

3 Methodik

3.1 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ruhruniversität zu Bochum hinsichtlich rechtlicher und ethischer Bedenken begutachtet. Im Schreiben vom 13.10.1999 (Registrationsnummer 1236) wurden keine Bedenken gegen die Durchführung der Studie in der vorgelegten Form geäußert.

Alle Patienten wurden vollständig aufgeklärt und erteilen ihre Zustimmung zur Teilnahme an den Versuchen schriftlich.

3.2 Probanden- Charakteristika

In der Kontrollgruppe wurden 8 nicht stark übergewichtige Normalpersonen untersucht. Die zweite Gruppe bestand aus 8 gesunden, glukosetoleranten, nicht stark übergewichtigen erstgradigen Verwandte von Patienten mit T2DM. Die demographischen Charakteristiken der Probanden sind in Tabelle 2 angegeben. Männer und Frauen waren bzgl. Alter und BMI vergleichbar. Bei allen Probanden wurde ein Typ 2 Diabetes mellitus nach ADA-Kriterien (117) ausgeschlossen und waren keine Leber- oder Nierenerkrankungen bekannt. Die Probanden standen unter keiner Dauermedikation.

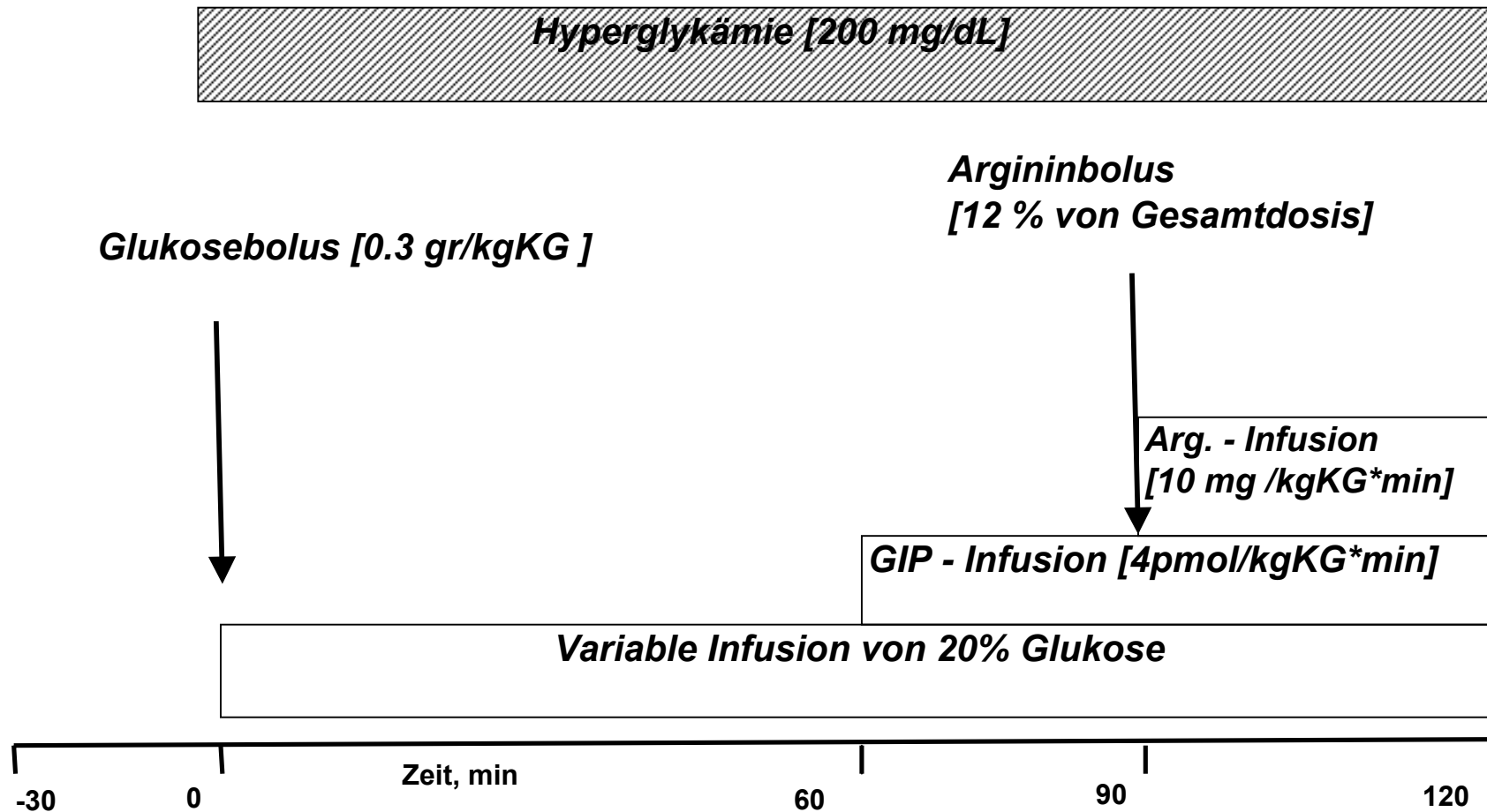
3.3 Versuchsprotokoll

Im Untersuchungsprojekt wurde das Sekretionsmuster der β -Zelle bei der erstgradigen Verwandten von Patienten mit T2DM und Kontrollpersonen mittels eines hyperglykämischen Glukoseklemmtests mit 3 verschiedenen Sekretagen (Glukose, GIP und Arginin) (Abbildung 1) verglichen. Jeder Patient nahm an einem Glukoseklemmtest teil.

Alle Untersuchungen wurden am Morgen nach einer zehnstündigen nächtlichen Nüchternperiode begonnen. An beiden Unterarmen wurde eine Venenverweilkanüle plziert. Zum "Offenhalten" wurde langsam physiologische NaCl-Lösung infundiert.

Abbildung 1

Schematische Darstellung des 3-Stufen hyperglykämischen Glukoseklemmtests



