

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II

der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Grosshadern

Direktorin: Prof. Dr. med. Julia Mayerle

***Bestimmung der Rolle von endogenem GLP-1 in der
enteroinsulinären Achse mittels DPP-4-Inhibition und
GLP-1-Rezeptorblockade bei Patienten mit Diabetes mellitus
Typ 2***

Dissertation

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

vorgelegt von

Gabriele Bollinger, geb. Kutscherauer

aus

Haag in Oberbayern

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Schirra

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Carolin Daniel
PD Dr. Martin Füchtenbusch
Prof. Dr. Klaus G. Parhofer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Benedikt Aulinger

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	10
1.1 Das Inkretinkonzept und seine Geschichte	11
1.2 Die Inkretinhormone	13
1.2.1 GIP.....	13
1.2.2 GLP-1.....	14
1.3 Inkretineffekt (IE) bei Gesunden	17
1.4 Inkretineffekt (IE) bei Typ 2 Diabetikern	18
1.5 GLP-1 und seine Rolle in der heutigen Therapie des T2DM.....	22
1.5.1 GLP-1-Rezeptor-Agonisten	22
1.5.2 DPP-4-Inhibitoren, u.a. Sitagliptin	23
2. Ziel der Studie	24
3. Material und Methoden	26
3.1 Genehmigungsverfahren und Einverständniserklärung	26
3.2 Probanden	27
3.2.1 Ein-, und Ausschlusskriterien	27
3.2.2 Charakteristika.....	29
3.3 Studienmedikation	31
3.3.1 Sitagliptin (Januvia®).....	31
3.3.2 Exendin(9-39)	32
3.4 Experimentelles Studiendesign	34
3.5 Praktische Durchführung.....	37
3.6 Bezug der Studienmedikation, Probenaufbereitung und Analysen.....	38
3.7 Statistische Auswertung	40
4. Ergebnisse	42
4.1 Effekte der DPP-4-Inhibition und GLP-1-Rezeptorblockade im Nüchternzustand	45

4.2	Effekte der DPP-4-Inhibition und GLP-1-Rezeptorblockade während OGTT und isoglykämischer Nüchtern-Hyperglykämie (Clamp).....	48
4.2.1	Glukose	50
4.2.2	Insulin, C-Peptid und IGR.....	52
4.2.3	Inkretineffekt (IE).....	56
4.2.4	Glukagon.....	56
4.2.5	GLP-1 und GIP	57
4.2.6	Magenentleerung anhand des 13C-Actetat Atemtest	59
5.	Diskussion	62
	Literaturverzeichnis	70
	Danksagung	77
	Affidavit.....	78
	Publikationsliste	79

Zusammenfassung

Der Inkretineffekt (IE) beschreibt das Phänomen, dass eine orale Glukosemahlzeit zu deutlichen höheren Insulinspiegeln führt als eine isoglykämische intravenöse (iv) Glukosegabe. Vermittelt wird er durch die intestinalen Inkretinhormone GLP-1 und GIP, welche über die enteroinsulinäre Achse die pankreatischen Betazellen stimulieren. Während bei Gesunden der IE 40-60% zur postprandialen Insulinantwort beiträgt und hauptsächlich von GIP getragen wird, ist dieser im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) deutlich reduziert. Synthetisches GIP scheint bei T2DM im Gegensatz zu GLP-1 nicht mehr insulinotrop wirksam zu sein. Die neuere, Inkretin-basierte antidiabetische Therapie nutzt vor allem GLP-1, indem sie entweder den GLP-1-Rezeptor stimuliert (Inkretinmimetika) oder den Abbau von endogenem GLP-1 und GIP hemmt (Dipeptidylpeptidase (DPP)-4 -Inhibitoren). GLP-1 senkt den Blutzucker durch Stimulation von Insulin, Hemmung von Glukagon und Hemmung der Magenentleerung. Die Pathophysiologie des endogenen GLP-1 beim T2DM ist dabei aber weitgehend unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von endogenem GLP-1 bei Patienten mit T2DM in der Regulation der Insulin- und Glukagonsekretion, des Inkretineffekt und der Magenentleerung zu untersuchen. Dabei wurden die endogenen Inkretinhormone durch den oralen DPP-4-Inhibitor Sitagliptin stimuliert und die Wirkung von GLP-1 durch den intravenösen spezifischen GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39) (Ex-9) blockiert.

24 Patienten mit gut eingestelltem T2DM (HbA1c $6.3 \pm 0.2\%$, 14 männlich) wurden in einer prospektiven, randomisierten Plazebo-kontrollierten, doppelt-verblindeten Cross-over Studie mit vier Behandlungsphasen zu je zwei Studientagen untersucht. Nach 12stündigem Fasten startete jede Behandlungsphase mit einem oralen Glukosetoleranztest (OGTT, 75 g), der unter 100 mg oralem Sitagliptin (Januvia®) oder Plazebo erfolgte, mit intravenöser Hintergrundinfusion von Ex-9 (900 pmol/kg/min) oder NaCl 0.9%. Diese Dosis Ex-9 blockiert den GLP-1-Rezeptor zu >95%. Die OGTT enthielten jeweils 100 mg ¹³C-Acetat, um über einen Atemtest simultan die Magenentleerungskinetik zu messen. Am jeweils zweiten Studientag wurden dann die postprandialen Glukoseexkursionen des ersten Tages mittels intravenöser Infusion einer 20%igen Glukoselösung imitiert (isoglykämischer Clamp). Während 240 Minuten erfolgten in regelmässigen Abständen

Blutabnahmen zur Bestimmung der Blutglukosekonzentration, sowie der Plasmakonzentrationen von Insulin, C-Peptid, GLP-1, GIP und Glukagon. In Atemgasproben wurde $^{13}\text{C-CO}_2$ bestimmt zur Berechnung der Magenentleerungskinetik. Der Inkretineffekt wurde aus der Differenz der inkrementellen Area under the curve (iAUC) für Insulin, C-Peptid und der Insulin-Glukose-Ratio (IGR) berechnet. Unterschiede wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse für wiederholte Messungen (two-way ANOVA) analysiert mit oraler und intravenöser Medikation als unabhängigen Faktoren.

Der Inkretineffekt betrug etwa 55% bis 60%. Sitagliptin senkte signifikant die postprandialen Blutglukosekonzentrationen und steigerte die Plasmakonzentrationen von GLP-1, GIP, Insulin und C-Peptid, sowie die IGR, als auch den Inkretineffekt. Der GLP-1-Rezeptorantagonist Ex-9 steigerte die postprandialen Blutglukosekonzentrationen und reduzierte die Plasmakonzentrationen von Insulin und C-Peptid und die IGR: der Inkretineffekt war unter Ex-9 um etwa die Hälfte reduziert. Ex-9 reduzierte sowohl die insulinotrope Wirkung von Sitagliptin, als auch den unter Sitagliptin gesteigerten Inkretineffekt deutlich. Dennoch blieben unter Sitagliptin auch vor Hintergrund von Ex-9 die Plasmakonzentrationen von Insulin und C-Peptid, sowie der Inkretineffekt signifikant erhöht.

Ex-9 steigerte bereits die nüchtern-basalen Glukagonspiegel und steigerte signifikant die postprandialen Glukagonexkursionen. Sitagliptin reduzierte signifikant die postprandialen Plasmaglukagonkonzentrationen. Unter GLP-1-Rezeptorblockade mit Ex-9 hatte Sitagliptin keinen Effekt mehr auf Plasmaglukagon.

Die Magenentleerung, gemessen anhand der $^{13}\text{C-CO}_2$ -Exhalationskinetik (lag Period, Halbwertszeit), war unter Ex-9 signifikant beschleunigt, unter Sitagliptin verlangsamt. Unter GLP-1-Rezeptorblockade mit Ex-9 hatte Sitagliptin keinen Effekt mehr auf die Magenentleerungsparameter.

Zusammengefasst weisen in unserer Studie Patienten mit gut eingestelltem T2DM einen deutlichen Inkretineffekt auf, durchaus vergleichbar mit historischen Daten von Gesunden. Endogenes GLP-1 ist ein bedeutender Mediator sowohl der nüchternen, als auch postprandialen Blutzuckerkontrolle beim Diabetiker. Es trägt zu etwa 50% zum Inkretineffekt bei. Es hemmt darüber hinaus tonisch die Glukagonfreisetzung und reduziert die Magenentleerungsgeschwindigkeit. Eine DPP-4-Hemmung durch Sitagliptin erhöht die Plasmaspiegel von GLP-1 und GIP. Sitagliptin stimuliert die Insulinsekretion und steigert

deutlich den Inkretineffekt bei Patienten mit T2DM. Sitagliptin reduziert Plasmaglukagon und verlangsamt die Magenentleerung. Die insulinotrope Wirkung und somit auch der Inkretineffekt der DPP-4-Hemmung ist etwa zur Hälfte durch endogenes GLP-1 vermittelt. Wir vermuten, dass endogenes GIP verantwortlich ist für die unter GLP-1-Rezeptorblockade auch bei Patienten mit T2DM noch deutlich verbleibende insulinotrope Wirkung. Die glukagonostatische Wirkung von Sitagliptin, ebenso wie seine hemmende Wirkung auf die Magenentleerung, ist hingegen ausschließlich durch endogenes GLP-1 vermittelt. Beide - sowohl GLP-1 als auch non-GLP-1-Inkretine - sind somit bei Patienten mit T2DM funktionell aktiv.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glukoseexkursion und Inkretineffekt bei Gesunden und Patienten mit T2DM im Vergleich.....	20
Abbildung 2: Experimentelles Design der Studientage	36
Abbildung 3: Qualität der isoglykämischen Clamps: Vergleich der Blutglukoseexkursionen von OGTT und korrespondierendem isoglykämischen Clamp während den einzelnen Behandlungsphasen	44
Abbildung 4: Blutglukosekonzentrationen und inkrementelle AUC nach OGTT für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen	51
Abbildung 5: Plasmainsulin-Exkursionen über basal nach OGTT und isoglykämischem intravenösen Clamp und inkrementelle AUC für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen	53
Abbildung 6: Plasma-C-Peptid-Exkursionen über basal nach OGTT und isoglykämischem intravenösen Clamp und inkrementelle AUC für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen	54
Abbildung 7: Insulin-Glukose-Ratio (IGR) nach OGTT und während isoglykämischem Clamp, sowie IE basierend auf der IGR.....	55
Abbildung 8: Plasmakonzentrationen von Glukagon, GLP-1 und GIP vor und nach OGTT für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen	58
Abbildung 9: Magenentleerung des OGTT entsprechend dem 13C-CO ₂ -Atemtest	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probandencharakteristika mit Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, BMI und HbA _{1c} von 24 Patientin mit T2DM	30
Tabelle 2: Behandlungssequenzen und Randomisierung.....	34
Tabelle 3: Effekte von oralem Sitagliptin und intravenösem Ex-9 auf die Blutglukose und die Plasmahormonkonzentrationen im Nüchternzustand	47
Tabelle 4: Effekte von oralem Sitagliptin und intravenösem Ex-9 auf die Blutglukoseexkursionen, die Plasmahormonkonzentrationen und auf den Inkretineffekt nach OGTT und dem korrespondierenden isoglykämischen Clamp bei 24 Patienten mit T2DM.....	48
Tabelle 5: Effekte von Sitagliptin und Ex-9 auf die Kinetik der 13C-Acetat-Atemtests als Mass für die Magenentleerung des OGTT bei 24 Patienten mit T2DM .	60

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
AUC	Area under the curve
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BMI	Body Mass Index
CV	Coefficient of variation
DPP-4	Dipeptidyl-Peptidase-4
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Ex-9	Exendin(9-39)
GEC	Gastric emptying coefficient (Koeffizient der Magenentleerung)
GGT	Gammaglutamyltransferase
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
GIP	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLP-2	Glucagon-like peptide 2
HbA1c	Glykohämoglobin
iAUC	(incremental) Inkrementelle AUC
IE	Inkretineffekt
IGR	Insulin/Glukose-Ratio (insuline-to-glukose-ratio)
ILMA	Sandwich-Immuno-Lumineszenz-Assay
iv	intravenös
NaCl	Natriumchlorid
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
po	per os
RIA	Radioimmunoassay
SAE	Serious adverse event
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2

1. Einleitung

Die Entdeckung der Inkretinhormone, die Erforschung ihrer Wirkungsweise sowie das Zusammenspiel mit anderen Determinanten der Glukosehomöostase haben die Therapie des Diabetes mellitus entscheidend beeinflusst. Mit bis dato etablierten Therapien konnten normale HbA1c-Werte oft nicht erreicht werden. Ausserdem war eine weitere Gewichtszunahme nicht selten und bei einigen Präparaten bestand ein nicht unwesentliches Hypoglykämierisiko. Das bei Diabetes mellitus ohnehin erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse wurde dadurch noch zusätzlich erhöht [1]. Darüber hinaus konnte auch das Fortschreiten des Krankheitsprozesses nicht aufgehalten werden, welches im Wesentlichen durch eine zunehmende Betazell-Dysfunktion bzw. einen Betazellverlust gekennzeichnet ist [2]. Die Kenntnis der Physiologie von Glukagon-like peptide-1 (GLP-1) war der Ausgangspunkt für die Entwicklung der GLP-1-Rezeptoranaloga und der Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4)-Inhibitoren, welche heute weit verbreitet im Einsatz sind. Beide Wirkstoffklassen senken die Plasmaglukose bei Typ 2 Diabetikern nachhaltig [3]. Trotzdem sind noch immer nicht alle Signal- und Wirkungswege bekannt. Vor allem die Beteiligung von GLP-1 und GLP-1-unabhängigen Inkretinen an den Effekten einer DPP-4-Blockade auf die Insulin-, -und Glukagonsekretion, den Inkretineffekt (IE) und die Magenentleerung bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) sind nicht geklärt und sollen Gegenstand dieser Arbeit sein.

1.1 Das Inkretinkonzept und seine Geschichte

Der Inkretineffekt beschreibt das Phänomen, dass eine orale Glukoseaufnahme zu deutlich höheren Blutinsulinspiegeln als eine intravenöse isoglykämische Glukosegabe führt. Geschuldet ist dieser Effekt der Tatsache, dass eine orale Glukosezufuhr zu einer glukoseabhängigen Ausschüttung der sogenannten insulinotropen Inkretinhormone, namentlich GLP-1 und GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide), aus spezialisierten enteroendokrinen Zellen des Verdauungstrakts führt, was bei einer intravenösen Glukoseverabreichung nicht der Fall ist [4, 5]

Bis zu dieser Erkenntnis verging jedoch ein knappes Jahrhundert und die Geburtsstunde der gastrointestinalen Endokrinologie lag dabei am Beginn des 20. Jahrhunderts als Bayliss und Starling als Erste publizierten, dass Dünndarmmukosa-Extrakte einen Faktor enthalten, welcher über den Blutstrom das exokrine Pankreas stimuliert. Sie nannten den Faktor «Sekretin» und sprachen dabei erstmals von Hormonen [6]. Nachdem 1921 das «Insulin» entdeckt wurde, waren Zunz und La Barre durch ihre Versuche zur «Kreuzzirkulation», bei denen sie die Kreisläufe zweier Hunde koppelten, richtungsweisend für die weitere Entwicklung des Inkretinkonzepts. Aus ihren Studien postulierten sie, dass die «Sekretin-Extrakte» das exokrine Pankreas zur Insulinausschüttung anregen [7]. Der Begriff «Inkretin» wurde 1932 wiederum erstmals von La Barre definiert, mit welchem er eine Substanz bezeichnete, welche aus der oberen Darmmukosa gewonnen, in der Lage war, die Blutzuckerspiegel zu senken, ohne dabei das exokrine Pankreas zu stimulieren. Schon zu diesem Zeitpunkt dachte er die Idee an, dass «Inkretine» in Zukunft wohl eine Rolle in der Therapie des Diabetes mellitus spielen könnten [8]. Geschuldet durch den zweiten Weltkrieg lag die Forschung in der gastrointestinalen Endokrinologie danach viele Jahre brach, bis es in den 1960er Jahren durch die Entwicklung von Radioimmunoassays (RIA) möglich wurde, Insulinspiegel im Blut zu messen. Zwei unabhängige Forschungsgruppen um Elrick et al aus den USA und McIntyre et al aus Grossbritannien, konnten 1964 mittels RIA zeigen, dass die Insulinantwort nach einer oralen Glukoseaufnahme deutlich höher ausfällt, als nach einer intravenösen Glukoseinfusion, und dies sogar, wenn die Blutglukosespiegel während der Infusion höher liegen [9-11]. Es wurde geschätzt, dass 50% der Insulinantwort auf der insulinotropen Wirkung von gastrointestinal sezernierten Substanzen beruhen, der Inkretineffekt also 50% beträgt [12]. Unger und Eisentraut bildeten für die Gesamtheit der Wechselwirkungen zwischen Dünndarm

und endokrinem Pankreas den Begriff der «Enteroinsulinären Achse» [13]. Es lag nun also eine Definition des Begriffs «Inkretineffekt» vor, doch welche Faktoren der Dünndarmmukosa genau dafür verantwortlich waren, blieb vorerst weiterhin unklar. 1970 sequenzierte John Brown erstmals ein neues Peptid namens GIP (damals gastric inhibitory peptide) und wandelte aufgrund dessen insulinotroper Eigenschaften später zusammen mit Dupré das Akronym um in «glucose-dependent insulinotropic polypeptide». Erst 1985 wurde die insulinotrope Eigenschaft eines weiteren neuen intestinalen Peptides, GLP-1, nachgewiesen, und damit startete nun letzten Endes die Forschung und Etablierung einer inkretinbasierten Diabetestherapie [9], welche bereits 53 Jahre früher von La Barre angedacht worden war.

1.2 Die Inkretinhormone

Während eine Reihe insulinotroper Hormone bekannt ist, definierte Creutzfeldt 1979 die Eigenschaften von Inkretinhormonen [14]:

- Sekretion nach oraler Kohlenhydratbelastung
- Steigerung der Insulinsekretion in den erreichten zirkulierenden Plasmakonzentrationen
- Glukoseabhängigkeit der Wirkung; d.h. Hyperglykämie als Voraussetzung, keine nachweisbare Auswirkung auf die Insulinsekretion bei normalen Plasmaglukosekonzentrationen oder gar hypoglykämischer Stoffwechsellage

Die beim Menschen bekannten Inkretinhormone sind GIP («glucose-dependent insulinotropic polypeptide») und GLP-1 («glucagon-like peptide-1»).

1.2.1 GIP

GIP wird absorptionsabhängig von spezialisierten enteroendokrinen Zellen, den K-Zellen der Schleimhaut des Duodenums und oberen Jejunums sezerniert. Im Nüchternzustand sind bei Menschen nur Plasmakonzentrationen im Picomolarbereich messbar [5]. Stimulationsreize zur GIP Ausschüttung sind Glukose und andere Kohlenhydrate wie Sucrose, Triglyceride und einige Aminosäuren. Die Ausschüttung erfolgt innerhalb von ca. 15 min und erreicht nach etwa 1 h ihr Maximum [4]. GIP ist ein Peptid, bestehend aus 42 Aminosäuren, welches seine Wirkung über einen Peptidhormonrezeptor der 7-Transmembran-Domänen-Familie ausübt. Dieser findet sich vor allem auf den Betazellen der Langerhans-Inseln auf dem Pankreas, aber auch im Gehirn, dem Dünndarm und im Fettgewebe [15]. Die Degradation von GIP erfolgt bereits kurz nach Sekretion durch die ubiquitär vorkommende Amino-Peptidase Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP-4) [16]. Diese spaltet das biologisch aktive GIP(1-42) in sein inaktives Bruchstück GIP(3-42). Beide werden dann mit einer Halbwertszeit von etwa 20 min über die Niere ausgeschieden.

Die Hauptwirkung von GIP bei Gesunden besteht in der glukoseabhängigen Insulinfreisetzung [14]. Es fördert ausserdem die Insulinbiosynthese [17] und steigert in vitro die Proliferation [18] und das Überleben der Betazellen [19]. GIP regt ausserdem die Glukagonfreisetzung an [20]. Im Gegensatz zu GLP-1 bewirkt es keine Verzögerung der Magenentleerung [21].

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist die insulinotrope Eigenschaft des GIP deutlich reduziert [22].

1.2.2 GLP-1

GLP-1 wird ebenso, getriggert durch intraluminale Nahrungsbestandteile, vor allem Kohlenhydrate und Fett, aus L-Zellen des Gastrointestinaltrakts freigesetzt [23]. Hauptsächlich kommen L-Zellen beim Menschen im Ileum und Kolon vor, sind aber auch, in weniger grosser Dichte, im proximalen Dünndarm zu finden [24]. L-Zellen enthalten neben GLP-1 noch andere enteroendokrine Hormone, wie Enteroglukagon, Peptid YY und GLP-2, die gleichzeitig mit GLP-1 freigesetzt werden [25]. Die distale Lage des Grossteils der L-Zellen im Gastrointestinaltrakt kontrastiert mit der schnellen postprandialen Sekretion von GLP-1. Diese Beobachtungen legen das Vorhandensein einer indirekten humoralen Stimulation durch Hormone aus dem oberen Dünndarm und/oder durch das enterale Nervensystem nahe [24]. Etabliert konnten diese Annahmen im Menschen aber bisher nicht werden. Studien beim Menschen legen nahe, dass die direkte luminal Stimulation der jejunalen L-Zellen zur GLP-1 Sekretion vorhanden sein muss [26] und vielleicht sogar die Hauptquelle der postprandialen Freisetzung ist. Wohingegen die GLP-1 Freisetzung aus den distaleren Teilen des Verdauungstrakts vor allem für die länger vorhandenen erhöhten GLP-1 Konzentrationen nach Nahrungsaufnahme verantwortlich sind. Es wird spekuliert, ob die proximale GLP-1 Stimulation hauptsächlich die Insulinfreisetzung triggert, während die distal freigesetzten Mengen über andere Mechanismen den Blutglukosespiegel regulieren [27]. Darauf soll aber weiter unten im Text im Rahmen der GLP-1 Wirkungen genauer eingegangen werden.

