

1. Einleitung

1.1 Typ 2 Diabetes mellitus

Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) ist mit einer Prävalenz von 6% in Deutschland (1) eine der häufigsten Erkrankungen mit hoher sozioökonomischer Bedeutung (2). Eine Zunahme des T2DM wurde sowohl in Deutschland (3), als auch in anderen europäischen Ländern, vor allem in Schweden und Finnland, gefunden (4 -7).

Die Ätiologie des T2DM ist weitgehend unbekannt, so dass die Therapie bisher vorwiegend symptomatisch bleibt. Neben Umweltfaktoren, wie körperlicher Inaktivität und Ernährungsgewohnheiten (8, 9), sind genetische Faktoren bei der Entstehung des T2DM gesichert. Belegt ist dies durch zahlreiche Zwillingsstudien, die den starken Einfluß genetischer Faktoren auf die Manifestation des T2DM zeigen (10, 11). Die Erbllichkeit des T2DM ist polygen bedingt (12, 13) und verschiedene genetische Besonderheiten sind für Krankheitmanifestation nötig.

Pathogenetisch findet sich eine verminderte Insulinsensitivität, verbunden mit einer inadäquaten Insulinsekretion und oft eine erhöhte, durch Hyperinsulinämie nicht effektiv hemmbare, hepatische Glukoseproduktion (14 -16). Dabei ist von einer bimodalen Genese des T2DM auszugehen (17, 19, 22, 24): sowohl eine pankreatische β -Zell Dysfunktion (15, 23, 24, 26-29), als auch eine Insulinresistenz (18, 25), als Folge noch nicht identifizierter Gendefekte sowie Umweltfaktoren (25, 26), sind an der Genese des T2DM beteiligt. Allerdings ist bisher weiter unklar, wie stark der relative Einfluß von Umweltfaktoren versus genetische Faktoren auf die β -Zellfunktion und Insulinresistenz ist, und welcher Art speziell die genetischen Läsionen sind, die zur β -Zelldysfunktion und zur Insulinresistenz führen.

1.2 Probleme der Phenotypisierung der frühen β -Zellfunktionsstörungen

Vor 40 Jahren wurde gezeigt, dass Typ-2-Diabetiker eine verminderte Insulinantwort im OGTT (30) und im IVGT (31) aufweisen. Die erste Phase der Insulinantwort fehlt bei fast allen Diabetikern mit der nüchternen Blutglukosewerten über 115 mg/dl (32).

Pathophysiologisch führt der Verlust der ersten Phase der Insulinantwort zur Steigerung der hepatischen Glukoseproduktion postprandial (33), zur Senkung der peripheren Glukoseaufnahme (34, 35) und erhöhten Lipolyse in Fettgewebe (36).

Da ein manifester Diabetes mellitus durch die Glukosetoxizität per se den Phänotyp beeinflusst (37), müssen solche Probanden untersucht werden, welche ein hohes Risiko, aber noch keine manifeste Glukosestoffwechselstörung (Hyperglykämie) haben:

1. erstgradige Verwandte von Typ-2-Diabetespatienten
2. Frauen mit anamnestischem Gestationsdiabetes
3. Personen mit normaler Glukosetoleranz, die später eine gestörte Glukosetoleranz oder Typ 2 Diabetes bekommen.

Bei den Personen mit gestörter Glukosetoleranz (IGT) ist eine verminderte (24, 38, 39) oder normale, sogar erhöhte erste Phase der Insulinsekretion (40) beschrieben worden. Bei Frauen mit anamnestischem Gestationsdiabetes wurde auch nach der Rückkehr zur NGT eine reduzierte erste Phase der Insulinsekretion beobachtet (41, 42).

Aufgrund der Schwierigkeiten der prospektiven Studien und möglichem Einfluß des Geschlechts (im Fall von Frauen mit anamnestischem Gestationsdiabetes), sind die erstgradige Verwandte von Typ-2-Diabetespatienten am besten für die metabolische Phenotypisierung geeignet. Viele der erstgradigen Verwandte von Typ-2-Diabetespatienten weisen unter hyperglykämischen Bedingungen typische Merkmale des Typ 2 Diabetes, wie Insulinresistenz und reduzierte β -Zellfunktion, auf (27 - 29). Diese Individuen haben ein ca. 40-50% Risiko im weiteren Leben einen Typ 2 Diabetes zu entwickeln (43). Eine gestörte Insulinsekretion wurde schon in früheren Untersuchungen an erstgradigen Verwandten von Familien, bei denen beide Elternteile an T2DM erkrankt waren, beobachtet (46). Bei Personen, bei denen nur ein Elternteil einen T2DM hatte, ist eine reduzierte (28, 29, 45), normale (46, 47) oder sogar erhöhte (48, 49) erste Phase der Insulinantwort beobachtet worden. In einigen prospektiven Studien wurde nachgewiesen, dass eine reduzierte erste Phase der Insulinantwort ein unabhängiger Prediktor für das Auftreten des T2DM ist (22, 50, 51). Bei der Auswahl der Probanden sind Faktoren wie Alter (52), Geschlecht, BMI und körperliche Aktivität (24), welche Einfluß auf die Insulinsekretion/Insulinsensitivität ausüben können, sorgfältig abzuwägen.