Bei allen Probanden wurde eine Hyperglykämie von 200mg/dL hergestellt und durch Infusion von 20% Glukoselösung aufrechterhalten.

Die Patienten verharrten während des Versuches in liegender oder sitzender Position.

Die Versuche wurden zwischen 7⁰⁰ und 8⁰⁰ Uhr mit der Entnahme der basalen (-15, -5 und 0 min) Blutproben begonnen. Zum Zeitpunkt 0 min wurde ein Bolus von 40% Glukoselösung (0,3 gr x kg Körpergewicht) über einen intravenösen Zugang gegeben und in den ersten 10 min jede 2,5 min die Blutproben abgenommen. Sobald die Blutglukose nach dem Glukosebolus ein Niveau von 200 mg/dl erreichte, wurde eine 20% Glukose-Infusion i.v. angeschlossen. Danach erfolgten die nächsten Blutentnahmen zu den Zeitpunkten des Klemmtests: 25, 40, 60, 62,5, 65, 67,5, 70, 85, 90, 92,5, 95, 97,5, 100 und 115. Es wurde je 4 ml Blut (EDTA)-Monovette gewonnen. In diesen Proben wurden Insulin, C-Peptid und Proinsulin bestimmt.

Die beiden Ohrläppchen wurden mit einer Salbe (Finalgon®, Nonivamid 4mg/g, Nicoboxil 25 mg/g) ca. 15 min vor der ersten Blutabnahmen eingerieben, um eine Hyperämie und damit verbundene „Arterialisierung“ des Kapillarblutes zu erreichen. Zur Überprüfung der „Klemmbedingungen“ wurden die Kapillarblutproben alle 5 min aus dem Ohrläppchen abgenommen.

In der Zeit von 60 bis 120 min wurde das GIP der menschlichen Sequenz (PolyPeptide Laboratorien GmbH, Wolfenbüttel, Deutschland) in einer Dosierung von $2 \text{ pmol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ über einen Perfusor (Perfusor segura, Braun Melsungen, Deutschland) intravenös infundiert. Zum Zeitpunkt 90 min wurden zusätzlich ein Arginin-Bolus (12% der Arginin-Infusionsdosis) und eine Arginin-Infusion ($10 \text{ mg} \times \text{Kg Körpergewicht} \times \text{min}$) über einen anderen Perfusor gegeben. Nach 120 min wurde der Versuch beendet.