GLP-1 wurde initial auf der Gensequenz des Proglukagongens identifiziert, welches sowohl in den Alphazellen des Pankreas, als auch in den L-Zellen des Darmes exprimiert wird. Neben der Gensequenz für Glukagon selbst, fanden sich Codierungssequenzen für zwei Glukagon-ähnliche (also «glucagon-like») Peptide. Durch posttranslationale Prozessierung werden GLP-1 und GLP-2 schliesslich im Darm freigesetzt. Die bioaktive Form von GLP-1 wird aus GLP-1(1-37) generiert und zirkuliert in 2 unterschiedlichen Formen, GLP-1(7-37) und GLP-1(7-36)amid. Ca. 80% des bioaktiv zirkulierenden GLP-1 entspricht der amidierten Form, welche eine etwas längere Halbwertszeit aufweist. Beide sind

äquipotent hinsichtlich der Wirkung auf die Insulinsekretion [28, 29]. Sowohl die Nüchtern-, als auch die postprandialen Plasmakonzentrationen von GLP-1 sind niedriger als die von GIP [4]. Die Degradation von GLP-1 erfolgt analog der von GIP durch die DPP-4. Diese setzt bei GLP-1 so rasch ein, dass es in den Mesenterialvenen bereits zu 50% als inaktive Form vorliegt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde lange Zeit diskutiert, ob sich GLP-1 überhaupt als primäres Inkretinhormon qualifiziert, oder seine Wirkung vielmehr durch das autonome Nervensystem vermittelt wird [30]. Nauck et al konnten jedoch zeigen, dass es auch in physiologisch vorkommenden Konzentrationen Effekte beim Menschen zeigt [31].

Seine Wirkungen entfaltet GLP-1 über einen Peptidhormon-Rezeptor der 7-Transmembran-Domänen-Familie, welcher sich an Inselzellen des Pankreas, Magen, Herz und mehreren Regionen des peripheren und zentralen Nervensystems findet. Eine der Hauptwirkungen von GLP-1 ist die glukoseabhängige Stimulation der Insulinsekretion. Da diese bei Euglykämie oder nur sehr niedrigen Blutglukosekonzentrationen kaum oder eben nur sehr schwach vorhanden ist [31], kann GLP-1 allein keine Hypoglykämien auslösen, was einen therapeutischen Nutzen besitzt. Die Insulinsekretion wird direkt und indirekt stimuliert. Zum einen wird an den Betazellen des Pankreas die Exozytose von Insulingranula bewirkt [32] und ein «Priming-Effekt» erzielt, bei dem ein Glukosestimulus eine verbesserte Insulinsekretion bewirkt [33]. Zum Anderen führt GLP-1 zu einer vermehrten Insulingen-Expression [34]. Darüber hinaus ergeben sich an Zelllinien- und Tiermodellen zahlreiche Hinweise, dass GLP-1 eine Wirkung auf das Zellwachstum und die Differenzierung der Inselzellen, sowie eine antiapoptotische Wirkung auf Betazellen hat [35-37].

Eine weitere Hauptwirkung von GLP-1 ist die Hemmung der Glukagonsekretion aus pankreatischen Alpha-Zellen. Auch hier ist eine Glukoseabhängigkeit vorhanden. Unter experimenteller Hypoglykämie ist die gegenregulatorische Sekretion von Glukagon nicht beeinträchtigt [38]. Unklar ist bisher noch, ob diese Wirkung von GLP-1 direkt durch GLP-1-Rezeptoren auf der Alpha-Zelle erfolgt, oder aber über die Freisetzung von Insulin und Somatostatin.

Ein anderer wichtiger Effekt von GLP-1 zur Regulation des Glukosehaushalts ist die Hemmung der Magenentleerung. Schon in physiologischer Konzentration hat es einen deut-

lichen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Magenentleerung [39-41]. In supraphysiologischen Konzentrationen führt es sogar zu einer kompletten Ausschaltung der Magenentleerung.

Über die GLP-1 Rezeptoren des zentralen Nervensystems werden weitere Effekte vermittelt. So induziert GLP-1 ein subjektives Sättigungs-, und Völlegefühl, respektive vermindert das Appetitgefühl und führt so zu einer reduzierten Kalorienaufnahme [42, 43]. Betrachtet man all diese Wirkungen von GLP-1 zusammen im komplexen System Mensch, wird seine effektive Rolle als Inkretinhormon jedoch in Frage gestellt. Unter physiologischen Bedingungen überwiegt immer der Effekt auf die Magenentleerungsgeschwindigkeit [44]. Durch einen verzögerten Übertritt des Nahrungsbreis in das Duodenum und somit einen verringerten Anstieg der Plasmaglukosekonzentration, wird die Ausschüttung anderer Inkretinhormone (GIP) und die von Insulin verringert. Unter dem Strich wird also die postprandiale Insulinkonzentration verringert, obwohl GLP-1 eigentlich glukoseabhängig die Insulinausschüttung steigert [45]. Bei Gesunden spielt GLP-1 demnach als Inkretinhormon eine untergeordnete Rolle und der Inkretineffekt wird vor allem durch GIP getragen.

Anders ist die Ausgangslage bei Hyperglykämie, etwa im Rahmen eines T2DM. Wie oben bereits erwähnt, fällt dort GIP als Inkretin grösstenteils aus, während GLP-1 in seiner Aktivität erhalten bleibt [22]. Betrachtet man die dem Diabetes zugrunde liegenden Pathomechanismen, nämlich eine gestörte Insulinsekretion mit reflektorischer Hyperglukagonämie, eine verminderte Insulinsensitivität der Peripherie und eine zunehmende Insulinresistenz, sowie eine gelegentlich vorhandene beschleunigte Magenentleerung, die Reduktion der Betazellmasse und den gesteigerten Appetit, dann vermag genau GLP-1 ein verheissungsvoller Kandidat für die Diabetestherapie zu sein.

Abgesehen vom antidiabetischen Effekt, weiss man heute auch, dass GLP-1 über die am und im Herzen vorhandenen GLP-1-Rezeptoren eine gewisse Wirkung entfaltet, was nicht unwesentlich ist, da die endotheliale Dysfunktion eine häufige Begleiterkrankung bei Diabetikern ist [37]. Bei Nagetieren hat man bereits umfangreiche Kenntnisse. Hier konnte eine Verlängerung der Lebensdauer vom Kardiomyozyten und eine Verbesserung des kardialen Outputs nach ischämischen Ereignissen demonstriert werden [46], sowie eine Verbesserung einer bestehenden endothelialen Dysfunktion.

1.3 Inkretineffekt (IE) bei Gesunden

Wie einleitend erwähnt, führt der IE bei Stoffwechselgesunden nach oraler Glukosezufuhr zu einer deutlich höheren Insulin-Sekretionsantwort als bei isoglykämischer intravenöser Glukoseinfusion. Perley und Kipnis schätzten den IE bis zu 50%, wobei der Inkretinbeitrag zur Insulinausschüttung bei Glukosebelastungen zwischen 25 bis 100g mengenabhängig zwischen 20-60% betrug [12]. Es finden sich dabei bisher keine Hinweise, dass diese Inkretinantwort nach einer gemischten Mahlzeit bedeutend geringer sein sollte, als nach einer reinen Glukoseaufnahme. Quantifiziert werden kann der Inkretineffekt durch die Messung der Konzentrationen von Plasmainsulin und -C-Peptid und der daraus abgeleiteten Sekretionsraten (AUC). Grösser fällt der IE bei der Messung der Plasmainsulinkonzentrationen im Gegensatz zu den Plasma-C-Peptid-Konzentrationen aus, wobei letztere die Insulinsekretionsraten eigentlich genauer widerspiegeln. Die Erklärung dafür ist darin zu finden, dass Insulinkonzentrationen normalerweise in peripheren Blut gemessen werden, was mindestens eine Leberpassage einschliesst, während der grössere Mengen des neu sezernierten Insulins bereits wieder eliminiert werden. Diese Elimination wird bei einer oralen Glukoseaufnahme reduziert. Somit kann man folgern, dass die erhöhten Insulinkonzentrationen nach einer oralen Glukosezufuhr im Vergleich zu einer intravenösen Gabe, auf die insulinotrope Wirkung der gastrointestinalen Hormone, aber auch auf die herabgesetzte Elimination von Insulin zurückzuführen sind [47, 48].

Obwohl den Inkretinhormonen eine additive Wirkung zugeschrieben wird [31], scheint GLP-1 bei Gesunden physiologischer Weise nur eine untergeordnete Rolle in der Entstehung des IEs zu spielen und dieser wird hauptsächlich von GIP getragen. [49].

1.4 Inkretineffekt (IE) bei Typ 2 Diabetikern

Wenn man Typ-2 Diabetiker mit Gesunden vergleicht, findet sich ein deutlich reduzierter oder gar fehlender IE [50]. Abbildung 1 zeigt den Inkretineffekt bei Gesunden und Typ 2 Diabetikern als Differenz der Plasmainsulin-, bzw.- C-Peptid-Konzentrationen nach oraler und isoglykämischer intravenöser Glukosegabe. Hierfür wurden als Ursache unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen diskutiert, welche zum Teil noch nicht hinreichend oder kontrovers erforscht sind. Zum Einen steht dabei die zunehmende Insulinresistenz und gestörte Glukosetoleranz bei Typ 2 Diabetikern im Raum. Hansen et al demonstrierten, dass der IE bei jungen gesunden Männern durch eine, über einen kurzen Zeitraum, provozierte Insulinresistenz und Verminderung der Glukosetoleranz gesenkt werden kann. Daraus zogen sie den Schluss, dass der reduzierte IE bei Diabetikern ebenso eine Folge der diabetischen Stoffwechsellaage ist [51]. Ein weitaus grösseres Forschungsfeld zur Ursachensuche des reduzierten IE bei Diabetes mellitus ist aber die herabgesetzte postprandiale Inkretinsekretion und die verminderte Wirkung, sprich das insulinotrope Potential der Inkretine durch eine Insensitivität der Beta-Zellen. Schaut man sich Studien zur GIP-Sekretion an, konnte sowohl eine Hypersekretion [52], als auch eine Hyposekretion festgestellt werden, zumeist fand sich jedoch ein Sekretionsmuster ähnlich dem von Gesunden. Hinsichtlich der GLP-1-Sekretion fanden die Arbeitsgruppen um Holst in etwas älteren Arbeiten eine verminderte postprandiale GLP-1 Sekretion [53, 54], während Bagger et al. zeigten, dass sich bei Patienten mit T2DM und Gesunden auf eine ansteigende orale Glukosemenge gleiche GLP-1- und GIP-Antworten ergaben. Die Magenentleerung war dabei ebenso in beiden Gruppen mit zunehmender Glukosemenge verzögert, so dass es nach einem schnellen initialen Anstieg der Inkretinhormonkonzentrationen nur zu einem langsamen weiteren Anstieg kam. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass vor allem die herabgesetzte insulinotrope Fähigkeit der Inkretinhormone, und damit einhergehend die Unfähigkeit den IE mit steigender Glukosezufuhr zu regulieren, hauptursächlich für den deutlich abgeschwächten IE bei T2DM ist [55]. Metaanalysen kommen heute zu dem Schluss, dass bei T2DM ein normales Sekretionsmuster der Inkretine vorliegt [56, 57] mit deutlichen interindividuellen Variationen [5]. Hinsichtlich der verminderten insulinotropen Fähigkeit der Inkretine scheint beim T2DM wiederum GIP die Hauptrolle zu spielen. Exogen zugeführtes humanes GIP stimuliert die

Insulinsekretion in physiologischer Konzentration deutlich weniger und in pharmakologischer Konzentration sogar nur marginal. Durch den Wegfall seines Beitrags zur Insulinstimulation, bei Gesunden ja der Grossteil, ist der IE deutlich reduziert. Es scheint, dass die relativ erhaltene GLP-1 Aktivität bei Diabetikern diesen Wegfall nicht kompensieren kann, obwohl es zusätzlich die Glukagonkonzentration senkt [22].

Des Weiteren macht es den Anschein, dass bei Diabetikern die bei Gesunden beschriebene additive Wirkung der Inkretinhormone auf die Insulinstimulation gestört ist. Werden beide Inkretine exogen zugeführt, hebt sich sogar die Suppression der Glukagonausscheidung auf, welcher unter alleiniger GLP-1-Gabe vorhanden ist [48, 58].

Fasst man also die bisherigen Ausführungen zusammen, ist bei Diabetikern demnach ein Mechanismus defekt oder gar fehlend, welcher bei Gesunden etwa 2/3 der Insulinantwort auf eine Glukosezufuhr ausmacht [5]. Es stellt sich die Frage nach Huhn oder Ei: ist der reduzierte IE wirklich eine Folge der diabetischen Stoffwechsellage oder gehen die beschriebenen Pathomechanismen vielmehr der Entstehung der Krankheit voraus und erzeugen sie sogar. Eine Tatsache, die dafür spricht, dass die diabetische Stoffwechsellage die Reduktion des IE bedingt, ist, dass der Inkretineffekt bei erstgradigen Verwandten von Typ 2 Diabetikern in etwa gleich dem von vergleichbaren gesunden Probanden ist. Es ist also wohl keine genetische Prädisposition zur Entstehung von T2DM [59]. Auch, dass Patientin mit chronischer Pankreatitis und sekundärem Diabetes, im Gegensatz zu denen mit normaler Glukosetoleranz, einen verminderten IE zeigen, spricht dafür, dass es sich um eine Folgeerscheinung handelt [60]. Durch welche Eigenart des Diabetes aber diese Erscheinung des verminderten oder fehlenden IE hervorgerufen wird, ist bisher nicht klar.

1.5 GLP-1 und seine Rolle in der heutigen Therapie des T2DM

Diese heute vorhandenen Erkenntnisse lassen GIP als brauchbaren Kandidaten für die Diabetestherapie ausscheiden, obwohl es ehemals gerade wegen seiner bei Gesunden ausgeprägt vorhandenen insulinotropen Aktivität als verheissungsvoller Kandidat gehandelt wurde. GIP hat bei Typ 2 Diabetikern in pharmakologischer Dosierung nahezu keine Auswirkungen auf die Plasmaglukose und erhöht tendenziell die Glukagonsekretion [22, 58]. Die weitestgehend erhaltene insulinotrope Aktivität und Reduktion der Glukagonsekretion bei T2DM [22], sowie die Verzögerung der Magenentleerung [61, 62] liess GLP-1 damit in den Fokus der inkretinbasierten Diabetestherapie rücken. Darüber hinaus steigert es das Sättigungsgefühl und vermindert die Nahrungsaufnahme [63] und hilft so, eine Gewichtsreduktion zu erzielen. Aber auch die oben beschriebenen Eigenschaften, welche bisher nur im Zell- oder Tiermodell nachgewiesen wurden, wie etwa die Steigerung des Wachstums und der Regeneration der Betazellen und das antiapoptische Potential [35, 36], wären eine Hoffnung in der Diabetestherapie, sollten sich diese beim Menschen in gleichem Masse bestätigen lassen.

Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von ca. 2 Minuten eignet sich natives GLP-1 aber nicht für die Therapie des Diabetes mellitus. Es mussten also Anstrengungen unternommen werden, die rasche Degradation zu verhindern. Hier zeigen sich mehrere Möglichkeiten.

1.5.1 GLP-1-Rezeptor-Agonisten

Prinzipiell werden unter dem Begriff der GLP-1-Rezeptor-Agonisten alle Substanzen zusammengefasst, welche fähig sind, an den GLP-1-Rezeptor zu binden und eine GLP-1-ähnliche Wirkung hervorzurufen. Es wird aber in der Folge unterschieden zwischen Inkretin-Mimetika und GLP-1-Analoga.

Inkretin-Mimetika sind GLP-1-ähnliche Substanzen und resistent gegenüber der Degradation durch die DPP-4. Ein natürlich vorkommender Vertreter ist das Exendin-4, welches im Speichel des Gila-Monsters, *Heloderma suspectum*, gefunden wurde. Es weist zu ca. 50% eine Aminosäurehomologie mit GLP-1 auf und bindet mit hoher Affinität an den GLP-1-Rezeptor [64]. Exenatide, die rekombinante Form des Exendin-4, ist unter dem Namen Byetta® zur Behandlung des Diabetes zugelassen.

GLP-1-Analoga sind dem GLP-1 strukturähnliche Peptide, welche so modifiziert wurden, dass sie bei Bindung an den Rezeptor eine langsamere Kinetik aufweisen. Dies durch verlangsamte Resorption aus dem Subkutangewebe und/oder Resistenz gegenüber der DPP-4. Auch hier sind bereits zahlreiche Produkte der Familie der «Glutide» auf dem Markt [65].

1.5.2 DPP-4-Inhibitoren, u.a. Sitagliptin

Eine andere Strategie wird mit der Klasse der DPP-4-Inhibitoren bzw. DPP-4-Hemmern verfolgt. GLP-1 liegt nach endogener Sekretion nur etwa zu 50% in seiner biologisch aktiven Form vor, da sofort mit der Sekretion auch die Inaktivierung durch die DPP-4 einsetzt [30]. Eine Hemmung der DPP-4 und somit der Degradation des endogen sezernierten GLP-1, verlängert also die biologische Halbwertszeit beider Inkretinhormone.

Sitagliptin, welches in unserer Studie zur DPP-4 Hemmung eingesetzt wird, ist hochselektiv für die DPP-4 und weist keine Affinität zu anderen Dipeptidylpeptidasen, wie etwa der DPP-8 oder -9, auf, welche ebenso in der Lage sind Peptidhormone zu degradieren. Unter dem Handelsnamen Januvia® ist Sitagliptin zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen.

2. Ziel der Studie

Postprandial und glukoseabhängig aus der Darmmukosa freigesetzte Inkretinhormone, namentlich GIP und GLP-1, bewirken beim Gesunden durch eine Steigerung der Insulinsekretion und Hemmung der Glukagonsekretion eine Reduktion der Blutzuckerwerte. Dabei ist die Insulinsekretion nach oraler Glukosezufuhr deutlich höher als nach einer intravenösen isoglykämischen Glukoseinfusion. Dieses Phänomen wird als Inkretineffekt (IE) bezeichnet, ist durch die Inkretinhormone bedingt und beträgt etwa 40-60%. Bei Patienten mit T2DM ist der IE reduziert. Während die Wirkung von GIP deutlich reduziert oder sogar aufgehoben ist, scheint GLP-1 auch bei Diabetikern weiterhin zu wirken, wenn auch in reduziertem Masse. Zudem konnte eine Verlangsamung der Magenentleerung durch exogenes GLP-1 sowohl bei Gesunden, als auch bei Patienten mit T2DM festgestellt werden. Ein Effekt der bei Diabetikern wohl noch deutlicher zur Glukosehomöostase beiträgt. Die Funktionalität und Rolle von endogenem GLP-1 ist hier bislang nicht geklärt.

Beide Inkretinhormone werden rasch durch das Enzym DPP-4 abgebaut. Sitagliptin ist ein Inhibitor der DPP-4 und erhöht so die zirkulierende Menge von bioaktivem, endogenem GLP-1 und GIP. Seit 2007 ist Sitagliptin unter dem Namen Januvia® zur Therapie des Diabetes mellitus zugelassen. Unklar ist jedoch, ob und inwiefern Sitagliptin den reduzierten Inkretineffekt zu steigern vermag und welche Rolle die erhöhten Plasmaspiegel der Inkretinhormone für die therapeutische Wirkung von Sitagliptin spielen.

Mit dieser Studie sollen die Effekte einer oralen Gabe von Sitagliptin 100mg auf die Inkretin-induzierte Insulinsekretion (und somit des IE) und die Magenentleerung bei Patienten mit T2DM untersucht werden. Der IE wird quantitativ aus der Differenz der Plasmainsulins- und -C-Peptidanstiege über basal nach OGTT und entsprechender isoglykämischer intravenöser Glukoseinfusion (Glucose-Clamp) berechnet und ist dadurch unabhängig von der Änderung der Glykämie, welche durch eine Gabe von Sitagliptin zu erwarten ist.

Um die spezifische Rolle von GLP-1 - und dadurch letztendlich auch die der «nicht-GLP-1-Inkretine» - zu beschreiben, wird der spezifische GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin(9-39)amid (EX-9) eingesetzt. Dies in Kombination sowohl mit Sitagliptin, als auch Plazebo.

In dieser randomisierten Placebo-kontrollierten cross-over-Studie ergeben sich somit folgende experimentelle Konstellationen. Jeder Proband nahm an acht Studientagen teil:

	OGTT	Isoglykämischer Clamp zur Berechnung des Inkretineffekts des OGTT
Placebo p.o.	Magenentleerung	Inkretineffekt
Sitagliptin p.o.	Magenentleerung	Inkretineffekt
Placebo p.o + Ex-9 IV	Magenentleerung	Inkretineffekt
Sitagliptin p.o. + Ex-9 IV	Magenentleerung	Inkretineffekt

OGTT (oraler Glukosetoleranztest)

Ziel der Studie ist also herauszufinden, ob Sitagliptin durch seine DPP-4-Inhibition den IE bei Typ 2 Diabetikern steigern kann und welchen Beitrag GLP-1 und nicht-GLP-1-Inkretine (GIP) dabei leisten. Zusätzlich untersuchen wir die Auswirkung auf die Glukagonfreisetzung und die Magenentleerung der unterschiedlichen Behandlungen.