1.3 Methoden zur Untersuchung der β -Zellfunktion *in vivo*.

Verschiedene Methoden (Tabelle 1), wie der intravenöse Glukosetoleranz-Test mit Minimal Model (53, 54), Glukagon-Test (55, 56), oraler Glukosetoleranz-Test (57, 58), der Homeostatic Model Analysis (HOMA) (59, 60), Continuous Infusion of Glucose Model Analysis (CIGMA) (61), sowie der hyperglykämische Glukoseklemmtest (62), mit seinen Modifikationen (63-67), stehen für die Charakterisierung der β -Zellfunktion und der Insulinsensitivität zur Verfügung. Diese Tests messen hauptsächlich die glukosestimulierte Insulinantwort.

Zusätzliche Informationen über α - und β -Zellfunktion sind durch die Gabe anderer Insulinsekretagen wie Arginin (63, 64) zu bekommen.

1.3.1 Hyperglykämischer Glukoseklemmtest

Der Test wurde zuerst von der Arbeitsgruppe DeFronzo (62) als eine zweistündige Prozedur mit der Gabe von einem Glukosebolus und einer kontinuierlichen Glukose-Infusion zum Erhalten eines Blutzuckers im Bereich 7 mmol/l beschrieben.

Im Vergleich zum OGTT und IVGT erlaubt der Test die Überprüfung der ersten und zweiten Phasen der glukoseabhängigen Insulinsekretion im Bezug auf standardisierte Blutglukosekonzentrationen (62). Frühe β -Zellsekretionsdefekte sind bei Personen mit normaler Glukosetoleranz schwer zu diagnostizieren. Zum Beispiel in den Arbeiten von Pimenta et al. (28) und Van Haeften et al. (29) zeigten erstgradige Verwandte von Typ-2-Diabetikern eine normale Plasmainsulinantwort im OGTT und eine reduzierte Plasmainsulinantwort im hyperglykämischen Clamp.

Im weiteren Verlauf wurde der Test durch die Gabe von nicht glykämischen Stimulatoren wie Arginin (63, 64), GLP-1(63), GIP (64, 65) oder Fettsäuren (66, 67) als auch durch andere Glukosezielwerte erweitert. Diese Modifikationen erlauben eine differenzierte Charakterisierung der β -Zellsekretionsmuster.

Es ist in dem Test auch möglich, nicht nur das β -Zellsekretionsmuster, sondern auch die maximale Sekretionskapazität (63), die Insulinsensitivität (68) und Insulinclearance (69) einzuschätzen.

Tabelle 1: Methoden zur Untersuchung der Insulinsensitivität und der β -Zellfunktion *in vivo*.

Eigenschaften	Glukose Clamp	OGTT	Minimal Model	HOMA/CIGMA	Arginin Test	Glukagon Test
Quantitativ	ja	nein	ja	nein	ja	ja
Einschätzung der AIR	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Einschätzung der ISI	ja	ja	ja	ja	nein	nein
Einfach	+	++	+	+++	+	+++
Ökonomisch	nein	ja	nein	ja	nein	nein
Physiologisch	++	+++	++	++	+	++
Reproduzierbarkeit	++	++	+++	++	++	+++
Mechanismus der Interpretation	ja	ja	ja	nein	nein	ja
Korrelation mit Glukoseclamp		gut	gut	gut	mittel	nicht bekannt

CIGMA = constant infusion of glucose with model assessment; **HOMA**= homeostatic model assessment; **CIGMA** = constant infusion of glucose with model assessment.

