

Aus dem
Institut für Klinische Diabetologie
des Deutschen Diabetes Zentrums
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. univ. Michael Roden

**Validierung des Botnia-Clamps zur Bestimmung des M-Wertes bei
Patienten mit Diabetes mellitus**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
vorgelegt von

Simon Piepel

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolay Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Roden

Zweitgutachter PD Dr. med. Ralf Westenfeld

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kahl S, Nowotny B, Piepel S, Nowotny PJ, Strassburger K, Herder C, Pacini G, Roden M: Estimates of insulin sensitivity from the intravenous-glucose-modified-clamp test depend on suppression of lipolysis in type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 57:2094-102, 2014

Zusammenfassung

Der Botnia-Clamp stellt eine in der Diabetesforschung verwendete Testkombination bestehend aus intravenösem Glukose-Toleranztest (IVGTT) und hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Test (HEC) zur Erfassung von Insulinsekretion und Insulinsensitivität dar. Die direkte Abfolge der beiden Testverfahren an einem Versuchstag ist ein entscheidender Vorteil gegenüber der zeitlich aufwendigeren, getrennten Durchführung, birgt jedoch die Gefahr ungewollter Einflussfaktoren auf die Messung der Insulinsensitivität. Für eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse existiert aktuell jedoch keine ausreichende Datenlage.

Die vorliegende randomisierte, offene Studie untersucht die Auswirkung des IVGTT auf den im direkten Anschluß durchgeführten HEC in Patienten (n = 19) mit Typ-2-Diabetes. Es erfolgte ein Vergleich des Botnia-Clamp mit einem Kontroll-HEC ohne vorgeschalteten IVGTT sowie die Bestimmung möglicher Einflussfaktoren (zirkulierende glukoregulatorische Hormone, freie Fettsäuren, Zytokine).

Die erbrachten Ergebnisse zeigten eine Korrelation der Insulinsensitivität (M-Wert) von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC (M-Wert_{Botnia}: 8.7 ± 0.8 mg kg [FFM]⁻¹ min⁻¹ / M-Wert_{Kontrolle}: 8.1 ± 0.57 mg kg [FFM]⁻¹ min⁻¹, CV 11.0 %, r = 0.87, p < 0.001). Im Mittel fanden sich 7 % höhere M-Werte im Botnia-Clamp, jedoch ohne einen unmittelbaren Bezug zum IVGTT (M_{Botnia} > M_{Kontrolle}: 10 Versuchsteilnehmer). Die Bestimmung der hepatischen Insulinsensitivität durch Messung der endogenen Glukoseproduktion (EGP) mittels 6,6-²H₂-Glukose lieferte übereinstimmende Werte in beiden Varianten. Vor HEC-Beginn (0. – 60. Minute) fanden sich signifikante IVGTT-induzierte Unterschiede der Plasmaspiegel von Glukose, Insulin, C-Peptid und freien Fettsäuren (FFA) in Botnia-Clamp und Kontroll-HEC. Eine Korrelation zum M-Wert ließ sich für FFA_{60.Minute} (r = -0.60, p < 0.01) und Glukose_{60.Minute} (r = 0.59, p = 0.0077) bestätigen.

Im Rahmen der Studie zeigte sich letztendlich kein signifikanter Unterschied der Insulinsensitivität (EGP, M-Wert) zwischen Botnia-Clamp und Kontroll-HEC; allerdings war ein Bezug von Glukose und FFA auf den M-Wert nachweisbar, welcher unter veränderten Versuchsbedingungen von Bedeutung sein könnte.

Abkürzungsverzeichnis

T1D	Diabetes mellitus Typ 1
T2D	Diabetes mellitus Typ 2
LADA	<i>Latent autoimmune diabetes of the adult</i>
NGT	normale Glukosetoleranz
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
IVGTT	intravenöser Glukosetoleranztest
HEC	Hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp
EGP	endogene Glukoseproduktion
ΔEGP	Reduktion der endogene Glukoseproduktion
FFA	<i>Free fatty acids</i> , freie Fettsäuren
TAG	Triacylglyceride
BG	Blutglukose
OAD	orale Antidiabetika
WHO	<i>World health organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
IR	Insulinresistenz
IGT	<i>Impaired glucose tolerance</i> , gestörte Glukose-Toleranz
NPG	Nüchternplasmaglukose
HWZ	(Plasma-) Halbwertszeit
ZNS	zentrales Nervensystem
AKT	Proteinkinase B

PKC	Proteinkinase C
AIR	<i>Acute insulin response</i> , Akute Insulinantwort
ACPR	<i>Acute C-peptide response</i> , Akute C-Peptid-Antwort
AUC	<i>Area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
GIR	Glukoseinfusionsrate
FFM	<i>Fat free mass</i> , Magermasse
BMI	<i>Body mass index</i>
SOP	<i>Standard operating procedure</i> , Standardisierte Durchführungs-Vorschrift
NaCl	Natriumchlorid
BIA	Bioimpedanzanalyse
d2	deuterierte Glukose (6,6- ² H ₂ -Glukose)
VWK	Venenverweilkanüle
REE	<i>Resting energy expenditure</i> , Ruheenergieumsatz
RQ	respiratorischer Quotient
LOX	Lipidoxidation
GOX	Glukoseoxidation
APE	<i>Atom percent Enrichment</i> , Atom-Prozent Anreicherung
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
SA	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
CV	<i>Coefficient of variation</i> , Variationskoeffizient
min	Minute

h	Stunde
l	Liter (Milli- (ml))
mol	Mol (Milli- (mmol), Mikro- (μ mol), Nano- (nmol), Pico- (pmol))
g	Gramm (Milli- (mg), Mikro- (μ g))