3. Material und Methoden

3.1 Genehmigungsverfahren und Einverständniserklärung

Die Studie wurde vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte unter der Vorlagennummer 4033252 genehmigt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigte die Studie unter der Projektnummer 239-07.

Alle Studienteilnehmer wurden erst nach Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung in die Studie eingeschlossen. Dieser Einverständniserklärung ging eine ausführliche ärztliche Aufklärung über das Ziel der Studie, den Ablauf, der beinhalteten Prozeduren, der Dauer und der potentiellen Risiken und Nutzen voraus. Die Studienteilnahme war freiwilliger Natur und konnte jederzeit von Seiten der Probanden widerrufen werden.

3.2 Probanden

In die Studie wurden 24 Typ 2 Diabetiker eingeschlossen, welche nicht insulinpflichtig waren, maximal orale Antidiabetika einnahmen und in der Lage waren, ab einer Woche vor Studienbeginn und während der gesamten Studiendauer auf diese zu verzichten (Details siehe unten). Die Aufnahme in die Studie erfolgte bei Erfüllung aller Ein- und Ausschlusskriterien und nach einer ausführlichen ärztlichen Untersuchung, EKG, Bestimmung der Vitalparameter und Laboruntersuchungen. Jeder Patient durchlief eine 21-tägige Screeningphase und wurde nachfolgend randomisiert den Behandlungsphasen zugeweiht.

3.2.1 Ein-, und Ausschlusskriterien

Die Studienteilnehmer mussten folgende Einschlusskriterien aufweisen:

- Patienten mit T2DM, wobei im gebärfähigen Alter die Einschränkung einer chirurgisch erbrachten Sterilität oder die Verwendung einer doppelten Barrieremethode bestand
- Die Patienten mussten in der Lage sein, orale Antidiabetika für mindestens 1 Woche vor Beginn der Studie abzusetzen (Glitazone 4 Wochen), diätetische Massnahmen einzuhalten und ein tägliches Blutzuckerprofil zu führen (Nüchternwert, prä- und 2h postprandial).
- Verpflichtung zu einer Kontaktaufnahme bei Nüchternblutzuckerwerten >11 mmol/l (200mg/dl) und 2h-postprandialen Werten >13.3 mmol/l (240mg/dl)
- Pausieren von Medikamenten, welche die Magenentleerung beeinflussen, Ausnahme dabei Herzmedikamente in stabiler Dosierung
- Alter 30-70 Jahre
- HbA1c $\leq 9\%$ zum Screeningzeitpunkt
- BMI <40 kg/m²
- Nüchternblutzucker ≤ 11 mmol/l (200 mg/dl) zum Screeningzeitpunkt
- Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung vor Beginn der Studie

Ausserdem bestanden folgenden Ausschlusskriterien zum Screeningzeitpunkt, aber auch zu jeder Zeit während der bereits begonnen Studie:

- Diabetes mellitus Typ 1, Sekundäre Diabetesformen, zB nach Pankreastrauma, Cushing-Syndrom oder Akromegalie
- Insulinbedarf in den letzten 3 Monaten
- Gebärfähige Frauen, sowie schwangere oder stillende Frauen
- Einnahme von Thiazolidinedion während des letzten Monats vor Beginn der Studie
- Vorliegen von signifikanten Begleiterkrankungen und Komplikationen des Diabetes mellitus
- Vorliegen von Nüchtern-Triglyzeridwerten $> 5.1 \text{ mmol/l}$ ($<450 \text{ mg/dl}$) während der letzten 4 Wochen
- Behandlung mit systemischen Steroiden oder Schilddrüsenhormonen in wechselnder Dosierung
- Stattgehabte chirurgische gastrointestinale Eingriffe (ausgenommen Appendektomie und Cholezystektomie)
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie während 4 Wochen vor Studienbeginn
- Blutspende oder Verlust $\geq 400 \text{ ml}$ innerhalb der letzten 2 Monate
- Erkrankungen mit deutlicher Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes in den letzten 2 Wochen vor Studienbeginn
- Persönliche Anamnese mit klinisch signifikanten EKG-Veränderungen oder Familienanamnese mit Long-QT-Syndrom
- Bekannte oder Hinweise auf eine ausgeprägte Arzneimittelallergie, insbesondere gegenüber der Studienmedikation, sowie Vorliegen einer Atopie
- Stattgehabte chirurgische Interventionen oder Erkrankungen, die Einfluss auf Absorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung von Medikamenten haben
- Gesamtleukozyten $<1500/\mu\text{l}$ bei Studieneinschluss oder Thrombozyten $<100.000/\mu\text{l}$ zum Screeningzeitpunkt
- Bestehende oder vergangene Immunsuppression
- Hinweise auf eine Leberfunktionsstörung anhand der Parameter GOT, GPT, GGT, alkalische Phosphatase und Bilirubin

- Nachweislicher oder anamnestisch angegebener Missbrauch von Medikamenten oder Alkohol innerhalb des letzten Jahres

3.2.2 Charakteristika

Insgesamt wurden 41 Probanden mit Typ 2 Diabetes mellitus gescreent und 27 randomisiert. 24 davon, 14 männliche und 10 weibliche Personen, wurden letztendlich in die Studie eingeschlossen bzw. beendeten diese (siehe Tabelle 1). In einem Fall widerrufen ein Proband seine schriftliche Einverständniserklärung, bei den zwei anderen Probanden kam es während der Studienphase zu Hyperglykämien, welche sich mit den Ausschlusskriterien deckten und somit eine potentielle Gefährdung für die Patienten darstellte. Die Patienten waren durchschnittlich 61.6 ± 1.8 Jahre (range 36 - 70) alt und wiesen einen BMI von 27.7 ± 0.9 kg/m² (range 20 - 37) auf. Der T2DM war gut eingestellt mit einem durchschnittlichen HbA1c von $6.3 \pm 0.2\%$ (range 5.4 - 8.4), bei einer mittleren Diabetesdauer von 6.6 ± 1.2 (range 1 - 25) Jahren.

Tabelle 1: Probandencharakteristika mit Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, BMI und HbA1c von 24 Patientin mit T2DM

Random. Nummer	Geschlecht	Alter (Jahre)	Diabetesdauer (Jahre)	BMI (kg/m ²)	HbA1c
0101	W	70	5	22	5.6
0102	W	66	3	27.5	5.9
0103	M	63	8	32	6.5
0104	W	55	1	37	7.3
0105	M	67	5	27.5	6.2
0107	M	66	2	26	6.3
0108	W	63	13	24.5	5.8
0110	M	69	10	26.5	6.2
0112	W	63	25	20	5.9
0115	W	68	2	29.5	5.5
0117	W	66	7	32.4	6.4
0118	M	70	7	26	5.9
0120	W	63	6	32	5.6
0121	W	67	2	21.5	5.4
0119	M	36	2	30	5.9
1109	W	59	1	32.6	5.4
0114	M	57	5	23	7.7
0106	M	62	8	31.3	6.2
0111	M	37	1	27	5.7
0123	M	66	10	25	8.4
0124	M	55	4	33.8	7.4
1113	M	66	20	24.5	6.0
0122	M	62	5	27.7	5.8
1116	M	62	7	26.5	7.8
Mittelwert		61.6	6.6	27.7	6.3
SEM		1.8	1.2	0.9	0.2

3.3 Studienmedikation

Als Studienmedikation kamen Sitagliptin (Januvia®) und Exendin(9-39) zum Einsatz. Die Effekte beider Substanzen werden mit einem Plazebo verglichen.

3.3.1 Sitagliptin (Januvia®)

Sitagliptin ist ein hochselektiver und potenter Inhibitor der DPP-4 mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration der DPP-4 (IC₅₀) von 18 nM. Es besteht keine Affinität zu anderen Prolin-selektiven Peptidasen, wie etwa der DPP-8 oder DPP-9 [66]. Die ubiquitär vorkommende DPP-4 ist hauptverantwortlich für die Degradation von GLP-1 und GIP durch Abspaltung eines N-terminalen Dipeptids, welche schon wenige Minuten nach der endogenen Sekretion einsetzt. Sitagliptin hemmt dosisabhängig die DPP-4 und verhindert damit den sonst sehr raschen Abbau der Inkretinhormone [67]. Dadurch wird die Konzentration der aktiven Inkretinhormone in der Zirkulation erhöht, was mit einer Erhöhung der glukoseabhängigen Insulinsekretion und Hemmung der Glukagonsekretion einhergeht [68]. In einem «steady-state», welches nach etwa drei Tagen erreicht wird, ist die Inhibition anhaltend stabil. Die Plasmaaktivität der DPP-4 wird bei Dosen von 50-200 mg einmal täglich über 24h zu $\geq 80\%$ gehemmt. So werden die postprandialen aktiven Inkretinkonzentrationen in etwa verdoppelt [69, 70]. Die Wirksamkeit von Sitagliptin wurden in vielen kontrollierten, randomisierten und doppelt-verblindeten Multizenterstudien belegt [68]. Schon eine Monotherapie erzielt signifikante Verbesserungen des HbA_{1c}-Werts, wobei Dosen >100mg einmal täglich keine weiteren Vorteile hinsichtlich der Wirkungskraft mit sich brachten [71]. Diese Dosierung wird auch als Standarddosierung bei unbeeinträchtigter Nierenfunktion empfohlen. Auch in Kombination mit Metformin wurde bei einer Dosierung von 100mg Sitagliptin täglich, eine signifikante Reduktion des HbA_{1c} Werts erreicht und sowohl die Nüchtern-, als auch die postprandialen Plasmaglukosekonzentrationen signifikant gesenkt. Die zusätzliche Gabe von Sitagliptin zu Metformin konnte den HbA_{1c} um 0.7% senken [72-74]. Sehr ähnlich verhält es sich bei antidiabetischer add-on Therapie zu Sulfonylharnstoff (HbA_{1c} Reduktion um 0.74%) [75], Pioglitazon [76] und Insulin (HbA_{1c} Reduktion um 0.6%) [77].

Nach oraler Einnahme wird Sitagliptin schnell absorbiert und weist eine absolute Bioverfügbarkeit von 87% auf. Mittlere maximale Plasmakonzentrationen werden nach ca. 1-4 Stunden erreicht. 38% von Sitagliptin sind reversibel an Plasmaproteine gebunden.

Knapp 80% wird unverändert renal eliminiert. Die Verstoffwechslung erfolgt vor allem über Cytochrom P450. Die Pharmakokinetik von Sitagliptin ist bei Typ 2 Diabetikern gleich der von Gesunden. Auch eine moderate Leberinsuffizienz (Child-Pugh Score 7-9) hat keine Auswirkungen auf die Pharmakokinetik. Im Rahmen einer Niereninsuffizienz kommt es zu einer inversen Relation der Kreatinin Clearance gegenüber der AUC von Sitagliptin. Entsprechend der Beeinträchtigung der Nierenfunktion steigen die AUC Werte von Sitagliptin an, so dass Patienten mit einer Kreatinin Clearance <45 ml/min eine Dosisreduktion empfohlen wird. Wie alle anderen DPP-4 Inhibitoren weist Sitagliptin kein intrinsisches Hypoglykämierisiko auf, da es lediglich die endogen, unter Hyperglykämie sezernierten Inkretinhormone länger vor dem Abbau bewahrt. Zudem ist es gewichtsneutral [78].

In unserer Studie wurde Sitagliptin in der Dosierung von 100mg eingesetzt, welches die generell empfohlene Dosis für eine effektive DPP-4-Hemmung ist. Sitagliptin ist im Allgemeinen und speziell in der Dosierung unserer Studie gut verträglich. Die häufigsten Nebenwirkungen sind unspezifischer Natur, wie Kopf-, Hals- und Gelenkschmerzen, Nasopharyngitis, Atemwegs- oder Harnwegsinfektionen oder sehr selten Hautveränderungen [79].

Der Einsatz von Sitagliptin in der Dosierung von 100mg/d als Therapeutikum bei Diabetes mellitus Typ 2 wurde vom BfArM im März 2007 genehmigt (010175-Z689). Sitagliptin und sein Placebo wurde von Merck & Co., Inc., Rahway, NJ zur Verfügung gestellt

Um ein stabiles Plasmalevel für unsere Studie zu erreichen, wurde Sitagliptin jeweils morgens am Tag vor der Studie und an den Studientagen selbst eingenommen.

3.3.2 Exendin(9-39)

Ex-9 ist ein spezifischer und reversibler Antagonist des GLP-1-Rezeptors, welcher die Wirkung von GLP-1 kompetitiv hemmt. Es ist ein Derivat des Agonisten Exendin-4 [64, 80]. Darüber hinaus ist das Peptid ein schwacher Antagonist am menschlichen GIP-Rezeptor, die halbmaximale Hemmkonzentration (IC₅₀) beträgt hier 4.5 µmol/L [80]. Die Applikation erfolgt intravenös. Die Plasmahalbwertszeit ist mit 20 min relativ kurz, danach wird das Peptid ohne Metabolisation renal eliminiert [81]. Ex-9 wurde sowohl in Tier-, als auch in humanen Studienprotokollen verwendet, um die wichtige Rolle von

GLP-1 für die Glukosetoleranz zu untersuchen und herauszustellen [81, 82]. In Validierungsstudien konnte gezeigt werden, dass Ex-9 dosisabhängig die durch intravenöses GLP-1 hervorgerufene Insulinsekretion reduziert und ab einer Dosis von 300pmol/kg/min die insulinotrope Aktivität zu 85% inhibiert [83]. Weitere Untersuchungen unseres Labors zeigten, dass Ex-9 in einer Dosierung von 900 pmol/kg/min mindestens 95% der GLP-1 induzierten Insulinsekretion hemmt und das bei guter Verträglichkeit [84]. Mit dem Zweck, die spezifischen Effekte von endogenem GLP-1 zu quantifizieren, wird es in unserer Studie genau in dieser Dosierung eingesetzt.

Exendin(9-39)acetat wurde als steriles Lyophilisat mit pharmazeutischer Qualität gekauft von Bachem (Clinalfa Products, Läufelfingen, Schweiz) und unmittelbar vor Einsatz in 0.154 M NaCl aufgelöst.

3.4 Experimentelles Studiendesign

Unsere Studie ist eine monozentrische, doppelt-blinde, randomisierte, Plazebo-kontrollierte, Cross-over Studie mit vier Behandlungsphasen zu je zwei Studientagen.

Alle 24 Patienten durchliefen die gleichen vier Behandlungsphasen. Die Einteilung in die jeweilige Behandlungssequenz, erfolgte per Zufall. Der Unterschied bestand in der Reihenfolge, in welcher die Studienmedikation appliziert wurde (Tabelle 2). Zwischen den einzelnen Behandlungssequenzen lagen mindestens vier Tage und eine Behandlungssequenz musste innerhalb von maximal fünf Tagen durchlaufen werden.

Tabelle 2: Behandlungssequenzen und Randomisierung

Behandlungsphase*	1	2	3	4
Behandlungssequenz	Behandlungs-Nr.			
A	1	2	3	4
B	2	1	3	4
C	1	2	4	3
D	2	1	4	3
E	3	4	1	2
F	4	3	2	1

*jede Behandlungsphase beinhaltet zwei Studientage: einen ersten Tag mit einem OGTT und einen zweiten Tag mit einem isoglykämischen Glukose-Clamp um den Inkretineffekt zu berechnen

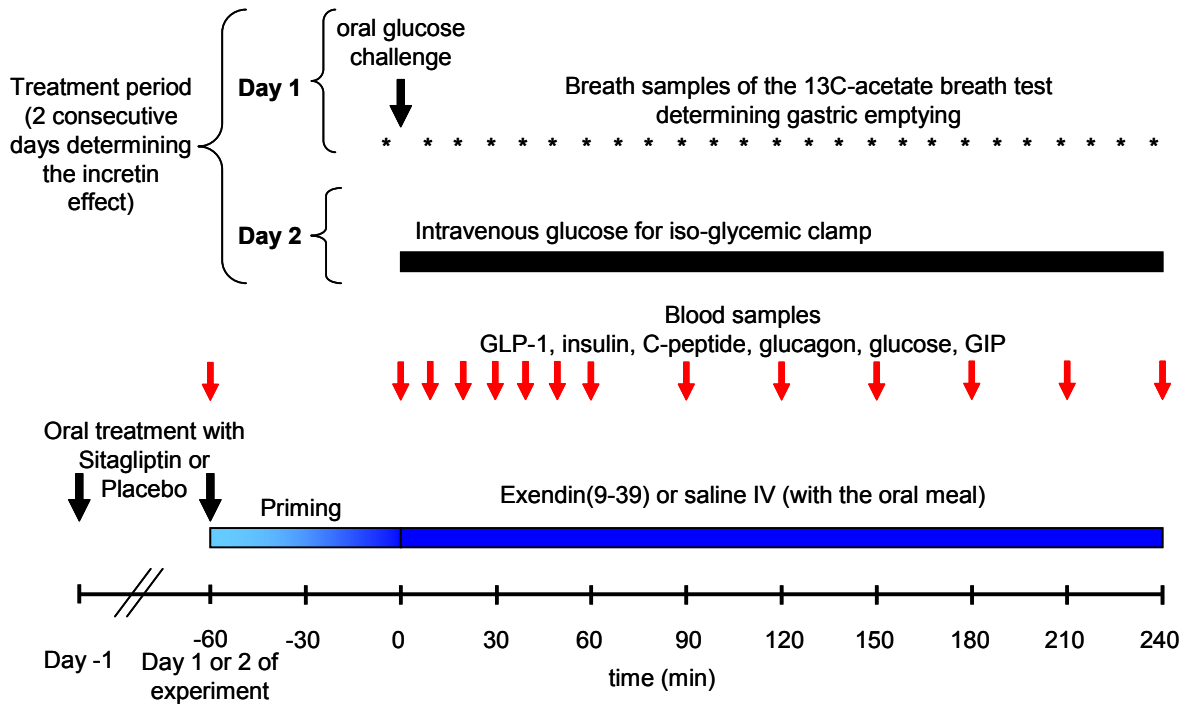
Behandlung 1: Plazebo po + NaCl 0.9% iv
 Behandlung 2: Sitagliptin po + NaCl 0.9% iv
 Behandlung 3: Sitagliptin po + Exendin(9-39) iv
 Behandlung 4: Plazebo po + Exendin(9-39) iv

Abbildung 2 zeigt das experimentelle Studiendesign. Am jeweils ersten Tag einer Behandlungsphase erhielten die Patienten einen OGTT mit 75 g Glukose. Am zweiten Tag erfolgte ein isoglykämischer Clamp. Hierbei werden die Blutglukosekonzentrationen und der jeweilige Konzentrationsanstieg des Vortages mittels intravenöser Infusion von Glukose 20% nachgeahmt [85]. Der Unterschied der Plasmainsulin- bzw C-Peptidexkursion zwischen oraler Glukoseaufnahme und intravenöser Gabe entspricht dem IE.

Dieser wurde getrennt, basierend auf den Plasmakonzentrationen von Insulin, C-Peptid und der Insulin/Glukose-Ratio (IGR) berechnet. Der OGTT enthielt zudem 100mg ¹³C-Acetat, anhand dessen per Atemtest die Magenentleerung gemessen werden konnte [86] (im Rahmen der Arbeit wird verkürzt vor allem auf die Ergebnisse eingegangen). Die Patienten nahmen ihre orale Studienmedikation (Sitagliptin oder Plazebo) einen Tag vor (Tag -1) und an den jeweiligen Studientagen der einzelnen Phasen ein. Dies entspricht einer Menge von mindestens 3 und maximal 5 Tabletten der Studienmedikation pro Behandlungsphase. Während des OGTTs wurde, je nach Behandlungsphase, Ex-9 in der Dosierung von 900 pmol/kg/min oder NaCl 0.9% in gleichem Volumen intravenös während des gesamten Versuchstags verabreicht. An jedem Studientag wurden über die Dauer der Zeit jeweils gleichzeitig Plasmakonzentrationen von Glukose, Glukagon, GIP, GLP-1, Insulin und C-Peptid bestimmt. Die Studientage begannen immer morgens nach einer nächtlichen (mind. 12 Stunden) Fastenperiode und dauerten ungefähr 5 Stunden.

Abbildung 2: Experimentelles Design der Studientage

Four treatment periods in random order: - Placebo po and saline iv - Placebo po and exendin(9-39) iv
 - Sitagliptin po and saline iv - Sitagliptin po and exendin(9-39) iv



3.5 Praktische Durchführung

Die orale Studienmedikation wurde doppelt verblindet an die Probanden ausgegeben. Diese nahmen sie morgens am Tag vor der Studienphase und an beiden Tagen der Behandlung nach einer mindestens 12-stündlichen nächtlichen Fastenperiode ein. Lagen Brückentage zwischen den zwei Behandlungstagen, wurde die Studienmedikation auch an diesen in gleicher Weise eingenommen. Am Studientag selbst wurde die Medikation 60 Minuten (t -60) vor Beginn des Experiments eingenommen. Über eine in einer Ellenbogenvene angelegte Verweilkanüle wurde zum gleichen Zeitpunkt wie die orale Medikation (t -60) eine Infusion mit Ex-9 in der Dosierung vom 900 pmol/kg/min oder NaCl 0.9% als korrespondierendes Plazebo für die Dauer von insgesamt 300 Minuten gestartet (t -60 bis 240). Ex-9 wurde vom Hersteller als lyophiles Pulver geliefert und in 0.154 molarer NaCl-Lösung aufgelöst. Dieser Schritt erfolgte jeweils am Studientag durch die medizinischen Labormitarbeiterinnen, die, im Unterschied zur versuchsdurchführenden Person, nur dahingehend entblindet waren. Am kontralateralen Unterarm wurde eine zusätzliche Verweilkanüle gelegt, über die die Blutproben entnommen wurden. Die Hand dieser Seite wurde im Rahmen der «heated-hand»-Technik mittels einer Infrarotlampe kontinuierlich auf exakt 40°C erwärmt. Die Hauttemperatur wurde über einen sensorgesteuerten Biothermostat reguliert. Diese Technik erlaubt die Gewinnung von arterialisierten venösen Blutproben [83].