In ca. 1,5 h nach der Beendigung des Versuches wurden die Venenverweilkanülen entfernt. Für die Prophylaxe einer möglichen Unterzuckerung wurde die i.v. Glukose-Infusion noch ca. 1,5 Stunden fortgeführt und die Patienten erhielten ihr normales Mittagmahl.

3.4 Infusionslösungen

Für die Glukose-Bolusgabe wurde 40% Glukoselösung (40% im Wasser, Delta-Pharma, Pfullingen, Deutschland) und für die kontinuierliche Infusion 20% Glukoselösung (20% im Wasser, Delta-Pharma, Pfullingen, Deutschland) verwendet.

Die 20% Glukoselösung wurde mittels einer Infusionpumpe (Braun, Melsungen, Deutschland) und einen Schlauch mit 8 ml Totraumvolumen (Braun, Melsungen, Deutschland) infundiert. Der Glukose-Bolus wurde von Hand während der ersten 50 Sekunden des Glukoseklemmtests gegeben.

Es wurde für jeden Versuch das synthetische GIP in 0.9% Kochsalzlösung und 2 ml eigenes Vollblut als Trägermedium infundiert.

Das synthetische GIP wurde von PolyPeptide Laboratorien, Wolfenbüttel, Deutschland bezogen. Das verwendete GIP trug die Lot-Nummer als pharmazeutisches Produkt C-0229. Der Netto-Peptid-Gehalt betrug 88%. Unter sterilen Bedingungen wurde eine Stammlösung mit einer GIP-Konzentration von $50 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ hergestellt. Dem synthetischen GIP wurden dazu 0.9% NaCl mit 1% Humanalbuminlösung zugesetzt. Diese Stammlösung wurde unter einer Sterilbank filtriert und bis Verwendung maximal sechs Monate bei -30°C in Portionen zu je 3-4 ml gelagert. HPLC-Profil (vom Hersteller zur Verfügung gestellt) zeigten für diese Stammlösung einen Reinheitsgrad von $> 99\%$. Aufgetaute Stammlösungen wurden sofort verwendet.

Zum Nachweis bakterieller Kontamination wurden Proben kultiviert. Alle Proben blieben negativ. Eine Überprüfung auf Pyrogene erfolgte mittels Limulus-Assay (Limulus amoebocyte lysate endo-LAL, Chromogenix AB, Mölndal, Sweden). Alle Proben zeigten mit einer gemessenen Endotoxin-Konzentration von $<0.03 \text{ EU/ml}$ keinen Hinweis auf Kontamination.

Am Morgen des Versuchstages wurden die Stammlösungen aufgetaut und mit 0,9 % Kochsalzlösung und 2 ml eigenem Vollblut auf 50 ml in der erforderlichen Konzentration verdünnt. Die Menge an GIP für die erforderliche Infusionsrate von $2.0 \text{ pmol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ wurde von dem Test mit Hilfe einer entsprechenden Formel und eines Tabellenkalkulationsprogrammes (Excel 5.0, Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) anhand des gemessenen Körpergewichtes des Patienten berechnet.

Zur Infusion des GIP wurde eine Infusionpumpe (Perfusor segura, Braun, Melsungen, Deutschland) und ein Schlauch mit 2 ml Totraumvolumen (Braun, Melsungen, Deutschland) benutzt.

Es wurde L-Arginin-Hydrochlorid (21% im Wasser, Braun, Melsungen, Deutschland) für die Arginin-Bolusgabe und für die kontinuierliche Arginin-Infusion verwendet.

Die Menge an Arginin für die erforderliche Infusionsrate von $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ wurde mit Hilfe einer entsprechenden Formel und eines Tabellenkalkulationsprogrammes (Excel 5.0, Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) anhand des gemessenen Körpergewichtes des Patienten berechnet. Der Arginin-Bolus wurde als 12 % der gesamten Infusionsdosis berechnet.