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes Mellitus (DM)	2
1.1.1	Epidemiologische Aspekte	4
1.1.2	Typ-2-Diabetes mellitus (T2D).....	4
1.1.3	T2D: Symptome und Diagnosekriterien.....	5
1.1.4	T2D: Therapie.....	8
1.2	Insulin	9
1.2.1	Molekül und natürliches Vorkommen.....	9
1.2.2	Physiologischer Regelkreis der Insulinsekretion.....	10
1.3	β -Zell-Dysfunktion.....	11
1.4	Insulinresistenz (IR).....	12
1.4.1	Zelluläre Mechanismen der IR.....	14
1.5	Botnia-Clamp	15
1.5.1	Intravenöser Glukose Toleranz Test (IVGTT).....	15
1.5.2	Hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp (HEC)	16
1.6	Ziele der Arbeit	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Fallzahlkalkulation / Power	20
2.2	Studienkollektiv.....	20
2.3	Studienablauf.....	21
2.4	Versuchsvorbereitung.....	22
2.5	Versuchstag.....	22
2.5.1	Voruntersuchungen	23
2.5.2	Anreicherung von 6,6- ² H ₂ -Glukose.....	24
2.5.3	Glukose-Bolus (Botnia-Clamp) / NaCl-Bolus (Kontroll-HEC).....	25
2.5.4	Clamp	27
2.5.5	Versuchsende.....	28
2.6	Abbruchkriterien und Fehlerquellen.....	29
2.7	Blutentnahmen und Laborparameter	29
2.8	Bestimmung der endogenen Glukoseproduktion (EGP) mittels 6,6- ² H ₂ - Glukose.....	31

2.9	Indirekte Kalorimetrie (IC).....	32
2.10	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	34
4	Diskussion.....	50
4.1	Einordnung der Studienergebnisse anhand der bestehenden Literatur....	51
4.2	Auswirkungen des IVGTT auf den M-Wert	54
4.3	Einfluss des IVGTT auf Stoffwechselfparameter und Hormone.....	58
4.3.1	Einfluss von Insulin auf den M-Wert	58
4.3.2	Einfluss von Glukose auf den M-Wert	58
4.3.3	Einfluss von FFA auf den M-Wert.....	59
4.3.4	Auswirkungen des IVGTT auf den Energiestoffwechsel im HEC.....	60
4.4	Auswirkung des IVGTT auf die EGP / EGP-Suppression im HEC.....	61
4.5	Glukagon, Cortisol und Entzündungsparameter	63
5	Schlussfolgerung.....	65
6	Quellenverzeichnis	68
7	Anhang.....	79
7.1	Infusionsvorschrift.....	79
7.2	Blutentnahmeschema: CLAVA mit IVGTT (Botnia-Clamp)	80
7.3	Blutentnahmeschema: CLAVA ohne IVGTT (Kontrollvariante).....	81
7.4	Probenverarbeitung	82

1 Einleitung

Der im Rahmen dieser Studie untersuchte Botnia-Clamp entspricht der Kombination aus einem intravenösem Glukose Toleranz Test (IVGTT) und einem hyperinsulinämisch-euglykämischem Clamp (HEC) [1,2]. Gemeinsam ermöglichen sie eine Aussage über die Funktion der Insulin-produzierenden β -Zellen sowie der Insulinsensitivität peripherer Gewebe [3, 4, 5]. Im Regelfall erfolgt die Durchführung der beiden Verfahren in direkter Abfolge an einem Tag. Fraglich ist hierbei, inwieweit dieser Versuchsaufbau eine Beeinflussung der Ergebnisse des zuletzt durchgeführten HEC verursacht. Drei zuvor veröffentlichte Studien [6, 7, 8] näherten sich dieser Fragestellung bereits an, lieferten allerdings keine aussagekräftigen Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen des IVGTT auf den M-Wert bei Patienten mit Typ-2-Diabetes (T2D). Unbeachtet blieb zudem die mögliche Einflussnahme des IVGTT auf die Plasmaspiegel von Glukagon, Cortisol, freien Fettsäuren (FFA), Insulin, C-Peptid, Zytokine, den Energiestoffwechsel sowie die endogene Glukoseproduktion, welche im Rahmen der vorliegenden Studie näher untersucht wurde.

1.1 Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes mellitus (umgangssprachlich: Zuckerkrankheit) bezeichnet eine Störung des Glukosestoffwechsels, wobei verschiedene Typen der Erkrankung mit unterschiedlicher Ätiologie existieren. Die Namensgebung erfolgte durch Thomas Willis, der bereits im 17. Jahrhundert die Namen zweier Hauptsymptome zusammenfügte. Er beobachtete die gesteigerte Produktion von Urin (*diabetes*) mit süßlichem Geschmack (*mellitus*).