1.3.2 Inkretine und β -Zellfunktionsstörung

Der Inkretineffekt beschreibt das Phänomen, dass nach oraler Glukosegabe die Insulinsekretion höher als nach intravenöser Gabe von Glukose ausfällt (70). Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) und Glukagon-like Peptide-1 (GLP-1) sind die beiden bekannten Inkretinhormone, die nach einer Mahlzeit aus dem Darm freigesetzt werden und die Insulinsekretion verstärken (71). GIP wird in den K-Zellen des Duodenums und oberen Jejunums synthetisiert (72). GLP-1 wird von den L-Zellen des unteren Ileums, Kolons und Rektums sezerniert (73).

Beide Hormone zusammen sind postprandial für ca. 50% des Insulinanstieges verantwortlich (70, 74). Durch Imitation des Blutzuckeranstieges, wie nach oraler Glukosegabe mittels intravenöser Glukose-Infusion, wurde gezeigt, dass sich die Sekretionsantwort der β -Zelle bei gleichzeitiger GIP-Infusion im Vergleich zu einer oralen Glukosegabe nicht wesentlich unterschied (74). Das Ergebnis belegte den überwiegenden Beitrag des GIP zur gesamten Inkretinwirkung (ca. 75%), und somit den Stellenwert des GIP als wichtiges Inkretinhormon beim Stoffwechselgesunden unter physiologischen Bedingungen (70, 74, 75), während der Beitrag des GLP-1 umstritten ist (75, 76).

Neben der Verabreichung von oraler Glukose und Testmahlzeiten, konnten auch isolierte Aminosäuren und Triglyceridgaben eine GIP-Freisetzung, und damit einen Anstieg der im Nüchternzustand niedrigen GIP-Konzentrationen bewirken (77, 78).

Im Gegensatz zu GLP-1 scheint GIP keinen Einfluß auf die Glukagonsekretion auszuüben (79). Bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus unterscheidet sich die Stimulation der Insulinsekretion durch intravenöse, verglichen zu oraler Glukosegabe, kaum (80), das bedeutet, der Inkretineffekt fehlt nahezu vollständig (71). Es wurde nachgewiesen, dass bei Typ 2 Diabetikern die insulinotrope Wirkung von GLP-1 unbeeinträchtigt ist, während die Insulinsekretion auf GIP erheblich reduziert ist (81, 82). Durch Steigerung der GIP-Infusionsrate (maximal $2.4 \text{ pmol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) konnte der Verlust der insulinotropen Wirkung des GIP bei Typ 2 Diabetikern nicht ausgeglichen werden (82). Es ist unklar, ob eine verminderte GIP-Wirkung sich bei Typ 2 Diabetikern als Ergebnis bestimmter Stoffwechselveränderungen findet, oder ob ein primärer, möglicherweise genetisch determinierter Defekt vorliegt, der bereits den prädiabetischen Phänotyp charakterisiert (65).

1.3.3 Arginin und glukoseabhängige Insulinsekretion

Zusätzliche Informationen über α - und β -Zellfunktion sind durch die Gabe der anderen Insulinsekretagen wie Arginin zu bekommen. Die Methode wurde erst von der Arbeitsgruppe Ward (83) erfunden und von der Arbeitsgruppe Ahren etabliert (84). Nach der wiederholten Gabe von Arginin bei zwei verschiedenen Blutglukoseniveaus (14 und 25 mmol/l) wird die sog. maximale Acute Insulin Antwort (AIR_{max}) als ein Index für die Insulinsekretionskapazität gemessen (84). In diesem Test ist es nicht möglich, die erste und zweite Phase der Insulinsekretion einzuschätzen. Wird Arginin als Bolus und Infusion gegeben, so ist es möglich die biphasische Insulinantwort zu bestimmen (85).

1.4 Probleme der Methodik der Insulinkonzentrationsbestimmungen

1.4.1 Physiologie und Messung der Insulinsekretion

Zur Beurteilung der endogenen Insulinsekretion im Nüchternzustand und nach verschiedenen Stimuli, werden meist die peripheren Konzentrationen von Insulin oder C-Peptid, oder von beiden herangezogen. Insulin und C-Peptid entstehen durch enzymatische Spaltung aus der gemeinsamen Precursormolekül Proinsulin (86) und werden von den B-Zellen äquimolar in die portale Zirkulation sezerniert (87, 88).

Während das C-Peptid die Leber ohne Extraktion passiert (89), werden im Nüchternzustand ca. 50% des neu sezernierten Insulins während der ersten Passage von der Leber extrahiert („first-pass“ Effekt), bevor es die periphere Zirkulation erreicht (87, 90, 91). Daher spiegelt die periphere Insulinkonzentration eher die posthepatische bzw. systemische Insulinabgaberate als die pankreatische Insulinsekretionsrate wieder.