Die 21% L-Arginin-Hydrochloridlösung wurde mittels einer Infusionpumpe (Braun, Melsungen, Deutschland) und eines Schlauches mit 8 ml Totraumvolumen (Braun, Melsungen, Deutschland) infundiert. Der Arginin-Bolus wurde vom Hand über 20 Sekunden zum Zeitpunkt 90 min des Glukoseklemmtests gegeben. Die Arginin-Infusion wurde sofort nach der Bolus-Gabe angeschlossen und bis an das Ende (120 min) des Glukoseklemmtests gegeben.

3.5 Blutentnahmen

Blutentnahmen erfolgten ausschließlich über die vorgesehene Venenverweilkanüle mit angeschlossenem Dreiwegehahn. Vor jedem Meßwert wurden 2 ml Blut entnommen und verworfen, um unzulässige Verdünnungen des Blutes durch das Totraumvolumen der Kanüle und des Dreiwegehahns zu vermeiden. Nach der Entnahme erfolgte eine Spülung der Kanüle und des Dreiwegehahnes durch 0.9% NaCl mittels einer 2 ml Spritze.

Zur Bestimmung der Blutglukosekonzentrationen wurden die Kapillarblutproben in einer Microvette (ca. 20 μl ; Hemo Cue, Aengelholm, Sweden) jede 5 Minuten aus einem Ohrläppchen entnommen.

Die Blutproben zur Messung von Insulin-, C-Peptid-, Proinsulin-Konzentrationen wurden mit 10 ml Monovetten (Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen und nach Lagerung in Eis am gleichen Tag bei $+4^{\circ} \text{C}$ zentrifugiert.

Der Serumüberstand wurde in zwei Portionen zu je ein Mal 1.0 ml pipettiert und in 1 ml Plastik - „Cups“ mit Deckel bei -20°C gelagert.

Zur Messung der Proben wurden keine vormals aufgetauten Proben verwendet.

Der Blutverlust pro Versuch betrug ca. 200 ml.

3.6 Laborbestimmungen

3.6.1 Blutglukose

Die Bestimmung der Blutglukosekonzentration wurde mit einem HemoCue Glucose-Analyser(Hemo Cue, Aengelholm, Sweden) nach der photometrischen Methode gemessen. Die Kapillarblutproben wurden durch Kapillarwirkung ca. 20 µl Blut in eine Microvette gesaugt und sofort in der Messkamera des Photometers plaziert. Der in der Microvette befindliche Saponin hämolysiert die Erythrozyten. Unter Mutarotase wird α -D-Glukose in β -D-Glukose umgewandelt, welche dann mit NAD (Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid) unter Einwirkung von Glukose-Dehydrogenase als Katalysator zu NADH reagiert. Das Enzymsystem GDH/Mutarotase garantiert ein molares Verhältnis zwischen der verfügbaren Glukose und dem produzierte NADH. NADH und MTT, ein chromogenes Tetrazoliumsals, reagieren unter der katalytischen Einwirkung des Enzym Diaphorase zu NAD und MTTH. Die Konzentrationen des gebildeten MTTH, eines farbigen Formazans, ist proportional zur Glukosekonzentration und wird photometrisch bei zwei Wellenlängen gemessen.

Zwischen Blutentnahme und Ausgabe des Meßwertes jeder Probe lagen maximal 1.5 Minuten.

Die Präzision in der Serie lag stets unter 4.5 %.

3.6.2 Hormone

Insulin

Insulin wurde mit einem kommerziellen Insulin-Enzyme-Linked-Immunsorbentassay (ELISA)-Kit bestimmt (Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Die Sensitivität dieses Assay, definiert als die Insulinkonzentration des Nullkalibrators plus 2 Standardabweichungen (ermittelt aus dem Mittelwert der Extinktion), lag bei <1,0 mU/l bei einem Nachweisbereich ohne Verdünnung bis 200 mU/l. Der Variationskoeffizient für Intra-Assay-Bestimmungen zwischen 11 mU/l und 154 mU/L betrug 2.8 bis 4.0 % und für Inter-Assay-Bestimmungen 2.6 bis 3.6 %. Die Kreuzreaktivität für humanes Proinsulin war kleiner als 0.01% und für C-Peptid kleiner als 0.01%. Die Wiederfindug von zugefügtem Insulin lag zwischen 94 und 113% (mittlere Wiederfindug 104%).