Die Entstehung des DM beruht auf einer Dysregulation der Glukosehomöostase, welche einen Anstieg der Blutglukose (BG) zur Folge hat. Verantwortlich hierfür kann eine eingeschränkte Produktion von Insulin und / oder eine gestörte Wirkung des Hormons am Erfolgsorgan sein. Eine Übersicht der möglichen Ursachen, sowie der jeweiligen Krankheitsformen ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Der Typ-1-Diabetes (T1D) gilt als eine autoimmunologisch verursachte Erkrankung, bei der Auto-Antikörper meist bereits im Kindesalter zur Manifestation diabetischer Symptome führen. Beim T1D handelt es sich um einen absoluten Insulinmangel, der eine sofortige Insulinsubstitution notwendig macht [9]. Die häufigste Form (~90%) stellt der T2D dar, welcher zu den erworbenen Erkrankungsformen mit einer ausgeprägten genetischen Komponente zählt. Der T2D weist eine hohe Prävalenz im Alter auf, allerdings erkranken zunehmend auch jüngere Patienten. Er basiert auf einem relativen Insulinmangel und ermöglicht eine ausreichende Kontrolle des Glukosestoffwechsels durch konsequente Lebensstiländerung und orale Antidiabetika. Bei einem Teil der zunächst mit T2D-diagnostizierten Patienten lassen sich ebenfalls Diabetes-auslösende Auto-Antikörper nachweisen. Trotz dieser autoimmunologischen Komponente erreichen die Patienten oftmals eine gute Einstellung der BG ohne Substitution von Insulin für drei bis sechs Monate. Entsprechend dieser kurz beschriebenen Eigenschaften erfolgt die Bezeichnung dieses Patientenkollektivs als *Latent autoimmune diabetes in adults* (LADA) [10], welcher dem T1D zugeordnet wird.

Eine weitere Erkrankungsform stellt der Gestationsdiabetes (3% aller Schwangeren) dar, welcher sich typischer Weise zwischen der 24. und 28. Schwangerschaftswoche manifestiert. Postpartal ist häufig eine Rückbildung der Symptomatik zu beobachten. Die betroffenen Mütter neigen jedoch zur erneuten

Manifestation im Rahmen von Folgeschwangerschaften. Im weiteren Lebensverlauf weisen sie ein kumulatives Risiko zur Entwicklung eines T2D mit einer Inzidenz von annähernd 60 % nach zehn Jahren (post partum) auf [11].

<p>Autoimmunologisch</p> <ul style="list-style-type: none"> • Typ-1-Diabetes mellitus (T1D) • <i>Latent autoimmune diabetes in adults</i> (LADA)
<p>Erworben (mit genetischer Komponente)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Typ-2-Diabetes mellitus (T2D) • Gestationsdiabetes
<p>Selten</p> <ul style="list-style-type: none"> • Genetisch (β-Zell-Funktion) Chromosomale-DNA Störung (\rightarrow <i>Maturity onset Diabetes of the Young</i> (MODY)), Mitochondriale-DNA – Störung, etc. • Genetisch (Insulinresistenz) Typ A Insulinresistenz, Rabson-Mendenhall Syndrom, etc. • Genetische Syndrome Down-Syndrom, Klinefelter Syndrom, Turner Syndrom, Porphyrie, Chorea Huntington, Prader-Willi Syndrom, Friedreich Ataxie, Myotone Dystrophie, etc. • Medikamenten-induziert Glukokortikoide, Thiazide, L-Thyroxin, Kontrazeptiva, α/β-adrenerge Agonisten, Interferon-α, Dilantin, etc. • Infektionen Kongenitale Röteln, Cytomegalie-Virus, etc. • Endokrinopathien Akromegalie, Phäochromozytom, Cushing-Syndrom, Hyperthyreose, Somatostatinom, Glukagonom, Aldosteronom, etc. • Pathologien des exokrinen Pankreas Chronische Pankreatitis, Mukoviszidose, Hämochromatose, Neoplasien, Trauma, etc.

Tabelle 1: Ätiologische Einteilung des DM modifiziert nach [12]

1.1.1 Epidemiologische Aspekte

Der DM ist die häufigste metabolisch-endokrinologische Erkrankung der Welt mit rasant steigender Prävalenz und Mortalität. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) und Danaei et al lag die ungefähre Anzahl von Patienten mit DM im Jahre 1980 noch bei geschätzten 153 Millionen Personen weltweit [11, 13]. Für das Jahr 2010 gingen Forscher zunächst von 285 Millionen Erkrankten aus [14], jedoch korrigierte die WHO unter Berücksichtigung nachträglich eingetroffener Daten die Anzahl von an DM erkrankten Patienten für das Jahr 2008 auf mehr als 347 Millionen Betroffene weltweit [15]. Bis zum Jahr 2030 wird ein weiterer Anstieg der Prävalenz auf 439 Millionen [14] beziehungsweise 552 Millionen [16] in neueren Veröffentlichungen erwartet. Gleichzeitig wurde für 2011 eine Krankheits-assoziierte Mortalität von mehr als 3.4 Millionen Todesopfern vermutet, die sich voraussichtlich bis zum Jahr 2030 verdoppeln wird [15].

Im Gesundheitsbericht von 2011 wurde berichtet, dass in Deutschland ca 8 Millionen Bundesbürger (10% der Gesamtbevölkerung) an DM leiden [17]. Laut CoDiM-Studie ergaben sich für das deutsche Gesundheitssystem DM-assoziierte Kosten von 36 Milliarden Euro im Jahr 2000 [18].

1.1.2 Typ-2-Diabetes mellitus (T2D)

Der T2D weist einen engen Zusammenhang zum Bruttoinlandsprodukt pro Kopf einer Gesellschaft auf und ist fast ausschließlich für die rasante Zunahme der weltweiten DM-Prävalenz verantwortlich. Die Ausprägung eines T2D weist eine ausgeprägte hereditäre Komponente auf, wobei Alter, männliches Geschlecht und das metabolische Syndrom wichtige Risikofaktoren darstellen [19]. Das metabolische Syndrom ist charakterisiert durch Insulinresistenz (IR), abdominelle Adipositas, Dyslipidämie sowie Hypertonie. Die aktuell verwendete Definition (Tabelle 2) der *International Diabetes Federation* beruht auf der Arbeit von Alberti et al aus dem Jahr 2005 [19]. Bei Frauen zeigte sich zudem ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines T2D bei einem amnestischen Gestationsdiabetes oder Polyzystischen Ovarialsyndrom [20].

