) wurden von der Firma Biotrend, Hamburg, Deutschland käuflich erworben wurden.

3.3. Auswertung und Statistik:

Alle Daten wurden berechnet als Mittelwert \pm SEM (SEM: Standardabweichung des Mittelwerts). Die Blutzuckerkonzentrationen und der Glukoseverbrauch wurden als absolute Werte berechnet, ebenso die Plasmahormonkonzentrationen vor Start des hyperglykämischen Clamp. Der Glukoseverbrauch („total glucose load“) ist die Summe der intestinalen Glukoseperfusion und der im hyperglykämischen Clamp intravenös applizierten Glukose.

Bei der Analyse der Plasmahormonkonzentrationen nach Start des hyperglykämischen Clamp wurde in Analogie zur „first-phase-Insulinsekretion“ und zur „second-phase-Insulinsekretion“ eine akute Reaktion (ARH: acute reaction to hyperglycemia) während der ersten 10min (0-10 min) der Hyperglykämie und eine anhaltende Reaktion (SRH) im steady state der Hyperglykämie von 60-120 min getrennt berechnet. Veränderungen der Plasmahormonkonzentrationen in diesen Perioden wurden entsprechend der Trapezregel als über die individuellen Basalwerte ansteigende AUC (area under the curve) berechnet. Basale Plasmakonzentrationen sind definiert als der Mittelwert der Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt -70 und -60 min des jeweiligen Untersuchungstags.

Der Inkretineffekt mit und ohne Ex-9 wurde – getrennt für Insulin und C-Peptid – als Differenz zwischen den AUC unter duodенaler Mahlzeitperfusion und unter duodенaler Perfusion mit 0.154 M NaCl (isoglykämische Kontrolle) berechnet. Unter den isoglykämischen Bedingungen des hyperglykämischen Clamp entspricht er somit der durch die Freisetzung der Inkretinhormone zusätzlich verursachten Insulinsekretion.

Als Statistik-Software wurde SigmaStat für Windows, Version 2.03, eingesetzt (SPSS inc.). Die Normalverteilung der Daten wurde zunächst mit dem Kolmogoroff-Smirnov-Test überprüft. Effekte von Ex-9 sowie Unterschiede zwischen Gesunden und Diabetikern wurden untersucht mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse für wiederholte Messungen und ein-Faktor-Wiederholung (2way RM ANOVA, one factor repetition). Die unabhängigen Faktoren waren die Kombination aus intravenöser Infusion und duodенaler Perfusion (duodенale Mahlzeit/intravenöses 0.154 M NaCl oder duodенale Mahlzeit/intravenöses Ex-9 oder duodенales 0.154 M NaCl/ intravenöses 0.154 M NaCl = isoglykämische Kontrolle) sowie der Diabetes-Status (Gesunde oder T2DM). Wenn der ANOVA einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Infusion/Perfusion beschrieb, wurden Subgruppen-Unterschiede mit dem Student-Newman-Keuls-multicomparison-Test als posthoc-Test analysiert. Der 2way ANOVA

erlaubt eine Subgruppenanalyse unter Berücksichtigung einer signifikanten Interaktion zwischen den Faktoren. Wenn der ANOVA eine signifikante Interaktion zwischen den beiden Faktoren zeigte – das bedeutet: Effekte der Infusion sind abhängig vom Diabetes-Status -, wurden Subgruppen-Unterschiede ebenfalls mit dem Student-Newman-Keuls-Test analysiert (all-pairwise comparison).

Unterschiede waren bei $P < 0.05$ signifikant.

Die Daten vor Start des hyperglykämischen Clamp, während der akuten Hyperglykämieperiode (ARH) und der steady-state Hyperglykämie (SRH) sind inklusive der o.g. statistische Analyse in den Tabellen 4, 5 und 6 zusammen gestellt. Allen im Text genannten Unterschieden sowie allen in den Graphiken erkennbaren Unterschiede liegt die in diesen Tabellen gezeigte statistische Analyse zugrunde.

4. Ergebnisse

Zwölf gesunde Probanden und 12 Probanden mit T2DM wurden an drei Versuchstagen Untersuchungen unterzogen, um den Anteil von endogenem GLP-1 am Inkretineffekt zu untersuchen. Der Inkretineffekt ist die Differenz zwischen der postprandialen Insulinsekretion und der isoglykämischen nüchternen Insulinsekretion. Die Stimulation von GLP-1 und GIP erfolgte an zwei Tagen durch eine duodenale Nährstoffperfusion (2.03 kcal/min), die Wirkung auf die Insulinsekretion wurde unter einer Hyperglykämie von 180 mg/dl untersucht (hyperglykämischer Clamp): siehe Abbildung 1 für das Versuchsdesign. An einem dieser Tage wurde der GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39), an dem anderen NaCl 0.9% intravenös verabreicht. Ein dritter Tag, an dem statt Nahrung NaCl 0.9% duodenal perfundiert wurde, diente als Kontrolle der allein durch Hyperglykämie stimulierten Insulinsekretion, um den Inkretineffekt zu errechnen.

Zwei gesunde Probanden schieden nach dem ersten Versuchstag aus wegen Intoleranz der nasoduodenalen Sonde. Die übrigen Probanden absolvierten alle Untersuchungen. Exendin(9-39) wurde gut und nebenwirkungslos vertragen. Die korrekte Lage der nasoduodenalen Sonde wurde überwiegend manometrisch anhand des typischen Musters der antroduodenalen Motilität kontrolliert (die Sonde diente gleichzeitig als Manometriesonde) ; nur zu Beginn der Studie wurde die Sondenlage zusätzlich unter Durchleuchtung kontrolliert. Die damit verbundene Strahlenbelastung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Diese Daten wurden dem Bundesamt für Strahlenschutz mitgeteilt.

4.1. Wirkung von Exendin(9-39) während der Nüchternperiode und während duodенaler Nährstoffperfusion (vor hyperglykämischem Clamp)

Tabelle 4 zeigt die Daten sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse.

Die Gesunden begannen die Untersuchungen normoglykämisch (Blutglukosekonzentration 84 ± 3 mg/dl), die Patienten mit T2DM zeigten hingegen erwartungsgemäß eine Nüchternhyperglykämie (Blutglukosekonzentration 122 ± 6 mg/dl). Ebenso waren die basalen Plasmakonzentrationen von Insulin und C-Peptid bei den Diabetikern im Vergleich zu den Gesunden signifikant erhöht. Exendin(9-39) steigerte signifikant die Nüchternglukose sowohl bei den Gesunden als auch bei den T2DM um etwa 7 mg/dl bis 11 mg/dl. Gleichzeitig steigerte Exendin(9-39) die Plasmaglukagonkonzentration in Gesunden und Diabetikern. Die nüchternen Plasmakonzentrationen von Insulin und C-Peptid blieben bei den Gesunden unter Exendin(9-39) unverändert, bei den T2DM wurde Insulin tendentiell, aber nicht signifikant erniedrigt, die Plasmakonzentration von C-Peptid nahm hingegen signifikant ab.

Die duodenale Mahlzeitperfusion steigerte binnen 30 min signifikant die Blutglukosekonzentration sowie die Plasmakonzentration von Insulin und C-Peptid sowohl bei den Gesunden als auch bei den Diabetikern. Die Plasmakonzentration von Glukagon blieb bei den Gesunden unbeeinflusst von der duodenalen Mahlzeit, stieg hingegen bei den Diabetikern nicht-signifikant an. Unter duodенaler Mahlzeitstimulation waren die Glukagon-Spiegel bei den Diabetikern jedoch signifikant höher als bei den Gesunden.

Die Nüchternspiegel von GLP-1 und GIP waren bei Gesunden und Diabetikern gleich. Als Prämisse vorliegender Arbeit wurde die Freisetzung von GLP-1 und GIP durch die duodenale Mahlzeitperfusion deutlich gesteigert: die Plasmakonzentration von GLP-1 stieg sowohl bei den Gesunden als auch bei den Diabetikern etwa um den Faktor 5, die von GIP etwa um das sechsfache. Während der kurzen Phase der Exendin(9-39)-Aufsättigung und der 30minütigen Nährstoffperfusionsphase unterschied sich die Dynamik der GIP und GLP-1-Plasmaspiegel nicht zwischen Diabetikern und Gesunden. Unter Exendin(9-39) waren die GLP-1-Plasmaspiegel bereits in den ersten 30 min der Nährstoffperfusion bei Patienten und Gesunden höher als unter NaCl 0.9%, der Unterschied war aber nicht signifikant.

Tab 4. : Wirkungen von intravenösem Exendin(9-39) (Ex-9) und der duodenalen Mahlzeit auf die Blutglukose- und Plasmahormonkonzentrationen in Gesunden und Patienten mit T2DM vor Initiierung des hyperglykämischen Clamp

	Nüchtern		Nüchtern		Duodenale Perfusion (Mahlzeit)	
	basal		intravenöse Infusion (NaCl 0.9% oder Ex-9)			
	-70/-60 min		-30 min		0 min	
	NaCl 0.9%	NaCl 0.9% (Ex-9)	NaCl 0.9%	Ex-9	NaCl 0.9%	Ex-9
Gesunde Probanden						
Blutglukose (mg/dl)	84±3	85±2	85±3	92±3 *	92±3 §	98±3 §
Insulin (µU/ml)	9.1±2.0	10.8±1.6	8.8±2.0	10.0±1.8	16.1±2.0 §	13.7±2.3 §
C-peptide (pg/ml)	1.9±0.2	1.9±0.2	1.9±0.2	1.6±0.2	3.2±0.3 §	2.7±0.4 §
Glukagon (pg/ml)	38.7±7.5	33.2±6.6	33.5±8.6	41.4±7.3 *	35.9±7.2	37.3±4.9
GLP-1 (pmol/l)	0.29±0.06	0.3±0.06	0.53±0.1	0.45±0.08	2.5±0.6 §	3.0±0.8 §
GIP (pg/ml)	27±4	26±3	23±5	25±3	141±18 §	146±22 §
T2DM						
Blutglukose (mg/dl)	122±6 #	122±5 #	118±6 #	129±5 *#	126±6 #§	145±4 *#§
Insulin (µU/ml)	4.9±1.9 #	3.7±2.4 #	5.3±2.2 #	2.5±1.4 #	10.1±3.1 §	11.5±5.0 §
C-peptide (pg/ml)	4.2±0.5 #	4.3±0.8 #	4.2±0.6 #	3.3±0.5 *#	5.0±0.7 §	5.7±1.7 §
Glukagon (pg/ml)	44±6	46±7	47±5	60±7 *	54±7 #	64±7 #
GLP-1 (pmol/l)	0.22±0.05	0.3±0.07	0.7±0.3	0.9±0.2	2.4±0.7 §	4.0±1.3 §
GIP (pg/ml)	24±4	26±6	24±5	23±6	166±34 §	221±50 §

Mittelwert ± SEM der absoluten Daten von 12 Gesunden und 12 Patienten mit T2DM.

ANOVA (siehe 2.3 für Erläuterungen):

*:P<0.05: signifikante Unterschiede zwischen NaCl 0.9% und Ex-9 nach Berücksichtigung von Effekten des Diabetes-Status

#:P<0.05: signifikante Unterschiede zwischen T2DM und Gesunden nach Berücksichtigung von Effekten der intravenösen Infusion.

§:P<0.05: signifikante Unterschiede zwischen duodener Mahlzeit und duodenalem NaCl 0.9% nach Berücksichtigung von Effekten der intravenösen Infusion

4.2. Wirkung von Exendin(9-39) während der duodenalen Nährstoffperfusion unter isoglykämischer Hyperglykämie

In Analogie zur first-phase-Insulinsekretion, einer frühen schnellen Phase der Insulinsekretion nach akuter Glukosebelastung, und zur second phase Insulinsekretion, die die Insulinsekretion unter stabiler Hyperglykämie im steady state beschreibt, wurde in vorliegender Arbeit die Periode des Hyperglykämischen Clamp in zwei Phasen unterteilt:

ARH (Acute Response to Hyperglycemia) beschreibt die akute Phase der isoglykämischen Hyperglykämie während der ersten 10 Minuten des Clamp.

SRH (Sustained Response to Hyperglycemia) beschreibt die steady-state-Phase der isoglykämischen Hyperglykämie während der zweiten Stunde (60 bis 120 Minuten) des Clamp.

Tabelle 5 (ARH) und 6 (SRH) zeigen die entsprechenden Daten sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse.

4.2.1 Blutglukosekonzentration und Glukoseverbrauch

Nach Start des Glukose-Clamp mit Zielkonzentration 180 mg/dl via Glukosebolus kam es unter den drei experimentellen Bedingungen (duodenale Mahlzeit mit NaCl 0.9%, duodenale Mahlzeit mit Exendin(9-39), isoglykämische Kontrolle) während der ARH (Tab. 5) zu einem schnellen Anstieg der Blutglukosekonzentration auf im Mittel 194 ± 4 mg/dl, 193 ± 3 mg/dl und 190 ± 4 mg/dl bei den Gesunden und auf 192 ± 3 mg/dl, 191 ± 2 mg/dl und 191 ± 4 mg/dl bei den T2DM. Im steady state der Hyperglykämie (SRH, Tab. 6) lagen die Blutglukosekonzentrationen bei 178 ± 1.2 mg/dl, 177 ± 0.5 mg/dl und 178 ± 0.4 mg/dl bei den Gesunden und bei 180 ± 1 mg/dl, 187 ± 2.7 mg/dl und 181 ± 0.8 mg/dl bei den T2DM. Abgesehen von einer gering, aber signifikant erhöhten Blutglukose bei den T2DM während SRH unter Exendin(9-39) lagen somit identische Bedingungen bei Diabetikern und Gesunden unter allen experimentellen Bedingungen der Studie vor.

Der Glukoseverbrauch, d.i. die Menge an intravenöser Glukose, die erforderlich war, zur o.g. stabilen Hyperglykämie war bei den Gesunden während der ARH unter duodenaler Mahlzeitperfusion gleich zu dem isoglykämischen Kontrollexperiment ohne duodenale Mahlzeit und im steady state (SRH) sogar doppelt so hoch (Tab. 5 und 6). Dies verdeutlicht die Konsequenz des Inkretineffekts: unter duodenaler Mahlzeit- und somit auch Kohlenhydratgabe ist die Menge der zur Isoglykämie erforderlichen intravenösen Glukose gleich oder deutlich höher als ohne Mahlzeit, obwohl die Mahlzeit selbst schon Kohlenhydrate enthält. Im

Vergleich zu den Gesunden war bei den Patienten mit T2DM der Bedarf an intravenöser Glukose erwartungsgemäß deutlich niedriger. Im Unterschied zu den Gesunden wurde bei den T2DM während der ARH weniger Glukose benötigt mit duodener Mahlzeit als in der isoglykämischen Nüchtern-Kontrolle. Während SRH lag der Glukoseverbrauch bei den T2DM zwar unter Mahlzeitperfusion zwar noch höher als in der isoglykämischen Kontrolle, der Unterschied war aber bei weitem nicht so groß wie bei den Gesunden. Somit gibt bereits der Glukoseverbrauch während der Hyperglykämie einen Hinweis auf den gestörten Inkretineffekt bei Patienten mit T2DM.

Exendin(9-39) als GLP-1-Rezeptorantagonist reduzierte den Glukoseverbrauch sowohl bei Gesunden als auch bei Diabetikern. Endogenes GLP-1 interagiert also sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit T2DM mit dem isoglykämischen Glukoseverbrauch als indirektem Maßstab für den Inkretineffekt.

