

## 5 Diskussion

Für die Charakterisierung des metabolischen Phänotyps genügt nicht alleine die Feststellung der Glukosetoleranz und die Messung der Insulinwirkung (resistent oder empfindlich), es muß auch die Insulinsekretion charakterisiert werden, da eine Störung der Insulinsekretion neben Insulinresistenz zur Entstehung eines Typ 2 Diabetes mellitus beiträgt (17, 24, 27). Hierbei sollten, wenn möglich, mehrere Qualitäten der Insulinsekretion, wie die Insulinantwort auf verschiedene Sekretagoga untersucht werden.

Für diesen Zweck wurde in der vorgelegten Studie der klassische hyperglykämische Glukoseklemmtest um eine GIP-Infusion und einen anschließenden Arginin-Bolus sowie eine Arginin-Infusion erweitert. Der Test erlaubt eine differenzierte Bestimmung der Insulin-, C-Peptid- und Proinsulin-Konzentrationen als Antwort auf Stimulation durch diese drei unterschiedlichen Sekretagoga: eine erste und zweite Phase der glukosestimulierten Insulinsekretion, eine frühere und späte Phase der GIP-induzierten Insulinsekretion sowie eine akute arginininduzierte maximale Insulinsekretion nach dem Arginin-Bolus und eine zweite Phase der arginininduzierten Insulinsekretion.

Der 3-stufige hyperglykämische Glukoseklemmtest wurde von allen Probanden gut toleriert. Eine leichte Übelkeit wurde von 3 Probanden nach dem Arginin-Bolus berichtet.

### *5.1 Korrelationen zwischen den verschiedenen Phasen der Insulinsekretion*

Die ersten und zweiten Phasen der glukoseabhängigen Insulinsekretion korrelierten hoch miteinander ( $r=0.64$ ,  $p=0.01$ ).

Die GIP-induzierte Insulinsekretion korrelierte gut mit der Arginin-induzierten Insulinsekretion und auch mit den ersten und zweiten Phasen der glukoseabhängigen Insulinsekretion ( $r=0.81$ ,  $p=0.001$  und  $r=0.76$ ,  $p=0.01$ ).

Die akute Arginin-induzierte Insulinsekretion korrelierte am besten mit der GIP-induzierten Insulinsekretion und der zweiten Phase der glukoseabhängigen Insulinsekretion ( $r=0.76$ ,  $p=0.001$  und  $r=0.77$ ,  $p=0.0005$ ) (Tabelle 4).

Dies war ähnlich wie die Ergebnisse der klinischen Studien mit Verwendung einer anderen Modifikation des hyperglykämischen Glukoseklemmtests mit GLP-1 und Arginin (63). Der unterschiedliche Grad der Korrelation zwischen verschiedenen Phasen der Insulinsekretion während des 3-stufigen, hyperglykämischen Glukoseklemmtests spricht für die unterschiedlichen Aspekte der  $\beta$ -Zellsekretion, die mit der neuen Modifikation des hyperglykämischen Glukoseklemmtests untersucht werden können. Die Sekretionsdefekte in einzelnen, nicht aber in allen Phasen des hyperglykämischen Glukoseklemmtests, können auf spezifische  $\beta$ -Zellsekretionsdefekte (sogar genetische Festlegung) hinweisen. So zeigen z.B. Personen mit Glukokinase-Mutationen (MODY 2) eine normale Insulinantwort unter einem Arginin-Bolus, aber eine reduzierte glukoseabhängige Insulinantwort (125).

## ***5.2 Einfluß der Insulinresistenz auf die verschiedenen Phasen der Insulinsekretion***

Der Insulin Resistenz Index (HOMA) war signifikant niedriger ( $p=0.00004$ ) und der in dem Glukoseklemmtest gemessene Insulin Sensitivitäts Index war signifikant höher ( $p= 0.038$ ) in der Kontrollgruppe, als in der Gruppe der erstgradig Verwandte von T2DM Patienten.