Voraussetzung:	<ul style="list-style-type: none"> • Stammbetonte Adipositas <p>ODER</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bauchumfang (Bevölkerungs-spezifisch)
PLUS zwei weitere Faktoren:	<ul style="list-style-type: none"> • arterielle Hypertonie • Hypertriglyzeridämie • niedriges HDL-Cholesterin • erhöhte Nüchternplasmaglukose

Tabelle 2: WHO-Definition des Metabolischen Syndroms modifiziert nach [19] HDL, *High-density lipoprotein*

Als gesicherte Veränderungen, welche sich letztendlich bei allen Patienten nachweisen lassen, gelten eine Störung der Insulinsekretion der β -Zellen im Pankreas sowie die Resistenz Insulin-sensitiver Gewebe gegenüber Insulin [21, 22].

Untersuchungen der longitudinalen Whitehall II Kohorte zeigten, dass eine rasche Verschlechterung von Insulinsensitivität und β -Zell-Funktion während der letzten 5 bzw. 4 Jahre vor Diagnosestellung einsetzt. Es bestehen jedoch Hinweise, dass insbesondere die Insulinsensitivität bereits zuvor eine langsame Verschlechterung über mehrere Jahre aufweist [23].

1.1.3 T2D: Symptome und Diagnosekriterien

In frühen Krankheitsstadien kommt es zu einer allmählichen Verschlechterung von Insulinsensitivität und β -Zell-Funktion [22], welche zunächst asymptomatisch verläuft. In Anfangsstadien kann mittels konsequenter Lebensstiländerung (Ernährung, Bewegung, Gewichtsreduktion ...) noch eine Rückkehr der BG in den Normbereich erzielt werden. Ohne frühzeitige Intervention fallen die Patienten bei Krankheitsprogredienz klinisch zumeist mit unspezifischen Symptomen (Leistungsminderung, Müdigkeit, Polyurie, Polydipsie) auf (Tabelle 3).

Oftmals bestehen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jedoch bereits Komplikationen des T2D auf Grund der langjährigen Schädigung von Blutgefäßen und Organen (Tabelle 4). Bei einem weit fortgeschrittenen, nicht diagnostizierten T2D kann zu akuten, potenziell lebensbedrohlichen Notfällen im Rahmen eines hyperosmolaren oder ketoazidotischen Kommas kommen. Als Auslöser gelten

Situationen mit akuter Steigerung des Insulinbedarfs (Infektionen, Herzinfarkt, Traumata, Schwangerschaften). Neben der namensgebenden Bewusstseinsintrübung imponieren Volumenmangel-Schock, akutes Nierenversagen, peritoneale Reizerscheinungen, Magen-Darm-Atonie und Magenüberblähung [24].

Entscheidend für den weiteren Krankheitsverlauf ist das Auftreten von Mikro- und Makroangiopathien, welche im Rahmen des DM vor allem durch langanhaltende Hyperglykämie und Hyperinsulinämie verursacht werden [25]. Bei der diabetischen Makroangiopathie handelt es sich um eine Gefäßerkrankung mit Schädigung des Endothels und Ausbildung von Plaques, welche einer früh einsetzenden Arteriosklerose mit protrahiertem Verlauf ähnelt [26]. Im Gegensatz hierzu stellt die diabetische Mikroangiopathie eine Erkrankung der kleinen Gefäße und Kapillaren dar, wobei eine gestörte Permeabilität von Makromolekülen, eine Proliferation der Kapillarwand sowie eine Verdickung der Basalmembran entscheidende Faktoren der Pathogenese darstellen [20, 27]. Diese Veränderungen resultieren in Störungen des kapillaren Stoffaustausches bis hin zur kompletten Obstruktion des betroffenen Gefäßes.

Eine Beteiligung kardialer Gefäße kann zu Ischämie und Infarzierung des Herzmuskels führen, welches die häufigste Todesursache von Patienten mit T2D darstellt [10, 11, 17]. Im Rahmen des T2D treten bei hämodynamischer Stabilität zudem klinisch unauffällige Verläufe kardialer Ischämien („stumme“ Herzinfarkte) auf. Als Ursache hierfür gilt eine autonome Neuropathie, welche eine Dysfunktion sympathischer Afferenzen zur Schmerzwahrnehmung des Herzmuskels beschreibt [28].

Nach langjährigem Krankheitsverlauf ist zudem der Übergang in einen absoluten Insulinmangel möglich, der ähnlich dem T1D eine Insulinsubstitution erfordert [24].

Akute Symptome	
<ul style="list-style-type: none"> • Polydipsie • Polyurie, Nykturie (+/- Glukosurie) • Hungergefühl • Mundtrockenheit • Immunschwäche (rezidivierende Infektionen) • Kopfschmerzen • Gastrointestinale Krämpfe 	<ul style="list-style-type: none"> • Wadenkrämpfe • Plötzlicher Gewichtsverlust • Leistungsminderung • Müdigkeit • Sehstörungen • Langsame Wundheilung • Juckreiz • Rubeosis diabetica • Necrobiosis diabetica

Tabelle 3: Akute Symptome des DM modifiziert nach [11, 24]

Komplikationen	
<p>Makroangiopathie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Koronare Herzkrankheit (KHK) • Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) • Ischämischer Hirninfarkt • Diabetisches Fußsyndrom <p>Mikroangiopathie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diabetische Nephropathie • Diabetische Retinopathie • Diabetische Polyneuropathie • Diabetisches Fußsyndrom 	<p>Fettleber</p> <p>Lipidstoffwechselstörung</p> <p>Diabetische Kardiomyopathie</p> <p>Hyporeninämischer Hypoaldosteronismus</p>

Tabelle 4: Komplikationen des DM modifiziert nach [11, 24]

Die Diagnosestellung des DM kann anhand verschiedener Kriterien erfolgen (Tabelle 5). Seit Oktober 2011 wurde die Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft um die Aufnahme des HbA1c-Wertes als Diagnosekriterium erweitert, welches in Übereinstimmung mit WHO und *American Diabetes Association* (ADA) erfolgte [20, 29].