Tab. 5. : Wirkungen von intravenösem Exendin(9-39) (Ex-9) auf die postprandialen Blutglukose- und Plasmahormonkonzentrationen und auf den Inkretineffekt während der **akuten Phase der isoglykämischen Hyperglykämie (ARH)** in Gesunden und Patienten mit T2DM

	Duodenale Mahlzeit-Perfusion		Isoglykämische Kontrolle:
	intravenöses NaCl 0.9%	intravenöses Ex-9	Duodenale NaCl 0.9% Perfusion
			intravenöses NaCl 0.9%
Gesunde Probanden			
Blutglukose (mg/dl)	194 ± 4	193 ± 3	190 ± 4
Glukoseverbrauch (mg/kg)	211 ± 9	188 ± 7 *	204 ± 6
Insulin (µU/ml·min)	599 ± 158 §	383 ± 82 *§	255 ± 81
C-Peptid (pg/ml·min)	85.2 ± 19.4 §	53.9 ± 10.1 *§	43.8 ± 11.0
Inkretin-Effekt:			
Insulin (µU/ml·min)	345 ± 101	128 ± 62 *	-
C-Peptid (pg/ml·min)	41.5 ± 15.3	10.2 ± 9.0	-
T2DM			
Blutglukose (mg/dl)	192 ± 3	191 ± 2	191 ± 4
Glukoseverbrauch (mg/kg)	129 ± 13 §#	86 ± 10 *§#	148 ± 13 #
Insulin (µU/ml·min)	145 ± 52 §#	97.5 ± 35.8 *§#	18.2 ± 17.9 #
C-Peptid (pg/ml·min)	23.3 ± 10.0 §#	17.3 ± 8.5 *§#	1.6 ± 3.1 #
Inkretin-Effekt:			
Insulin (µU/ml·min)	127 ± 44	79 ± 28 *	-
C-Peptid (pg/ml·min)	21.7 ± 7.9	15.7 ± 6.7 *	-

Mittelwert ± SEM während der ersten 10 Minuten des hyperglykämischen Clamp bei 12 gesunden Probanden und 12 Patienten mit T2DM. Blutglukosekonzentration und Glukoseverbrauch sind als absolute Mittelwerte angegeben, die Plasmahormonkonzentrationen als über die nüchtern basalen Werte ansteigende AUC. Der Inkretineffekt ist berechnet als die Differenz zum isoglykämischen Kontrollexperiment. 2 way RM ANOVA (siehe 2.3 für Erläuterungen):

*:P<0.05: signifikanter Unterschied verglichen mit intravenöser NaCl 0.9%/duodener Mahlzeit

§:P<0.05: signifikanter Unterschied verglichen mit dem isoglykämischen Kontrollexperiment

#:P<0.05: signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern und Gesunden

Tab. 6.: Wirkungen von intravenösem Exendin(9-39) (Ex-9) auf die postprandialen Blutglukose- und Plasmahormonkonzentrationen und auf den Inkretineffekt im **steady-state** der **isoglykämischen Hyperglykämie (SRH)** in Gesunden und Patienten mit T2DM

	Duodenale Mahlzeit-Perfusion		Isoglykämische Kontrolle:
	intravenöses NaCl 0.9%	intravenöses Ex-9	Duodenale NaCl 0.9% Perfusion
			intravenöses NaCl 0.9%
Gesunde Probanden			
Blutglukose (mg/dl)	178 ± 1.2	177 ± 0.5	178 ± 0.4
Glukoseverbrauch (mg/kg)	770 ± 98 §	675 ± 50 §	343 4
Insulin (mU/ml·min)	6.4 ± 1.0 §	3.5 ± 0.4 *§	1.3 ± 0.5
C-Peptid (ng/ml·min)	1.9 ± 0.4 §	0.9 ± 0.1 *§	0.5 ± 0.1
Glukagon (pg/ml·min)	-837 ± 361 §	-224 ± 283 *§	-1091 ± 220
GLP-1 (pM·min)	83.3 ± 24.9 §	113.7 ± 30.0 *§	-8.2 ± 5.2
GIP (ng/ml·min)	12.6 ± 1.6 §	12.8 ± 1.8 §	-0.8 ± 0.1
Inkretin-Effect:			
Insulin (mU/ml·min)	5.1 ± 0.8	2.1 ± 0.4 *	-
C-Peptid (ng/ml·min)	1.3 ± 0.3	0.4 ± 0.1 *	-
T2DM			
Blutglukose (mg/dl)	180 ± 1.0	187 ± 2.7 *§#	181 ± 0.8
Glukoseverbrauch (mg/kg)	180 ± 26 #	121 ± 14 #	110 ± 11 #
Insulin (mU/ml·min)	2.5 ± 0.8 §#	1.3 ± 0.4 *§#	0.5 ± 0.2
C-Peptid (ng/ml·min)	0.7 ± 0.2 §#	0.4 ± 0.1 *§	0.2 ± 0.08
Glukagon (pg/ml·min)	54 ± 216 §#	942 ± 213 *§#	-838 ± 220 #
GLP-1 (pM·min)	128 ± 24 §	204 ± 38 *§	10.2 ± 9.3
GIP (ng/ml·min)	13.8 ± 2.3 §	12.1 ± 1.7 §	-0.5 ± 0.2
Inkretin-Effect:			
Insulin (mU/ml·min)	2.0 ± 0.7 #	0.8 ± 0.2 *	-
C-Peptid (ng/ml·min)	0.5 ± 0.1 #	0.2 ± 0.06 *	-

Mittelwert ± SEM während der ersten 10 Minuten des hyperglykämischen Clamp bei 12 Gesunden und 12 Patienten mit T2DM. Blutglukosekonzentration und Glukoseverbrauch sind als absolute Mittelwerte angeben, die Plasmahormonkonzentrationen als über die nüchtern basalen Werte ansteigende AUC. Der Inkretineffekt ist berechnet als die Differenz zum isoglykämischen Kontrollexperiment. 2 way RM ANOVA (siehe 2.3 für Erläuterungen):

*:P<0.05: signifikanter Unterschied verglichen mit intravenöser NaCl 0.9%/duodenaler Mahlzeit;
 §:P<0.05: signifikanter Unterschied verglichen mit dem isoglykämischen Kontrollexperiment
 #:P<0.05: signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern und Gesunden

4.2.2 Insulin, C-Peptid und Inkretineffekt

4.2.2.1 ARH: akute Insulin response auf Hyperglykämie

Tabelle 5 zeigt die entsprechenden Daten sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen den zeitlichen Verlauf der Plasmakonzentrationen von Insulin und C-Peptid.

Nach Initiierung des hyperglykämischen Clamp mit Gabe des Glukosebolus kam es bei den Gesunden zu einem raschen und temporären Anstieg der Plasmainsulin- und C-Peptidkonzentration, die etwa 10 min andauerte, entsprechend einer first-phase der Insulinsekretion. Diese „acute insulin response to hyperglycemia“ (ARH) war bei den Patienten mit T2DM allenfalls angedeutet oder fehlte.

Sowohl bei den Gesunden als auch den Diabetikern war die ARH von Insulin und C-Peptid signifikant und deutlich stärker ausgeprägt unter duodенaler Mahlzeitperfusion als in der isoglykämischen Kontrolle unter Nüchternbedingungen. Die resultierende Differenz entspricht dem Inkretineffekt (Tab. 5). Bei den Gesunden betrug der Inkretineffekt basierend auf Insulin 345 ± 101 $\mu\text{U/ml min}$, basierend auf C-Peptid 54.5 ± 15.3 pg/ml min . Dies entsprach 58% bzw. 49% der postprandialen Insulinsekretion. Bei den Patienten mit T2DM war der Inkretineffekt um mehr als die Hälfte niedriger als bei den Gesunden und betrug basierend auf Insulin 127 ± 44 $\mu\text{U/ml min}$, basierend auf C-Peptid 21.7 ± 7.9 pg/ml min . Der relative Anteil des Inkretineffekts an der postprandialen Insulinsekretion war dabei bei den Diabetikern sogar höher als bei den Gesunden und entsprach 88% (Insulin) bzw. 94% (C-Peptid) der postprandialen Insulinsekretion.

Der GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39) reduzierte die postprandialen Plasmakonzentrationen von Insulin und C-Peptid während der ARH sehr deutlich und signifikant sowohl bei Gesunden als auch bei T2DM (Tab. 5). Jedoch waren selbst unter GLP-1-Rezeptorblockade die postprandialen Plasmainsulin- und C-Peptid-Konzentrationen signifikant höher als unter der isoglykämischen Nüchtern-Kontrolle, und zwar sowohl bei Gesunden als auch bei den Patienten mit T2DM. Der absolute Inkretineffekt wurde durch Exendin(9-39) bei den Gesunden von 345 ± 101 auf 128 ± 62 $\mu\text{U/ml min}$ und bei den Diabetikern von 127 ± 44 auf 79 ± 28 $\mu\text{U/ml min}$ reduziert (jeweils $p < 0.05$), war also auch bei den Diabetikern unter Exendin(9-39) noch deutlich nachweisbar. Entsprechendes fand sich für C-Peptid (Tab. 5). Der prozentuale Anteil des Inkretineffekts an der gesamten postprandialen Insulinsekretion unter Exendin(9-39) betrug bei den Gesunden 33% (Insulin) bzw. 19% (C-Peptid), bei den Diabetikern 81% (Insulin) bzw. 91% (C-Peptid).

Setzt man den absoluten Inkretineffekt unter NaCl 0.9% und Exendin(9-39) in Relation zur gesamten postprandialen Insulinsekretion unter NaCl 0.9%, dann betrug der GLP-1-unabhängige Inkretineffekt bei den Gesunden 21% (Insulin, Gesamt-Inkretineffekt 58%) bzw. 12% (C-Peptid, Gesamt-Inkretineffekt 49%). Bei den Diabetikern war das 55% (Insulin, Gesamt-Inkretineffekt 88%) bzw. 67% (C-Peptid, Gesamt-Inkretineffekt 94%).

Dies bedeutet, dass Patienten mit T2DM zwar eine im Vergleich zu Gesunden deutlich reduzierte akute Insulin-Antwort auf Glukose haben; diese ist aber sogar stärker geprägt vom Inkretineffekt als bei den Gesunden und selbst nach GLP-1-Rezeptorblockade noch deutlich nachweisbar, also nur teilweise abhängig von GLP-1.

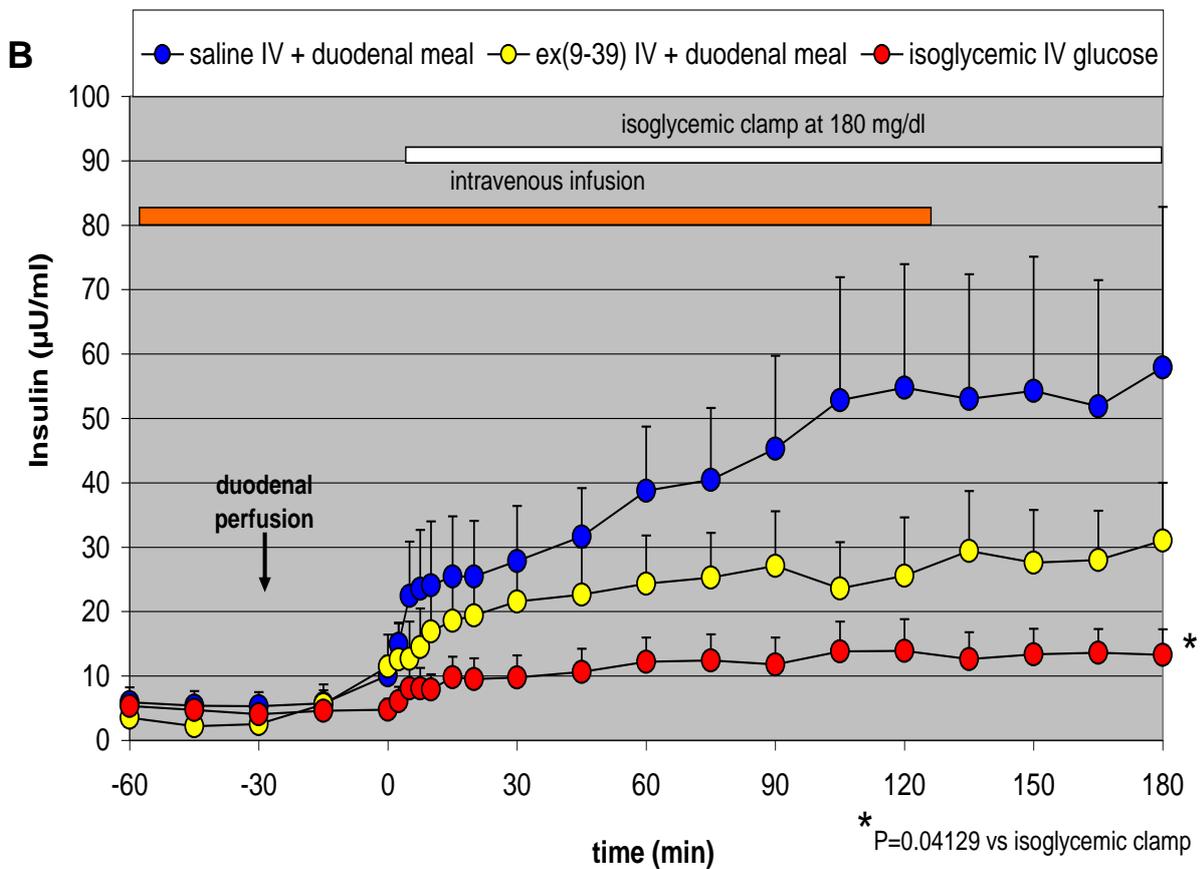
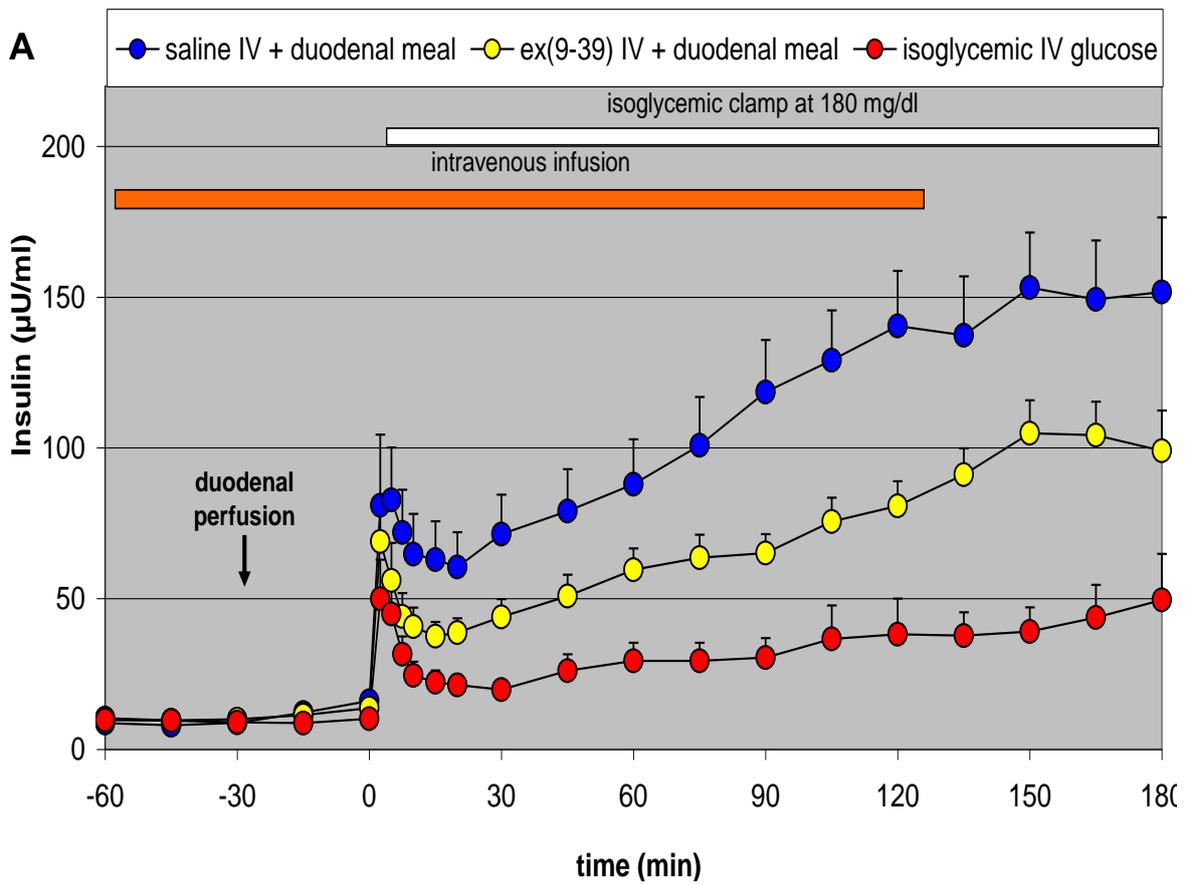