Zum Zeitpunkt «0» wurde am ersten Studientag ein OGTT mit 75 g Glukose innerhalb von 5 Minuten konsumiert und am korrespondierenden Studientag 2 die intravenöse Glukoseinfusion gestartet. Zudem wurden an Tagen mit OGTT vor Einnahme der Glukosemahlzeit und alle 10 Minuten danach Atemproben für den $^{13}\text{CO}_2$ -Atemtest abgegeben, um später die Magenentleerungsgeschwindigkeit zu bestimmen [61, 86]. Die intravenöse Glukoseinfusion des zweiten Versuchstages wurde mit 20%iger Glukose bei einer NaCl-Hintergrundinfusion durchgeführt. Im Rahmen des intravenösen Glukose Clamps wurden alle 5 Minuten die Blutzuckerwerte gemessen und die Glukoseinfusionsgeschwindigkeit mittels Perfusor so angepasst, dass die Blutzuckerkonzentrationen des Vortages möglichst genau nachgestellt wurden [85].

Blutproben zur Bestimmung von Glukose, sowie der Plasmakonzentrationen von Insulin, C-Peptid, Glukagon, GIP und GLP-1 wurden an beiden Studientagen in regelmässigen

Abständen entnommen. Diese erfolgten zu den Zeitpunkten -60, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, und 240. Insgesamt wurden so pro Proband und Studientag 14 Blutproben gesammelt.

3.6 Bezug der Studienmedikation, Probenaufbereitung und Analysen

Sitagliptin und die orale Plazebomedikation wurden von Merck & C. Inc., Rahway, NJ, bereitgestellt. Die Tabletten wurden bereits randomisiert zugestellt.

Ex-9 wurde als steriles lyophiles Pulver in pharmazeutischer Qualität von Bachem (Clnalfa Porducts, Läu felingen, Schweiz) bezogen.

Aus den arterialisierten venösen Blutproben wurde die Blutglukosekonzentration mittels Glukoseoxidasemethode gemessen (Glukoseanalysator HemoCue GmbH, Ängelholm, Schweden).

Die Blutproben wurden in 5ml Einheiten abgenommen. Diese wurden zum Schutz der Plasmahormone in eisgekühlten EDTA-Monovetten mit 500 Einheiten des Proteaseinhibitors Aprotinin und 50 µL des DPP-4 Inhibitors Diprotin A (3 mmol/l) pro Milliliter Blut gesammelt. Die Röhrchen wurden danach weiter auf Eis gelagert und innerhalb von 30 Minuten nach Abnahme zentrifugiert. Das Blutplasma wurde danach in Eppendorf-Cups pipettiert und bis zur Analyse bei -30°C eingefroren.

Die Immunreaktivität von Plasmainsulin, Plasma-C-Peptid und GLP-1(7-36) wurde durch einen Sandwich-Immuno-Lumineszenz-Assay (ILMA) mit spezifischen monoklonalen Capture- und Detectio-Antikörpern bestimmt [87]. Der GLP-1-Assay kreuzreagiert dabei zu 100% mit humanem bioaktivem GLP-1(7-36)-Amid und zeigt keine messbare Kreuzreaktivität mit GLP-1(7-37)-Amid, GLP-1(9-36)-Amid, GLP-2(1-33)-Amid, GIP(3-42)-Amid, Glukagon(1-29)-Amid und Ex(9-39)-Amid. Das lower detection limit ist 0.4 pmol/l. Der Variationskoeffizient (CV) innerhalb eines, respektive zwischen den verschiedenen Assays, lag dabei bei <6 bzw. <15%.

Die Messung von Glukagon und GIP erfolgte durch kommerzielle Radioimmunoassay Kits des Herstellers Linco Research, St. Charles, MO. Die Immunreaktivität von GIP wurde mittels eines polyklonalen Antiserums (Katalognummer 98171) bestimmt. Dieser Assay zeigt 100% Kreuzreaktivität mit humanem GIP(1-42) und keine messbare zu humanem

GIP(3-42), GLP-1(7-36)-Amid, GLP-1(9-36)-Amid, GLP2(1-33)-Amid, GLP-2(3-33)-Amid und Glukagon. Das lower detection limit ist <5 pmol/l, die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten (CV) liegen bei <6, resp. <15% [88].

3.7 Statistische Auswertung

Die Berechnungen zur Power der Studie greifen auf einem two-tailed paired t-Test mit 5% Signifikanzniveau. Für eine Power von 90% waren 24 Probanden nötig um eine Differenz im IE von 11% auszumachen. Ausgangspunkt war dafür ein Variationskoeffizient (CV) zwischen den Individuen von 0.20 [59].

Alle erhobenen Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Blutzuckerkonzentrationen sowie die Plasmakonzentrationen der Hormone vor OGTT und isoglykämischen Clamp werden als absolute Werte angegeben.

Die Abweichungen der Blutglukosekonzentrationen sowie der Plasmahormonkonzentrationen von den individuellen Basalwerten (zum Zeitpunkt $t = 0$) während des OGTTs und dem isoglykämischen Clamp werden gemäss der Trapezregel als area under the curve über basal (incremental AUC, iAUC) berechnet.

Der IE wurde jeweils für Insulin, C-Peptid und die Insulin/Glukose-Ratio (IGR) berechnet. Er stellt die Differenz der iAUCs der genannten Werte aus OGTT und entsprechendem isoglykämischen Clamp dar.

Mit dem Kolmogoroff-Smirnov-Test wurde die Normalverteilung der gewonnenen Ergebnisse geprüft. Die Effekte von Sitagliptin und Exendin(9-39) wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse für wiederholte Messungen (two-way ANOVA for repeated measures) untersucht. Als unabhängige Faktoren wurden dabei die orale Studienmedikation (Sitagliptin oder Plazebo) und die intravenöse Infusion (Ex-9 oder NaCl) gesehen. Ergab die two-way-ANOVA eine Abhängigkeit der Faktoren, erfolgte eine Subgruppenanalyse mit einem Student-Newman-Keuls multicomparison-Test als post-hoc Analyse.

Für die Magenentleerung ist die Zeit der maximalen $^{13}\text{CO}_2$ Exhalation der bestgeeignete Parameter des ^{13}C -Acetat-Atemtests. Eine weiter gehende Analyse erfolgte durch nicht-linearen exponentiellen Fit der prozentualen $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation (%dose/h) mit der Formel $y = at^b e^{-ct}$ und der kumulativen $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation mit der Formel $y = m(1 - e^{-kt})^\beta$. Aus diesen Konstanten wurden die Parameter 'half emptying time' $t_{1/2} = -1/k \ln(1 - 2^{-1/\beta})$ und die lag Phase $t_{\text{lag}} = (\ln \beta/k)$ errechnet.

Bei $P < 0.05$ waren Unterschiede statistisch signifikant.

Die Daten zu den Effekten von Sitagliptin und Ex-9 im Nüchternzustand sind in Tabelle 3 erfasst. Die Daten zu den Effekten von Sitagliptin und Ex-9 während des OGTT und dem isoglykämischen Clamp, sowie der IE, sind in Tabelle 4 erfasst. Die Daten zur Magenentleerung sind in Tabelle 5 erfasst. Diese wurden anhand der oben aufgeführten statistischen Analysen berechnet und alle im Text sowie in den Abbildungen genannten bzw. dargestellten Unterschiede liegen diesen Tabellen zugrunde.

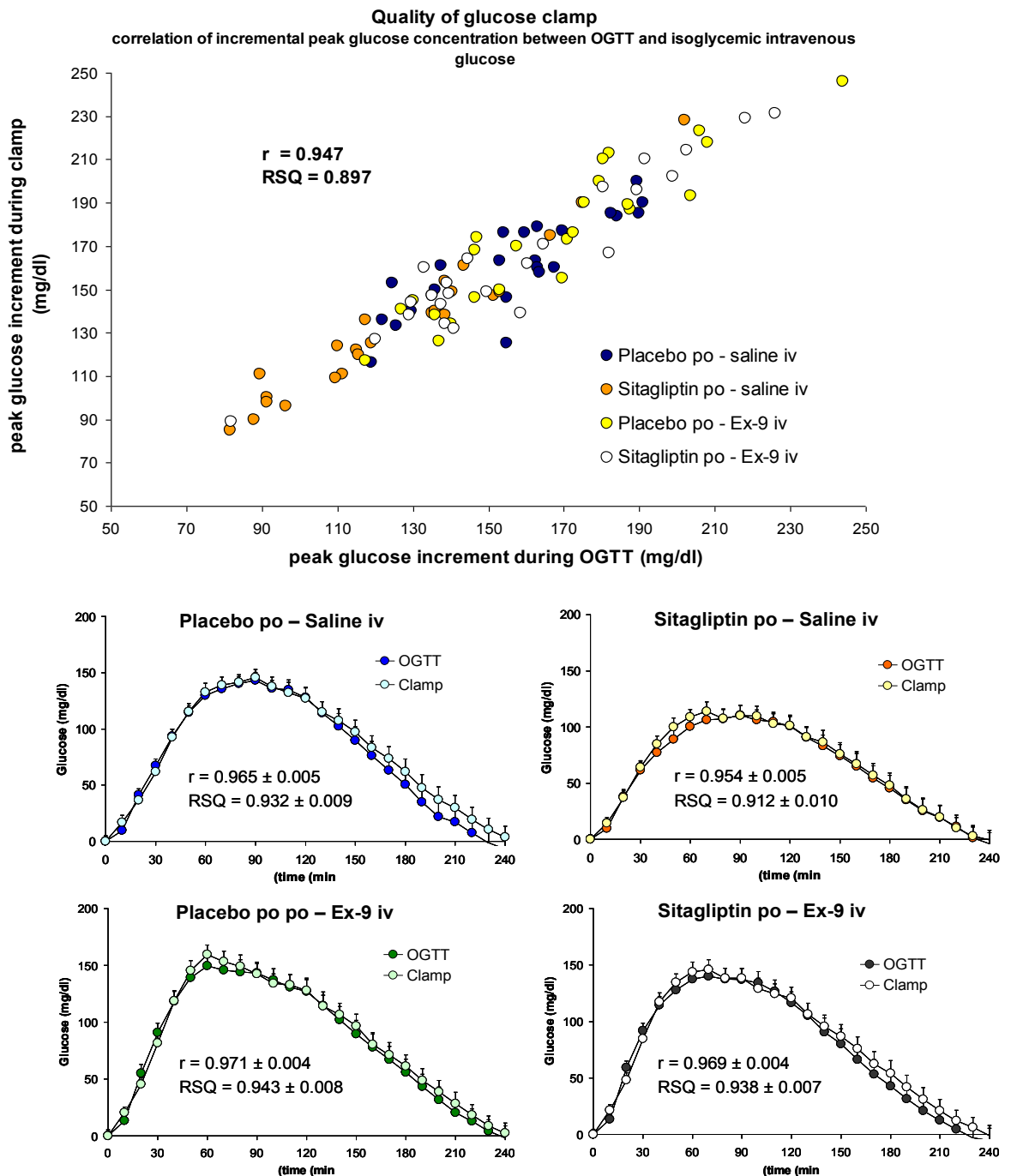
4. Ergebnisse

24 Patienten mit T2DM nahmen an 4 Behandlungssequenzen zu je 2 Versuchstagen teil, um die Frage zu beantworten, ob Sitagliptin in der Lage ist, den im Rahmen des Diabetes mellitus reduzierten IE zu steigern und inwiefern endogenes GLP-1 an den Effekten von Sitagliptin beteiligt ist. Der IE ist die Differenz der Plasmainsulinexkursionen nach oraler Glukosebelastung und isoglykämisch intravenös infundierter Glukose. GLP-1 und GIP wurden durch Ingestion eines oralen Glukosetoleranztest (OGTT) mit 75 g Glukose stimuliert. Dies erfolgte mit und ohne DPP-4-Hemmung mittels Sitagliptin. Zur Quantifizierung der Rolle von endogenem GLP-1, erfolgten zwei weitere Tage mit einem OGTT, bei denen vor oraler Medikation mit Placebo oder Sitagliptin, eine GLP-1-Rezeptorblockade mit kontinuierlicher intravenöser Infusion des GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin(9-39) durchgeführt wurde. Um den IE zu berechnen, wurden an separaten Tagen die Blutzuckerkonzentrationen jedes OGTT nüchtern durch eine intravenös verabreichte Glukoseinfusion imitiert (Glukose-Clamp).

Gemäss dem Blutzuckertagebuch, welches die Probanden zu Hause führen mussten, waren alle Probanden vor Beginn der Studie diabetisch kompensiert. Sowohl Sitagliptin, als auch Ex-9 wurden von allen Studienteilnehmern gut vertragen. Von den gescreenten freiwilligen Probanden widerrief einer (subject number 01019) seine schriftliche Einverständniserklärung nach Auftreten von Kopfschmerzen während des Clampversuches (NaCl Infusion), welche unter Paracetamol komplett regredient waren. Es bestand kein Zusammenhang mit der Studienmedikation. Zudem gab es während der laufenden Studie zwei frühzeitige Abbrüche (subject numbers 0113, 0116), da das Blutglukoselimit nach Absetzen der oralen antidiabetischen Medikation während des OGTT nicht eingehalten werden konnte und die Studienteilnehmer damit ausgeschlossen werden mussten. Alle Studienausscheider wurden gemäss Studienprotokoll mit entsprechender Ersatznummer ersetzt, sodass insgesamt 24 Probanden die Studie vollständig durchliefen. Es kam zu einem SAE (subject number 1109), welches jedoch nicht in Zusammenhang mit der Studienmedikation gesehen werden kann. Die betreffende Probandin informierte uns eine Woche nach Abschluss der Studie, dass bei ihr der Verdacht auf ein Mammakarzinom erhoben worden war. Das SAE wurde schriftlich an die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU München und das BfArM gemeldet.

Die Voraussetzung für valide Daten und alle Vergleiche in unserer Studie war, dass die Blutglukoseexkursionen der OGTT und der zugehörigen isoglykämischen Clamps möglichst übereinstimmend waren. Abbildung 3 zeigt, dass dies mit einem durchschnittlichen R^2 Wert von 0.93 ± 0.009 (Plazebo + NaCl), 0.91 ± 0.01 (Sitagliptin + NaCl), 0.94 ± 0.008 (Plazebo + Ex-9) und 0.94 ± 0.007 erreicht wurde.

Abbildung 3: Qualität der isoglykämischen Clamps: Vergleich der Blutglukoseexkursionen von OGTT und korrespondierendem isoglykämischen Clamp während den einzelnen Behandlungsphasen



Korrelation der Spitzenglukoseexkursion zwischen OGTT und isoglykämischen Clamp (Bild oben).

Postprandiale Blutglukoseexkursionen nach 75 g oraler Glukose (OGTT) und während einer isoglykämischen intravenösen Glukoseinfusion (Clamp) über 240 min bei 24 Patienten mit T2DM während der verschiedenen Behandlungsphasen.

Der RSQ Determinationskoeffizient dient der Einschätzung der Übereinstimmung von OGTT und Clamp.

4.1 Effekte der DPP-4-Inhibition und GLP-1-Rezeptorblockade im Nüchternzustand

Tabelle 3 fasst die Effekte von Sitagliptin und Ex-9 auf Blutglukose und Hormone nüchtern, also noch vor Gabe des OGTT, zusammen.

Entsprechend der Tatsache, dass unsere Probanden Typ 2 Diabetiker waren, waren die Nüchtern-Glukosekonzentrationen mit 125 ± 4.7 mg/dl (Plazebo + NaCl) erhöht.

Die Behandlung mit Sitagliptin führte zu einer signifikanten Reduktion der Nüchternblutglukose im Vergleich zu einer Gabe von oralem Plazebo im Rahmen des T2DM. Zum Zeitpunkt -70 Min 118 ± 4.3 mg/dl vs 125 ± 4.7 mg/dl ($P = 0.004$) und zum Zeitpunkt 0 Min 114 ± 4.1 mg/dl vs. 120 ± 4.3 mg/dl ($P = 0.011$).

Die 60 minütige Priming-Infusion mit Ex-9 ($t = 0$ Min) steigerte die Blutglukosekonzentrationen signifikant im Vergleich zu NaCl (132 ± 5.4 mg/dl, $P < 0.001$). Sitagliptin senkte die Nüchternblutglukose auch vor Hintergrundinfusion mit Ex-9 (129 ± 4.5 mg/dl, $P = 0.011$).

Die Infusion mit Ex-9 hatte keinen Einfluss auf die Nüchtern-Plasmakonzentrationen von Insulin zum Zeitpunkt 0 Min, reduzierte aber trotz höherer Blutglukosespiegel die Plasma-C-Peptid-Konzentrationen ($P = 0.023$).

Die Nüchtern-Plasmakonzentrationen von Glukagon stiegen unter Infusion von Ex-9 signifikant an ($P = 0.021$), zeigten aber keine Änderung unter Sitagliptinbehandlung.

Sitagliptin führte zu einer signifikanten Erhöhung der aktiven GLP-1- ($P < 0.001$) und GIP-Plasmakonzentrationen ($P = 0.029$) im Nüchternzustand. Dies erfolgte unabhängig von Ex-9. Jedoch verstärkte sich dieser Effekt unter Ex-9-Infusion bei GLP-1 sogar zusätzlich (Sitagliptin + NaCl vs. Sitagliptin + Ex-9: 1.6 ± 0.1 pmol/l vs. 2.7 ± 0.4 pmol/l, $P < 0.001$).

Zusammengefasst reduzierte Sitagliptin nüchtern die Blutglukose, GLP-1 und GIP im Plasma stiegen an. Signifikante Effekte auf Plasmainsulin, und -glukagon waren nicht messbar, wahrscheinlich als Ausdruck der glukoseabhängigen Wirkung der Inkretinhormone. Der GLP-1-Rezeptorantagonist Ex-9 steigerte nüchtern die Blutglukose, verbunden mit einer Reduktion des Plasma-C-Peptid und einem Anstieg des Plasmaglukagon. Sitagliptin senkte die Nüchtern-Blutglukosekonzentration und steigerte Plasma-GLP-1

und -GIP auch vor Hintergrund von Ex-9. Letzteres kann als erster Hinweis auf eine GLP-1-unabhängige Wirkung von Sitagliptin gewertet werden.

Tabelle 3: Effekte von oralem Sitagliptin und intravenösem Ex-9 auf die Blutglukose und die Plasmahormonkonzentrationen im Nüchternzustand

Orale Medikation	Plazebo po	Sitagliptin po	Plazebo po	Sitagliptin po
+	+	+	+	+
Intravenöse Infusion	NaCl iv	NaCl iv	Ex-9 iv	Ex-9 iv
-70 Min: zu Beginn jeder Behandlungsphase (ohne intravenöse Infusion)				
Blutglukose (mg/dl)	125 ± 4.7	118 ± 4.3 *	120 ± 4.6	118 ± 4.1 *
Insulin (µU/ml)	9.7 ± 1.3	9.3 ± 1.3	10.6 ± 1.5	9.6 ± 1.7
C-Peptid (ng/ml)	6.1 ± 1.4	5.4 ± 0.7	5.8 ± 0.9	5.7 ± 1.0
Glukagon (pg/ml)	43.0 ± 6.0	37.7 ± 5.8	42.7 ± 6.3	40.0 ± 5.9
GLP-1 (pmol/l)	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.6 ± 0.3
GIP (pmol/l)	24.0 ± 1.5	24.9 ± 1.5	23.1 ± 1.2	25.8 ± 1.5
0 Min: nach 60 Min Priming-Infusion				
Blutglukose (mg/dl)	120 ± 4.3	114 ± 4.1 *	132 ± 5.4 #	129 ± 4.5 *#
Insulin (µU/ml)	8.7 ± 1.3	7.4 ± 1.0 *	7.6 ± 1.0	6.0 ± 1.0 *
C-Peptid (ng/ml)	5.4 ± 1.1	4.8 ± 0.6	3.8 ± 0.4 #	4.1 ± 0.5 #
Glukagon (pg/ml)	36.5 ± 6.3	35.5 ± 6.3	40.7 ± 6.8 #	38.8 ± 6.3 #
GLP-1 (pmol/l)	0.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1 *	1.0 ± 0.2	2.7 ± 0.4 *#
GIP (pmol/l)	21.2 ± 1.3	22.5 ± 1.0 *	22.5 ± 0.9	25.8 ± 1.4 *

Mittelwert ± SEM der absoluten Daten im Nüchternzustand (vor Einnahme des OGTT) zu Beginn jeder Behandlungsphase (-70 min) und nach intravenöser Infusion (0 min) von 24 Patienten mit T2DM

ANOVA (siehe 3.4. für Erläuterung)

*:P<0.05 zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zu oralem Plazebo und der gleichen intravenösen Infusion

#:P<0.05 zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zu NaCl-Infusion und der gleichen oralen Medikation

4.2 Effekte der DPP-4-Inhibition und GLP-1-Rezeptorblockade während OGTT und isoglykämischer Nüchtern-Hyperglykämie (Clamp)

Tabelle 4 fasst die Daten und Ergebnisse der statistischen Auswertung zusammen.