Aufgrund dieser Beobachtungen scheint die C-Peptidbestimmung in der Peripherie das geeignetere Verfahren zur Beurteilung der Insulinsekretion zu sein. Außerdem wird die Beurteilung der peripheren Insulinkonzentration durch eine variable hepatische Insulinextraktion und eine variable Plasmaclearance des Insulins erschwert (93, 96). Wegen der fehlenden hepatischen Extraktion und der längeren Plasmahalbwertszeit des C-Peptides im Vergleich zum Insulin (92), bestehen in der peripheren Zirkulation höhere C-Peptidkonzentrationen im Vergleich zum Insulin. Das periphere C-Peptid gibt jedoch wegen

seiner relativ langen Halbwertszeit von ca. 30 Minuten, im Vergleich zur kürzeren Halbwertszeit des Insulins von ca. 5 Minuten, rasche Veränderungen der Insulinsekretion, wie z.B. beim i.v. Glukosetoleranztest oder beim hyperglykämischen Glukoseklemmtest (93) nur verzerrt wieder. Die routinemäßige Messung der Insulinkonzentration in der Pfortader, oder die routinemäßige Insulinapplikation in die Pfortader, ist nicht möglich und auf bestimmte experimentelle Situationen beschränkt.

Als Ausweg aus diesen methodischen Schwierigkeiten kam die Messung der pankreatischen Insulinsekretionsrate selbst in Frage. Nach Bekanntwerden erster kinetischer Daten zum humanen C-Peptid (94) wurde von Eaton (95, 96) eine Methode zur Messung der pankreatischen C-Peptidsekretionsrate beschrieben, die wegen der äquimolaren Sekretion von Insulin und C-Peptid der pankreatischen Insulinsekretionsrate entspricht. Durch mathematische Analyse die periphere C-Peptidkonzentrationen kann die Insulinsekretionsrate von C-Peptid gemessen werden (95, 96). Die Plasmaclearance vom C-Peptid ist bei physiologischen und supraphysiologischen C-Peptidkonzentrationen, auch unter non-steady-state-Bedingungen, konstant (97-100) und wird nicht durch die Einnahme einer Mahlzeit oder durch wechselnde Plasmaglukosekonzentrationen beeinflusst (101).

1.4.2 Physiologie und Messung der Insulinclearance

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Clearance von Insulin ein zu sättigender Prozeß ist (102, 103), und dass die Sättigung nur im supraphysiologischen Bereich eintritt (104). Die Leber gilt als Hauptorgan für die Plasmaclearance des endogenen Insulins und ist für bis zu 70% des gesamten Insulinmetabolismus verantwortlich (102, 103). Das zweitwichtigste Organ für den Insulinmetabolismus ist die Niere (103).

Eine Vielzahl von pathologischen Zuständen wie: Adipositas, gestörte Glukosetoleranz, Typ 2-Diabetes mellitus und Leberzirrhose sind mit einer verminderten Insulinclearance assoziiert (105-107). Nach starker Stimulation der Insulinsekretion in Rahmen des Glukoseklemmtests kommt es auch zu einer Abnahme der Plasmaclearance von endogenem Insulin (93).

Die Möglichkeit, die pankreatischen Insulinsekretionsrate im Nüchternzustand und nach der Stimulation zu bestimmen, erlaubt nicht invasive Untersuchungen über die Beziehung zwischen der Insulinwirkung und der Insulin-clearance.

1.4.3 Physiologie und Messung des Proinsulinprozessing

Proinsulin, ein aus 86 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, wird in der β -Zelle als „Precursor“ vom Insulin synthetisiert (86). Ca. 85% des Proinsulins wird über zwei verschiedene Konversionsschritte in der Position 64/65 und 31/32 in Insulin und C-Peptid umgewandelt. Dabei entstehen als Intermediarprodukte die Des- und Split-Proinsuline (108, 109).

Die Plasmakonzentrationen des Proinsulin sind bei der Typ 2 Diabetiker deutlich erhöht (110, 111). Man unterscheidet dabei zwischen absoluter und relativer (sog. Proinsulin zu Insulin oder Proinsulin zu C-Peptid Ratio) Hyperproinsulinämie. Relative Hyperproinsulinämie findet man bei der schlanken Typ 2 Diabetikern (111), bei Personen mit Gestationsdiabetes (112) und bei Personen mit IGT (113, 114). Die Ergebnisse der großen epidemiologischen Studien weisen darauf hin, dass die relative Hyperproinsulinämie eher als die Hyperinsulinämie mit der Konversion zu Typ 2 Diabetes mellitus korreliert (115, 116).