Abbildung 2: Plasmakonzentration von **Insulin** in 12 **gesunden Probanden (A)** und 12 **Patienten mit T2DM (B)**, Mittelwert \pm SEM

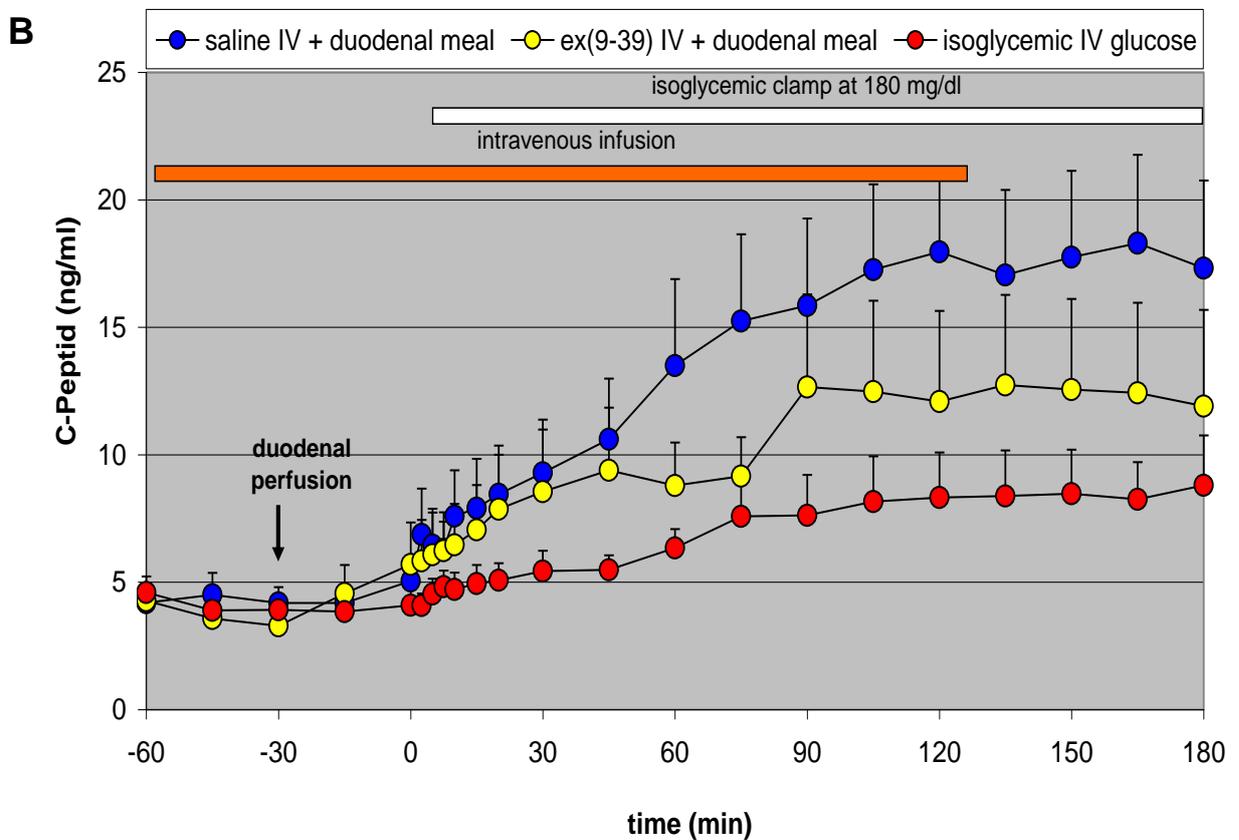
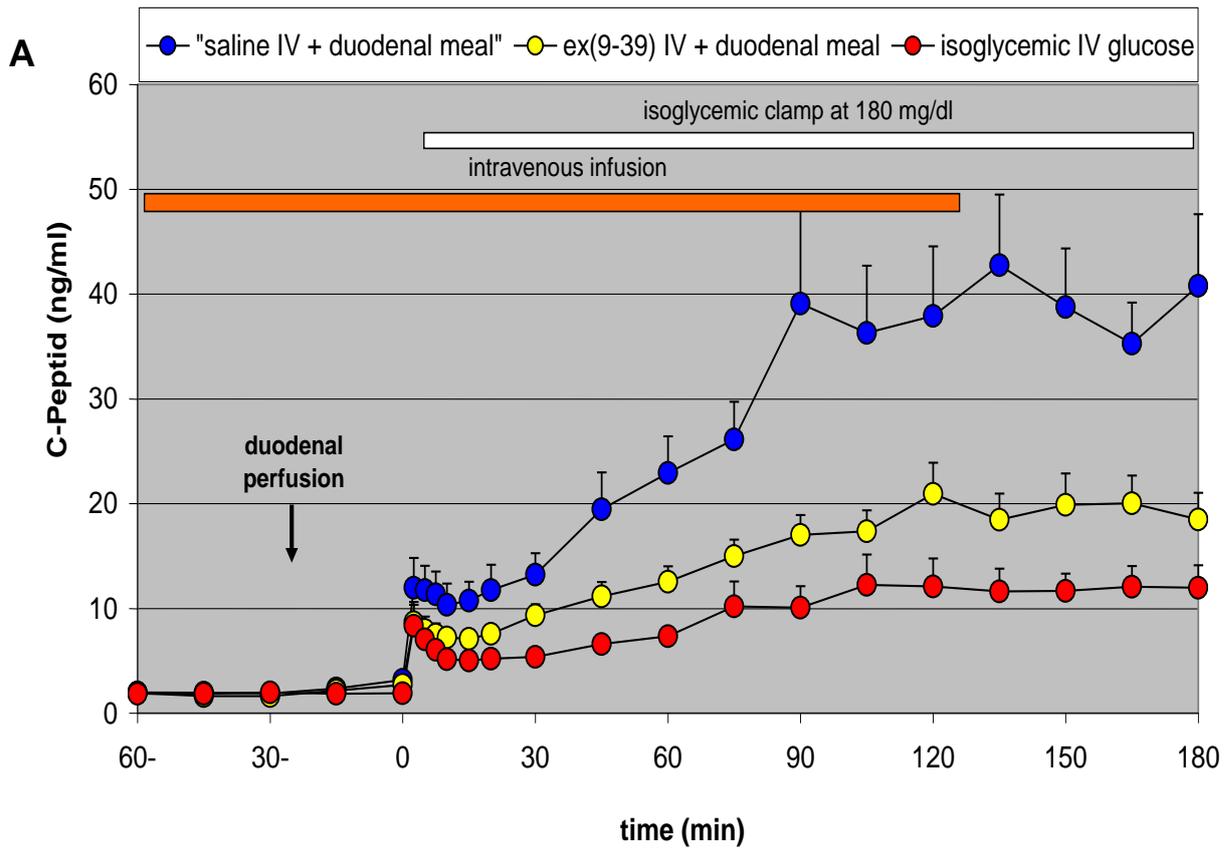


Abbildung 3: Plasmakonzentration von **C-Peptid** in 12 **gesunden Probanden (A)** und 12 **Patienten mit T2DM (B)**, Mittelwert \pm SEM

4.2.2.1 SRH: Insulin response im steady state der Hyperglykämie

Tabelle 6 und die Abbildung 2 und 3 zeigen die entsprechenden Daten sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse. SRH = sustained response to hyperglycemia = Insulin- und C-Peptid-Plasmakonzentrationen während des steady state der Hyperglykämie (60-120min nach Start des Clamp), was der „second-phase“ der Insulinsekretion entspricht.

Die postprandialen Plasmakonzentrationen von Insulin und C-Peptid während der SRH waren erwartungsgemäß bei den Diabetikern deutlich niedriger als bei den Gesunden (Tab. 6). Sowohl bei Diabetikern als auch bei Gesunden waren Insulin und C-Peptid unter duodener Mahlzeitperfusion deutlich höher als unter der entsprechenden isoglykämischen Nüchtern-Kontrolle. Die Differenz entspricht dem Inkretineffekt (Tab. 6). Wie die Gesamt-Insulinsekretion, so war auch der Inkretineffekt - also die quantitative Insulinsekretion bedingt durch gastrointestinale Nährstoffe - signifikant größer bei den Gesunden als bei den Diabetikern.

Bei den Gesunden betrug der Inkretineffekt basierend auf Insulin 5.1 ± 0.8 mU/ml min, basierend auf C-Peptid 1.3 ± 0.3 ng/ml min. Dies entsprach 79% bzw. 72% der postprandialen Insulinsekretion. Bei den Patienten mit T2DM war der Inkretineffekt um mehr als die Hälfte niedriger als bei den Gesunden und betrug basierend auf Insulin 2.0 ± 0.7 mU/ml min, basierend auf C-Peptid 0.5 ± 0.1 ng/ml min. Der relative Anteil des Inkretineffekts an der postprandialen SRH-Insulinsekretion war dabei bei den Diabetikern gleich dem der Gesunden und entsprach 82% (Insulin) bzw. 72% (C-Peptid) der postprandialen Insulinsekretion.

Der GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39) reduzierte die postprandialen Plasmakonzentrationen von Insulin und C-Peptid während der SRH sehr deutlich und signifikant sowohl bei Gesunden als auch bei T2DM (Tab. 6). Jedoch waren selbst unter GLP-1-Rezeptorblockade die postprandialen Plasmainsulin- und C-Peptid-Konzentrationen signifikant höher als unter der isoglykämischen Nüchtern-Kontrolle, und zwar sowohl bei Gesunden als auch bei den Patienten mit T2DM. Der absolute Inkretineffekt während SRH wurde durch Exendin(9-39) bei den Gesunden von 5.1 ± 0.8 auf 2.1 ± 0.4 mU/ml min und bei den Diabetikern von 2.0 ± 0.7 auf 0.8 ± 0.2 mU/ml min reduziert (jeweils $p < 0.05$), war also auch bei den Diabetikern unter Exendin(9-39) noch deutlich nachweisbar. Entsprechendes fand sich für C-Peptid (Tab. 6). Der prozentuale Anteil des Inkretineffekts an der gesamten postprandialen Insulinsekretion unter Exendin(9-39) betrug bei den Gesunden 62% (Insulin) bzw. 41% (C-Peptid), bei den Diabetikern 65% (Insulin) bzw. 51% (C-Peptid).

Setzt man den absoluten Inkretineffekt unter NaCl 0.9% und Exendin(9-39) in Relation zur gesamten postprandialen Insulinsekretion unter NaCl 0.9%, dann betrug der GLP-1-

unabhängige Inkretineffekt bei den Gesunden 34% (Insulin, Gesamt-Inkretineffekt 79%) bzw. 19% (C-Peptid, Gesamt-Inkretineffekt 72%). Bei den Diabetikern war das 34% (Insulin, Gesamt-Inkretineffekt 82%) bzw. 29% (C-Peptid, Gesamt-Inkretineffekt 72%).

Dies bedeutet, dass Patienten mit T2DM zwar eine im Vergleich zu Gesunden deutlich reduzierte second-phase (SRH) Insulin-Antwort auf Hyperglykämie zeigen; diese ist aber nahezu dentisch wie bei Gesunden stark geprägt vom Inkretineffekt und selbst nach GLP-1-Blockade noch deutlich nachweisbar, also nur teilweise abhängig von GLP-1.

Abbildung 4 zeigt den Zeitverlauf des Inkretineffekts bei Gesunden und Diabetikern mit und ohne GLP-1-Rezeptorblockade im Vergleich zum gesamten postprandialen Insulinoutput.

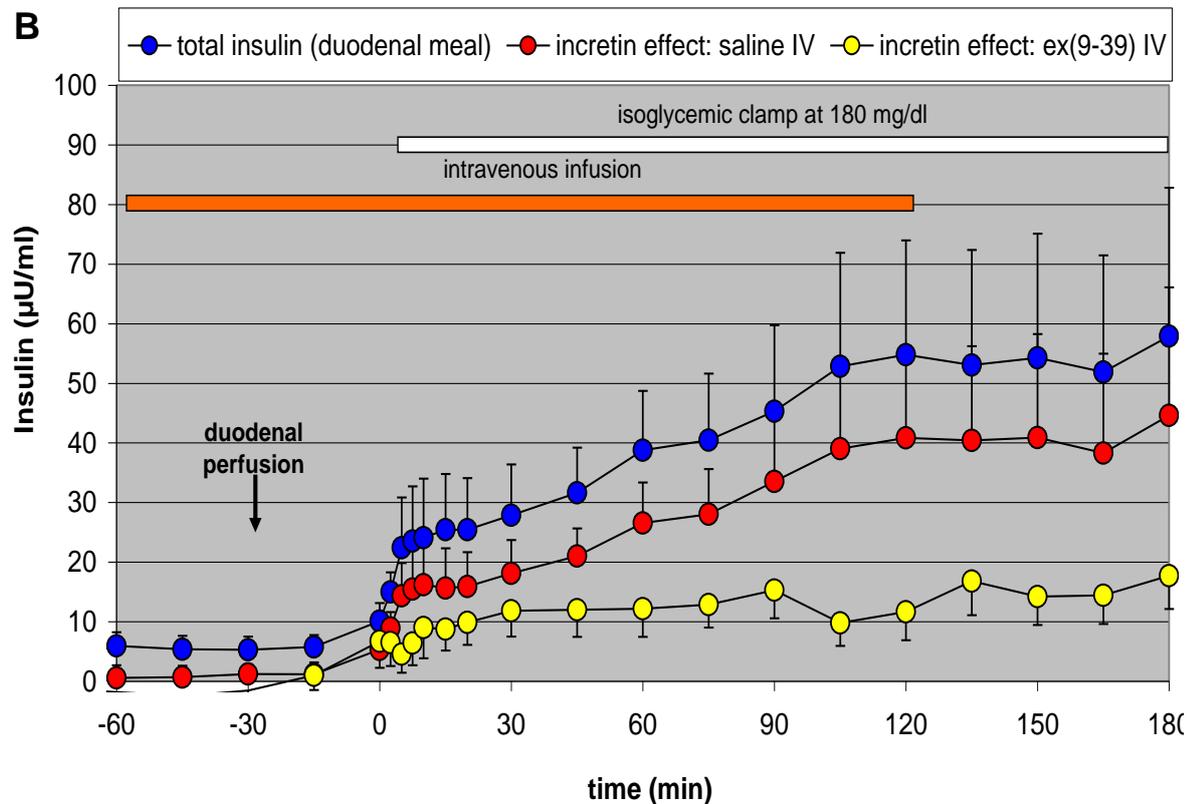
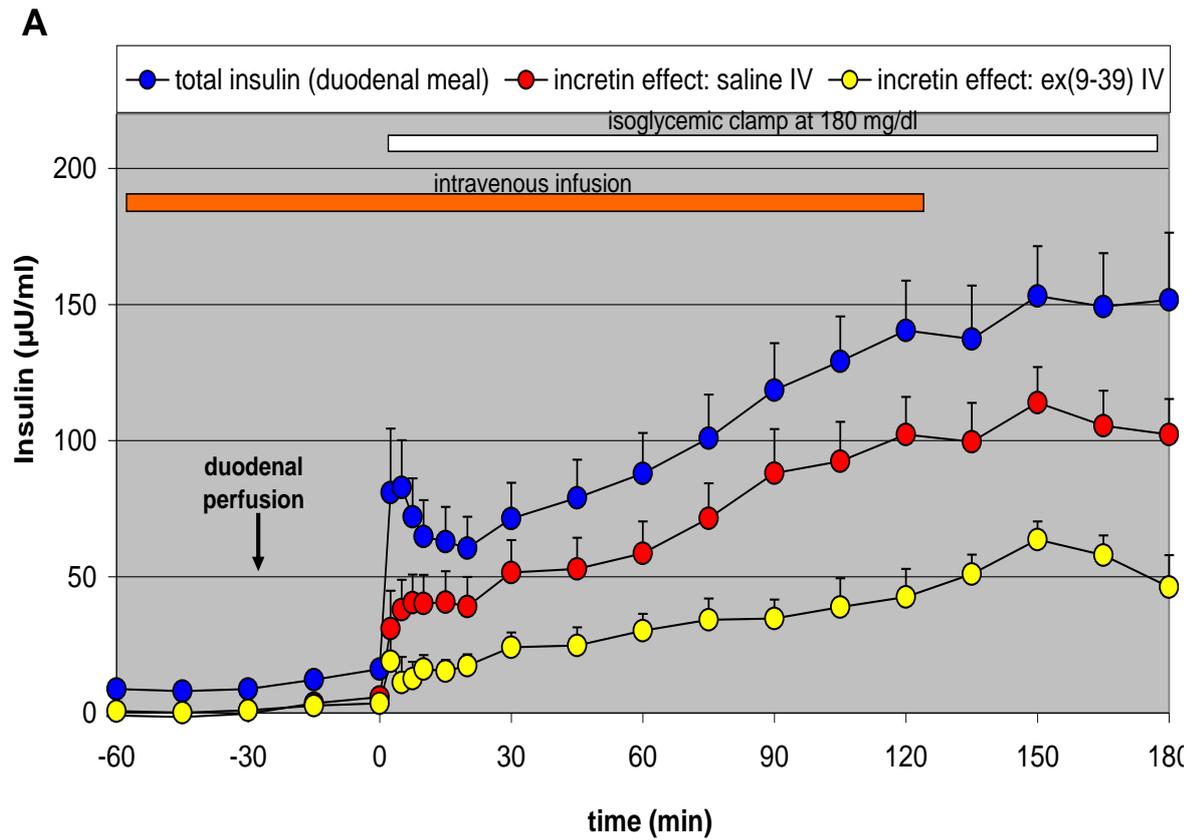