Trägt man die glukoseinduzierte Insulinsekretion gegen die Insulinsensitivität auf, so zeigt sich der bekannte hyperbolische Zusammenhang zwischen Insulinsensitivität und Insulinsekretion (123), das bedeutet, je insulinresistenter ein Proband ist, um so mehr Insulin müssen seine  $\beta$ -Zellen freisetzen. Personen, die in dieser Darstellung im linken unteren Quadranten liegen, haben ein höheres Risiko, an Diabetes mellitus zu erkranken (24). Aufgrund dessen wurde in der vorgelegten Studie ein Vergleich von Insulin Resistenz Index und verschiedenen Phasen der Insulinsekretion mittels Korrelationsanalyse unternommen.

Es ergaben sich signifikante Zusammenhänge, sogar eine Tendenz, dass Probanden mit hohem Insulinresistenz Index eine höhere Insulinsekretion aufwiesen (Tabelle 4).

Am höchsten korrelierte mit dem Insulin Resistenz Index die frühere Phase der GIP-stimulierten Insulinsekretion ( $r=0.66$ ,  $p=0.01$ ), dies weist auf die Interdependenz zwischen insulinotroper GIP-Wirkung und Insulinresistenz hin.

Die akute Arginin-induzierte Insulinsekretion war dagegen nicht korreliert mit dem Insulin Resistenz Index ( $r=0.48$ ,  $p=0.06$ ). Dies belegt die akute Arginin-induzierte

Insulinsekretion als einen stabilen und unabhängigen Parameter für die Charakterisierung der individuellen Insulinsekretion.

Die für den Einfluß der Insulinresistenz adjustierten peripheren Insulinkonzentrationen in verschiedenen Phasen des hyperglykämischen Glukoseklemmtests, zeigten keinen Unterschied unter Hyperglykämie zwischen beiden Gruppen. Dies widerspricht den Ergebnissen anderer Studien (65, 126), in denen die Inkretin-induzierte Insulinsekretion bei erstgradig Verwandten von T2DM in hyperglykämischen Glukoseklemmtest untersucht wurde. Diese Differenz könnte mit dem jungen Alter unserer Probanden verbunden sein.

Ein Vergleich von Insulin Resistenz Index und verschiedenen Phasen der C-Peptidsekretion ergab in der Korrelationsanalyse nur einen signifikanten Zusammenhang für die basalen C-Peptidkonzentrationen (Tabelle 5). Es besteht eine Tendenz, dass Probanden mit hohem Insulin Resistenz Index eine höhere basale C-Peptidsekretion aufweisen. Die basalen C-Peptidkonzentrationen waren jedoch nicht signifikant höher bei erstgradig Verwandten von T2DM ( $p=0.059$ ).

### ***5.3 Einschätzung der maximalen Insulinsekretionskapazität***

Die Bestimmung der maximalen Insulinsekretionskapazität ist für die metabolische Charakterisierung der Glukosestoffwechselstörungen von größter Bedeutung. Die Infusion von drei Secretagogen zusammen (90-120 min des Glukoseklemmtest), führte zu einer Erhöhung der peripheren Insulin- und C-Peptidkonzentrationen, welche höher als die in dem Arginin-Test erreichten maximalen Insulinkonzentrationen waren (84). Die unter drei verschiedenen Insulinsekretagoga erreichte maximale Serumkonzentrationen von Insulin und C-Peptid weisen auf die pankreatische  $\beta$ -Zell Sekretionskapazität hin. In Tierexperimenten korrelierte die maximale Insulinantwort mit der  $\beta$ -Zellmasse und dem  $\beta$ -Zell-Volumen (127).

### ***5.4 ISR in verschiedenen Phasen des hyperglykämischen Glukoseklemmtests.***

Aufgrund unterschiedlicher basaler Insulinkonzentrationen zwischen beiden Gruppen, wurde die Insulinsekretionsrate berechnet. Die basale Insulinsekretionsrate war signifikant höher in

der Gruppe der erstgradig Verwandte von T2DM ( $p=0.003$ ). Die basale ISR korrelierte signifikant positiv mit allen drei Phasen der Insulinsekretion während des hyperglykämischen Glukoseklemmtests (Tabelle 6).