Für die klinische Praxis empfehlen Kerner et al. [29] zunächst die Bestimmung des HbA1c, wobei die Diagnosestellung bei einem HbA1c > 6.5 % erfolgt. Im Grenzbereich von 5.7 bis 6.5 % sollte zusätzlich ein OGTT oder eine Bestimmung der NPG durchgeführt werden. Befinden sich die Patienten weiterhin im

Grenzbereich so ist eine Lebensstiländerung und der Abbau von Risikofaktoren zu empfehlen, in deren Folge sich eine erneute Diagnostik nach spätestens einem Jahr anschließt. Alle erhobenen Parameter sollten darüber hinaus im Rahmen einer zweiten Bestimmung innerhalb von drei Monaten bestätigt werden.

	HbA1c- Bestimmung	NPG	OGTT (Gabe von 75 g Glukose)	Gelegenheits BG + Symptome
Physiologisch	< 5.7 %	< 100 mg dl ⁻¹ (< 5.5 mmol l ⁻¹)	2 h-Wert: < 140 mg dl ⁻¹ (< 7.8 mmol l ⁻¹)	
Grenzbereich	5.7 – 6.5%	100-125 mg dl ⁻¹ (5.5 – 6.9 mmol l ⁻¹) <i>Impaired fasting glucose</i> (IFG)	2 h-Wert: 140 – 199 mg dl ⁻¹ (7.8 – 11.0 mmol l ⁻¹) <i>Impaired glucose tolerance</i> (IGT)	
Diabetes	≥ 6.5 %	≥ 126 mg dl ⁻¹ (7.0 mmol l ⁻¹)	2 h-Wert: ≥ 200 mg dl ⁻¹ (11.1 mmol l ⁻¹)	≥ 200 mg dl ⁻¹ (11.1 mmol l ⁻¹)

Tabelle 5: Diagnosekriterien des Typ-2-Diabetes modifiziert nach [20, 29]; nüchtern Plasmaglukose (NPG), oraler Glukosetoleranztest (OGTT), Millimol (mmol), Milligramm (mg), Liter (l), Deziliter (dl)

1.1.4 T2D: Therapie

Die Heilung des DM ist nicht möglich, sodass Prävention und frühzeitige Intervention bei Risikopatienten im Vordergrund stehen. Die Grundlage einer jeden Therapie besteht aus einer konsequenten Lebensstiländerung, wobei eine ausreichende *Compliance* der Patienten als Voraussetzung gilt. Die Maßnahmen umfassen eine Umstellung der Ernährung, körperliche Bewegung sowie den Abbau von Risikofaktoren (Rauchen, Alkohol, Adipositas). In Anfangsstadien der Erkrankung können diese Maßnahmen ausreichen, um Symptome und Progression der T2D einzuschränken. Bei unzureichendem Erfolg der

Lebensstiländerung stehen zusätzlich verschiedene orale Antidiabetika (OAD) zur Verfügung. Ist auch durch Kombination verschiedener OAD keine ausreichende Kontrolle des Glukosestoffwechsels möglich, gilt eine Therapie mit exogenem Insulin als indiziert [30].

1.2 Insulin

Beim Insulin handelt es sich um ein zentrales Hormon der Glukosehomöostase, dessen fehlende Produktion und periphere Wirkung hauptverantwortlich für die Entstehung des DM sind. Das anabole Hormon stammt aus dem endokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), welcher erstmals vom deutschen Pathologen Paul Langerhans im Jahre 1869 als „inselartige“ Zellhaufen identifiziert wurde. Die Funktion dieser im Pankreas disseminiert vorkommenden Zellinseln blieb jedoch bis ins 20. Jahrhundert unbekannt. Der lateinischen Übersetzung *Insula* verdankt das erstmals um 1920 isolierte Hormon seine Namensgebung. Es wurde 1923 erstmals zur Therapie des DM eingesetzt.

1.2.1 Molekül und natürliches Vorkommen

Das menschliche Insulin stammt aus den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln und wird ins portalvenöse Blut abgegeben. Es handelt sich um ein 5.8 kDa großes Proteohormon bestehend aus zwei Peptidketten (A/B Kette) mit insgesamt 51 Aminosäuren [31].

Nach erfolgter Proteinbiosynthese wird das Hormon intrazellulär in so genannten β -Granula gespeichert. In diesen Vesikeln befinden sich Insulin-Hexamere in Form von kondensierten Zinkkomplexen, die kurz vor Sekretion wieder in die einzelnen Monomere zerfallen. Das so gespeicherte Insulin umfasst den durchschnittlichen, zehntägigen Bedarf einer gesunden Versuchsperson [32, 33].

Eine detaillierte Beschreibung des Regelkreises, der zu Sekretion des Hormons führt, ist in dem folgenden Abschnitt 1.2.2 zusammengefasst. Nach Freisetzung besitzt Insulin eine Plasma-Halbwertszeit (HWZ) von ungefähr 7 bis 15 Minuten. Ursache hierfür ist ein ausgeprägter First-Pass Effekt (~50%) der Leber sowie ein

rascher enzymatischer Abbau in den Erfolgsorganen, welches eine exponentiell verlaufende Elimination zur Folge hat [33]. Die Veränderungen zellulären Prozesse durch Insulin können hingegen länger anhalten [34, 35].