Abbildung 4: Inkretin-Effekt: Plasmakonzentration von Insulin in 12 gesunden Probanden (A) und 12 Patienten mit T2DM (B): die gesamte postprandiale Insulinsekretion unter duodенalер Mahlzeit (blau), der gesamte Inkretineffekt (rot) sowie der Inkretineffekt unter GLP-1-Rezeptorblockade (gelb) im Zeitverlauf. Mittelwert \pm SEM

4.2.3 Plasmakonzentrationen von Glukagon

Tabelle 6 und die Abbildung 5 zeigen die entsprechenden Daten sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse. SRH = sustained response to hyperglycemia = Glukagon-Plasmakonzentrationen während des steady state der Hyperglykämie (60-120min nach Start des Clamp).

Die postprandialen Plasmakonzentrationen von Glukagon während der Hyperglykämie waren bei den Patienten mit T2DM signifikant höher als bei den Gesunden. Während die isoglykämische Hyperglykämie die Plasmakonzentrationen von Glukagon bei den Gesunden reduzierte, hatte die Hyperglykämie keinen Einfluss auf das Plasmaglukagon bei den T2DM. Im Gegensatz zu den Gesunden bewirkte die duodenale Mahlzeitperfusion bei den T2DM einen signifikant höheren Glukagonspiegel als die duodenale Perfusion von NaCl 0.9%. Höhere Plasma-Glukagonspiegel, mangelnde Suppression durch Hyperglykämie und ein paradoxer postprandialer Glukagon-Anstieg belegen die beim Diabetes mellitus pathophysiologisch relevante mangelnde Suppression des Glukagon mit der Folge eines konsekutiv gesteigerten hepatischen Glukose-output.

Der GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39) steigerte die Plasmakonzentrationen von Glukagon signifikant sowohl bei den Gesunden als auch bei den Patienten mit T2DM.. Dies zeigt, dass die Suppression der endogenen Glukagonsekretion durch endogenes GLP-1 unverändert auch bei Patienten mit T2DM intakt ist. Es ergibt sich somit kein Hinweis, dass eine unzureichende Wirkung von endogenem GLP-1 pathophysiologisch beteiligt ist an der oben genannten mangelhafte Glukagonsuppression unter Hyperglykämie bei T2DM.

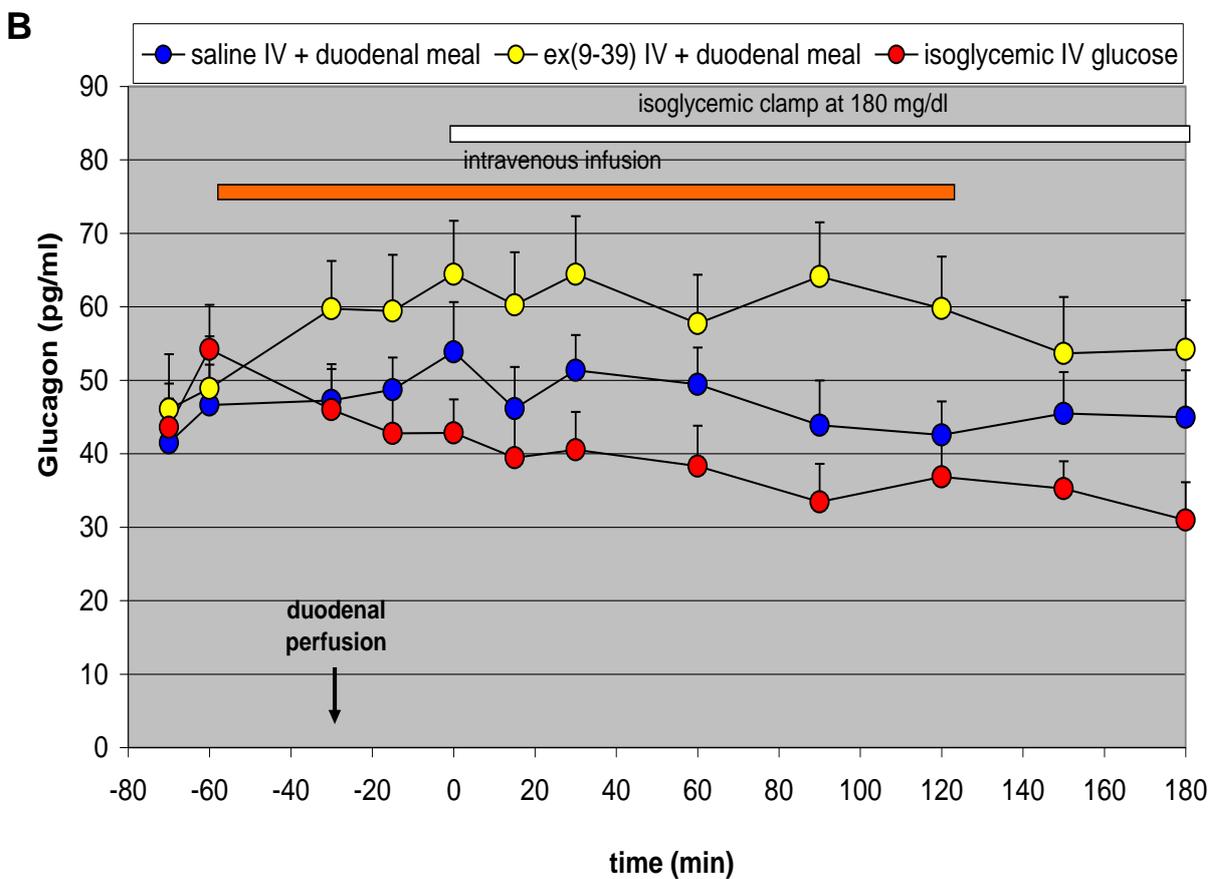
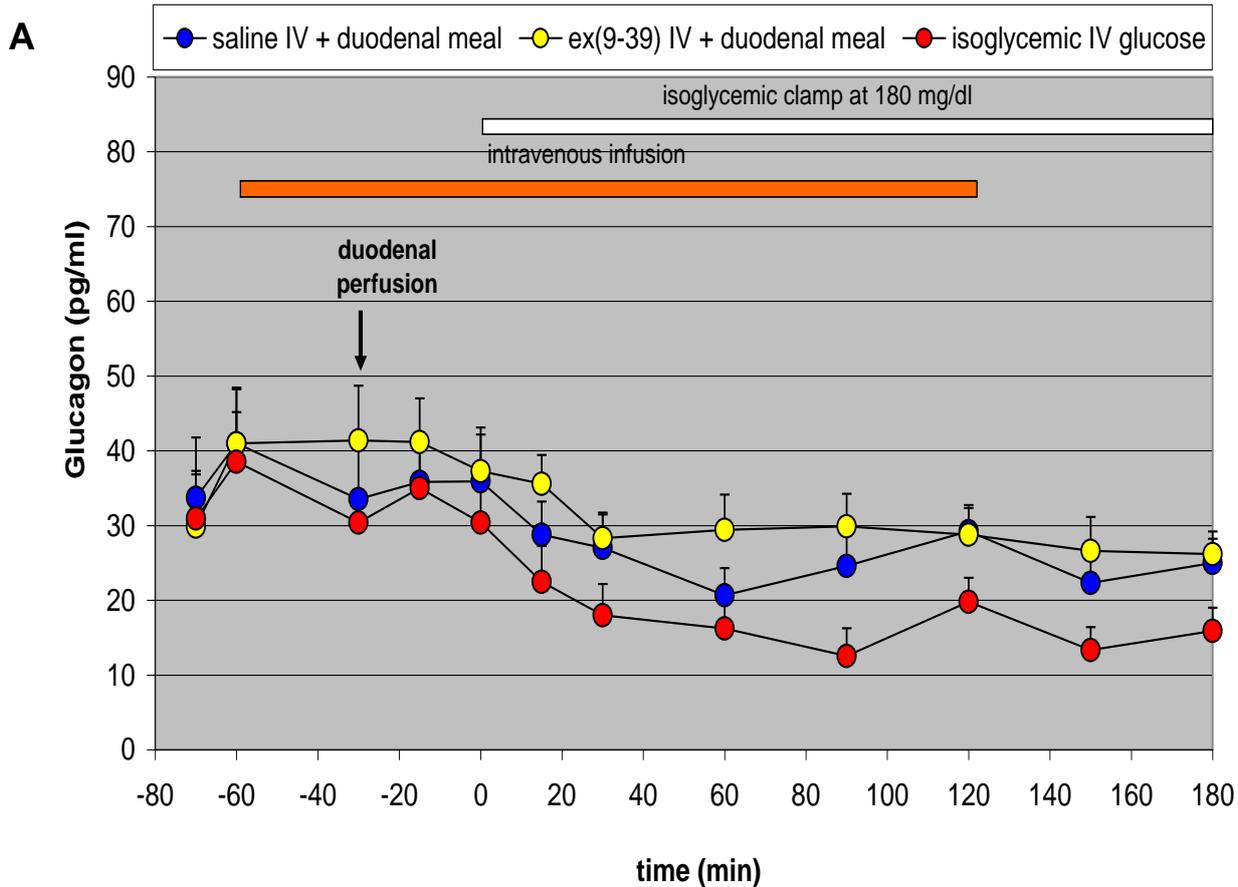


Abbildung 5: Plasmakonzentration von **Glukagon** in 12 **gesunden Probanden (A)** und 12 **Patienten mit T2DM (B)**, Mittelwert \pm SEM

4.2.4 Plasmakonzentrationen von GLP-1(7-36) und GIP

Tabelle 6 und die Abbildungen 6 und 7 zeigen die entsprechenden Daten sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse. SRH = sustained response to hyperglycemia = GLP-1- und GIP-Plasmakonzentrationen während des steady state der Hyperglykämie (60-120min nach Start des Clamp).

Beide Inkretinhormone - -GLP-1 und GIP – zeigten unter duodенaler Mahlzeitperfusion einen raschen Konzentrationsanstieg im Plasma. Spitzenspiegel wurden unter kontinuierlicher Perfusion nach 30min (GLP-1) bzw. 45min (GIP) erreicht. Die Plasmaspiegel blieben während der Perfusion weitgehend kontinuierlich erhöht.

Patienten mit T2DM zeigten tendentiell höhere postprandiale GLP-1-Plasmaspiegel als Gesunde, dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant. Der Anstieg von GIP war bei Diabetikern und Gesunden hingegen nahezu identisch.

Der GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39) steigerte die GLP-1-Plasmakonzentrationen sowohl bei den Diabetikern als auch bei den Gesunden signifikant. Exendin(9-39) hatte hingegen keinen Einfluss auf die Plasmakonzentrationen von GIP. Erhöhte GLP-1-Plasmakonzentrationen unter dem GLP-1-Rezeptorantagonist sind bei Gesunden bekannt und wahrscheinlich das Resultat Blockade einer Autofeedbackhemmung von GLP-1. Erstmals wurde gezeigt, dass dieses Phänomen identisch auch bei Diabetikern existiert.