C-Peptid

C-Peptid wurde mit einem C-Peptid-Enzyme-Linked-Immunosorbentassay (ELISA)-Kit bestimmt (C-Peptide ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Die Sensitivität dieses Assay, definiert als die C-Peptid-Konzentration des Nullkalibrators plus 2 Standardabweichungen (ermittelt aus dem Mittelwert der Extinktion), lag bei $< 15 \text{ pmol/l}$ ($< 0,045 \text{ } \mu\text{g/l}$) bei einem Nachweisbereich ohne Verdünnung bis 4000 pmol/l . Der Variationskoeffizient für Intra-Assay-Bestimmungen zwischen 255 pmol/l und 2508 pmol/l betrug 3.4 bis 5.0 % und für Inter-Assay-Bestimmungen 2.4 bis 4.4 %. Die Kreuzreaktivität für humanes Insulin war kleiner als 0.1% und für Proinsulin 100 % (h-Proinsulin des (64-65) 86%, h-Proinsulin split (65-66) 98%, h-Proinsulin des (31-32) 58%, h-Proinsulin split (32-33) 96%). Die Wiederfindung von zugefügtem humanem C-Peptid lag zwischen 93 und 112 % (mittlere Wiederfindung 107 %).

Proinsulin

Proinsulin wurde mit einem kommerziellen ELISA-Kit (Proinsulin ELISA, DRG Instruments GmbH, Germany) bestimmt. Die Sensitivität dieses Assay, definiert als die Proinsulin-Konzentration des Nullkalibrator plus 2 Standardabweichungen (ermittelt aus dem Mittelwert der Extinktion), lag bei $< 0.5 \text{ pmol/l}$ ($< 0,0045 \text{ } \mu\text{g/l}$) bei einem Nachweisbereich ohne Verdünnung bis 66 pmol/l . Der Variationskoeffizient für Intra-Assay-Bestimmungen zwischen 6.97 pmol/l und 60.3 pmol/l betrug 4.8 % und für Inter-Assay-Bestimmungen zwischen 7.32 pmol/L und 64.7 pmol/l bis 6.8 %. Es ergab sich keine Kreuzreaktivität für humanes Insulin und für C-Peptid (h-Proinsulin des (64-65) 84%, h-Proinsulin split (65-66) 90%, h-Proinsulin des (31-32) 95%, h-Proinsulin split (32-33) 95%). Die Wiederfindung von zugefügtem humanem Proinsulin betrug 93 und 101 % (mittlere Wiederfindung 97%).

3.7 Auswertung

3.7.1 HOMA-Analyse

Die β -Zellsekretionskapazität und Insulinresistenz wurde, wie von Matthews et al. beschrieben, mittels des HOMA-Modells berechnet (61). Grundlage ist die nüchtern bestimmten Konzentrationen von Plasmaglukose und Insulin. Die Referenzwerte für die 100% Sekretionskapazität der β -Zelle und dem Faktor 1 der Insulinresistenz basieren auf Daten, die an Gesunden im Alter von 40-68 Jahren ermittelt worden.

Zur Berechnung mittels des HOMA-Modells wurden die ersten 3 Werte während der Basalperiode des Glukoseklemmtests herangezogen.