Tabelle 4: Effekte von oralem Sitagliptin und intravenösem Ex-9 auf die Blutglukoseexkursionen, die Plasmahormonkonzentrationen und auf den Inkretineffekt nach OGTT und dem korrespondierenden isoglykämischen Clamp bei 24 Patienten mit T2DM

orale Medikation + intravenöse Infusion	Plazebo po + NaCl iv	Sitagliptin po + NaCl iv	Plazebo po + Ex-9 iv	Sitagliptin po + Ex-9 iv
Blutglukose (OGTT)				
AUC (g/dl · 240 min)	18.5 ± 1.1	15.1 ± 1.1 *	20.1 ± 1.2 #	18.4 ± 1.4 *#
Peak (mg/dl)	155 ± 4.5	126 ± 6.1 *	167 ± 6.1 #	158 ± 6.9 *#
Time to peak (min)	90 ± 5	100 ± 6	85 ± 6	92 ± 6
Insulin				
AUC (mU/ml · 240 min)				
OGTT	7.8 ± 1.4	9.0 ± 1.4 *	6.2 ± 1.0 #	7.6 ± 1.2 *#
Clamp	3.5 ± 0.7	4.0 ± 0.8 *	3.8 ± 0.7 #	4.6 ± 1.0 *#
Inkretineffekt	4.4 ± 0.8	5.0 ± 0.8	2.5 ± 0.4 #	3.0 ± 0.4 #
C-Peptid				
AUC (µg/ml · 240 min)				
OGTT	5.7 ± 1.6	8.5 ± 2.5 *	4.6 ± 1.4 #	6.0 ± 1.8 *#
Clamp	2.4 ± 0.7	3.1 ± 1.0 *	2.7 ± 0.8	3.5 ± 1.1 *
Inkretineffekt	3.4 ± 1.0	5.4 ± 1.8 *	1.9 ± 0.6 #	2.5 ± 0.8 *#
Insulin-Glucose ratio (IGR)				
AUC (mU/mg · 240 min)				
OGTT	3.3 ± 0.6	4.5 ± 0.8 *	2.4 ± 0.5 #	3.1 ± 0.6 *#
Clamp	1.1 ± 0.3	1.7 ± 0.4 *	1.2 ± 0.4	1.7 ± 0.5 *
Inkretineffekt	2.1 ± 0.4	2.8 ± 0.5 *	1.2 ± 0.2 #	1.4 ± 0.2 *#
Glukagon				
OGTT				
AUC (pg/ml · 120 min)	-18.9 ±	-731 ± 260 *	860 ± 306 #	413 ± 303 #
AUC (pg/ml · 60 min)	385 ± 117	-133 ± 124 *	776 ± 140 #	607 ± 135 #

orale Medikation + intravenöse Infusion	Plazebo po + NaCl iv	Sitagliptin po + NaCl iv	Plazebo po + Ex-9 iv	Sitagliptin po + Ex-9 iv
GLP-1 AUC (pmol/l · 240 min)				
OGTT	235 ± 50	520 ± 61 *	652 ± 83 #	1616 ± 239
Clamp (absolute Konzentration.)	51.5 ± 5.8	202 ± 45 *	59.2 ± 8.5	139 ± 19 *
GIP AUC (nmol/l · 240 min)				
OGTT	1.5 ± 0.3	3.9 ± 0.4 *	1.3 ± 0.2	2.5 ± 0.4 *#
Clamp (absolute Konzentration)	5.7 ± 0.2	5.5 ± 0.2	Nicht gemessen	Nicht gemessen

Mittelwert ± SEM des inkrementellen AUC (iAUC) über 240 Minuten nach OGTT und entsprechender isoglykämischer intravenöser Glukoseinfusion bei 24 Patienten mit T2DM. Der Inkretineffekt ist die Differenz der AUC (iAUC OGTT – iAUC Clamp)

ANOVA (siehe 3.4. für Erläuterung)

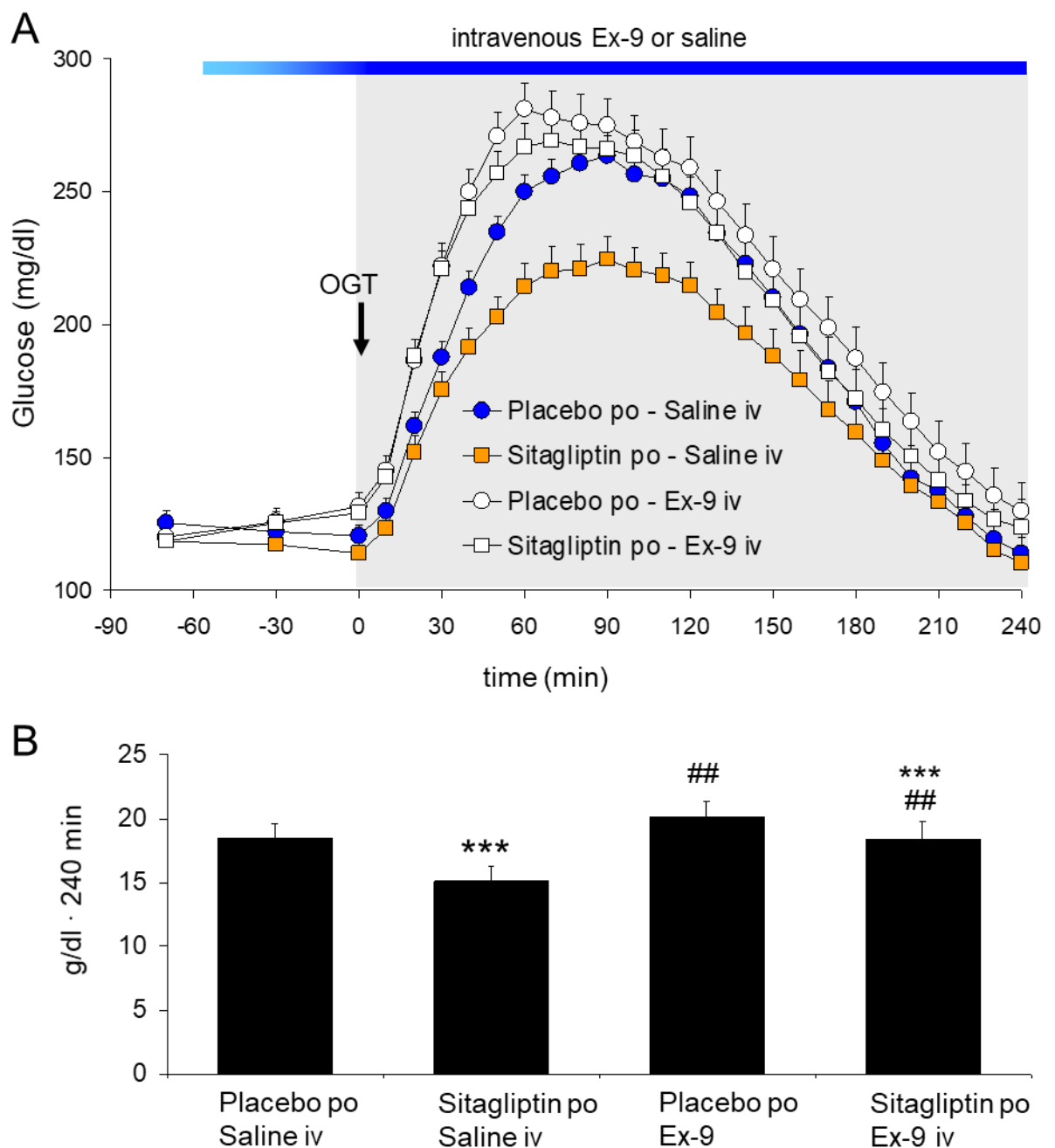
*:P<0.05 zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zu oralem Plazebo + der gleichen intravenösen Infusion

#:P<0.05 zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zu NaCl-Infusion und der gleichen oralen Medikation

4.2.1 Glukose

Sitagliptin reduzierte im Vergleich zu Plazebo während des OGTT signifikant die inkrementelle AUC (iAUC) der Blutglukoseexkursion ($P < 0.001$) und ebenso die inkrementellen Blutglukosespitzenwerte signifikant (siehe Tabelle 4 und Abbildung 4). Da Sitagliptin bereits zur Regulation der Hyperglykämie als orales Antidiabetikum zugelassen ist, waren diese Ergebnisse zu erwarten. Zudem war die Zeit bis zum Erreichen der Glukosespitzenwerte im Blut unter Behandlung mit Sitagliptin tendenziell verzögert ($P = 0.067$). Unter GLP-1-Rezeptorblockade mit Ex-9 waren sowohl die Blutglukose-iAUC ($P = 0.004$), als auch die Blutglukosespitzenkonzentrationen ($P = 0.001$) nach dem OGTT signifikant erhöht. Ex-9 reduzierte signifikant die Blutzucker-senkende Wirkung von Sitagliptin. Dennoch reduzierte Sitagliptin die Blutzuckerexkursionen auch vor Hintergrund mit Ex-9 signifikant. Der glukosesenkende Effekt von Sitagliptin war unter Ex-9-Hintergrundinfusion nur etwa halb so gross als mit NaCl-Infusion, blieb aber noch signifikant nachweisbar.

Abbildung 4: Blutglukosekonzentrationen und inkrementelle AUC nach OGTT für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen



Mittelwert \pm SEM

A: Blutglukosekonzentrationen vor und nach OGTT mit 75 g Glukose in 24 Patienten mit T2DM für Plazebo oral (po) plus NaCl (saline) intravenös (iv), Sitagliptin po plus NaCl iv, Plazebo po plus Ex-9 iv und Sitagliptin po plus Ex-9 iv

B: Inkrementelle AUC (iAUC) für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen

***P < 0.001 für Sitagliptin vs Plazebo po

##P < 0.01 für Ex-9 vs NaCl iv

4.2.2 Insulin, C-Peptid und IGR

Da die Insulin- und C-Peptid-Sekretion stark abhängig ist von der Glykämie, wurde als weiterer Parameter zusätzliche die Insulin-zu-Glukose-Ratio (IGR) berechnet. (siehe Tabelle 4 und Abbildungen 5,6,7)

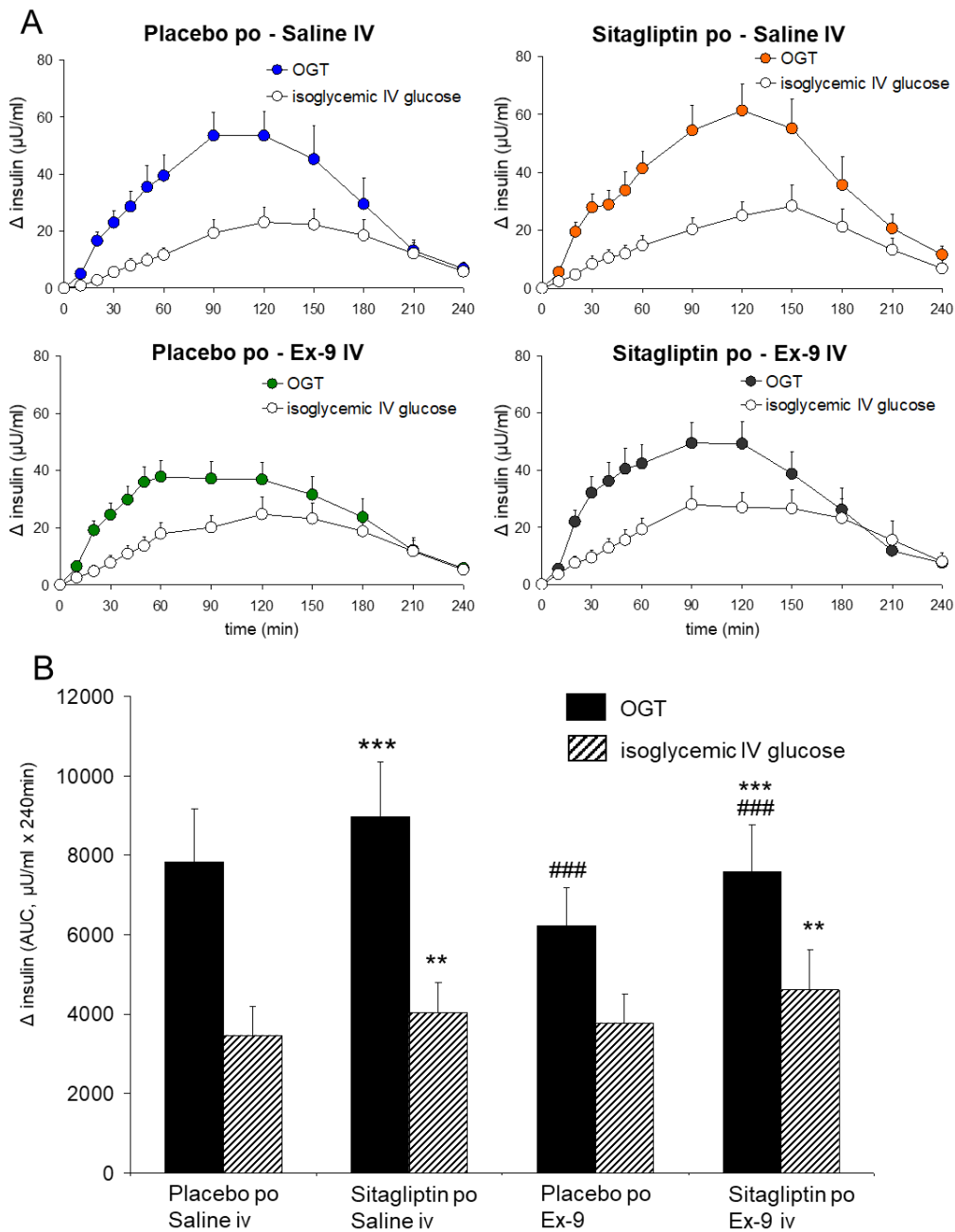
Unter der Behandlung mit Sitagliptin zeigte sich bei Hintergrundinfusion mit NaCl eine signifikante Steigerung der Insulin-, ($P < 0.001$) und C-Peptid-Konzentrationen ($P = 0.032$) im Vergleich zu Placebo. Dies war evident trotz niedrigerer Glykämie. Dementsprechend war auch die IGR mit deutlicher Signifikanz erhöht ($P < 0.001$).

Auch während der isoglykämischen intravenösen Clamps steigerte Sitagliptin die Plasmakonzentrationen von Insulin ($P = 0.003$) und C-Peptid ($P = 0.050$) sowie die IGR. Dies war erstaunlich, denn die Patienten waren beim intravenösen Clamp trotz Hyperglykämie nüchtern, die Freisetzung der Inkretinhormone wurde also nicht durch Nahrung stimuliert.

Die Infusion von Ex-9 reduzierte die nach OGTT postprandialen Plasmakonzentrationen von Insulin ($P < 0.001$) und C-Peptid ($P = 0.012$) im Vergleich zu NaCl, trotz Steigerung der Blutglukosekonzentrationen. Daraus resultierte auch eine signifikante Senkung der IGR unter Ex-9-Infusion ($P < 0.001$). Ex-9 reduzierte die insulinotrope Wirkung von Sitagliptin signifikant. Dennoch steigerte Sitagliptin auch vor Hintergrund von Ex-9 die Plasmakonzentrationen von Insulin ($P < 0.001$) und C-Peptid ($P = 0.032$) signifikant. Sitagliptin zeigte also trotz GLP-1 Rezeptorblockade eine insulinotrope Wirkung.

Die Plasmakonzentrationen von Insulin waren während des isoglykämischen Clamps, welcher die Bedingungen des OGTTs unter Ex-9 wiedergab (während des Clamps wurde kein Ex-9 infundiert) im Vergleich zu den Versuchsbedingungen mit NaCl-Infusion wenig, aber trotzdem signifikant höher ($P = 0.044$). Dies ist wohl den höheren Blutglukosekonzentrationen unter Ex-9 im Vergleich zu NaCl geschuldet. Aus diesem Grund blieb die IGR nahezu gleich ($P = 0.758$).

Abbildung 5: Plasmainsulin-Exkursionen über basal nach OGTT und isoglykämischem intra-venösen Clamp und inkrementelle AUC für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen



Mittelwert \pm SEM

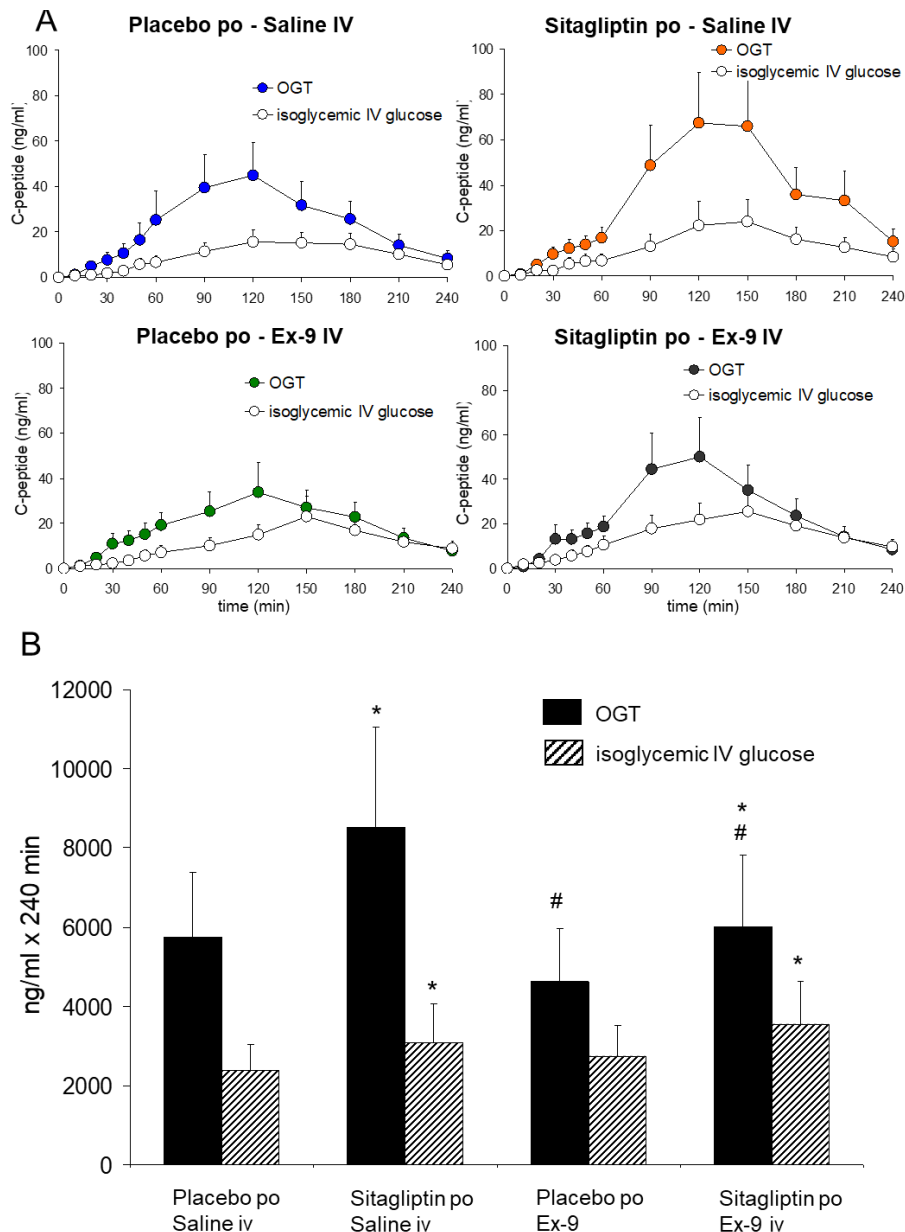
A: Plasmainsulin Exkursionen über basal nach einem OGTT mit 75 g Glukose oder einer isoglykämischen IV Glukoseinfusion (ISO-IV glucose) über 240 Minuten bei 24 Patienten mit T2DM während vier Behandlungsphasen: Plazebo oral (po) plus NaCl (saline) intra-venös (iv) (oben links), Sitagliptin po plus NaCl iv (oben rechts), Plazebo po plus Ex-9 iv (unten links) und Sitagliptin po plus Ex-9 iv (unten rechts). Der Bereich zwischen den Kurven von OGTT und intravenöser Glukose kennzeichnet den IE für Insulin

B: Inkrementelle AUC (iAUC) für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen

P < 0.01, *P < 0.001 für Sitagliptin vs Plazebo po

###P < 0.001 für Ex-9 vs NaCl iv

Abbildung 6: Plasma-C-Peptid-Exkursionen über basal nach OGTT und isoglykämischem intravenösen Clamp und inkrementelle AUC für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen



Mittelwert \pm SEM

A: Plasma-C-Peptid-Exkursionen über basal nach einem OGTT mit 75 g Glukose oder einer isoglykämischen intravenösen Glukoseinfusion (ISO-IV glucose) über 240 Minuten bei 24 Patienten mit T2DM während vier Behandlungsphasen: Plazebo oral (po) plus NaCl (saline) intravenös (iv) (oben links), Sitagliptin po plus NaCl iv (oben rechts), Plazebo po plus Ex-9 iv (unten links) und Sitagliptin po plus Ex-9 iv (unten rechts). Der Bereich zwischen den Kurven von OGTT und intravenöser Glukose kennzeichnet den IE für Insulin