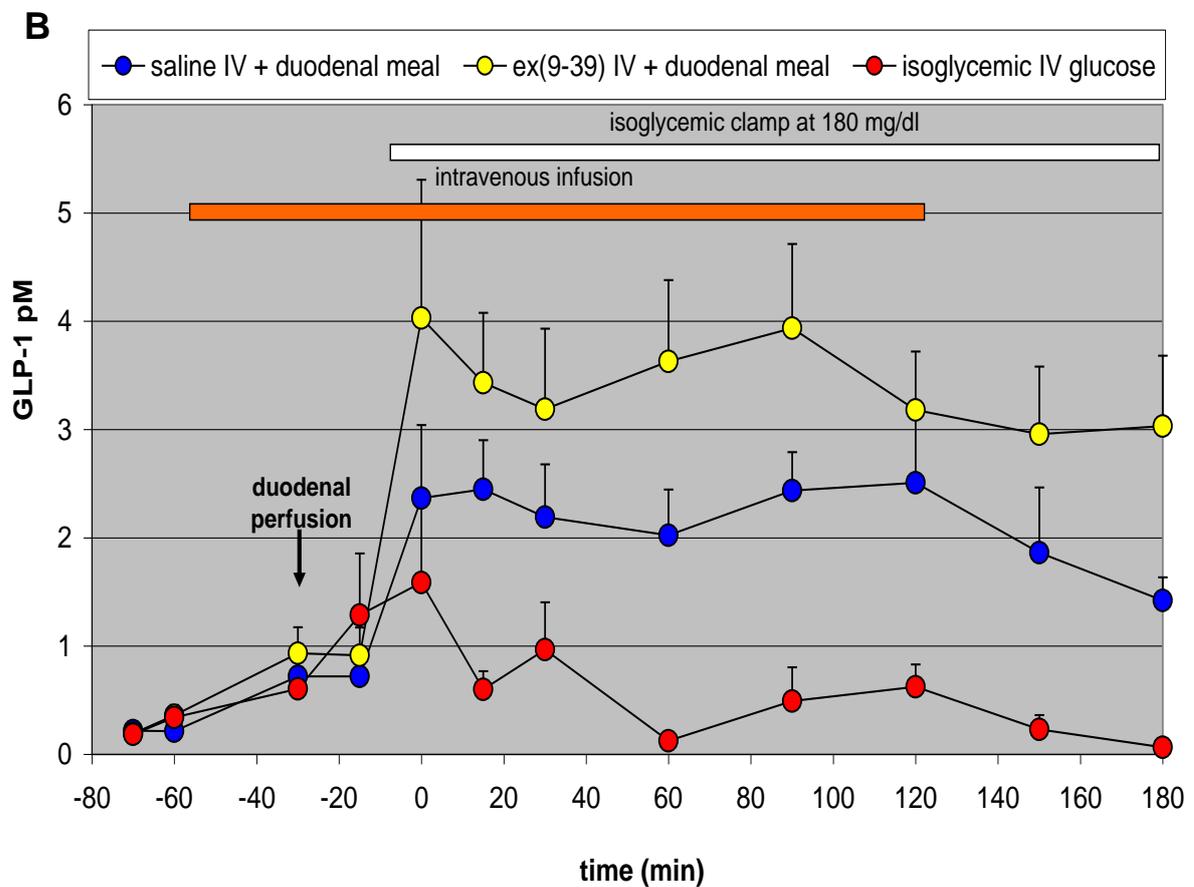
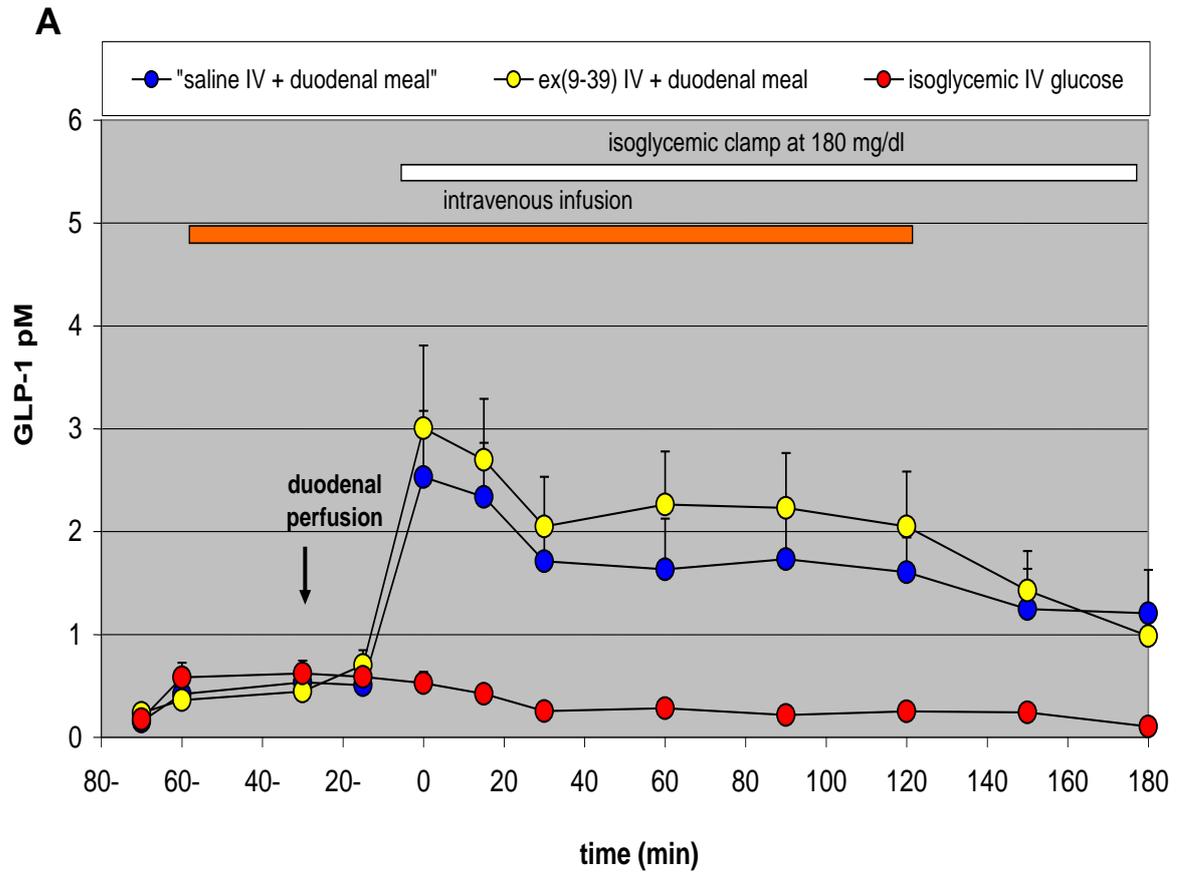


Abbildung 6: Plasmakonzentration von **GLP-1(7-36)** in 12 **gesunden Probanden (A)** und 12 **Patienten mit T2DM (B)**, Mittelwert \pm SEM

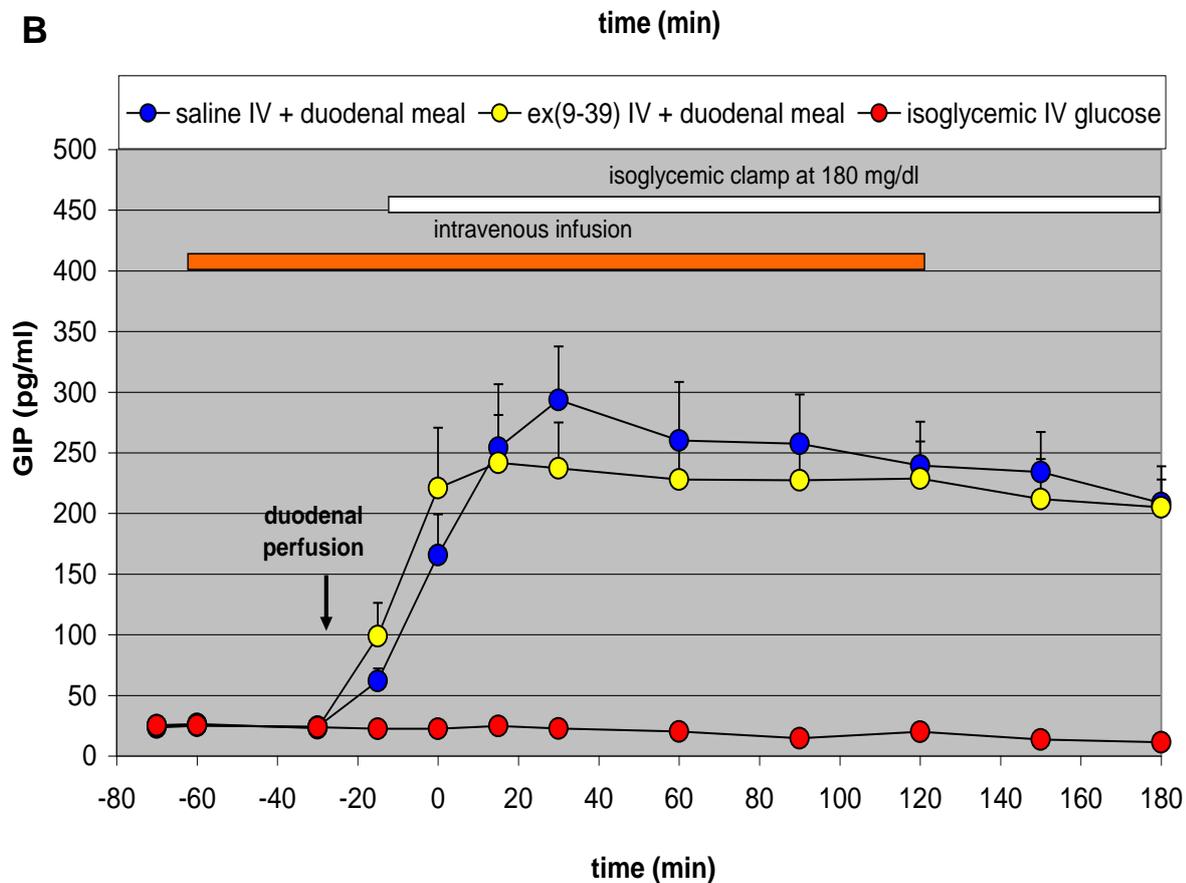
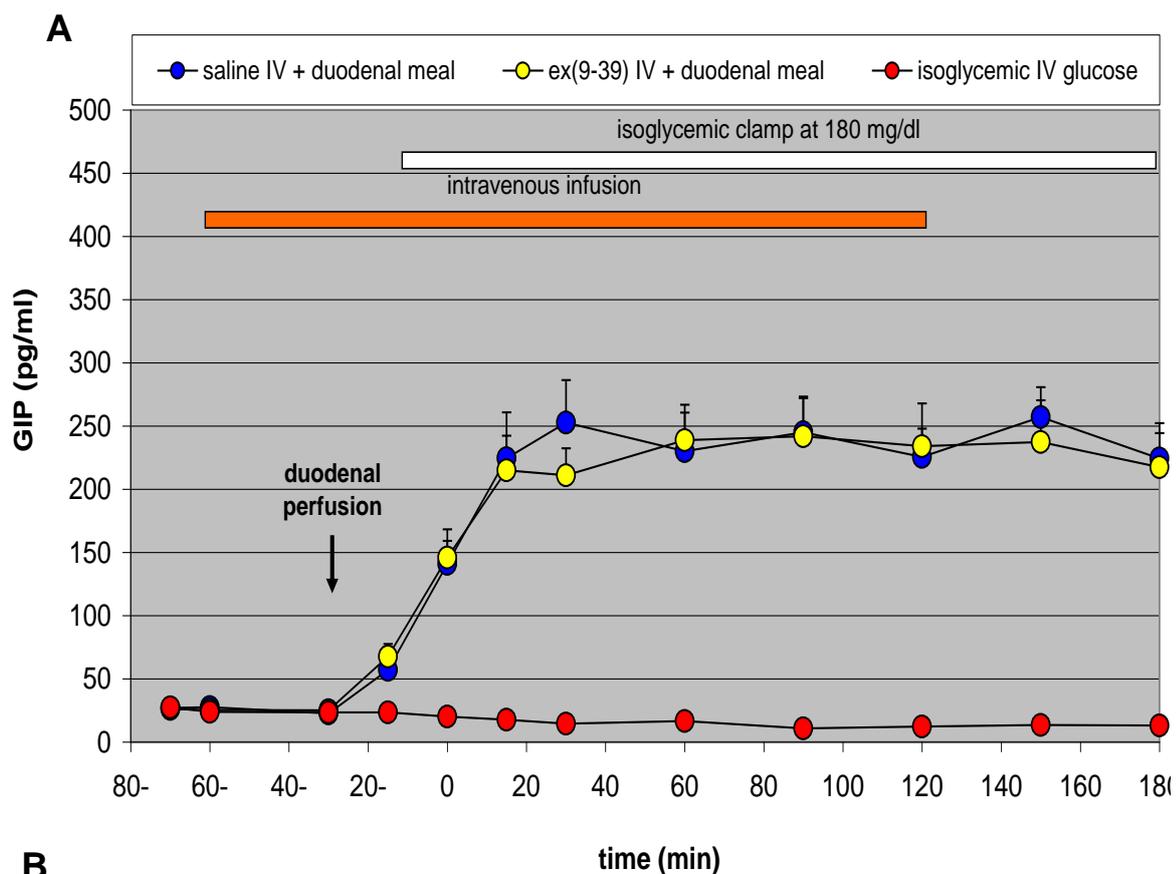


Abbildung 7: Plasmakonzentration von **GIP** in 12 **gesunden Probanden (A)** und 12 **Patienten mit T2DM (B)**, Mittelwert \pm SEM

5. Diskussion

Nach Nahrungsaufnahme wird mehr Insulin freigesetzt als unter isoglykämischen Nüchternbedingungen. Der resultierende Inkretineffekt ist die Differenz zwischen der postprandialen Insulinsekretion und der isoglykämischen nüchternen Insulinsekretion. Beim Menschen gibt es zwei Darmhormone – GLP-1 und GIP -, die als Inkretinhormone die postprandiale Insulinsekretion zusätzlich stimulieren. Der Inkretineffekt ist bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) reduziert [35]. Einerseits zeigte synthetisches GIP bei Patienten mit T2DM eine fehlende oder verminderte insulinotrope Wirkung [10, 36, 37]. Im Gegensatz zu GIP wirkt synthetisches GLP-1 auch bei Patienten mit T2DM insulinotrop [10, 38, 39]. Andererseits scheint die postprandiale Freisetzung von GIP bei Patienten mit T2DM weitgehend normal zu sein [40, 41], wohingegen mehrere Studien verminderte postprandiale GLP-1-Plasmakonzentrationen beschrieben haben [40, 42, 43]. Die erhaltene insulinotrope Wirkung von GLP-1 war die entscheidende Grundlage für die Entwicklung von GLP-1-basierten Antidiabetika, die die pharmakologische Therapie des T2DM in den letzten fünf Jahren entscheidend geprägt haben (GLP-1-R-Agonisten, DPP-4-Inhibitoren). Es ist allerdings bis heute unklar, inwiefern eine spezifische Störung der enteroinsulinären Achse zur Pathophysiologie des Diabetes mellitus beiträgt. Darüberhinaus ist der Anteil, den die endogenen Inkretinhormone an der postprandialen Insulinfreisetzung bei Patienten mit T2DM haben, unbekannt.

Mit der vorliegenden Studie soll der Anteil von GLP-1 und non-GLP-1 (GIP) am Inkretineffekt bei gesunden Menschen und Patienten mit T2DM ermittelt und dessen Rolle bei der Pathophysiologie des T2DM untersucht werden. Dazu wurde die Wirkung des endogenen GLP-1 mit dem spezifischen und kompetitiven GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39) geblockt [18]. Jeweils zwölf gesunde Probanden und Patienten mit T2DM wurden an drei Tagen unter einer identischen Hyperglykämie mittels hyperglykämischen Clamp [34] untersucht. An zwei Tagen erfolgte eine duodenale Sondenernährung zur Sicherstellung einer identischen intestinalen Nährstoffzufuhr als Stimulus für die Freisetzung der Inkretinhormone. An einem dieser beiden Tage wurde dabei Exendin(9-39) intravenös verabreicht, um den Anteil der durch GLP-1 verursachten Effekte am gesamten Inkretineffekt zu quantifizieren. An einem weiteren Tag (Tag 3) wurde statt der duodenalen Nährstoffe physiologische Kochsalzlösung duodenal perfundiert (Kontrolle), um den Effekt der alleinigen Hyperglykämie auf die Insulinsekretion zu quantifizieren.

Der gesamte Inkretineffekt ist die Differenz zwischen dem postprandialen Insulinoutput an Tag 1 und dem Insulinoutput des Kontrollexperiment mit duodенaler Kochsalzperfusion (Tag 3). Der GLP-1-unabhängige Inkretineffekt ist die Differenz zwischen dem postprandialen Insulinoutput an Tag 2 (Exendin(9-39)) und dem Insulinoutput des Kontrollexperiment mit duodенaler Kochsalzperfusion (Tag 3). Da weitere Inkretine beim Menschen nicht bekannt sind, kann der Anteil des Inkretineffekts, der nicht von GLP-1 verursacht wird, als GIP-induziert angesehen werden.

5.1. Enteroinsulinäre Achse: Insulin und Inkretineffekt

In der Nüchternperiode hatte Exendin(9-39) keinen Einfluss auf die Insulinplasmakonzentrationen, weder bei den Gesunden noch bei den Diabetikern. Dies ist auch nicht zu erwarten, da die insulinotrope Wirkung von GLP-1 glukoseabhängig erfolgt. Exendin(9-39) bewirkte zwar bereits nüchtern sowohl bei den Gesunden als auch den Diabetikern einen diskreten, aber signifikanten Anstieg der Blutglukosekonzentration (um im Mittel 7 bzw. 11 mg/dl). Dies ist Folge einer Stimulation von Glukagon unter Exendin(9-39), da bereits basale GLP-1-Plasmaspiegel eine tonische Glukagonhemmung bewirken [18, 44]. Wie ebenfalls von früheren Studien in Gesunden bekannt, wirken bereits basale Nüchternspiegel von endogenem GLP-1 dann insulinotrop, wenn simultan die Blutglukosekonzentration erhöht ist [18]. Das bedeutet, dass Exendin(9-39) bereits nüchtern die Insulinsekretion reduziert, vorausgesetzt, es liegt eine Hyperglykämie vor. Der diskrete Anstieg der Blutglukosekonzentration unter Exendin(9-39) in der Nüchternperiode reichte bereits aus, um bei den ohnehin hyperglykämischen Diabetikern die Plasmakonzentrationen von C-Peptid signifikant zu reduzieren, tendentiell auch die von Insulin (Tab. 4). Die Ergebnisse der aktuellen Arbeit zeigen, dass die Insulinsekretion von Patienten mit T2DM sehr sensitiv auf eine Blockade bereits basaler GLP-1-Plasmaspiegel im Nüchternzustand reagiert. Dies wurde auch kürzlich von einer amerikanischen Arbeitsgruppe gezeigt, die den GLP-1-Rezeptorantagonisten längerfristig nüchternen Patienten mit T2DM verabreicht hat [14]. Auch die β -Zelle von Diabetikern steht also unter einer tonischen stimulierenden Wirkung von endogenem GLP-1.