Synchron mit den Insulinmolekülen werden zudem äquimolare Mengen des C-Peptids, welches als Nebenprodukt bei der Proteinbiosynthese anfällt, produziert, gespeichert und letztendlich sezerniert. Im Gegensatz zum Insulin unterliegt das C-Peptid einer geringen First-Pass-Elimination und weist einen linearen Abbau auf. Die dementsprechend längere HWZ ermöglicht einen Rückschluss auf die Insulinsekretion mit Hilfe mathematischer Berechnungen [36].

1.2.2 Physiologischer Regelkreis der Insulinsekretion

Die Bedeutung von Insulin für den Organismus beruht auf seiner entscheidenden Rolle im Rahmen der Glukosehomöostase, wo es eine schnelle Anpassung des Organismus an wechselnde Stoffwechselbedingungen ermöglicht. Die β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas gelten als Produktionsort des Insulins im menschlichen Körper. Ihre Funktion besteht neben der Produktion und Speicherung von Insulin vor allem in der kontinuierlichen, bedarfsorientierten Sekretion des Hormons zur Aufrechterhaltung der Normoglykämie. Nach Nahrungsaufnahme kommt es binnen wenigen Minuten zur verstärkten Freisetzung des gespeicherten Insulins aus den β -Granula (Vesikeln) der β -Zellen [33]. Als physiologische Reaktion auf einen plötzlichen Anstieg der BG zeigt sich eine biphasische Insulinantwort bestehend aus einer Akut- (*acute insulin response*) und einer Spätphase (*second phase*). Entscheidend für eine physiologische β -Zell-Funktion ist neben den absolut erreichten Insulinplasmaspiegeln vor allem der Verlauf der Insulinplasmaspiegel nach der Nahrungsaufnahme. Experimentell lassen sich die Veränderungen der Insulinsekretion in verschiedenen Belastungstests (*standard meal test*, OGTT, IVGTT) beobachten [2].

Neben Glukose unterliegt die β -Zelle der Regulation durch neuronale Signale, Nahrungsbestandteile (z.B. Arginin, Lipide), Hormone (GIP, GLP-1, Glukagon, Adrenalin, Cortisol, Somatostatin) und Medikamente (z.B. Sulfonylharnstoffe) [33, 37, 38, 39]. Insbesondere die Inkretine (GLP-1, GIP), welche in der

Dünndarmmukose produziert werden, bewirken bei Nahrungsaufnahme eine Modifikation der Insulinantwort [40, 41].

Das Ziel der komplexen β -Zell-Antwort besteht in einer exakten Justierung des Insulinspiegels zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung einer Normoglykämie innerhalb enger Grenzen. Von besonderer Bedeutung ist zudem die Anpassung der Insulinsekretion an verschiedene Situationen mit einem gesteigerten (z.B. Nahrungsaufnahme, Infektionen, Operationen, Schwangerschaften, schwerste Erkrankungen, Hyperthyreose) oder verminderten (z.B. Sport) Bedarf.

Auf der Zelloberfläche finden sich je nach Gewebe verschiedene Isotypen der Insulinrezeptoren sowie Insulin-sensitive Glukosetransporter. Intrazellulär erfolgt die Aktivierung einer Signalkaskade [22, 42], wodurch eine (I) Stimulation der de-novo Synthese von Speichersubstanzen (Glykogen, Triacylglyceride (TAG)), (II) Hemmung von Lipolyse / β -Oxidation, Proteolyse, Glukoneogenese sowie die (III) Förderung des Zellwachstums ausgelöst werden [42, 43]. Trotz des Vorkommens von Insulinrezeptoren auf der Oberfläche diverser Gewebe gelten Muskulatur, Leber, Fettgewebe und Gehirn als wichtigste Erfolgsorgane des Hormons [22].

1.3 β -Zell-Dysfunktion

Die β -Zell-Dysfunktion beschreibt das Abweichen der β -Zellen von ihrem physiologischen Sekretionsverhalten und stellt gemeinsam mit der IR eine frühzeitige Veränderung in der Pathogenese des T2D dar [44]. Erste Anzeichen einer Dysfunktion spiegeln sich in einer reduzierten oder fehlenden Akutphase der Insulinantwort, einem verspäteten Erreichen des maximalen Insulinspiegels sowie einer lang anhaltenden Hyperinsulinämie wieder [2, 45, 46]. Bezogen auf den Glukosestoffwechsel bedeutet dies eine länger anhaltende postprandiale Hyperglykämie auf Grund der reduzierten sowie verspäteten Antwort der β -Zellen. Bei einer stärker ausgeprägten Dysfunktion treten zudem Störungen der Spätphase auf [47]. Die Feststellung einer β -Zell-Dysfunktion kann mit Hilfe eines IVGTT erfolgen, bei dem die Reaktion auf einen intravenös applizierten Glukosebolus ausgewertet wird [2, 46].

Zur Entstehung der Dysfunktion trägt neben der Hyperglykämie (Glukotoxizität) auch eine Dyslipidämie (Lipotoxizität) [48, 49] bei. Weitere Einflussfaktoren sind genetische Faktoren [50], subklinische Entzündungsprozesse (low-grade inflammation) sowie oxidativer und endoplasmatischer Stress [51, 52]. In der Folge treten neben einer verminderten Insulinsynthese auch eine vermehrte β -Zell Apoptose sowie eine verminderte β -Zell Proliferation auf [44, 53], wobei die Einschränkung der Insulinsynthese gegenüber einer Reduktion der Anzahl von β -Zellen führend ist [54].