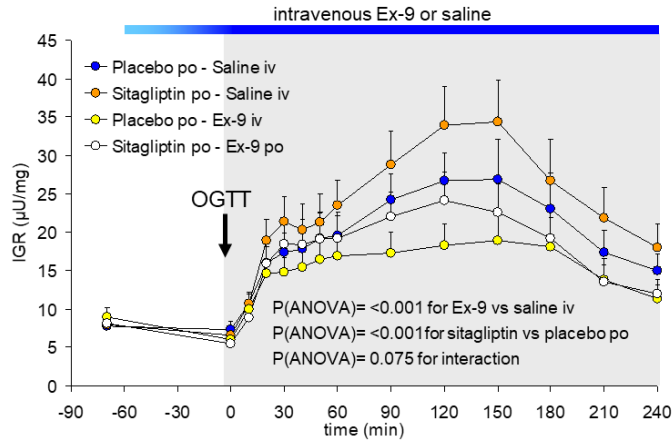
B: Inkrementelle AUC (iAUC) für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen

P < 0.01, *P < 0.001 für Sitagliptin vs Plazebo po

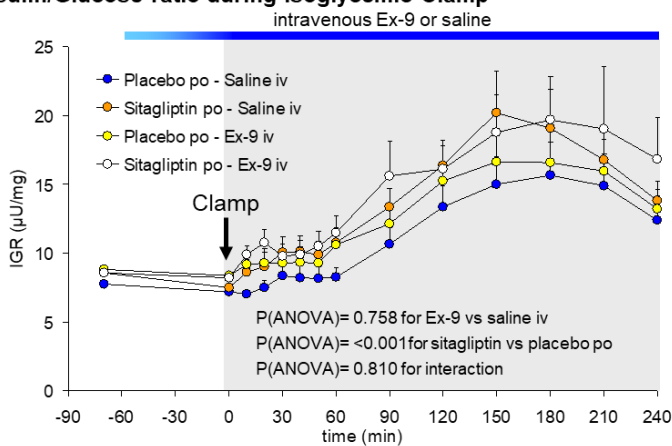
###P < 0.001 für Ex-9 vs NaCl iv

Abbildung 7: Insulin-Glukose-Ratio (IGR) nach OGTT und während isoglykämischem Clamp, sowie IE basierend auf der IGR

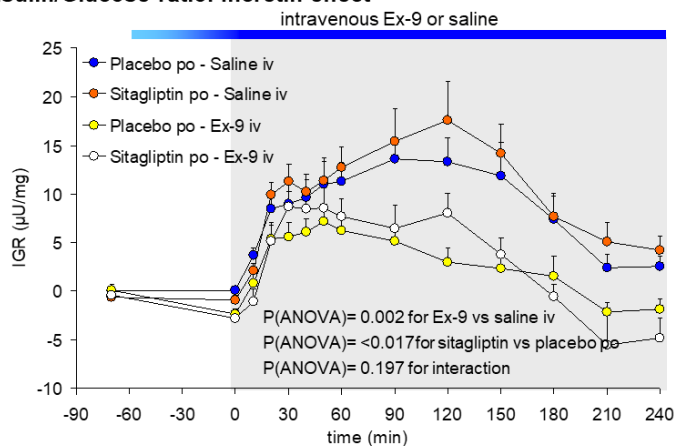
A Insulin/Glucose ratio after OGTT



B Insulin/Glucose ratio during isoglycemic Clamp



C Insulin/Glucose ratio: Incretin effect



Mittelwert \pm SEM

Die IGR nach einem OGTT mit 75 g Glukose (A), während dem entsprechenden isoglykämischen Clamp (B) und der IE berechnet anhand der IGR bei 24 Patientin mit T2DM mit Plazebo po plus NaCl (Saline) iv, Sitagliptin po plus NaCl iv, Plazebo po plus Ex-9 iv und Sitagliptin plus Ex-9 iv.

Signifikanzniveau in den einzelnen Abbildungen wiedergegeben

4.2.3 Inkretineffekt (IE)

Sitagliptin führte in unserer Studienpopulation von Typ 2 Diabetikern zu einer signifikanten Erhöhung des IE (Δ AUC [OGTT - Clamp]) basierend auf den Plasmakonzentrationen von C-Peptid ($P = 0.043$) und der IGR ($P = 0.017$). Anhand der Plasmainsulinkonzentrationen konnte zwar ebenso eine Steigerung, jedoch ohne statistische Signifikanz errechnet werden ($P = 0.108$) (siehe Tabelle 4 und Abbildungen 5,6,7)

Ex-9 reduzierte den IE signifikant mit einer relativen Reduktion von 40-50%, unabhängig davon, ob Sitagliptin oder Plazebo verabreicht wurde. Diese signifikante Verminderung des IE zeigte sich sowohl bei Berechnung anhand der Plasmakonzentrationen von Insulin ($P = 0.005$) und C-Peptid ($P = 0.002$) als auch der IGR ($P = 0.002$). Endogenes GLP-1 vermittelt also zu etwa der Hälfte den IE bei unseren Diabetikern.

Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen der oralen Medikation und der intravenösen Infusion: so steigerte Sitagliptin den IE auch vor Hintergrundinfusion von Ex-9 auf der Basis der C-Peptid-Plasmakonzentrationen und des IGR signifikant, auf der Basis von Plasmainsulin tendenziell. Erstmals konnte so gezeigt werden, dass eine DPP-4 Hemmung den IE sowohl über endogenes GLP-1, als auch über endogene nicht-GLP-1-Inkretine (a.e. GIP) steigert

4.2.4 Glukagon

Die Einnahme des OGTT bewirkte nach temporärer Steigerung innerhalb der ersten 60 Minuten eine anhaltende Suppression der Plasmakonzentrationen von Glukagon. (siehe Tabelle 4 und Abbildung 8).

Die durch Sitagliptin induzierte Hemmung der DPP-4 führte zu einer signifikanten Reduktion der Glukagon-Plasmakonzentrationen, sowohl während der ersten 60 Minuten ($P = 0.006$), als auch während der ersten 120 Minuten ($P = 0.05$) nach Ingestion des OGTT.

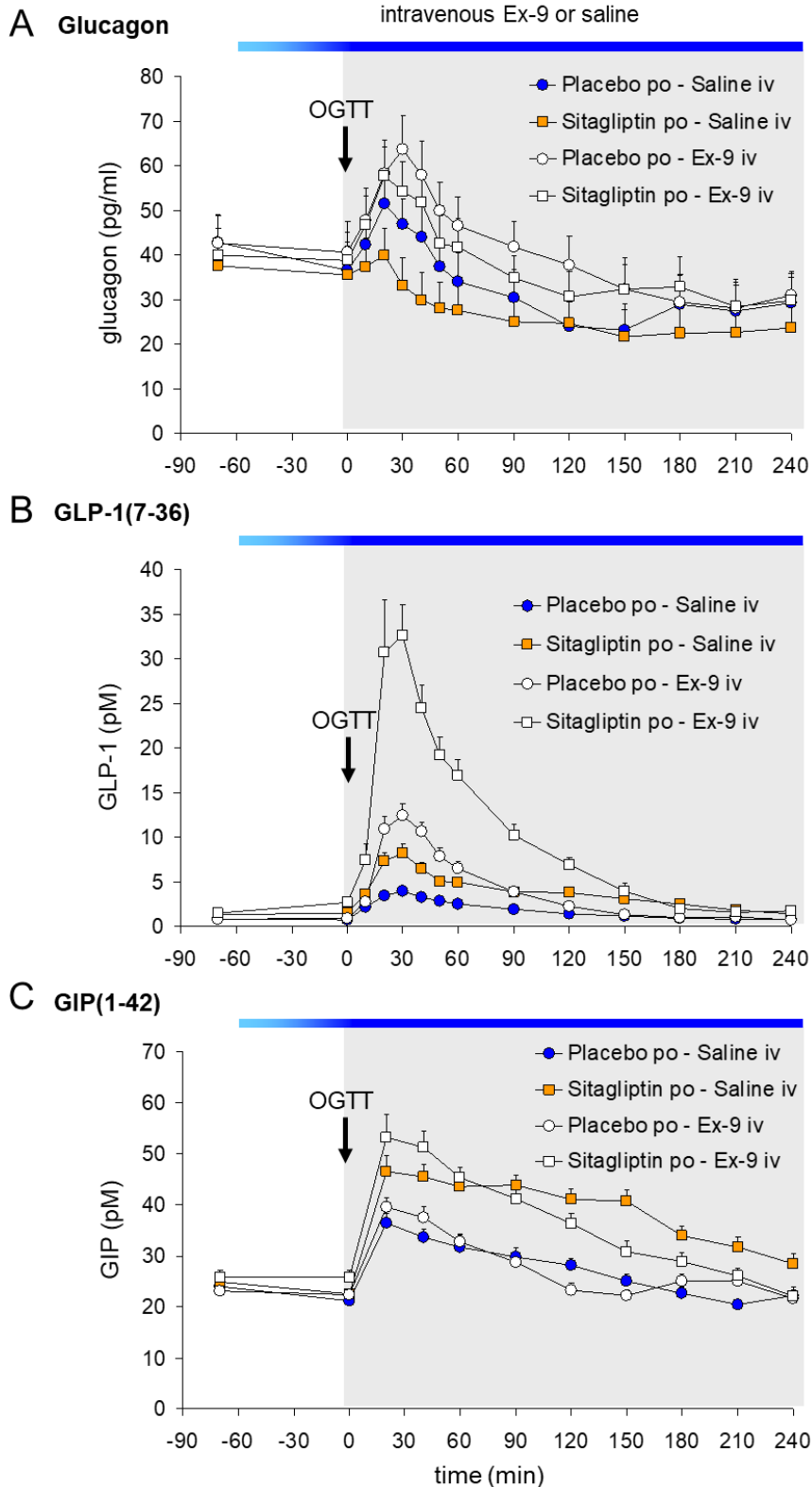
Die Blockade der GLP-1 Rezeptoren durch Ex-9 führte zu einer signifikanten Steigerung der Plasmakonzentrationen von Glukagon. Vor Hintergrund von Ex-9 hatte Sitagliptin keinen Effekt mehr auf die Glukagon-Plasmakonzentrationen (AUC 60 Minuten ($P = 0.347$), AUC 120 Minuten ($P = 0.221$)).

4.2.5 GLP-1 und GIP

Sitagliptin steigerte die Plasmakonzentrationen von aktivem GLP-1 und GIP nach dem OGTT signifikant (Siehe Tabelle 4 und Abbildung 8). Für GLP-1 betrug die Steigerung etwa das 2.2fache, für GIP etwa das 2.6fache. Diese Steigerung war für GLP-1 signifikant, sowohl bei Infusion von NaCl ($P = 0.043$), als auch bei Ex-9 ($P < 0.001$). Gleiches galt für GIP (NaCl, $P < 0.001$; Ex-9, $P = 0.003$). Die Infusion von Ex-9 führte zu einer signifikanten Erhöhung des in der Zirkulation befindlichen aktiven GLP-1, unabhängig von Sitagliptin ($P = 0.011$). Ex-9 hatte keinen Einfluss auf die GIP-Plasmakonzentrationen ($P = 0.600$). Es konnte bei den Konzentrationen von aktivem Plasma-GLP-1 ein additiver Effekt bei der Komedikation von Ex-9 und Sitagliptin festgestellt werden, welcher zu einem ca. 7fachen Anstieg der absoluten Level im Vergleich zu einer Gabe von NaCl und Plazebo führte.

Die Hemmung der DPP-4 mit Sitagliptin führte nicht nur nach dem OGTT zu dem beschriebenen Anstieg der Konzentrationen von aktivem Plasma-GLP-1, sondern interessanter Weise auch während des isoglykämischen intravenösen Clamps, bei dem keine Glukose in den Gastrointestinaltrakt gelangte. Auch hier war der Anstieg von statistischer Signifikanz im Vergleich zu Plazebo ($P < 0.001$). Offensichtlich stabilisiert Sitagliptin bereits basale Plasmakonzentrationen von GLP-1. Diese Beobachtung korreliert mit den höheren Plasmainsulinkonzentrationen unter Sitagliptin während der Clampversuche. Bei GIP konnte während der isoglykämischen intravenösen Glukoseinfusion hingegen keine Erhöhung der aktiven Konzentrationen durch Sitagliptin festgehalten werden.

Abbildung 8: Plasmakonzentrationen von Glukagon, GLP-1 und GIP vor und nach OGTT für die vier unterschiedlichen Behandlungsphasen



Mittelwert \pm SEM

Plasmakonzentrationen von Glukagon (A), GLP-1(7-36) (B) und GIP(1-42) (C) vor und nach einem OGTT mit 75 g Glukose bei 24 Patientin mit T2DM mit Plazebo oral (po) plus NaCl (saline) intravenös (iv), Sitagliptin po plus NaCl iv, Plazebo po plus Ex-9 iv und Sitagliptin po plus Ex-9 iv. Siehe Tabelle 4 für Statistik

4.2.6 Magenentleerung anhand des ^{13}C -Acetat Atemtest

Unter Sitagliptin kam es im Vergleich zu Plazebo zu einer signifikanten Verzögerung aller Parameter des ^{13}C -Acetat-Atemtests, entsprechend einer Verzögerung der Magenentleerung (siehe Tabelle 5 und Abbildung 9). Eine Hemmung der DPP-4 führte zu einer Verlängerung der lag Periode, also die Zeit bis zur maximalen $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation ($P = 0.005$), und der Halbwertszeit der Exhalation ($P = 0.001$). Gleichzeitig wurde die maximale Ausatemungsgeschwindigkeit verlangsamt ($P < 0.001$). Der Koeffizient der Magenentleerung (GEC) wurde demnach ebenso verringert ($P < 0.001$). Ex-9 beschleunigte die Magenentleerung durch Verkürzung der lag Periode ($P = 0.004$) und eine Beschleunigung der maximalen Ausatemungsgeschwindigkeit ($P = 0.007$). Unter GLP-1-Rezeptorblockade mit Ex-9 hatte Sitagliptin keine Wirkung mehr auf die Magenentleerungsgeschwindigkeit.

Tabelle 5: Effekte von Sitagliptin und Ex-9 auf die Kinetik der ^{13}C -Acetat-Atemtests als Mass für die Magenentleerung des OGTT bei 24 Patienten mit T2DM

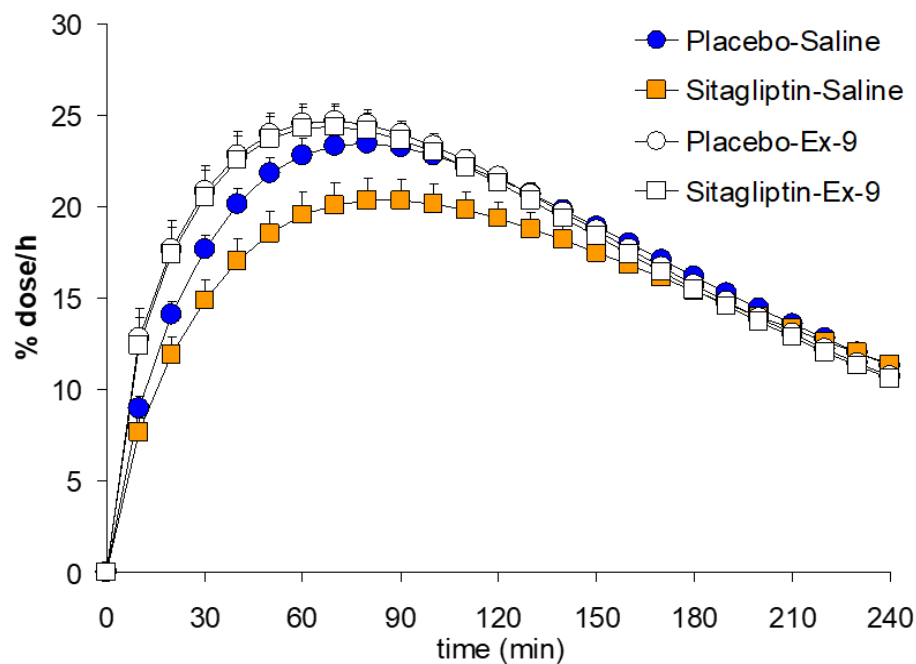
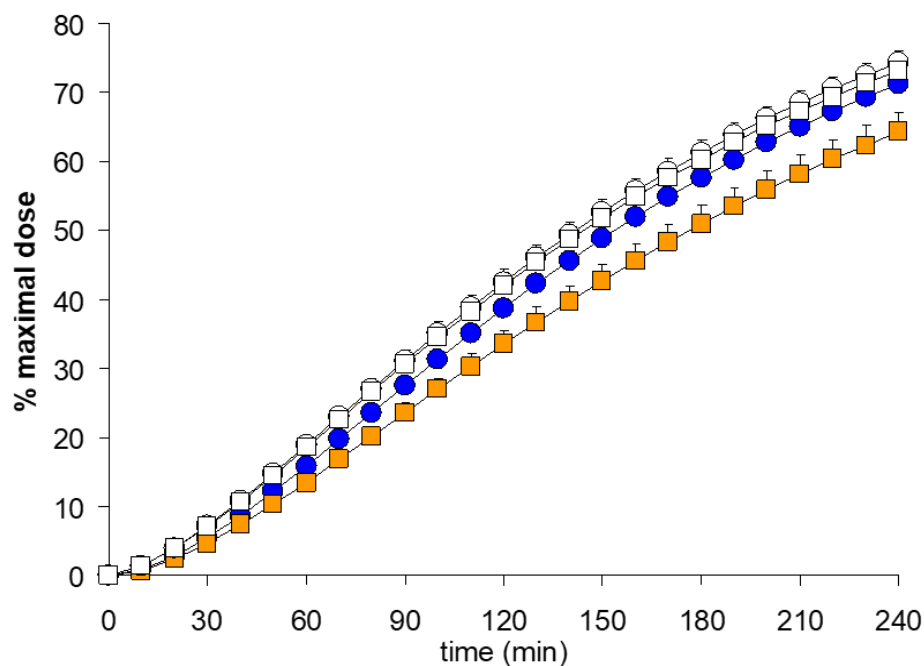
Orale Medikation	Plazebo po	Sitagliptin po	Plazebo po	Sitagliptin po
+	+	+	+	+
Intravenöse Infusion	NaCl iv	NaCl iv	Exendin-9 iv	Exendin-9 iv
-70 Min: zu Beginn jedes Versuchstages (ohne intravenöse Infusion)				
Lag Periode (Min)	80 ± 2.5	91 ± 3.8 *	69 ± 4.5 #	70 ± 3.8 #
Halbwertszeit (Min)	158 ± 6.5	198 ± 18 *	143 ± 6.0	152 ± 8.0 #
Koeffizient der Magenentleerung	3.85 ± 0.05	3.67 ± 0.07 *	3.89 ± 0.04	3.83 ± 0.05 #
Max. Ausatemungsgeschwindigkeit	23.6 ± 0.9	20.4 ± 1.2 *	26.1 ± 1.1 #	25.0 ± 1.2 #
Geschwindigkeitskonstante k	0.46 ± 0.02	0.39 ± 0.03 *	0.48 ± 0.02	0.46 ± 0.02 #
Slope β	1.84 ± 0.05	1.78 ± 0.06	1.74 ± 0.07	1.68 ± 0.07
Determinationskoeffizient (R^2)	0.936 ± 0.011	0.931 ± 0.010	0.951 ± 0.008	0.923 ± 0.013

Mittelwerte ± SEM

Geschwindigkeitskonstante k und Slope β entsprechend non-linearer Regression der ^{13}C -CO₂ Exhalation. Determinationskoeffizient R^2 für die Übereinstimmung der gemessenen Daten und der Regression.

*P < 0.05 zeigt signifikante Unterschiede zwischen Sitagliptin und Plazebo bei gleicher Hintergrundinfusion

#P < 0.05 zeigt signifikante Unterschiede zwischen Ex-9 und NaCl bei gleicher Hintergrundinfusion

Abbildung 9: Magenentleerung des OGTT entsprechend dem ^{13}C -CO₂-Atemtest**A** ^{13}C CO₂ exhalation rate**B** ^{13}C CO₂ cumulative exhalation

Mittelwert \pm SEM

Exhalationsgeschwindigkeit von ^{13}C CO₂ (A) und kumulative Exhalation von ^{13}C CO₂ (B) als Mass für die Magenentleerung nach einem OGTT mit 75 g Glukose versetzt mit ^{13}C -Acetat bei 24 Patienten mit T2DM mit Plazebo oralem (po) plus NaCl (Saline) intravenös (iv), Sitagliptin po plus NaCl iv, Plazebo po plus Ex-9 iv und Sitagliptin po plus Ex-9 iv. Für Statistik siehe Tabelle 5

5. Diskussion

Bei gesunden Menschen ist bekannt, dass die intestinalen Hormone GLP-1 und GIP glukoseabhängig die Insulinsekretion stimulieren und damit zur Senkung des postprandialen Glukosespiegels beitragen. Der Anteil, den diese beiden Inkretine an der Insulinausschüttung haben, wird Inkretineffekt (IE) genannt und auf 40-60% geschätzt. Unter IE versteht man die Differenz zwischen postprandialen Insulinplasmakonzentrationen und isoglykämischen Insulinplasmakonzentrationen im Nüchternzustand [4, 12]. Zudem konnte für GLP-1 gezeigt werden, dass es, ebenso glukoseabhängig, die Glukagonsekretion hemmt [38] und an weiteren komplexeren Aufgaben bei der Regulation der Glukosehomöostase teilnimmt. Dies betrifft im Zentralnervensystem etwa die Steuerung des Sättigungsgefühls und der Kalorienaufnahme [42, 43] und auf gastrointestinaler Ebene die Regulation der Magenentleerungsgeschwindigkeit [41, 89]. Bei Patienten mit T2DM ist der IE reduziert oder sogar gar nicht vorhanden [50], und frühere Studien zeigen, dass GIP, welches beim Gesunden hauptsächlich den IE hervorruft [49], kaum oder keine Wirkung beim T2DM hat. Die Aktivität von GLP-1 scheint hingegen bei T2DM zu grossem Teil erhalten [22]. Diese Erkenntnisse waren Ausgangsbasis für die Entwicklung der inkretinbasierten Therapie des T2DM mittels DPP-4-Inhibitoren und GLP-1-Analoga. Trotzdem sind bisher noch nicht alle pathophysiologischen Zusammenhänge vollständig geklärt und vor allem die Relevanz von endogenem GLP-1 ist unklar.