Die duodenale Nährstoffperfusion führte zu einer prompten und gleichartigen Freisetzung von GLP-1 und GIP bei den Gesunden und Diabetikern. Entsprechend den studienbedingten Voraussetzungen vorliegender Arbeit bewirkte die exogene Glukoseinfusion während des hyperglykämischen Clamp identische Blutglukosekonzentrationen bei Gesunden und Diabetikern (Tabelle 5 und 6).

Erstmals wurde in vorliegender Studie die Wirkung der endogenen Inkretinhormone auf die akute Phase der Insulinsekretion (ersten 10 Minuten des Clamps, ARH) und die späte Phase der Insulinsekretion (60 bis 120 Minuten, steady state, SRH) getrennt untersucht. Während die akute Phase (ARH) ein Maß für die Sekretion von gespeichertem Insulin ist, ist die späte Reaktion (SRH) ein Maß für die Insulinsynthese.

Die Versuchsergebnisse zeigen erwartungsgemäß, dass unter isoglykämischer Hyperglykämie mit und ohne duodenale Nährstoffperfusion die Insulinproduktion bei Patienten mit T2DM im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich vermindert ist (s. Abbildung 2). Dies war sowohl bei der akuten Phase (ARH) als auch bei der steady-state-Phase (SRH) festzustellen (s. Tabellen 5 und 6). Gerade der Verlust der first-phase-Insulinsekretion gilt als typisches Frühmerkmal des Diabetes mellitus. Auch der gesamte Inkretineffekt als Differenz zwischen der Insulinmenge zwischen Nährstoffperfusion und im Kontrollexperiment mit Kochsalzperfusion war bei den Diabetikern erwartungsgemäß deutlich niedriger als bei den gesunden Probanden (s. Abbildung 4, Tabellen 5 und 6). Dies entspricht Ergebnissen früherer Arbeiten [14, 35, 45]. Erstmals wurde darüber hinaus gezeigt, dass dies nicht nur den Inkretineffekt im steady state, sondern auch während der frühen first-phase-Sekretion betrifft. Die Reduktion des Inkretineffekts beim T2DM betrifft also analog der bekannten Einschränkung der β -Zell-Funktion beide Phasen der Insulinsekretion. Zu betonen ist, dass die Plasmakonzentrationen von GLP-1 und GIP bei Diabetikern und Gesunden nahezu identisch waren (siehe hierzu auch 5.2.). Somit ist dies ein erster strenger Hinweis, dass beim T2DM keine spezifische Störung der enteroinsulinären Achse vorliegt, sondern der verminderte Inkretineffekt eine Folge einer gestörten β -Zell-Funktion ist.

In früheren Studien, in denen der Inkretineffekt eines oralen Glukosetoleranztests von Diabetikern mit dem von Gesunden verglichen wurde, zeigte er sich bei den Diabetikern sowohl absolut als auch relativ vermindert [35]. Das bedeutet, dass nicht nur die absolute Zunahme der postprandialen Insulinsekretion durch Inkretinhormone vermindert war, sondern darüberhinaus auch deren relativer Anteil an der postprandialen Insulinsekretion. Im Gegensatz dazu war in der vorliegenden Arbeit der absolute Inkretineffekt während der first-phase und der second-phase-Insulinsekretion bei den Diabetikern vermindert, der relative Anteil des Inkretineffekts an der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion war bei den Diabetikern während der ARH sogar deutlich größer als bei den Gesunden (Insulin-basiert 88% vs 58%), und während der SRH war er gleich (82% vs 79%). Der Grund dieses Unterschiedes dürfte in der Intensität der β -Zell-Stimulation durch die Testmahlzeit liegen: die in früheren Studien verwendete orale Glukosemahlzeit [35] dürfte die Grenze der maximalen sekretorischen β -Zell-

Kapazität bei den Diabetikern überschreiten. Das bedeutet, dass die Insulinsekretion unter dem entsprechenden isoglykämischen Clamp bei den Diabetikern stärker ansteigt als die limitierte Sekretion nach der oralen Mahlzeit ansteigen kann. Konsekutiv führt dies zu einer Reduktion des relativen Anteils des Inkretineffekts an der gesamten postprandialen Insulinsekretion, die dann jedoch als artefiziell zu werten ist. Dies ist darüber hinaus umso eher zu erwarten, je schlechter die diabetische Stoffwechsellage der untersuchten Diabetiker ist. In vorliegender Arbeit wurde bewusst ein Hyperglykämie-Level gewählt, das die maximale Insulinsekretorische Kapazität auch bei den Diabetikern unterschreitet. Im Gegensatz zu Nauck et al. [35] wurden darüberhinaus Diabetiker mit gut eingestellter Stoffwechsellage untersucht (mittlerer HbA1c 6.4% statt >8% bei Nauck). Ähnlich wie in vorliegender Arbeit zeigte sich bei Patienten mit T2DM unter submaximaler glykämischer Stimulation (90 mg/dl oberhalb der Nüchtern glukose) auch in einer aktuellen anderen Arbeit keine Änderung des relativen, sondern nur eine Reduktion des absoluten Anteils des Inkretineffekts [14]. Ob eine Reduktion nicht nur des absoluten sondern auch des relativen Anteil des Inkretineffekts eher ein Phänomen des fortgeschrittenen Diabetes mellitus ist oder schlicht Folge eines Methoden-bedingten Überschreiten der Insulin-sekretorischen Kapazität, kann derzeit nicht beantwortet werden. Hierzu wären Studien erforderlich, die bei denselben Diabetikern den Inkretineffekt unter unterschiedlichen Testmahlzeiten untersuchen. Ein gemeinsamer Befund ist jedenfalls die deutliche Reduktion des absoluten Inkretineffekts. Dieser wiederum ist zwanglos durch eine gestörte β -Zell-Funktion erklärbar und bedarf nicht einer zusätzlichen Störung der enteroinsulinären Achse.

Hyperglykämie führt zu einer deutlichen Hemmung der Magenentleerung und somit auch der Inkretinfreisetzung [46-48]. Studien, die den Inkretineffekt bei Diabetikern unter hyperglykämischen Bedingungen untersuchen, nehmen in Kauf, dass über eine langsamere Magenentleerung bei den Diabetikern auch geringere Mengen an Inkretinhormonen freigesetzt werden. Auch dies ist ein möglicher Grund, warum in früheren Studien bei Diabetikern geringere relative Inkretineffekte gefunden wurden als bei Gesunden. In vorliegender Arbeit wurden Hyperglykämie-bedingte Effekte auf die Magenentleerung durch die duodenale Nährstoffperfusion vermieden, um endogene Inkretineffekte von Gesunden mit denen von Patienten mit T2DM möglichst objektiv vergleichen zu können.

Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit der Anteil von GLP-1 am Inkretineffekt bei T2DM Patienten quantitativ erfasst. Dies erfolgte parallel zu einer Studie einer amerikanischen Arbeitsgruppe, die zwar auch den GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39), darüberhinaus aber eine andere Methodik einsetzte [14], bei der eine Mahlzeit während eines laufenden

hyperglykämischen Clamps verabreicht wurde. Neu ist weiterhin die differenzierte Untersuchung von ARH und SRH. Exendin(9-39) reduzierte den Insulin-basierten Inkretineffekt in der ARH bei den Gesunden von 345 ± 101 auf 128 ± 62 $\mu\text{U}/\text{ml min}$ um 63%, den der Diabetiker von 127 ± 44 auf 79 ± 28 $\mu\text{U}/\text{ml min}$ um 38%. Der C-Peptid-basierte Inkretineffekt der ARH wurde bei den Gesunden um 75%, bei den Diabetikern um 28% gesenkt. Während der SRH betrug die Reduktion des Inkretineffekts bei den Gesunden 58% (Insulin) bzw. 73% (C-Peptid), bei den Diabetikern war die relative Reduktion vergleichbar mit jeweils 59% für Insulin und C-Peptid. Auch bei den Patienten mit T2DM blieb also ein deutlicher Inkretineffekt unter GLP-1-Rezeptorblockade nachweisbar, sowohl während der ARH als auch während der SRH. Der unter Exendin(9-39) GLP-1-unabhängige Inkretineffekt betrug basierend auf Insulin während der SRH bei Gesunden 62%, bei den Diabetikern 65% der postprandialen Insulinsekretion, während der ARH war er bei den Diabetikern sogar größer als bei den Gesunden (81% vs 33%).

Beides, der gesamte und der GLP-1-abhängige Inkretineffekt ist quantitativ bei Gesunden größer als bei den Diabetikern, der relative Anteil des gesamten und GLP-1-abhängigen Inkretineffekts an der gesamten postprandialen Insulinsekretion ist jedoch bei den Diabetikern ähnlich dem der Gesunden. Bereits in einer früheren Studie in Gesunden, bei der eine duodenale Glukoseperfusion benutzt wurde, hatte der GLP-1-abhängige Inkretineffekt mit ca. 60% einen etwas höheren Anteil als der GLP-1-unabhängige Inkretineffekt [44]. Grundsätzlich entsprechen diese Daten während der SRH auch denen der amerikanischen Arbeitsgruppe, bei denen die postprandiale Insulinsekretion unter Exendin(9-39) sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit T2DM um etwa die Hälfte reduziert wurde [14]. Methodisch bedingt wurde allerdings wahrscheinlich in beiden Arbeiten – der vorliegenden und der von Salehi et al. [14] - der Inkretineffekt nicht absolut korrekt gemessen: Salehi et al. verabreichten eine orale Mahlzeit während eines laufenden hyperglykämischen Clamp. Als Inkretineffekt wurde die Differenz zwischen dem Insulin während der Mahlzeit und den extrapolierten mutmaßlichen Insulinkonzentrationen des Clamp gemessen, wäre der Clamp nüchtern fortgeführt worden. Diese Methodik spart einen zusätzlichen Nüchternversuch ein, setzt aber stabile Insulinplasmakonzentrationen während Hyperglykämie voraus. Da Plasmainsulinkonzentrationen aber unter fortlaufender Hyperglykämie stetig ansteigen, dürfte diese Methode zu einer (geringen) Überschätzung des Inkretineffekts führen. Allerdings steht dieser wahrscheinlich eher geringen Fehleinschätzung die Messungenauigkeit durch die „traditionelle“ Messung des Inkretineffekts an zwei Tagen – orale/duodenale Testmahlzeit an einem Tag und isoglykämische Nüchternhyperglykämie am zweiten Tag – entgegen. Untersuchungen haben gezeigt, dass allein die Verlängerung der Messdauer auf zwei Tage zu

hochsignifikanten Unterschieden bei den Probanden führen kann [49]. Salehi et al. verwendeten außerdem eine niedrigere Dosis Exendin(9-39), die wahrscheinlich das endogene GLP-1 nicht komplett hemmt (siehe unten). Auch dies führt zu einer Überschätzung des GLP-1-unabhängigen Inkretineffekts. Da Hyperglykämie ein potenter Inhibitor der Magenentleerung ist und die intestinale Inkretinfreisetzung abhängig ist von der Magenentleerungsgeschwindigkeit, dürfte wiederum die Mahlzeitgabe unter hyperglykämischen Bedingungen zu einer Unterschätzung des Inkretineffekts geführt haben. Andererseits haben Salehi et al. gezeigt, dass unter hyperglykämischen Bedingungen Exendin(9-39) auch bei Diabetikern bereits nüchtern die Insulinplasmakonzentrationen senkt, basale GLP-1-Spiegel also unter Hyperglykämie einen tonisch stimulatorischen Einfluss auf die Insulinsekretion haben. In vorliegender Studie wurde dieser Effekt des basalen GLP-1 auf die hyperglykämische Nüchterinsulinsekretion vernachlässigt, da der Kontrollversuch mit duodенaler Kochsalzperfusion nicht mit Exendin(9-39) durchgeführt wurde. Ergo müssen wir davon ausgehen, dass in vorliegender Arbeit der GLP-1-unabhängige Inkretineffekt eher etwas überschätzt wird. Quantitativ dürfte die insulinotrope Wirkung des basalen GLP-1 unter Hyperglykämie aber eher vernachlässigbar gering sein im Vergleich zur insulinotropen Wirkung des stimulierten GLP-1.

Unter GLP-1-Rezeptorblockade existiert also auch beim T2DM ein Inkretineffekt. Es stellt sich die Frage, ob dieser Rest-Inkretineffekt bei T2DM tatsächlich GLP-1-unabhängig ist oder einer inkompletten Blockade des GLP-1-Rezeptors entspricht. In einer grundsätzlichen ersten früheren Studie bei gesunden Probanden wurde gezeigt, dass Exendin(9-39) in der Dosis 300 pmol/kg min die insulinotrope Wirkung von synthetischem GLP-1 um etwa 85% reduzieren kann [18]. Kürzlich wurde diese Studie ergänzt durch Untersuchungen zur antagonistischen Wirksamkeit von Exendin(9-39) in einer Dosis bis 1200 pmol/kg min. Dabei zeigte sich, dass eine Dosis von 600 pmol/kg/min Exendin(9-39) die GLP-1-Aktivität um mindestens 95% reduziert [50]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auch in der vorliegenden Untersuchung auf diese Dosis zurückgegriffen, so dass eine subtotale Hemmung der GLP-1-Rezeptoren vorausgesetzt werden konnte.

Mit vorliegender Studie wird gezeigt, dass GLP-1 beim T2DM ein Inkretinhormon ist. Darüberhinaus wird gezeigt, dass es auch beim T2DM einen GLP-1-unabhängigen Inkretineffekt gibt. Wir vermuten, dass GIP diesen GLP-1-unabhängigen Inkretineffekt vermittelt. Bewiesen werden könnte das beim Menschen nur durch einen GIP-Rezeptorantagonisten, den es aber nicht gibt. Die Vermutung von GIP als endogenem funktionell aktivem insulinotropen Inkretinhormon auch beim T2DM kontrastiert mit

Ergebnissen, die mit synthetischem GIP bei Diabetikern gewonnen wurden. So gibt es mehrere Studien in T2DM, die eine im Vergleich zu Gesunden fehlende oder deutlich reduzierte insulinotrope Wirksamkeit von GIP zeigen [10, 51]. Auch die insulinotrope Wirksamkeit von synthetischem GLP-1 war reduziert, konnte aber scheinbar durch supraphysiologische Dosierungen ausgeglichen werden [10, 39]. Als Gründe hierfür könnte ein fortgeschrittener oder nicht gut behandelter Diabetes, eine zu geringe Dosierung von GIP oder eine unzureichende Reinheit des verwendeten GIP angenommen werden. Insbesondere die Frage der Dosierung scheint von Bedeutung zu sein, da in den genannten Veröffentlichungen die verabreichten GLP-1-Konzentrationen erheblich über den üblichen physiologischen Konzentrationen lagen. Mittlerweile ist bekannt, dass über 80% der zirkulierenden GLP-1-Immunreaktivität biologisch inaktive Abbauprodukte der DPP-4 sind [52, 53]. Wenn in den 90er Jahren angenommen wurde, dass mit der damals üblichen Dosis an synthetischem GLP-1 von 0.3 bis 0.4 pmol/kg min physiologische postprandiale Plasmaspiegel imitiert wurden [10, 18], so betraf dies die damals messbare GLP-1-Plasmagesamtkonzentration, d.i. die Summe von biologisch aktivem GLP-1(7-36) und biologisch inaktivem GLP-1(9-36). Bereits durch die niedrig-dosierte „physiologische“ Infusion von biologisch aktivem GLP-1(7-36) mit dem Ziel physiologischer Plasmakonzentrationen wurden in diesen Studien somit deutlich pharmakologische GLP-1-Konzentrationen erzeugt. So verwendete Nauck 1993 [10] GLP-1 in der Dosis von 0.4 und 1.2 pmol/kg min, um zu zeigen, dass synthetisches GLP-1 insulinotrop beim T2DM ist. Ob synthetisches GIP in der damaligen Studie (0.8 und 2.4 pmol/kg min) in einer der GLP-1-Dosis vergleichbaren supraphysiologischen Dosis gegeben wurde, ist dagegen zumindest zweifelhaft. Neuere Studien, die GIP in höherer Dosierung – insbesondere auch als Bolus – eingesetzt haben, konnten zeigen, dass synthetisches GIP auch bei Patienten mit T2DM insulinotrop wirkt [37, 51]. Allerdings scheint synthetisches GIP auch die Glukagonsekretion zu stimulieren, so dass hochdosiertes GIP trotz Insulinsstimulation beim Diabetiker nicht in einer Blutzuckersenkung resultiert. Ein spezifischer GIP-Rezeptordefekt beim Diabetiker scheint jedenfalls unwahrscheinlich [51]. Grundsätzlich ist ein Rückschluss von einer vorhandenen oder fehlenden Wirkung eines synthetischen Peptids in pharmakologischer Dosis auf die Wirkung des endogenen Peptids nicht oder allenfalls sehr eingeschränkt möglich. Insofern sprechen diese Studien unter Verwendung von synthetischem GIP nicht gegen eine insulinotrope Rolle von endogenem GIP.