Die ISR in den ersten und zweiten Phasen der glukoseabhängigen Insulinsekretion korrelierten positiv miteinander ( $r=0.66$ ,  $p=0.01$ ). Die GIP-induzierte ISR korrelierte mit der ISR in den ersten und zweiten Phasen der glukoseabhängigen Insulinsekretion ( $r=0.83$ ,  $p=0.0001$  und  $r=0.80$ ,  $p=0.0002$ ), aber es ergab sich keine Korrelationen mit der Arginin-induzierten ISR.

Die akute Arginin-induzierte ISR korrelierte nur mit der ISR in der zweiten Phase der Arginin-induzierten Insulinsekretion ( $r=0.94$ ,  $p=0.0001$ ) positiv und war unabhängig von anderen in der Korrelation eingeschlossenen Parameter wie: Alter, Geschlecht, BMI und IRI (HOMA). Dies verstärkt die Bedeutung der akuten arginininduzierten Insulinsekretion als einen stabilen und unabhängigen Parameter für die Charakterisierung der individuellen Insulinsekretionsmuster. Der fehlende Zusammenhang zwischen der Arginin-induzierten ISR und anderen Phasen der Insulinsekretion, weist auf die Möglichkeit der getrennten Phänotypisierung der individuellen Insulinsekretionsmuster im hyperglykämischen Glukoseklemmtest hin.

Die unterschiedlichen Korrelationen des ISR lassen sich durch biochemische Mechanismen der Insulinsekretion plausibel erklären. Glukose aktiviert die Insulinsekretion durch ein  $K_{ATP}$ -Kanal – abhängiges Signaling und löst einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus (141). GIP aktiviert seinen Transmembranrezeptor auf die  $\beta$ -Zelle und erhöht intrazelluläre  $c$  AMP-Spiegel. Die  $c$  AMP-abhängige Insulinsekretion verstärkt die  $Ca^{2+}$ -getriggerte Sekretion (119). Arginin dagegen depolarisiert durch seine positive Ladung die  $\beta$ -Zellmembran und wirkt demnach unabhängig von den second-messenger gesteuerten Mechanismen (142).

### ***5.5 Insulinotrope Wirkung des GIP bei erstgradig Verwandten von T2DM***

Für die weitere Einschätzung der Insulinsekretion wurde ein Quotient  $ISR_t/ISR_{bas} \cdot 100$  (%) für jeden Zeitpunkt des hyperglykämischen Glukoseklemmtests berechnet. Die signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden bei den Zeitpunkten 62.5, 65, 92.5, 95, 97.5, 100 und 115 Minuten des Glukoseklemmtests beobachtet (Abbildung 5). Dieses Ergebnis weist auf eine defektive insulinotrope Wirkung des GIP bei erstgradig Verwandten von Typ 2

Diabetikern, als auch auf eine eingeschränkte Insulinsekretionskapazität unter Infusion der drei unterschiedlichen Sekretagen zusammen hin. Einige Studien konnten bereits zeigen, dass die insulinotrope Wirkung des GIP sowohl bei Typ 2 Diabetikern (81, 82), als auch bei insulinempfindlichen erstgradig Verwandten von Typ 2 Diabetikern (65) fehlt. Dieser einheitliche, von Geschlecht, Alter und BMI unabhängige Effekt kann durch die vorliegenden Untersuchungen auch auf die Gruppe jüngere, insulinresistente erstgradig Verwandte von Typ 2 Diabetikern ausgeweitet werden.