3.7.2 Pankreatische Insulinsekretionsrate

Die pankreatische Insulinsekretionsrate wurde mit Hilfe sog. Standardparameter der C-Peptidkinetik berechnet. Grundlagen dafür sind die während des Glukoseklemmtests bestimmten C-Peptid-Konzentrationen und die C-Peptidkinetikparameter. Die mathematische Prozedur, mittels welcher die Sekretionsrate eines Hormons bzw. Peptids aus seinen aktuellen Plasmakonzentrationen und den kinetischen Modellparametern berechnet wird, bezeichnet man als Deconvolution (97, 98). Die von Van Cauter et al. (120) ermittelten Standardparameter der C-Peptidkinetik für Normalpersonen, Übergewichtigen und Patienten mit Typ 2-Diabetes zeigten keinen signifikanten Genauigkeitsverlust im Vergleich zur Berechnung mit Individualparametern.

Das Verteilungsvolumen des zentralen Kompartiments wurde getrennt für Frauen und Männer nach folgenden Regressionsformeln ermittelt (120):

$$\text{Frauen: } V_d (l) = 1,11 \times \text{KOF}(m^2) + 2,04$$

$$\text{Männer: } V_d (l) = 1,92 \times \text{KOF}(m^2) + 0,64$$

Die lange Halbwertszeit ($T_{1/2}(\text{lang})$) des C-Peptides hängt nach Van Cauter et al. (120) folgendermaßen vom Alter ab:

$$T1/2(\text{lang})=0,14x \text{ Alter (J.)}+29,2.$$

Für $T1/2(\text{kurz})$ und F (Anteil der Elimination), der mit der kurzen Halbwertszeit assoziiert ist; $F=p1/(p1+p3)$ können die entsprechenden Gruppenmittelwerte verwendet werden.

Standardparameter der C-Peptidkinetik
(nach Van Cauter et al.1992)

| Parameter | Normalpersonen (N=111) | Adipöse (N=53) | Typ 2-Diabetiker (N=36) |
|------------------------|---------------------------|-------------------|----------------------------|
| $T1/2$ (kurz) (min) | 4,95 | 4,55 | 4,52 |
| F $F=p1/(p1+p3)$ | 0,76 | 0,78 | 0,78 |

$T1/2(\text{kurz})$, $T1/2(\text{lang})$, F und Vd wurden in das Computerprogramm zur Berechnung der Insulinsekretionsrate eingelesen (119). Die Insulinsekretionsrate wurde aus den mit einem gleitenden Durchschnitt über zwei Punkte geglätteten peripheren Serum-C-Peptidkonzentrationen berechnet.

Da C-Peptid ganz überwiegend in der Niere eliminiert wird (120) und ca. 10% des sezernierten C-Peptides unverändert im Urin ausgeschieden wird (121), können Standardparameter der C-Peptidkinetik nicht bei verminderter Nierenfunktion oder sonstigen Zuständen mit veränderter C-Peptidclearance aus dem Plasma verwendet werden.

3.7.3 *Metabolische Clearancerate von endogenem Insulin.*

Die Messung der pankreatischen Insulinsekretionsrate ermöglicht es, die metabolische Clearancerate (MCR_{ins}) von endogenem Insulin im Basalzustand und bei Stimulation der Insulinsekretion zu messen.

Im basalen Zustand ist die MCR_{ins} von endogenem Insulin als Verhältnis der basalen Insulinsekretionsrate zur basalen peripheren Insulinkonzentration definiert (92):

$$MCR_{bas} = \frac{\text{basale pankreatische Insulinsekretionsrate (pmol/min)}}{\text{basale periphere Insulinkonzentration (pmol/ml)}} \quad (\text{ml/min})$$

Unter Stimulation der Insulinsekretion erhält man die endogene Insulin-clearance (MCR_{stim}) als Verhältnis der Gesamtfläche unter der Insulinsekretionsratenkurve zur Gesamtfläche unter der peripheren Insulinkonzentrationskurve (92), allerdings unter der Voraussetzung, daß die Insulinsekretionsraten und –Konzentrationen auf das Niveau der Basalwerte zurückgekehrt sind:

$$MCR_{stim} = \frac{\text{Fläche unter den Insulinsekretionsraten}}{\text{Fläche unter der peripheren Insulinkonzentration}} \quad (\text{ml/min})$$

Da die Leber das Hauptorgan für die Clearance von endogenem Insulin ist (91, 94), stellt die Clearance von endogenem Insulin ein indirektes Maß für hepatische Insulinextraktion dar.