Ziel unserer Studie war es, die Rolle des endogenen GLP-1 in der enteroinsulinären Achse bei Patienten mit T2DM zu erforschen. Hierfür wurde sowohl eine Hemmung der DPP-4 durch Sitagliptin, als auch eine Blockade des GLP-1-Rezeptors durch Ex-9 [83] eingesetzt. Zusammenfassend wurde untersucht, ob Sitagliptin in der Lage ist, den bei Typ 2 Diabetikern verminderten IE zu steigern und welche Rolle dabei endogenes GLP-1, respektive nicht-GLP-1-Inkretine spielen.

Hierfür wurden 24 Patienten mit T2DM in vier unterschiedlichen Behandlungsphasen zu je zwei Studientagen in einer prospektiven, randomisierten, doppelt-verblindeten, Placebo-kontrollierten Cross-over Studie untersucht: der Effekt von oralem Sitagliptin versus oralem Placebo, jeweils vor intravenöser Hintergrundinfusion mit NaCl 0.9% oder dem GLP-1-Rezeptorantagonisten Ex-9 auf die Blutglukosekonzentrationen, die Plasmakonzentrationen von Insulin, C-Peptid und Glukagon sowie die Magenentleerung nach

Ingestion eines 75 g OGTT. Zur Bestimmung des IE wurden die Blutglukosekonzentrationen jedes OGTT an einem separaten Tag durch isoglykämische Glukoseinfusionen initiiert [85].

Sitagliptin wurde dabei in der für Diabetiker ohne Einschränkung der Nierenfunktion empfohlenen Dosierung von 100mg/ Tag verwendet. Ex-9 wurde mit 900 pmol/kg/min infundiert, einer Dosis, die bei Gesunden die insulinotrope Wirkung selbst einer supra-physiologischen GLP-1-Dosis zu über 95% hemmt [90]. Wir gehen davon aus, dass mit der von uns verwendeten Ex-9-Dosierung, die GLP-1 Aktivität subtotal blockiert wird

Die GLP-1-Rezeptorblockade mittels Ex-9 führte bei unseren Probanden mit T2DM zu einer signifikanten Reduktion der postprandialen Plasmainsulin- und -C-Peptidspiegel bei gleichzeitiger Erhöhung der Plasmaglukosekonzentrationen, resultierend in einer signifikanten Erniedrigung der Insulin-Glukose-Ratio (IGR). Dies wurde auch zuvor schon in mehreren Studien an Gesunden [81, 91, 92] und Patienten mit T2DM [87, 93] gezeigt. Ex-9 wurde als wirksamer Inhibitor des GLP-1-Rezeptors in vielen Studienprotokollen eingesetzt und half sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen die Rolle von GLP-1 zur Glukoseregulation zu untersuchen [81-83].

Sitagliptin reduziert die postprandialen Glukosekonzentrationen signifikant und steigerte, trotz des somit reduzierten Betazell-Glukosestimulus, die Plasmainsulin- und -C-Peptidkonzentrationen, was zu einer deutlichen und signifikanten Steigerung der IGR führte. Die postprandialen Plasmaspiegel von GLP-1 und GIP wurden durch Sitagliptin um das 2.2- resp. 2.6fache gesteigert, in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien [69]. Der GLP-1-Rezeptorantagonist Ex-9 führte zur teilweisen Aufhebung des insulinotropen und Blutzucker-senkenden Effekts von Sitagliptin. Jedoch steigerte Sitagliptin auch unter GLP-1-Rezeptorblockade Insulin und C-Peptid und senkte den Blutzucker: der Effekt von Sitagliptin war unter Ex-9 in etwa halbiert. Sitagliptin wirkt also über GLP-1 insulinotrop, ist aber auch unter GLP-1-Rezeptorblockade in der Lage, einen Teil der gestörten Glukosetoleranz durch eine verbleibende insulinotrope Wirkung wiederherzustellen. Zum ersten Mal konnte wir also zeigen, dass Sitagliptin seine insulinotrope Wirkung bei Patienten mit Diabetes mellitus über GLP-1-abhängige und GLP-1-unabhängige Mechanismen erzielt. Sitagliptin stabilisiert durch seine DPP-4-Hemmung auch GIP als weiteres DPP-4-abhängiges Inkretinhormon. Wir vermuten, dass endogenes GIP verant-

wortlich ist für die GLP-1- unabhängige insulinotrope Wirkung von Sitagliptin bei Patienten mit T2DM [94]. Eine ähnliche Wirkungsweise wurde bisher nur bei Mäusen gezeigt, bei welchen man genetisch ein Fehlen der Inkretinrezeptoren erzeugte. Wurde diesen Mäusen nun ein DPP-4-Inhibitor in pharmakologischer Dosierung verabreicht, kam es zwar bei Fehlen entweder des GLP-1- oder des GIP-Rezeptors zu einer Senkung der Blutzuckerspiegel, nicht aber wenn beide Rezeptoren fehlten [95].

Eines unserer Hauptziele war es, den Inkretineffekt (IE) unter Sitagliptinbehandlung mit und ohne Ex-9 Infusion zu quantifizieren. Insgesamt zeigten alle Individuen unserer Studienpopulation einen beachtlichen IE, im Mittel um die 60%. Dies steht etwas in Gegensatz dazu, dass der IE bei Patienten mit T2DM prinzipiell deutlich vermindert ist [50]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass unsere Patienten diabetisch sehr gut eingestellt waren (HbA1c 6.2%) [96]. Denn es ist davon auszugehen, dass die Ansprechempfindlichkeit der Betazellen auf Inkretine stark von der Gesamt-Betazellfunktion abhängt [51, 60, 97].

Dass endogenes GLP-1 eine Rolle beim IE bei Diabetikern spielt, wurde bereits früher beschrieben. In den bisherigen beiden Studien, die den Beitrag von endogenem GLP-1 zum IE bei T2DM untersucht haben, eine davon von der eigenen Arbeitsgruppe, wurde der postprandiale Metabolismus des Systems unter eher unphysiologischen experimentellen Bedingungen untersucht. Es wurde entweder eine oral aufgenommene Mahlzeit verwendet oder eine kontinuierliche duodenale Mahlzeitperfusion unter Aufrechterhaltung einer Hyperglykämie mittels Clamptechnik [87, 93]. Unser Versuchsaufbau mit einem Standard-OGTT mit 75 g Glukose und entsprechender isoglykämischer intravenöser Glukoseinfusion erlaubt es erstmals, direkt die Einflüsse sowohl einer DPP-4-Hemmung, als auch einer GLP-1-Rezeptorblockade auf den IE bei Diabetikern zu untersuchen. Sitagliptin führte dabei zu einer signifikanten Erhöhung des IE. Aus unseren Daten geht hervor, dass Sitagliptin nicht nur postprandial die Insulinsekretion steigert, sondern auch im hyperglykämischen Nüchternzustand. In unserer Studie bestand eine DPP-4-Inhibition sowohl an Versuchstagen mit OGTT als auch bei den isoglykämischen Clamps. Bereits die Stabilisierung nüchtern basaler, nicht nur postprandial stimulierter Inkretin hormone, wirkt also während Hyperglykämie insulinotrop. Nachdem also die Insulinsekretion durch Sitagliptin nicht nur nach dem OGTT, sondern auch während des entspre-

chenden isoglykämischen intravenösen Clamps gesteigert wurde, bei dem aber definitiv onsgemäss keine enterale Stimulation zur Freisetzung von intestinalen Hormonen stattfindet, fiel der IE deutlich kleiner aus als erwartet. Am besten wird diese Situation durch die IGR abgebildet, da diese für die unterschiedlichen glykämischen Level in Bezug auf die Insulinsekretion korrigiert. Gleiche Beobachtungen konnten auch in einer anderen Arbeitsgruppe um Vardarli gemacht werden, wo eine DPP-4 Hemmung mittels Vildagliptin bei Typ 2 Diabetikern sowohl nach oralem, als auch nach intravenösem Glukosetoleranztest zu einer deutlichen Steigerung der Insulinantwort führte. Jedoch konnte in deren Untersuchungen keine Verbesserung des IE durch Vildagliptin gefunden werden [98]. Eine mögliche Erklärung für dieses abweichende Ergebnis zu unserer Studie mag darin liegen, dass unsere Studienpopulation besser eingestellt war (HbA1c von 6.2 vs 7.7% bei Vardarli). Ausserdem bestand ein Unterschied in der Verabreichung des DPP-4-Inhibitors: während wir Sitagliptin jeweils nur erst einen Tag vor den Studientagen verabreichten, erhielt die Population bei Vardarli Vildagliptin für insgesamt 13 Tage und wurde an den letzten beiden Tagen davon untersucht. Unsere Daten zeigen, dass eine Behandlung mit Sitagliptin auch im Nüchternzustand zu signifikant gesteigerten aktiven GLP-1 Plasmakonzentrationen führt. Wobei der Nüchternzustand per se im Rahmen des Diabetes einer Hyperglykämie im Vergleich zur gesunden Bevölkerung entspricht und auch während der Clamp-Versuche eine Hyperglykämie, jedoch nicht ausgelöst durch enterale Nahrungsaufnahme, vorlag. Dies mag ursächlich für die gesteigerte Insulinsekretion während der intravenös hervorgerufenen Hyperglykämie sein [96]. Auf der anderen Seite zeigte D'Alessio et al. unter DPP-4-Hemmung eine Steigerung der Insulinantwort nach intravenösem Glukosetoleranztest bei nüchternen Typ 2 Diabetikern, ohne dass die Inkretinhormonkonzentrationen relevant erhöht waren [99]. Aufgrund dieser Ergebnisse nimmt man an, dass die Gruppe der DPP-4-Inhibitoren noch über alternative Mechanismen, als über den verminderten Abbau der Inkretinhormone, in der Lage sind, insulinotrope Effekte hervorzurufen und somit für den diabetischen Stoffwechsel vorteilhaft sind. Hier wird zum Einen eine Verbesserung der Inselzellfunktion diskutiert [99, 100], zum Anderen stellen Waget et al. mit ihren Untersuchungen an Mäusen die Hypothese auf, dass die DPP-4-Inhibitoren ihre glukosesenkenden Eigenschaften zum Teil durch eine lokale Konservierung von GLP-1 im Verdauungstrakt vermitteln, wodurch eine Darm-Gehirn-Achse für hormonelle Signalwege vorhanden sein soll [101]. Holst und

Deacon stellten diese Theorie eines enteralen Wirkmechanismus von GLP-1 als erste auf und gehen davon aus, dass GLP-1 im Verdauungstrakt viszerale Afferenzen stimuliert, welche wiederum einen neuronalen Reflex auslösen, der unter anderem zur Senkung der Blutglukose führt [102, 103].

Die GLP-1-Rezeptorblockade durch Ex-9 führte bei unseren Patienten mit T2DM zu einer signifikanten Reduktion des IE um etwa 40-50%. Dies wurde mit etwas anderem Versuchsaufbau bereits früher bei Patienten mit T2DM gezeigt [87, 93]. Ex-9 reduzierte zwar signifikant den durch Sitagliptin gesteigerten IE, er wurde aber nicht vollständig aufgehoben, sondern blieb unter Sitagliptin trotz Ex-9 noch signifikant erhöht. Dies zeigt, dass ähnlich der Situation bei Gesunden, GLP-1 nur einen Teil des IE verursacht. Es hebt im Gegenteil die Beobachtung hervor, dass auch bei T2DM noch ein anderes Inkretin funktionell aktiv sein muss, welches den IE trotz GLP-1-Rezeptorblockade stimuliert. Und darüber hinaus wird zum ersten Mal gezeigt, dass dieses GLP-1-unabhängige Inkretin ebenso durch die DPP-4 reguliert wird. Auch hier ist es, wie bereits oben erwähnt nahelegend, dass GIP dieses GLP-1-unabhängige Inkretin darstellt, zumal es durch Sitagliptin ebenfalls deutlich stimuliert wird. In unmittelbarem zeitlichen Zusammenhang zur Studiendurchführung konnte unsere These leider nicht überprüft werden, da zu diesem Zeitpunkt kein GIP-Rezeptorantagonist für den Einsatz in humanen Studien verfügbar war. Mittlerweile existiert aber ein natürlich vorkommender GIP-Rezeptorantagonist, GIP(3-30)NH₂, ein Fragment des GIP, welcher bisher in wenigen Studien mit gesunden Personen eine dosisabhängige effektive Hemmung (>80%) des GIP-Rezeptors gezeigt hat [104, 105]. Unserer Hypothese entgegen stehen frühere Beobachtungen, dass synthetisches GIP bei Typ 2 Diabetikern nicht wirksam zu sein scheint [22, 58, 106]. Möglicherweise verliert GIP seine insulinotrope Potenz beim fortgeschrittenen, schlecht eingestellten Diabetes. So konnte zumindest eine teilweise Erholung der insulinotropen Eigenschaften von GIP demonstriert werden, wenn durch eine intensive Insulintherapie bei T2DM die Glukosetoxizität reduziert wurde [107]. Eine relativ neue Studie von Stensen et al., aus dem Jahr 2021 setzte einen GIP-Rezeptorantagonisten bei zehn übergewichtigen Typ-2-Diabetikern ein und demonstrierte bei diesen zwar einen signifikanten insulinotropen und glukagonotropen Effekt von endogenem GIP, welcher sich aber im Umkehrschluss nicht in einer wesentlichen Senkung der postprandialen Glukoseexkursi-

onen äusserte [94]. Zuletzt liessen vor allem auch die herausragenden Effekte des dualen GIP/GLP-1-Rezeptor-Agonisten Tirzepatide, welcher 2022 in den USA von der FDA bereits zugelassen wurde, auf die Gewichtsreduktion, aber auch die Glukosehomöostase bei adipösen Typ 2 Diabetikern die Forschung zur Bedeutung von GIP bei Diabetiker wieder neu aufleben.

Glukagon stellt über die Wirkung auf die hepatische Glukoneogenese eine wichtige pathophysiologische Komponente beim T2DM dar. Glukagon steuert beim Gesunden die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase, postprandial nicht ausreichend supprimiertes Glukagon trägt bei Patienten mit T2DM zur Hyperglykämie bei [83, 87, 92]. Die Suppression von Glukagon ist somit einer der Eckpfeiler der antidiabetischen GLP-1-Wirkung. Diese kann durch den Einsatz von DPP-4-Inhibitoren verstärkt werden. Nach dem OGTT wurde bei unseren Probanden in den ersten 60 Minuten die Plasmaglukagonkonzentrationen erhöht und danach reduziert. Die Gabe von Sitagliptin führte zu einer sehr deutlichen Hemmung der Glukagonausschüttung, einem Mechanismus, der zu der Senkung der postprandialen Blutglukosekonzentrationen beigetragen haben sollte. Ex-9 führte durch die Blockade des GLP-1-Rezeptors sowohl nüchtern, als auch nach Gabe des OGTT zu einer deutlichen Steigerung der Plasmaglukagonkonzentrationen, welche auch bei gleichzeitiger Gabe von Sitagliptin nicht verringert wurden. Die DPP-4-Inhibition hatte also keine glukagonostatischen Effekte unter GLP1-Rezeptorblockade. Wir konnten also demonstrieren, dass GLP-1 ein tonisch-inhibitorischer Regulator der Glukagonsekretion bei Typ 2 Diabetikern ist, die GLP-1 vermittelte Hemmung der postprandialen Glukagonsekretion bei Diabetikern funktioniert, dass eine DPP-4-Hemmung die Glukagonhemmung verstärkt und dass dieser Mechanismus der DPP-4-Hemmung einzig durch GLP-1 vermittelt zu sein scheint.

Wie zu erwarten gewesen, waren die Konzentrationen von bioaktivem GIP und GLP-1 unter der Behandlung mit Sitagliptin erhöht. Ausserdem kam es zu einer zusätzlichen Erhöhung der aktiven GLP-1 Konzentrationen bei gleichzeitiger Gabe von Ex-9. Ein Effekt, der auch schon in früheren Studien, sowohl bei Gesunden, als auch Patienten mit T2DM, beschrieben wurde [87, 91, 92]. Man geht davon aus, dass es sich hierbei um eine Autofeedbackhemmung der GLP-1-Ausschüttung aus intestinalen L-Zellen durch endogenes GLP-1 handelt, welche durch den GLP-1-Rezeptorantagonisten blockiert wird. Das Phänomen tritt daher auch nur postprandial und nicht im Nüchternzustand

auf. Umso wichtiger ist in Anbetracht der hohen GLP-1 Konzentrationen unter Sitagliptin und Ex-9 die von uns eingesetzte hohe Dosierung von Ex-9, um den GLP-1-Rezeptor möglichst komplett zu blockieren.

Zur Messung der Magenentleerungsgeschwindigkeit verwendeten wir einen ^{13}C -Acetat-Atemtest, welcher als gut validierte indirekte Methode zur Messung der Magenentleerung von flüssigen Mahlzeiten eingesetzt wird [86]. Sitagliptin führte zu einer mäßigen aber signifikanten Verzögerung der Magenentleerung. Diese Beobachtung war aber unter gleichzeitiger GLP-1-Rezeptorblockade mittels Ex-9 nicht zu machen, so dass davon auszugehen ist, dass GLP-1 dafür verantwortlich ist. GLP-1 scheint also auch im Rahmen des T2DM einen hemmenden Einfluss auf die Magenentleerung zu haben. Wie schon früher gezeigt, ist die Magenentleerung ursächlich am frühen Blutglukosekonzentrationsanstieg nach Nahrungsaufnahme beteiligt [108, 109]. Analog dazu konnten wir unter Ex-9 eine Beschleunigung der Magenentleerung mit früheren und höheren Blutglukose-Spitzenpiegeln sehen, wohingegen Sitagliptin zu einer Verzögerung mit späteren und niedrigeren Spiegel führte. Hier ist die Datenlage nicht einheitlich: bei Gesunden wurde unter Einsatz von Ex-9 kein Effekt von endogenem GLP-1 auf die Magenentleerung nachgewiesen [92]. Studien mit dem DPP-4 Inhibitor Vildagliptin bei Diabetikern zeigten bei Woerle et al. eine Verzögerung der szintigraphisch gemessenen Magenentleerung [110]. Vella et al. benutzte zur Messung der Magenentleerungsgeschwindigkeit eine Gamma-Kamera und Vildagliptin wurde zuvor über 10 Tage eingenommen. Hier wiederum konnte kein Effekt festgestellt werden [111]. Dass GLP-1 ein Regulator der antroduodenalen Motilität und der Magenentleerung ist, scheint ausser Frage zu stehen [91]. Die Magenentleerung ist aber durch zahlreiche neurohumorale Regulatoren und auch die Glykämie selbst redundant reguliert. Mahlzeitzusammensetzung und -volumen, begleitende Glykämie und Diabetesstatus sind wichtige Einflussgrößen [96]. So hat bereits eine Änderung der Blutglukosekonzentrationen im physiologischen Rahmen einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Magenentleerung [112].

Unsere Studie weist einige wenige Einschränkungen auf, welche Einfluss auf die Interpretation haben könnten. Letztendlich bleibt unklar, ob Ex-9 tatsächlich in der Lage ist, alle GLP-1 Rezeptoren quantitativ zu blockieren, auch wenn die in der vorliegenden Arbeit gewählte Dosis dem zumindest nahe kommen sollte. So gibt es im menschlichen

Organismus einige Orte, wie etwa im Darm oder im Zentralnervensystem, welche erwie-senermaßen GLP-1 Rezeptoren aufweisen, aber über die Blutzirkulation nur erschwert oder kaum zugänglich sind. Es ist also unklar, inwieweit trotz GLP-1-Rezeptorblockade doch eine Restwirkung von GLP-1 vorhanden ist [101]. Zudem war unsere Kohorte an Typ 2 Diabetikern sehr gut eingestellt, was der niedrige HbA1c widerspiegelt. Es muss also weiter untersucht werden, inwieweit sich unsere Ergebnisse auch auf Diabetiker übertragen lassen, welche im Krankheitsverlauf weiter fortgeschritten sind, und daher die Funktion ihrer Betazellen stärker beeinträchtigt ist. In Bezug auf die Magenentlee-rung kann von unseren Untersuchungen mit einem Standard OGTT mit 75 g Glukose nicht vollständig auf feste Mahlzeiten geschlossen werden, da die Physiologie hier ab-weicht.