Diese reduzierte insulinotrope Wirkung von GIP wurde in unserer Studie bei Probanden mit normaler Glukosetoleranz nachgewiesen. Es könnte vermutet werden, daß die reduzierte insulinotrope Wirkung von GIP ein früher Marker für die Prädisposition zum T2DM ist. Die reduzierte insulinotrope Wirkung von GIP wurde in unserer Studie signifikant positiv mit dem Insulinresistenz Index korreliert. Dies bedeutet, dass die GIP-stimulierte Insulinsekretion nicht adäquat für den erhöhten Bedarf an Insulin bei insulinresistenten Probanden kompensieren kann.

Die Ursache für die reduzierte insulinotrope Wirkung von GIP bei T2DM bleibt weiter ungeklärt. Es könnte ein spezifischer Defekt, z. B. ein Defekt der Expression des GIP-Rezeptors auf  $\beta$ -Zellen, sein (119). Diese Hypothese wurde durch eine Studie an diabetischen Zucker-Ratten unterstützt (120). Andererseits sind Gen-Polymorphismen in der den GIP-Rezeptor kodierenden Region oder in der Promotor-Region nicht mit häufigem Auftreten des T2DM verbunden (121, 122). Die andere Hypothese erklärt die reduzierte insulinotrope Wirkung von GIP bei T2DM durch die reduzierte biologische Aktivität des GIP bei diesen Personen (122).

### ***5.6 Veränderungen des endogenen Insulinclearance***

Die Analyse der relativen Veränderungen der Insulinsekretionsrate und der simultanen peripheren Insulinkonzentrationen spricht für eine Abnahme der Clearance von endogen sezerniertem Insulin während des Glukoseklemmtests (Abbildung 6, 7). Die endogene Insulinclearance Rate war signifikant niedriger in der Gruppe der insulinresistenten erstgradig Verwandte von T2DM in der letzten Stunde des hyperglykämischen Glukoseklemmtests ( $p=0.028$ ). Dies bekräftigt sowohl die Ergebnisse der klinischen Studien an insulinresistenten

glukosetoleranten Personen (128), als auch an insulinresistenten glukosetoleranten erstgradig Verwandten von T2DM (129).

Die prospektiven Studien an Personen aus zwei ethnischen Gruppen mit hohem Risiko der Diabetesentwicklung (mexikanische Amerikaner (130) und Afroamerikaner (131)) weisen auf eine reduzierte Insulinclearance hin. Ein Zusammenhang zwischen fettinduzierter Insulin Resistenz und reduzierter Insulinclearance wurde sowohl bei Tieren (132), als auch bei Menschen (133) beobachtet. Unter einer Gewichtsabnahme kommt es zu einer Erhöhung der Insulinclearance bei Typ 2 Diabetikern, sowie bei Personen mit IGT und NGT (134).

Der Mechanismus der reduzierten hepatischen Insulinextraktion ist weiter unklar. Die hepatische Insulinextraktion ist beeinträchtigt unter Infusion von freien Fettsäuren (135). Andererseits können Inkretine zur Reduktion der hepatischen Insulinextraktion beitragen (136, 137). Ein Vergleich des Insulin Resistenz Index und der endogenen Insulinclearance Rate in verschiedenen Phasen des hyperglykämischen Glukoseklemmtests wurde in der vorgelegten Studie durchgeführt. Es ergab sich in der Korrelationsanalyse ein signifikanter negativer Zusammenhang für die endogene Insulinclearance Rate unter GIP-Infusionen ( $r = -0.59$ ,  $p = 0.02$ ) und unter Infusion von 3 Sekretagogen zusammen (90-120 min des Glukoseklemmtests) ( $r = -0.62$ ,  $p = 0.01$ ) (Tabelle 7). Somit besteht eine Tendenz, dass Probanden mit hohem Insulinresistenz Index eine reduzierte endogene Insulinclearance Rate unter GIP- Infusion und unter Infusion von 3 Sekretagogen zusammen (90-120 min des Glukoseklemmtests) haben. Dies unterstützt, dass GIP eine wichtige Rolle für das Aufrechterhalten einer genügend hohen peripheren Insulinkonzentrationen bei insulinresistenten Personen spielt. Diese Effekte werden durch die Erhöhung der  $\beta$ -Zellsekretion und die gleichzeitige Reduktion der Insulinclearance hervorgerufen.