Zusammengefasst ist der Inkretineffekt bei Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu Gesunden reduziert. Wie bei Gesunden beruhen etwa 60% des Inkretineffektes auf GLP-1 und etwa 40% sind unabhängig von GLP-1. Bei dem GLP-1-unabhängigen Inkretineffekt handelt es sich wahrscheinlich um einen Effekt des endogenen GIP. Aus diesen Daten ergibt

sich kein Anhalt für einen spezifischen Defekt der enteroinsulinären Achse in der Pathophysiologie des T2DM.

5.2. Enteroinsulinäre Achse: Sekretion von GLP-1 und GIP.

Die duodenale Nährstoffperfusion führte zu einem prompten und schnellen Anstieg der Plasmakonzentrationen von GLP-1 und GIP. Es konnte zwischen gesunden Probanden und Diabetikern kein signifikanter Unterschied dieser Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden, wenn auch die Werte für GLP-1 bei den Diabetikern in der späten Phase der duodenalen Nährstoffperfusion tendenziell höher waren als bei den Gesunden (s. Abbildungen 6-7 sowie Tabellen 6). Obwohl sich die GLP-1- und GIP-Konzentrationen zwischen den Gesunden und Diabetikern nicht unterschieden, sezernierten die β -Zellen bei Diabetikern im hyperglykämischen Zustand deutlich weniger Insulin als die der gesunden Probanden. Dies spiegelte sich wider in einem reduzierten absoluten, aber nicht relativen Inkretineffekt.

Bezüglich der GLP-1- und GIP-Konzentrationen im hyperglykämischen Zustand bei Gesunden und Diabetikern finden sich in der Literatur sehr widersprüchliche Aussagen: Kuo et al. berichten bei gesunden Probanden unter Hyperglykämie höhere Plasmakonzentrationen von GIP bei unverändertem GLP-1 [54]. Andere Autoren fanden aber auch einen Rückgang sowohl von GLP-1 als auch von GIP nach Einstellen eines hyperglykämischen Zustands [55]. Und eine dritte Gruppe von Studien stellte fest, dass sich die GIP-Konzentrationen bei Diabetikern nach Ernährung im hyperglykämischen Zustand erhöht [14, 56]. In früheren Studien waren beim T2DM postprandiale GIP-Plasmakonzentrationen erhöht, normal und erniedrigt gefunden worden [40, 41, 57, 58]. Insgesamt aber unter Betrachtung aller Daten scheint die GIP-Sekretion bei Diabetikern weitgehend unverändert. GLP-1-Plasmaspiegel wurden in mehreren Studien beim T2DM vermindert gefunden [40, 42, 43], in anderen aber nicht [13, 14, 41]. Wenn GLP-1-Plasmakonzentrationen bei Diabetikern erniedrigt waren, fand sich dies 2-3 Stunden nach Nahrungsaufnahme, aber nie unmittelbar postprandial, und korrelierte nicht mit dem typischen frühpostprandialen Insulinsekretionsdefizit der Patienten mit T2DM. Unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Ausschüttung von Inkretinhormonen lassen sich vermutlich vor allem auf methodische Unterschiede bei den einzelnen Studien zurückführen. Aus diesem Grund sind ältere Veröffentlichungen allein aufgrund der Weiterentwicklung der Mess- und Analysetechnik mit neueren Daten nicht unbedingt vergleichbar. Wichtiger erscheint jedoch, dass postprandiale GLP-1-Plasmakonzentrationen zwischen Individuen hoch variabel zu sein scheinen, wobei die Mittelwerte in den meisten Arbeiten bei Patienten mit T2DM relativ normal sind [13]. Ein wesentlicher Faktor könnte dabei die

Magenentleerungsgeschwindigkeit sein. Die Sekretion der Inkretinhormone ist direkt abhängig von der Menge und der Geschwindigkeit, mit der Nährstoffe (Kohlenhydrate und Fett) aus dem Magen ins Duodenum entleert werden [1, 44]. GLP-1 wird z.B. unterhalb einer Kohlenhydratentleerung von etwa 1.2 kcal/min nicht mehr freigesetzt [1]. Die Magenentleerungsgeschwindigkeit ist zum einen individuell variabel und wird zum anderen beeinflusst durch eine präexistente Hyperglykämie. Hyperglykämie übt eine stark hemmende Wirkung auf die Magenentleerung aus [46-48]. Da die oben genannten Studien bei Diabetikern eine orale Mahlzeit benutzten, die während Nüchternhyperglykämie verabreicht wurde und gefolgt war von einer (unkontrollierten) postprandialen Hyperglykämie, muss damit gerechnet werden, dass eine verminderte postprandiale Freisetzung gerade von GLP-1 schlicht Folge war einer im Vergleich zu den Gesunden verzögerten Magenentleerung. Effekte der Magenentleerung wurden in vorliegender Arbeit durch die duodenale Nährstoffperfusion bewusst vermieden, um gleiche Bedingungen für die Sekretion der Inkretinhormone zu schaffen. Unter diesen Bedingungen waren die postprandialen Plasmakonzentrationen von GLP-1 und GIP bei den Diabetikern nicht unterschiedlich zu den Gesunden. Das erklärt auch, warum die hier vorgestellten Ergebnisse mit anderen Daten, die auf ähnliche Weise gewonnen wurden, gut korrelieren [54]. In der Studie von Salehi wurde die orale Mahlzeit bei Gesunden und T2DM nach vorheriger Etablierung einer Hyperglykämie verabreicht [14]. Die Magenentleerung wurde parallel zur Messung der Inkretinplasmaspiegel mit dem D-Xylose-Test gemessen. Unter diesen Bedingungen - Hyperglykämie bei Gesunden und Diabetikern - unterschied sich die Magenentleerungsgeschwindigkeit nicht und auch die postprandialen Inkretinhormonplasmaspiegel waren nahezu identisch bei Gesunden und Patienten mit T2DM.

GLP-1-Rezeptorblockade mit Exendin(9-39) führte sowohl bei Gesunden als auch bei den Diabetikern zu einer erheblichen Steigerung der GLP-1-Plasmakonzentrationen. Der Anstieg betrug bei den Gesunden 36%, bei den Diabetikern sogar 60%. (s. Tabelle 6). Exendin(9-39) erhöhte also die GLP-1-Sekretion, und zwar bei Diabetikern mehr als bei den gesunden Probanden. Für GIP zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung kein solcher Unterschied zwischen diabetischen und gesunden Versuchspersonen, und zwar weder in der akuten Phase noch bei der Sekretionsrate im Zeitraum 60 bis 120 Minuten nach Erreichen des Glukosezielwertes (s. Abbildung 7 sowie Tabelle 6). Diese Daten stimmen mit Untersuchungen überein, die unter ähnlichen Bedingungen, allerdings mit einer Exendin(9-39)-Gabe von lediglich 300 pmol/kg/min, ermittelt wurden [14, 44]. Da die GLP-1-Plasmaspiegel nach intravenöser Verabreichung von GLP-1 durch Exendin(9-39) unbeeinflusst blieb [18], vermutet man weniger eine direkte Wechselwirkung zwischen Exendin(9-39) und dem GLP-1-Metabolismus, sondern vielmehr eine Autofeedbackhemmung der GLP-1-Sekretin durch GLP-

1, die durch die Blockade des GLP-1-Rezeptors unterbrochen wird. Die genaueren physiologischen Abläufe sind dabei allerdings noch weitgehend unbekannt [44].

Die gefundenen Ergebnisse weisen nach, dass die enteroinsuläre Achse auch bei T2DM grundsätzlich intakt ist. Da die postprandialen Plasmakonzentration der Inkretinhormone bei Patienten mit T2DM nicht unterschiedlich zu denen von Gesunden sind und sich somit auch die Stimulation der β -Zellen nicht von Gesunden unterscheidet, spielt die enteroinsuläre Achse für die Pathophysiologie von T2DM keine bedeutende Rolle. Der entscheidende Faktor scheint dabei ausschließlich eine gestörte Funktion der β -Zellen selbst zu sein. Eine solche Störung kann durch eine Insuffizienz der Zelle im Hinblick auf die Sekretionsfähigkeit, einer Zellatrophie oder einer verminderten Sensitivität der beteiligten Rezeptoren auf die entsprechenden Reize (Plasmaglukose- und Plasmainkretinkonzentrationen) hervorgerufen werden. Der Verlust des Reaktionsvermögens von β -Zellen auf GLP-1 wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt ([39, 59]). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass alle drei genannten Faktoren an einer Störung der Zellfunktion von β -Zellen beteiligt sind. Die vorliegenden Daten, die auf eine solche Störung der Zellfunktion hinweisen, bestätigen daher auch frühere Vermutungen, dass ein reduzierter Inkretineffekt nicht als eine Ursache sondern eher als Folge im Rahmen der Stoffwechsellage bei der Pathogenese eines T2DM Patienten anzusehen ist.

5.3. Enteroinsulinäre Achse: Sekretion von Glukagon.

Dem Glukagon kommt bei der Regulation der Blutglukosekonzentration als funktioneller Antagonist des Insulin eine besondere Bedeutung zu. Die wichtigste Wirkung des Glukagon ist es, normale Nüchtern-Plasmaglukosekonzentrationen zu erhalten und so Hypoglykämien zu vermeiden. Hierfür wird von Glukagon insbesondere die Glukoneogenese aber auch die Glykogenolyse in der Leber stimuliert. Die Glukagonbildung und -sekretion erfolgt in den α -Zellen des Inselorgans und wird durch niedrige Plasmaglukosekonzentrationen angeregt, aber auch zentralnervös gesteuert [60].

GLP-1 hemmt beim gesunden Menschen die Glukagonsekretion. Dies geschieht überwiegend über eine parakrine Suppression durch das in den Inselzellen freigesetzte Somatostatin, dessen Sekretion durch GLP-1 ausgelöst wird. Dieser Zusammenhang konnte an isolierten Pankreasinseln von Ratte und Mensch nachgewiesen werden [61, 62]. Allerdings verfügen auch die α -Zellen selbst über einige wenige GLP-1-Rezeptoren, über welche die Glukagonbildung direkt gehemmt werden kann [18]. Diese Wirkung ist jedoch bislang noch

unklar und wurde noch nicht quantifiziert [63], so dass hauptsächlich von einer parakrinen Hemmung durch Somatostatin ausgegangen werden kann. Die Hemmung von Glukagon ist ein wesentlicher antidiabetischer Mechanismus von GLP-1 [30, 64, 65]. Pharmakologische GLP-1-Konzentrationen senken über eine Glukagonhemmung bei Patienten mit T1DM und T2DM die Hyperglykämie. Und beim Gesunden wurde unter Einsatz des GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin(9-39) gezeigt, dass selbst basale endogene GLP-1-Spiegel tonisch die Glukagonsekretion der α -Zelle supprimieren [18, 44].

Bei Typ 2 Diabetikern liegt bereits im nüchternen Zustand eine Hyperglukagonämie vor, die sich auch im Zustand der Hyperglykämie nicht oder nur wenig zurückbildet. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit eindrücklich gezeigt werden. Es ist ein Charakteristikum des Diabetes mellitus, das wesentlich zur diabetischen Stoffwechsellage beiträgt. Verantwortlich hierfür ist vermutlich eine verringerte Empfindlichkeit der α -Zellen von Diabetikern gegenüber ansteigenden Glukosekonzentrationen bzw. Hyperinsulinämie. Wie bei den Gesunden führte Exendin(9-39) auch bei den Patienten mit T2DM sowohl nüchtern als auch unter duodenaler Ernährung zu einer Steigerung der Plasmaglukagonkonzentration (s. Abbildung 5 und Tabelle 6). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass endogenes GLP-1 auch beim Diabetiker die Glukagonsekretion inhibitorisch reguliert. Diese Wirkung ist beim T2DM somit komplett erhalten. Hieraus folgt, dass endogenes GLP-1 auch bei Diabetikern offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Glukagonsekretion spielt. Es gibt darüber hinaus keinerlei Hinweis dafür, dass eine defekte GLP-1-Wirkung verantwortlich ist für die pathologische Hypersekretion von Glukagon beim T2DM.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass auch bei Patienten mit T2DM ein GLP-1 unabhängiger Inkretineffekt besteht. Dieser GLP-1-unabhängige Inkretineffekt ist mutmaßlich durch endogenes GIP vermittelt. Quantitativ ist der Inkretineffekt bei Diabetikern reduziert. Sowohl der Anteil des Inkretineffekts an der gesamten postprandialen Insulinsekretion als auch das Verhältnis zwischen GLP-1-abhängigem und GLP-1-unabhängigem Inkretineffekt sind beim T2DM aber ähnlich wie bei Gesunden. Unter den Bedingungen einer kontrollierten duodenalen Nährstoffperfusion, die Effekte einer variablen Magenentleerung auf die Inkretinfreisetzung vermeidet, waren die postprandialen Plasmakonzentrationen von GLP-1 und GIP bei Gesunden und Patienten mit T2DM gleich. Darüberhinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass endogenes GLP-1 auch beim T2DM ein wichtiger inhibitorischer Regulator der endogenen Glukagonsekretion ist und dass dieser antidiabetische Mechanismus auch beim T2DM intakt ist. Entgegen früherer Annahmen ergibt

sich somit kein Anhalt für die Hypothese, dass eine Störung der enteroinsulinären Achse pathophysiologisch beteiligt ist am T2DM. Die enteroinsulinäre Achse ist auch beim T2DM intakt. Somit dürfte nicht nur der Stabilisierung von endogenem GLP-1 sondern auch der von endogenem GIP in der pharmakologischen Therapie des T2DM eine Rolle zukommen. Dies bleibt für die antidiabetische Wirkung von DPP-4-Inhibitoren zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

GLP-1 und GIP sind intestinale Hormone, die als Inkretinhormone der sogenannten enteroinsulinären Achse die postprandiale Insulinsekretion stimulieren und dadurch für 40-60% der postprandialen Insulinsekretion verantwortlich sind (Inkretineffekt). Der Inkretineffekt ist beim Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) deutlich vermindert. Beim Gesunden ist GLP-1 zusätzlich ein potenter und tonischer Inhibitor der Glukagonsekretion. Es ist unklar, inwiefern eine primäre Störung der enteroinsulinären Achse beiträgt zur Pathophysiologie des T2DM.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, erstmals den Anteil von endogenem GLP-1 und GIP an der postprandialen Insulinsekretion, dem Inkretineffekt und der Glukagonsekretion bei Gesunden und Patienten mit T2DM zu quantifizieren. Damit soll die Bedeutung der enteroinsulinären Achse für die Pathophysiologie des T2DM untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden 12 Gesunde und 12 Patienten mit T2DM in einem Placebo-kontrolliertem, prospektiven, randomisierten cross-over-Design an drei Tagen untersucht: an zwei Tagen wurde nach Start einer kontinuierlichen duodenalen Mahlzeitperfusion (2.03 kcal/min) durch variable intravenöse Infusion von Glukose eine dreistündige stabile Hyperglykämie von 180 mg/dl erzeugt (hyperglykämischer Clamp). Die duodenale Mahlzeitperfusion diente der kontrollierten Freisetzung der Inkretinhormone GLP-1 und GIP unabhängig von Störeffekten einer variablen Magenentleerungsgeschwindigkeit. An einem dieser Tage wurde der spezifische GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39), an dem anderen Tag NaCl 0.9% als Placebo intravenös infundiert. Die eingesetzte Dosis Exendin(9-39) (600 pmol/kg min) bewirkt eine subtotale Hemmung der insulinotropen Wirkung von GLP-1 um mindestens 95%. Ein dritter Tag, an dem statt Nahrung NaCl 0.9% ins Duodenum perfundiert wurde, diente als Kontrolle der allein durch Hyperglykämie stimulierten Insulinsekretion, um den Inkretineffekt zu berechnen (Inkretineffekt: postprandiale Insulinsekretion minus isoglykämische nüchterne Insulinsekretion). In regelmäßigen Abständen wurden die Plasmakonzentrationen von Insulin, C-Peptid, GLP-1, GIP und Glukagon gemessen (ILMA, ELISA bzw. Ria). Die Effekte auf die postprandiale endokrine Pankreassekretion wurden als AUC während der akuten Phase der isoglykämischen Hyperglykämie (ARH, 0-10 min) sowie im steady-state der isoglykämischen Hyperglykämie (SRH, 60-120 min) quantifiziert. Unterschiede wurden statistisch mit einer zweifaktoriellen ANOVA geprüft mit Infusion/Perfusion bzw. Diabetesstatus als unabhängigen Faktoren.