Für die Berechnung die endogene Insulin-clearance wurde die Insulinsekretionsrate zusätzlich als Fläche unter der Kurve bestimmt.

Für die Messung der endogenen Insulin-clearance im Basalzustand und während Stimulation der Insulinsekretion sind keine Annahmen über die Kinetik und die kompartimentale Verteilung des Insulins selbst erforderlich (92).

3.7.4 Proinsulin zu Insulin und Proinsulin zu C-Peptid Ratio (PI/Ins; PI/CP)

Für die Berechnung des Quotienten Proinsulin zu Insulin und Proinsulin zu C-Peptide wurden die Werte von den Hormonen unter der Voraussetzung, daß die Hormonenkonzentrationen auf das Niveau der Basalwerte zurückgekehrt sind, benutzt.

Die Quotienten sind in % dargestellt.

3.7.5 Insulin Sensitivität Index

Der Insulin Sensitivität Index (ISI) wurde berechnet, indem die mittlere Glukoseinfusionsrate durch den mittleren Seruminsulinspiegel zwischen Minute 40 und 60 des hyperglykämischen Glukoseklemmtests geteilt wurde.

3.7.6 Dispositionsindex

Da der Zusammenhang zwischen der Insulinsensitivität und der Insulinsekretion nicht linear ist, wurde für die Beurteilung des metabolischen Zustandes der Probanden ein Sog. Disposition Index berechnet: Disposition Index(DI) = ISI X AIR_(gluk.o-10 min) (126)

3.7.7 Phasen der Insulinsekretion

Die Berechnung der unterschiedlichen Insulinsekretionsphasen erfolgte nach folgenden Formeln:

$$1^{\text{ste}}\text{-Phase der glukoseabhängigen Insulinsekretion (I}_{1\text{st-phase}}) = \sum \text{Ins}_{2.5} + \text{Ins}_{5.0}$$

$$2^{\text{te}}\text{-Phase der glukoseabhängigen Insulinsekretion (I}_{2\text{te-phase}}) = \sum \text{Ins}_{25} + \text{Ins}_{40} + \text{Ins}_{60}$$

$$1^{\text{ste}}\text{-Phase der GIP-abhängigen Insulinsekretion (I}_{1\text{st-phase GIP}}) = \sum \text{Ins}_{62.5} + \text{Ins}_{65} + \text{Ins}_{67.5}$$

$$2^{\text{te}}\text{-Phase der GIP-abhängigen Insulinsekretion (I}_{2\text{te-phase GIP}}) = \sum \text{Ins}_{70} + \text{Ins}_{85} + \text{Ins}_{90}$$

$$1^{\text{ste}}\text{-Phase der argininstimulierten Insulinsekretion (I}_{1\text{st-phase ARG}}) = \sum \text{Ins}_{92.5} + \text{Ins}_{95}$$

$$2^{\text{te}}\text{-Phase der argininstimulierten Insulinsekretion (I}_{2\text{te-phase ARG}}) = \sum \text{Ins}_{100} + \text{Ins}_{115}$$

3.7.7 Statistische Auswertung

Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm s.e.m. angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Insulinsekretionsraten für den hyperbolen Einfluß der Insulinsensitivität korrigiert (126).

Die statistische Auswertung erfolgte bei normal verteilten Stichproben mit dem nicht gepaarten, zweiseitigen Student's t-Test und bei den nicht normal verteilten Stichproben mit dem nicht gepaarten, zweiseitigen Mann-Whitney-Test.

Zur Bestimmung von Abhängigkeiten und Vorhersagewerten wurden univariate und multiple lineare Regressionsanalysen (schrittweise), sowie Korrelationen nach Spearman berechnet. Die nicht normal verteilte Proben wurden vor den linearen Regressionsanalysen logarithmisch transformiert. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Softwarepakets SPSS für Windows, Version 10 (127). Bei $p < 0,05$ wurden Unterschiede als statistisch signifikant angesehen.