1.4 Insulinresistenz (IR)

Bei der IR handelt es sich um eine Abnahme der Insulinsensitivität, welche sich insbesondere an den besonders insulinsensitiven Geweben (Muskulatur, Leber, Fettgewebe, Gehirn) manifestiert. Im betroffenen Gewebe spiegelt sich die IR in einer Reduktion der physiologischen Zellantwort auf Insulin wider, welche bereits mehrere Jahre vor Manifestation von Symptomen des DM auftritt. Eine besonders rasche Progredienz der IR ist im Verlauf der letzten 5 Jahre vor Diagnosestellung zu beobachten [23].

Der Skelettmuskel stellt einen wichtigen Glykogenspeicher des Körpers dar und ist gemeinsam mit der Leber für den Großteil (Skelettmuskel ~ 66 %, Leber ~ 25 %) des postprandialen Glukoseumsatzes verantwortlich [55, 56]. Eine IR des Skelettmuskels spiegelt sich dementsprechend in einer Reduktion des Insulinvermittelten Glukoseumsatzes wieder [57], welche sich jedoch zunächst durch einen Anstieg der basalen beziehungsweise postprandialen Insulinspiegel kompensieren lässt [58, 59]. Der HEC (siehe 1.5.2) gilt als Goldstandard zur Messung der Insulinsensitivität mittels Glukoseumsatzes unter standardisierter Hyperinsulinämie. Unter HEC Bedingungen ist der Skelettmuskel annähernd für die gesamte Glukoseaufnahme verantwortlich [2]. Patienten mit T2D weisen im HEC eine deutliche (~ 50%) Reduktion des Glukoseumsatzes gegenüber glukosetoleranten Probanden auf [57].

In der Leber beeinflusst Insulin neben der postprandialen Glukoseaufnahme (~25%) [55, 56, 60] vor allem die endogene Glukoseproduktion (EGP), welche zu

95 % in der Leber ($EGP_{\text{Niere}} \sim 5 \%$) stattfindet [2]. Die Insulin-vermittelte Hemmung der EGP beruht auf einer Reduktion von Glykogenolyse und Glukoneogenese [61]. Unter Nahrungskarenz führen reduzierte Insulinspiegel hingegen zu einer Steigerung der EGP zur Aufrechterhaltung einer Normoglykämie im Blutplasma. Patienten mit T2D weisen eine erhöhte EGP bei Nahrungskarenz ($\sim 10 - 25\%$) auf, welche vor allem auf eine Steigerung der Glukoneogenese zurückzuführen ist [62, 63, 64]. Nach Nahrungsaufnahme ist bei Patienten mit T2D eine fehlende / verzögerte Reduktion der EGP sowie eine verminderte Akkumulation von Glykogen in den Hepatozyten zu beobachten [65]. Das Fettgewebe zählt ebenfalls zu den Insulin-sensitiven Organen, wobei das Hormon – neben der postprandialen Aufnahme von Glukose ($\sim 5\%$ des Gesamtumsatzes) – den Aufbau und die Stabilisierung intrazellulärer TAG vermittelt [66, 67]. Die Ausprägung einer IR des Fettgewebes trägt zu erhöhten Plasmaspiegeln von Glukose und FFA bei [66, 68]. Darüber hinaus beteiligt sich das Fettgewebe bei IR mittels Sekretion von Adipokininen und Stimulation eingewanderter Makrophagen an der T2D-typischen Entzündungsreaktion [69, 70, 71, 72].

Das ZNS weist ebenfalls eine große Anzahl von Insulinrezeptoren sowie Insulin-sensitiven Glukosetransportern (GLUT) in verschiedenen Arealen (Hypothalamus, Hippocampus, Großhirnrinde, Kleinhirnrinde) auf [73, 74]. Auswirkungen von Insulin auf den zerebralen Glukosestoffwechsel fanden sich im Appetit und Belohnungszentrum, jedoch nicht in anderen Arealen mit hoher Dichte von Insulinrezeptoren und GLUT [75, 76]. Als Reaktion auf eine Hyperglykämie konnte bei glukosetoleranten Probanden eine Abnahme der neuronalen Aktivität des Hypothalamus nachgewiesen werden, welche bei Patienten mit T2D deutlich eingeschränkt ist [77]. Die Großhirnrinde zeigte bei Hyperinsulinämie im Rahmen eines HEC hingegen eine reduzierte Aktivität bei adipösen Probanden gegenüber Probanden mit Normalgewicht [78]. Die IR des ZNS resultiert somit vor allem in einer Störung der physiologischen, neuronalen Aktivität [74]. Im Tiermodell konnte für alle peripheren, insulinsensitiven Organe (Skelettmuskel, Leber, Fettgewebe) eine Veränderung der Stoffwechseleigenschaften durch Signale aus dem ZNS nachgewiesen werden [79]. Auf Grund seiner zentralen regulatorischen Aufgaben

betrachten manche Autoren das ZNS als entscheidenden Ausgangspunkt der IR des menschlichen Körpers [80].

1.4.1 Zelluläre Mechanismen der IR

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der IR spielt die intrazelluläre Akkumulation von Lipiden und ihren Metaboliten (Diacylglycerole, Ceramide) in der Folge chronisch erhöhter FFA-Plasmaspiegel [22]. Als Quelle der FFA gelten wiederum eine lipidreiche Ernährung, eine periphere Lipolyse sowie eine hepatische de-novo Lipogenese [81].