Zusammenfassend konnten wir erstmals zeigen, dass die Glukosehomöostase bei Pati-enten mit T2DM nach einem OGTT über unterschiedliche Mechanismen durch endoge-nes GLP-1 geregelt wird: durch eine deutliche Zunahme der Insulinausschüttung, einer tonischen Hemmung der Glukagonsekretion und einer Hemmung der Magenentleerung. Bei gut eingestellten Patienten mit T2DM ist der IE weitgehend intakt (~60%). Die Be-handlung mit dem DPP-4-Inhibitor Sitagliptin steigert die Konzentrationen von aktivem GLP-1 und GIP und zwar postprandial und im Nüchternzustand. Sitagliptin stimuliert In-sulin postprandial und auch während Nüchternhyperglykämie, Sitagliptin steigert deut-lich den Inkretineffekt. Sitagliptin hemmt postprandial die Glukagonfreisetzung und re-duziert die Magenentleerungsgeschwindigkeit. Diese drei Mechanismen sind wesentlich verantwortlich für die antidiabetische Wirkung vom Sitagliptin. Die Hemmung der Glu-kagonfreisetzung und die Reduktion der Magenentleerungsgeschwindigkeit unter Si-tagliptin sind vermittelt durch GLP-1. Die insulinotrope Wirkung von Sitagliptin ist hin-gegen nur partiell über GLP-1 vermittelt. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass neben GLP-1 zusätzlich GLP-1-unabhängige Faktoren bestehen müssen, die für die insulinotrope Wirkung der DPP-4-Hemmung verantwortlich sind. GIP als weiteres bekanntes insulinot-rope Inkretinhormon würde die erforderlichen Kriterien erfüllen. Doch es braucht noch weitere Forschung um die Rolle von GIP im Rahmen des Diabetes mellitus zu definieren, und zu verstehen, wie genau die DPP-4-Inhibitoren um Sitagliptin neben einer Verstär-kung der endogenen GLP-1-Wirkung funktionieren.

Literaturverzeichnis

1. Grimaldi, A. and A. Heurtier, [*Epidemiology of cardio-vascular complications of diabetes*]. *Diabetes Metab*, 1999. **25 Suppl 3**: p. 12-20.
2. Gallwitz, B., *GLP-1 als Therapieprinzip bei Typ-2-Diabetes: GLP-1-Rezeptor-Agonisten und DPP-4-Inhibitoren*. Vol. 4. 2012, UNI-MED Verlag, Bremen: International Medical Publishers.
3. Drucker, D.J. and M.A. Nauck, *The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes*. *Lancet*, 2006. **368**(9548): p. 1696-705.
4. Nauck, M.A. and J.J. Meier, *The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016. **4**(6): p. 525-36.
5. Nauck, M.A. and J.J. Meier, *Incretin hormones: Their role in health and disease*. *Diabetes Obes Metab*, 2018. **20 Suppl 1**: p. 5-21.
6. Bayliss, W.M. and E.H. Starling, *The mechanism of pancreatic secretion*. *J Physiol*, 1902. **28**(5): p. 325-53.
7. Zunz E, L.B.J., *Contributions à l'étude des variations physiologiques de la sécrétion interne du pancréas: relations entre les sécrétions externe et interne du pancréas*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 1929. **31**: p. 20-44.
8. J, L.B., *Sur les possibilités d'un traitement du diabète par l'incrétine*. *Bull. Acad. R. Med. Belg.*, 1932. **12**: p. 620-34.
9. Creutzfeldt, W., *The [pre-] history of the incretin concept*. *Regul. Pept*, 2005. **128**(2): p. 87-91.
10. Elrick, H., et al., *Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1964. **24**: p. 1076-82.
11. McIntyre, N., C.D. Holdsworth, and D.S. Turner, *New Interpretation of Oral Glucose Tolerance*. *Lancet*, 1964. **2**(7349): p. 20-1.
12. Perley, M.J. and D.M. Kipnis, *Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects*. *J. Clin. Invest*, 1967. **46**(12): p. 1954-1962.
13. Unger RH., E.A., *Entero-insular axis*. *Arch Intern Med*, 1969. **123**.
14. Creutzfeldt, W., *The incretin concept today*. *Diabetologia*, 1979. **16**(2): p. 75-85.
15. Usdin, T.B., et al., *Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain*. *Endocrinology*, 1993. **133**(6): p. 2861-70.
16. Kieffer, T.J., C.H. McIntosh, and R.A. Pederson, *Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV*. *Endocrinology*, 1995. **136**(8): p. 3585-96.
17. Drucker, D.J., *The role of gut hormones in glucose homeostasis*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 24-32.
18. Trümper, A., et al., *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling*. *Mol Endocrinol*, 2001. **15**(9): p. 1559-70.

19. Kim, S.J., et al., *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression.* J Biol Chem, 2005. **280**(23): p. 22297-307.
20. Meier, J.J., et al., *Gastric inhibitory polypeptide (GIP) dose-dependently stimulates glucagon secretion in healthy human subjects at euglycaemia.* Diabetologia, 2003. **46**(6): p. 798-801.
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. 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. 301-307.
23. Layer, P., et al., *Ileal release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Association with inhibition of gastric acid secretion in humans.* Dig. Dis. Sci, 1995. **40**(5): p. 1074-1082.
24. Eissele, R., et al., *Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man.* Eur. J. Clin. Invest, 1992. **22**(4): p. 283-291.
25. Holst, J.J., *Glucagonlike peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone.* Gastroenterology, 1994. **107**(6): p. 1848-55.
26. 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.
27. Schirra, J. and B. Goke, *The physiological role of GLP-1 in human: incretin, ileal brake or more?* Regul. Pept, 2005. **128**(2): p. 109-115.
28. Orskov, C., et al., *Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans.* Diabetes, 1994. **43**(4): p. 535-9.
29. Orskov, C., A. Wettergren, and J.J. Holst, *Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable.* Diabetes, 1993. **42**(5): p. 658-61.
30. 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.
31. Nauck, M.A., et al., *Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations.* J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**(4): p. 912-917.
32. Knauf, C., et al., *Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage.* J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3554-63.
33. Fehmann, H.C., et al., *Priming effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide, glucose-dependent insulinotropic polypeptide and cholecystokinin-8 at the isolated perfused rat pancreas.* Biochim Biophys Acta, 1991. **1091**(3): p. 356-63.
34. Fehmann, H.C. and J.F. Habener, *Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells.* Endocrinology, 1992. **130**(1): p. 159-66.

35. Egan, J.M., et al., *GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2003. **19**(2): p. 115-23.
36. Urusova, I.A., et al., *GLP-1 inhibition of pancreatic islet cell apoptosis*. *Trends Endocrinol Metab*, 2004. **15**(1): p. 27-33.
37. Müller, T.D., et al., *Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)*. *Mol Metab*, 2019. **30**: p. 72-130.
38. Nauck, M.A., et al., *Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(3): p. 1239-46.
39. Schirra, J., et al., *GLP-1(7-36)amide (GLP-1) is a physiological regulator of human antro-pyloro-duodenal motility*. *Gastroenterology*, 2000. **118** (abstract).
40. Schirra, J., et al., *Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on motility and sensation of the proximal stomach in humans*. *Gut*, 2002. **50**(3): p. 341-348.
41. Wettergren, A., et al., *Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man*. *Dig. Dis. Sci*, 1993. **38**(4): p. 665-673.
42. Flint, A., et al., *Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(3): p. 515-520.
43. Gutzwiller, J.P., et al., *Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans*. *Gut*, 1999. **44**(1): p. 81-86.
44. Nauck, M.A., et al., *Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans*. *Am. J. Physiol*, 1997. **273**(5 Pt 1): p. E981-E988.
45. Kreymann, B., et al., *Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man*. *Lancet*, 1987. **2**(8571): p. 1300-1304.
46. Noyan-Ashraf, M.H., et al., *GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice*. *Diabetes*, 2009. **58**(4): p. 975-83.
47. Nauck, M.A., et al., *Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses*. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 1986. **63**(2): p. 492-498.
48. Nauck, M.A., et al., *The evolving story of incretins (GIP and GLP-1) in metabolic and cardiovascular disease: A pathophysiological update*. *Diabetes Obes Metab*, 2021. **23** Suppl 3: p. 5-29.
49. Nauck, M.A., *Is glucagon-like peptide 1 an incretin hormone?* *Diabetologia*, 1999. **42**(3): p. 373-379.
50. Nauck, M., et al., *Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes*. *Diabetologia*, 1986. **29**(1): p. 46-52.
51. Hansen, K.B., et al., *Reduced glucose tolerance and insulin resistance induced by steroid treatment, relative physical inactivity, and high-calorie diet impairs the incretin effect in healthy subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. **95**(7): p. 3309-17.
52. Nauck, M.A., B. Baller, and J.J. Meier, *Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2004. **53** Suppl 3: p. S190-S196.
53. 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. 3717-3723.

54. 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. 609-613.
55. Bagger, J.I., et al., *Impaired regulation of the incretin effect in patients with type 2 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(3): p. 737-45.
56. Calanna, S., et al., *Secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in patients with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of clinical studies*. *Diabetes Care*, 2013. **36**(10): p. 3346-52.
57. Calanna, S., et al., *Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies*. *Diabetologia*, 2013. **56**(5): p. 965-72.
58. Mentis, N., et al., *GIP does not potentiate the antidiabetic effects of GLP-1 in hyperglycemic patients with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2011. **60**(4): p. 1270-1276.
59. Nauck, M.A., et al., *Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes*. *Regul. Pept*, 2004. **122**(3): p. 209-217.
60. Knop, F.K., et al., *Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state?* *Diabetes*, 2007. **56**(8): p. 1951-9.
61. 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. 177-186.
62. Schirra, J., et al., *Differential effects of subcutaneous GLP-1 on gastric emptying, antroduodenal motility, and pancreatic function in men*. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 1997. **109**(1): p. 84-97.
63. Gutzwiller, J.P., et al., *Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 2): p. R1541-R1544.
64. Göke, 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. 19650-19655.
65. Nauck, M.A., et al., *GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes - state-of-the-art*. *Mol Metab*, 2021. **46**: p. 101102.
66. Dhillon, S., *Sitagliptin: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus*. *Drugs*, 2010. **70**(4): p. 489-512.
67. Thornberry, N.A. and A.E. Weber, *Discovery of JANUVIA (Sitagliptin), a selective dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes*. *Curr. Top. Med. Chem*, 2007. **7**(6): p. 557-568.
68. Lyseng-Williamson, K.A., *Sitagliptin*. *Drugs*, 2007. **67**(4): p. 587-597.
69. Herman, G.A., et al., *Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes*. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 2006. **91**(11): p. 4612-4619.
70. Bergman, A.J., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: a double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers*. *Clin Ther*, 2006. **28**(1): p. 55-72.

71. Raz, I., et al., *Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2006. **49**(11): p. 2564-2571.
72. Charbonnel, B., et al., *Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(12): p. 2638-43.
73. Raz, I., et al., *Efficacy and safety of sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes*. *Curr Med Res Opin*, 2008. **24**(2): p. 537-50.
74. Scott, R., et al., *Efficacy and safety of sitagliptin when added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes Obes Metab*, 2008. **10**(10): p. 959-69.
75. Hermansen, K., et al., *Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on glimepiride alone or on glimepiride and metformin*. *Diabetes Obes Metab*, 2007. **9**(5): p. 733-45.
76. Rosenstock, J., et al., *Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing pioglitazone therapy in patients with type 2 diabetes: a 24-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study*. *Clin Ther*, 2006. **28**(10): p. 1556-68.
77. Vilsbøll, T., et al., *Efficacy and safety of sitagliptin when added to insulin therapy in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes Obes Metab*, 2010. **12**(2): p. 167-77.
78. Gallwitz, B., *Review of sitagliptin phosphate: a novel treatment for type 2 diabetes*. *Vasc Health Risk Manag*, 2007. **3**(2): p. 203-10.
79. Williams-Herman, D., et al., *Safety and tolerability of sitagliptin in clinical studies: a pooled analysis of data from 10,246 patients with type 2 diabetes*. *BMC Endocr Disord*, 2010. **10**: p. 7.
80. Thorens, B., et al., *Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor*. *Diabetes*, 1993. **42**(11): p. 1678-1682.
81. Edwards, C.M., et al., *Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39*. *Diabetes*, 1999. **48**(1): p. 86-93.
82. D'Alessio, D.A., et al., *Elimination of the action of glucagon-like peptide 1 causes an impairment of glucose tolerance after nutrient ingestion by healthy baboons*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(1): p. 133-138.
83. 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. 1421-1430.
84. Schirra, J. and B. Goke, *GLP-1--a candidate humoral mediator for glucose control after Roux-en-Y gastric bypass*. *Diabetes*, 2014. **63**(2): p. 387-389.
85. 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-E223.
86. Braden, B., et al., *The [13C]acetate breath test accurately reflects gastric emptying of liquids in both liquid and semisolid test meals*. *Gastroenterology*, 1995. **108**(4): p. 1048-1055.

87. Woerle, H.J., et al., *The role of endogenous incretin secretion as amplifier of glucose-stimulated insulin secretion in healthy subjects and patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2012. **61**(9): p. 2349-2358.
88. Deacon, C.F., et al., *Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(10): p. 3575-81.
89. Schirra, J., et al., *Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on antro-pyloro-duodenal motility in the interdigestive state and with duodenal lipid perfusion in humans*. Gut, 2000. **46**(5): p. 622-631.
90. Schirra, J., et al., *The efficacy of exendin(9-39)amide as a GLP-1 receptor antagonist in human*. Gut, 2008. **57**(Suppl II): p. A85.
91. 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. 243-251.
92. Nicolaus, M., et al., *Endogenous GLP-1 regulates postprandial glycemia in humans: relative contributions of insulin, glucagon, and gastric emptying*. J. Clin. Endocrinol. Metab, 2011. **96**(1): p. 229-236.
93. Salehi, M., et al., *Effect of endogenous GLP-1 on insulin secretion in type 2 diabetes*. Diabetes, 2010. **59**(6): p. 1330-1337.
94. Stensen, S., et al., *Effects of endogenous GIP in patients with type 2 diabetes*. Eur J Endocrinol, 2021. **185**(1): p. 33-45.
95. Flock, G., et al., *Incretin receptors for glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are essential for the sustained metabolic actions of vildagliptin in mice*. Diabetes, 2007. **56**(12): p. 3006-3013.
96. Aulinger, B.A., et al., *Defining the role of GLP-1 in the enteroinsular axis in type 2 diabetes using DPP-4 inhibition and GLP-1 receptor blockade*. Diabetes, 2014. **63**(3): p. 1079-1092.
97. Meier, J.J. and M.A. Nauck, *Is the diminished incretin effect in type 2 diabetes just an epi-phenomenon of impaired beta-cell function?* Diabetes, 2010. **59**(5): p. 1117-1125.
98. Vardarli, I., et al., *Inhibition of DPP-4 with vildagliptin improved insulin secretion in response to oral as well as "isoglycemic" intravenous glucose without numerically changing the incretin effect in patients with type 2 diabetes*. J Clin. Endocrinol. Metab, 2011. **96**(4): p. 945-954.
99. D'Alessio, D.A., et al., *Treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin improves fasting islet-cell function in subjects with type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(1): p. 81-8.
100. Pratley, R.E., et al., *Twelve-week monotherapy with the DPP-4 inhibitor vildagliptin improves glycemic control in subjects with type 2 diabetes*. Horm Metab Res, 2006. **38**(6): p. 423-8.
101. Waget, A., et al., *Physiological and pharmacological mechanisms through which the DPP-4 inhibitor sitagliptin regulates glycemia in mice*. Endocrinology, 2011. **152**(8): p. 3018-3029.
102. Holst, J.J. and C.F. Deacon, *Glucagon-like peptide-1 mediates the therapeutic actions of DPP-IV inhibitors*. Diabetologia, 2005. **48**(4): p. 612-5.

103. D'Alessio, D.A., *What if gut hormones aren't really hormones: DPP-4 inhibition and local action of GLP-1 in the gastrointestinal tract*. *Endocrinology*, 2011. **152**(8): p. 2925-6.
104. Gasbjerg, L.S., et al., *Dose-dependent efficacy of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor antagonist GIP(3-30)NH(2) on GIP actions in humans*. *Diabetes Obes Metab*, 2021. **23**(1): p. 68-74.
105. Gasbjerg, L.S., et al., *Evaluation of the incretin effect in humans using GIP and GLP-1 receptor antagonists*. *Peptides*, 2020. **125**: p. 170183.
106. Meier, J.J., et al., *Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2001. **50**(11): p. 2497-2504.
107. Højberg, P.V., et al., *Four weeks of near-normalisation of blood glucose improves the insulin response to glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in patients with type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2009. **52**(2): p. 199-207.
108. 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-E109.
109. Samsom, M., et al., *Diabetes mellitus and gastric emptying: questions and issues in clinical practice*. *Diabetes Metab Res. Rev*, 2009. **25**(6): p. 502-514.
110. Woerle, H.J., et al., *A single dose of vildagliptin decelerates gastric emptying in patients with type 2 diabetes*. American Diabetes Association, 67th scientific sessions, 2007. **abstract**.
111. Vella, A., et al., *Effects of Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibition on Gastrointestinal Function, Meal Appearance and Glucose Metabolism in Type 2 Diabetes*. *Diabetes*, 2007: p. db07-0136.
112. Schvarcz, E., et al., *Physiological hyperglycemia slows gastric emptying in normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes mellitus*. *Gastroenterology*, 1997. **113**(1): p. 60-66.

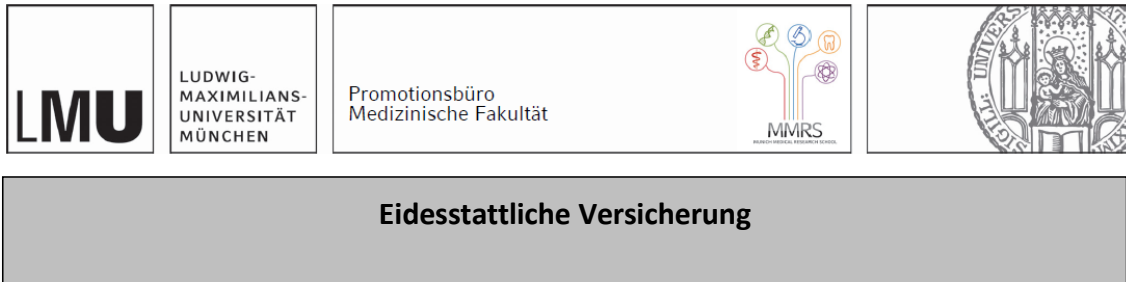
Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Jörg Schirra, durch den ich überhaupt erst in der Lage war, an dem spannenden Projekt, der Durchführung einer klinischen Studie teilzunehmen. Mit schier unendlicher Geduld hat er dazu beigetragen, dass dieses Projekt nach langer Ruhepause noch erfolgreich fertiggestellt werden konnte. Alle Diskussionen, Korrekturen und auch die Möglichkeit unsere Studie auf einem grossen internationalen Kongress zu präsentieren, werden mich nachhaltig beeinflussen.

Die Zusammenarbeit und medizinisch-technische Unterstützung durch Frau Rita Schinkmann und Frau Silke Knopp waren essentiell für die praktische Durchführung des Versuchsaufbaus.

Ausserdem Danke ich meinen Eltern, Anneliese und Franz Kutscherauer, die mir nicht nur ermöglichten, meinen Wunschberuf Arzt durch das Medizinstudium zu erreichen, sondern mich auch moralisch und finanziell unterstützten, die Zeit für die Durchführung der Studie aufbringen zu können.

Mein besonderer Dank gilt zudem meinem Ehemann Beat und meinen wundervollen zwei kleinen Töchtern Malea und Nalini, die in der Endphase der Arbeit viel auf mich verzichten mussten, mir Rückhalt auf allen Ebenen gaben, Mut zusprachen und sich nun mit mir freuen.

Affidavit**Eidesstattliche Versicherung**

Bollinger (geb.Kutscherauer), Gabriele

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Bestimmung der Rolle von endogenem GLP-1 in der enteroinsulinären Achse mittels DPP-4-Inhibition und GLP-1-Rezeptorblockade bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Gerlafingen, 29.12.2022

Gabriele Bollinger

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationsliste

- **Vortrag** am 13. Retreat der Medizinischen Klinik II der LMU, 04/2009: *“Auswirkung einer DPP-4-Hemmung auf den Inkretineffekt und die Rolle der spezifischen Inkretinhormone bei Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus“*
- **Postervorstellung** an der DoktaMed Messe der LMU, 06/2009: *„Good Clinical Practice in Clinical Studies: A randomized, placebo-controlled, double-blind, 4-period, crossover study to assess the impact of MK-0431 (Sitagliptin) on incretin effect and the role of specific incretin hormones in patients with type 2 diabetes mellitus“*
- **Vortrag** am 45. Jährlichen Meeting der EASD (European Association for the study of diabetes) in Wien: *“The DPP-4-Inhibitor Sitagliptin improves glucose tolerance in type 2 diabetes mellitus involving GLP-1 dependent and independent pathways“* und *“The role of GLP-1 in the enteroinsular axis in type 2 diabetes mellitus“*
- Aulinger B., Bedorf A., **Kutscherauer G.**, deHeer J., Holst JJ., Göke B., Schirra J., *Defining the role of GLP-1 in the enteroinsular axis in type 2 diabetes mellitus using DPP-4 inhibition and GLP-1 receptor blockade*, Diabetes, 2014. 63(3): p. 1079-92