Sowohl die Gesamtsekretion von Insulin als auch der absolute Inkretineffekt war bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu den Gesunden deutlich vermindert, und zwar sowohl in der akuten Phase der isoglykämischen Hyperglykämie (ARH) wie auch im steady-state der

isoglykämischen Hyperglykämie (SRH). Der relative Anteil des Inkretineffekts an der postprandialen Insulinsekretion war bei den Diabetikern weder in der ARH (Gesunde 58%, T2DM 88%) noch in der SRH (Gesunde 79%, T2DM 82%) reduziert. Exendin(9-39) reduzierte den Inkretineffekt signifikant bei Gesunden und Diabetikern in der ARH (Gesunde: um 63%, T2DM:um 38%) und in der SRH (Gesunde: um 58%, T2DM:um 59%). Ähnlich wie bei den Gesunden verblieb auch bei den Diabetikern unter GLP-1-Rezeptorblockade ein signifikanter Inkretineffekt, der in der ARH 81% und in der SRH 65% der postprandialen Insulinsekretion betrug. Wir vermuten, dass GIP für den GLP-1-unabhängigen Inkretineffekt verantwortlich ist.

Die Patienten mit T2DM zeigten signifikant höhere postprandiale Glukagon-Plasmakonzentrationen als die Gesunden. Im Gegensatz zu den Gesunden bewirkte die Hyperglykämie keine Suppression des Plasmaglukagon. Der GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-3) steigerte Plasmaglukagon bei beiden - Gesunden und Diabetikern - sowohl nüchtern als auch postprandial signifikant und deutlich. Dies ging einher mit einer Steigerung der Nüchternglukose. Somit ist endogenes GLP-1 auch bei Patienten mit T2DM ein tonisch inhibitorischer Regulator der Glukagonsekretion. Auch die Hemmung der postprandialen endogenen Glukagonsekretion ist bei Diabetikern intakt. Eine Störung der GLP-1-Wirkung ist nicht verantwortlich für die pathologisch hohe Glukagonsekretion beim T2DM.

Unter der kontinuierlichen duodenalen Mahlzeitperfusion zeigte sich kein Unterschied in den Plasmakonzentrationen von GLP-1 und GIP zwischen Gesunden und Diabetikern. Exendin(9-39) steigerte die postprandialen GLP-1-Plasmakonzentrationen in beiden Gruppen signifikant. Dies ist mutmaßlich eine Folge der durch den GLP-1-Rezeptorantagonisten ausgelösten Blockade der Autofeedbackhemmung der GLP-1-Sekretion durch endogenes GLP-1. Dieser bei Gesunden schon länger bekannten Effekt des Exendin(9-39) zeigt sich somit auch in Patienten mit T2DM.

Zusammengefasst existiert bei Patienten mit T2DM in ähnlicher Weise wie bei Gesunden ein GLP-1-unabhängiger Inkretineffekt, der mutmaßlich GIP induziert ist. Die absolute Insulinsekretion, nicht aber der Anteil des GLP-1-abhängigen und -unabhängigen Inkretineffekts ist beim T2DM vermindert. Auch die GLP-1-induzierte tonisch Hemmung von Glukagon ist beim T2DM vollständig erhalten. Unter der Bedingung einer kontrollierten intestinalen Nährstoffstimulation werden GLP-1 und GIP auch beim T2DM unverändert freigesetzt. Somit ergibt sich kein Anhalt für eine Störung der enteroinsulinären Achse in der Pathophysiologie des T2DM, die auch bei Diabetikern uneingeschränkt funktioniert. Der Verlust der Fähigkeit zu einer adäquaten Insulinsekretion kann somit nur in einer gestörten Funktion der β -Zellen selbst zu suchen sein.

7. Literaturverzeichnis

1. Schirra, J., et al., *Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans*. J Clin Invest, 1996. **97**(1): p. 92-103.
2. Gerich, J.E., *Postprandial hyperglycemia and cardiovascular disease*. Endocr Pract, 2006. **12 Suppl 1**: p. 47-51.
3. DeFronzo, R.A., R.C. Bonadonna, and E. Ferrannini, *Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview*. Diabetes Care, 1992. **15**(3): p. 318-68.
4. Reaven, G.M., *Pathophysiology of insulin resistance in human disease*. Physiol Rev, 1995. **75**(3): p. 473-86.
5. Creutzfeldt, W.O., et al., *Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients*. Diabetes Care, 1996. **19**(6): p. 580-6.
6. Delgado-Aros, S., et al., *Effect of GLP-1 on gastric volume, emptying, maximum volume ingested, and postprandial symptoms in humans*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **282**(3): p. G424-31.
7. Prigeon, R.L., et al., *Suppression of glucose production by GLP-1 independent of islet hormones: a novel extrapancreatic effect*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(4): p. E701-7.
8. Pannaciuoli, N., et al., *Postprandial glucagon-like peptide-1 (GLP-1) response is positively associated with changes in neuronal activity of brain areas implicated in satiety and food intake regulation in humans*. Neuroimage, 2007. **35**(2): p. 511-7.
9. Parlevliet, E.T., et al., *GLP-1 treatment reduces endogenous insulin resistance via activation of central GLP-1 receptors in mice fed a high-fat diet*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(2): p. E318-24.
10. Nauck, M.A., et al., *Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 301-7.
11. Green, B.D. and P.R. Flatt, *Incretin hormone mimetics and analogues in diabetes therapeutics*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. **21**(4): p. 497-516.
12. Toft-Nielsen, M.B., et al., *Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(8): p. 3717-23.
13. Meier, J.J. and M.A. Nauck, *Is secretion of glucagon-like peptide-1 reduced in type 2 diabetes mellitus?* Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008. **4**(11): p. 606-7.
14. Salehi, M., et al., *Effect of endogenous GLP-1 on insulin secretion in type 2 diabetes*. Diabetes, 2010. **59**(6): p. 1330-7.
15. Schirra, J., et al., *GLP-1 regulates gastroduodenal motility involving cholinergic pathways*. Neurogastroenterol Motil, 2009. **21**(6): p. 609-18, e21-2.
16. Bojanowska, E., *Physiology and pathophysiology of glucagon-like peptide-1 (GLP-1): the role of GLP-1 in the pathogenesis of diabetes mellitus, obesity, and stress*. Med Sci Monit, 2005. **11**(8): p. RA271-8.
17. Nauck, M.A., et al., *Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients*. Diabetologia, 1993. **36**(8): p. 741-4.
18. Schirra, J., et al., *Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1421-30.
19. Goke, R., et al., *Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19650-5.
20. Pfeiffer, A.F., et al., *Role of the gut Peptide glucose-induced insulinomimetic Peptide in energy balance*. Results Probl Cell Differ, 2010. **52**: p. 183-8.
21. Edholm, T., et al., *Differential incretin effects of GIP and GLP-1 on gastric emptying, appetite, and insulin-glucose homeostasis*. Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(11): p. 1191-200, e315.

22. Baggio, L.L. and D.J. Drucker, *Biology of incretins: GLP-1 and GIP*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(6): p. 2131-57.
23. Asmar, M., et al., *Glucose-dependent insulintropic polypeptide may enhance fatty acid re-esterification in subcutaneous abdominal adipose tissue in lean humans*. *Diabetes*, 2010. **59**(9): p. 2160-3.
24. Asmar, M., et al., *On the role of glucose-dependent insulintropic polypeptide in postprandial metabolism in humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **298**(3): p. E614-21.
25. Freeman, J.S., *Role of the incretin pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. *Cleve Clin J Med*, 2009. **76 Suppl 5**: p. S12-9.
26. Vilsboll, T., *On the role of the incretin hormones GIP and GLP-1 in the pathogenesis of Type 2 diabetes mellitus*. *Dan Med Bull*, 2004. **51**(4): p. 364-70.
27. Lupi, R., et al., *The direct effects of GLP-1 and GIP, alone or in combination, on human pancreatic islets*. *Regul Pept*, 2010. **165**(2-3): p. 129-32.
28. Meier, J.J., *The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2009. **23**(4): p. 433-41.
29. Diab, D.L. and D.A. D'Alessio, *The contribution of enteroinsular hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. *Curr Diab Rep*, 2010. **10**(3): p. 192-8.
30. Hare, K.J., *Role of GLP-1 induced glucagon suppression in type 2 diabetes mellitus*. *Dan Med Bull*, 2010. **57**(9): p. B4181.
31. Holst, J.J., *On the physiology of GIP and GLP-1*. *Horm Metab Res*, 2004. **36**(11-12): p. 747-54.
32. Meier, J.J., et al., *Gastric inhibitory polypeptide does not inhibit gastric emptying in humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **286**(4): p. E621-5.
33. Christensen, M., et al., *Glucagon-like peptide-2, but not glucose-dependent insulintropic polypeptide, stimulates glucagon release in patients with type 1 diabetes*. *Regul Pept*, 2010. **163**(1-3): p. 96-101.
34. DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, and R. Andres, *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. *Am J Physiol*, 1979. **237**(3): p. E214-23.
35. Nauck, M., et al., *Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes*. *Diabetologia*, 1986. **29**(1): p. 46-52.
36. Meier, J.J., et al., *Reduced insulintropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2001. **50**(11): p. 2497-504.
37. Vilsboll, T., et al., *Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients*. *Diabetologia*, 2002. **45**(8): p. 1111-9.
38. Schirra, J., et al., *Mechanisms of the antidiabetic action of subcutaneous glucagon-like peptide-1(7-36)amide in non-insulin dependent diabetes mellitus*. *J Endocrinol*, 1998. **156**(1): p. 177-86.
39. Kjemis, L.L., et al., *The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects*. *Diabetes*, 2003. **52**(2): p. 380-6.
40. Vilsboll, T., et al., *Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients*. *Diabetes*, 2001. **50**(3): p. 609-13.
41. Vollmer, K., et al., *Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance*. *Diabetes*, 2008. **57**(3): p. 678-87.
42. Toft-Nielsen, M.B., S. Madsbad, and J.J. Holst, *Determinants of the effectiveness of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(8): p. 3853-60.
43. Muscelli, E., et al., *Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients*. *Diabetes*, 2008. **57**(5): p. 1340-8.
44. Schirra, J., et al., *Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antro-pyloro-duodenal motility in humans*. *Gut*, 2006. **55**(2): p. 243-51.
45. Kim, M.H. and M.K. Lee, *The Incretins and Pancreatic beta-Cells: Use of Glucagon-Like Peptide-1 and Glucose-Dependent Insulintropic Polypeptide to Cure Type 2 Diabetes Mellitus*. *Korean Diabetes J*, 2010. **34**(1): p. 2-9.
46. Woerle, H.J., et al., *Importance of changes in gastric emptying for postprandial plasma glucose fluxes in healthy humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **294**(1): p. E103-9.

47. Woerle, H.J., et al., *Impaired hyperglycemia-induced delay in gastric emptying in patients with type 1 diabetes deficient for islet amyloid polypeptide*. *Diabetes Care*, 2008. **31**(12): p. 2325-31.
48. Samsom, M., et al., *Diabetes mellitus and gastric emptying: questions and issues in clinical practice*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2009. **25**(6): p. 502-14.
49. Tong J, A.B., Salehi M, D'Alessio, *Comparison of one- and two-day methods for measuring the incretin effect*. Poster presented at 69th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, New Orleans, 2009.
50. Schirra J, M.M., Nicolaus M, Wörle HJ, Göke B, *The efficacy of exendin(9-39)amide as a GLP-1 receptor antagonist in human*. Free Paper Session of the 16th United European Gastroenterology Week, Gießen, 2008.
51. Meier, J.J., et al., *Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects*. *Diabetes*, 2004. **53**(3): p. 654-62.
52. Deacon, C.F., et al., *Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(3 Pt 1): p. E458-64.
53. Hansen, L., et al., *Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine*. *Endocrinology*, 1999. **140**(11): p. 5356-63.
54. Kuo, P., et al., *Effects of physiological hyperglycemia on duodenal motility and flow events, glucose absorption, and incretin secretion in healthy humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. **95**(8): p. 3893-900.
55. Vollmer, K., et al., *Hyperglycemia acutely lowers the postprandial excursions of glucagon-like Peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(4): p. 1379-85.
56. Ebert, R. and W. Creutzfeldt, *Gastrointestinal peptides and insulin secretion*. *Diabetes Metab Rev*, 1987. **3**(1): p. 1-26.
57. Crockett, S.E., E.L. Mazzaferri, and S. Cataland, *Gastric inhibitory polypeptide (GIP) in maturity-onset diabetes mellitus*. *Diabetes*, 1976. **25**(10): p. 931-5.
58. Ross, S.A., J.C. Brown, and J. Dupre, *Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide following oral glucose in diabetes mellitus*. *Diabetes*, 1977. **26**(6): p. 525-9.
59. Hojberg, P.V., et al., *Near normalisation of blood glucose improves the potentiating effect of GLP-1 on glucose-induced insulin secretion in patients with type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2008. **51**(4): p. 632-40.
60. Gromada, J., I. Franklin, and C.B. Wollheim, *Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains*. *Endocr Rev*, 2007. **28**(1): p. 84-116.
61. Schmid, R., et al., *Comparison of GLP-1 (7-36amide) and GIP on release of somatostatin-like immunoreactivity and insulin from the isolated rat pancreas*. *Z Gastroenterol*, 1990. **28**(6): p. 280-4.
62. Fehmann, H.C., et al., *The effects of glucagon-like peptide-I (GLP-I) on hormone secretion from isolated human pancreatic islets*. *Pancreas*, 1995. **11**(2): p. 196-200.
63. R.D. Ramracheya, C.W., F. Abdulkader, M. Shigeto, A. Clark, P. Johnson, M. Braun, P. Rorsman, *GLP-1 inhibits Glukagon secretion from human alpha cells by a direct effect*. *European Association for the Study of Diabetes –EASD- Free Poster Session Poster PS 49, Stockholm 2010* 2010.
64. Abdul-Ghani, M. and R.A. DeFronzo, *Fasting hyperglycemia impairs glucose- but not insulin-mediated suppression of glucagon secretion*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(5): p. 1778-84.
65. De Marinis, Y.Z., et al., *GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca²⁺ channel-dependent exocytosis*. *Cell Metab*, 2010. **11**(6): p. 543-53.

München, 20.10.2011

Lucianno Guimaraes-Carneiro