### ***5.7 Absolute und relative Hyperproinsulinämie***

Die peripheren Proinsulin-Konzentrationen lagen in der Gruppe der erstgradig Verwandte von T2DM in der zweiten Stunde des Glukoseklemmtests, unter der Infusion von drei Sekretagogen zusammen, signifikant höher ( $p$ -Wert = 0.03 zweiseitiger Mann-Whitney-Test). Das Verhältnis von Proinsulin zum Insulin war gleich zwischen beiden Gruppen, im Gegensatz zum Verhältnis von Proinsulin zum C-Peptid, welches signifikant höher in der

Gruppe der erstgradig Verwandte von T2DM in der letzten Stunde des hyperglykämischen Glukoseklemmtests war ( $p=0.03$ ).

Eine absolute Hyperproinsulinämie wurde bei erstgradig Verwandten von Typ 2 Diabetikern in einigen Studien beobachtet (115, 116). Die absolute und relative Hyperproinsulinämie als Antwort auf GIP- und Arginin- Stimulation wurde bei erstgradig Verwandten von Typ 2 Diabetikern bis jetzt in keiner Studie beobachtet. Die Plasmakonzentrationen des Proinsulin sind bei Patienten mit T2DM (110, 111), mit Gestationsdiabetes (112) und bei den Personen mit IGT (113, 114), deutlich erhöht. Die Ergebnisse der großen epidemiologischen Studien weisen darauf hin, dass die Proinsulinspiegel und der Quotient Proinsulin zu Insulin, eher als die Insulinspiegel mit der Konversion zum Typ 2 Diabetes mellitus korrelieren (115, 116). Als die Ursache der relativen Hyperproinsulinämie werden am häufigsten 2 Hypothesen diskutiert: entweder eine defekte enzymatische Spaltung des Proinsulins oder die gestörte Reifung der Insulingranula unter Hyperstimulation der  $\beta$ -Zelle (138, 139).

Ein Vergleich der Proinsulinantwort in verschiedenen Phasen des hyperglykämischen Glukoseklemmtests mit anderen Parametern, wie z.B. Insulin Resistenz Index, ergab in der Korrelationsanalyse einen signifikanten positiven Zusammenhang für die Proinsulinantwort unter GIP- und Arginin-Infusion ( $r=0.55$ ,  $p=0.03$ )(Tabelle 8). Diese Ergebnisse bekräftigen die Daten von Ward et al. (140), welche eine absolute und relative Hyperproinsulinämie unter Dexamethason-induzierter Insulinresistenz bei Kontrollpersonen und Typ 2 Diabetikern beobachtete. Eine weitere Korrelationsanalyse ergab einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen relativer Hyperproinsulinämie und GIP-induzierter Insulinsekretion ( $r=-0.56$ ,  $p=0.03$ ), als auch einen positiven Zusammenhang für die relative Hyperproinsulinämie und endogene Insulinclearance ( $r=0.58$ ,  $p=0.02$ ) (Tabelle 10). Die in der Studie bei den erstgradig Verwandten von Typ 2 Diabetikern beobachtete absolute und relative Hyperproinsulinämie wird am ehesten durch zwei verschiedene Mechanismen hervorgerufen: eine reduzierte Proinsulinclearance und eine defekte Insulinsekretion unter GIP-Infusion, wie auch unter Infusion der 3 Sekretagogen zusammen.

Die in der vorliegenden Studie beobachtete relative Hyperproinsulinämie bei erstgradig Verwandten von Typ 2 Diabetikern unter GIP- und Arginin-Infusion kann als ein sehr früh auftretender Marker der unzureichenden  $\beta$ -Zellkompensation für Insulinresistenz dienen.