Im Tiermodell konnte eine Aktivierung verschiedener Isotypen der Proteinkinase C (PKC) durch intrazelluläre Lipide, Diacylglycerole, nachgewiesen werden, welche eine Störung der intrazellulären Signalkaskade durch Serin-Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrates (IRS) verursachen [82]. Die Aktivität der Proteinkinase B (AKT) wird hierdurch eingeschränkt [83] in deren Folge 1) eine Reduktion der Translokation des GLUT4-Transporters, 2) eine Reduktion der Glykogensynthese sowie 3) eine Steigerung der EGP auftritt [84, 85, 86]. Zhou et al [87] zeigten zudem eine direkte Inhibition der AKT – ohne vorherige Veränderungen der Proteinkinase B – durch andere intrazelluläre Lipide, die Ceramide.

Darüber hinaus verursachen hohe FFA-Plasmaspiegel eine Stimulation entzündlicher Signalwege. Im Mittelpunkt stehen die FFA-induzierte Aktivierung des Membran-gebundenen *Toll-like-receptor* (TLR) und die Aktivierung der PKC durch die intrazelluläre Akkumulation von Lipiden. In beiden Fällen ist eine Aktivierung des *Inhibitor of NF-kappa-B* (IKKB) sowie des *c-JUN NH₂-terminal kinase* (JNK) nachweisbar [22, 88].

Zudem konnten Störungen der mitochondrialen Funktion bei Patienten mit T2D beobachtet werden, welche sich vor allem in einem fehlenden Anstieg der ATP Synthese bei Stimulation durch hohe Insulin- und Glukose-Plasmaspiegel darstellte [89]. Mögliche Ursachen dieser reduzierten Syntheserate bestehen in einer 1) verringerten Anzahl von Mitochondrien, 2) einer reduzierten Kapazität zur oxidativen Phosphorylierung, 3) einer Störung der mitochondrialen Anpassung an

veränderte Stoffwechselbedingungen (*mitochondrial plasticity*) und 4) der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*) [90, 91]. Weitere intrazelluläre Störungen umfassen endoplasmatischen Stress [92] sowie eine reduzierte Bildung von Peroxisomen [93].

1.5 Botnia-Clamp

Der Botnia-Clamp [1] dient zur Charakterisierung von Studienkollektiven bezüglich der Ausprägung von IR und β -Zell-Dysfunktion. In der Regel besteht der Botnia-Clamp aus der Kombination eines einstündigen IVGTT mit einem dreistündigen HEC.

1.5.1 Intravenöser Glukose Toleranz Test (IVGTT)

Die erste intravenöse Applikation von Glukose am Menschen erfolgte bereits 1884 durch Worm-Müller zur Untersuchung der Glykosurie. Einen annähernd heute noch gültigen Versuchsablauf des IVGTT führte schließlich Thannhauser im Jahre 1913 durch [94]. Lundabaek versuchte ein erstes Standardprotokoll zu etablieren und forderte darüber hinaus die Einführung des IVGTT als Mittel der ersten Wahl zur Diagnosestellung des DM [95]. Er begründete dies mit der guten Reproduzierbarkeit sowie der Möglichkeit einer präzisen Abgrenzung einzelner Resistenzstadien. Trotz dieser Argumente wird der IVGTT hauptsächlich im Rahmen klinischer Studien zur Analyse der β -Zell-Funktion eingesetzt [2]. Hierbei orientiert sich eine Vielzahl von weltweit durchgeführten Studien an dem Routineprotokoll von Bingley et al unter Verwendung eines Körpergewichts-adaptierten Glukosebolus gefolgt von einer einstündigen Beobachtung [46]. Gegenüber einem OGTT oder einer Nahrungsaufnahme bleiben insbesondere gastrointestinale Hormone (Inkretine) unberücksichtigt, deren Sekretion im Rahmen der enteralen Resorption von Glukose erfolgt [2]. Der Inkretin-Effekt zeigt sich insbesondere beim Vergleich von OGTT und IVGTT, wobei der OGTT deutlich höhere Insulinspiegel hervorruft [2]. Neben der β -Zell-Sekretionsleistung

zeigten sich Unterschiede in der hepatischen Elimination von Insulin, die vermutlich als weitere Inkretinwirkung zu interpretieren sind [96].

Abgesehen von der Inkretinwirkung bleiben bei der intravenösen Glukosegabe auch andere Nahrungsbestandteile mit stimulierender Wirkung auf die Insulinsekretion sowie individuelle Unterschiede der gastrointestinalen Resorption unberücksichtigt [2]. Folglich ermöglicht der IVGTT nach Bingley et al eine selektive Betrachtung der Reaktion auf einen parenteralen Glukosebolus. Die physiologische Antwort auf den Glukosebolus besteht in einer zweiphasigen Steigerung der Insulinsekretion, der akuten Insulinantwort (*acute insulin response* (AIR)) sowie der Spätphase (*second phase*). Die AIR beschreibt hierbei eine stoßförmige Sekretion innerhalb der ersten zehn Minuten mit einem klaren absoluten Maximum. Demgegenüber beschreibt die ‚second phase‘ eine erneute Zunahme im Anschluss (10. – 60. Minute) an die AIR, gekennzeichnet durch einen langsameren, länger anhaltenden sowie BG-abhängigen Anstieg der Insulinsekretion [2].

Abweichend von diesem physiologischen Verlauf findet sich bei Patienten mit T2D häufig eine Dysfunktion der β -Zellen mit einem abweichenden Verhalten der Plasmaspiegel von Insulin und Glukose in oralen (OGTT) oder intravenösen (IVGTT) Glukose-Toleranztests. In Anfangsstadien des T2D ist oftmals noch eine klare Abgrenzung von AIR und *second phase* möglich. Patienten mit manifestem T2D zeigen hingegen keinen klar abgrenzbaren Anstieg der Insulinspiegel im Sinne einer AIR bei Stimulation durch Glukose im IVGTT [2, 47, 97].

1.5.2 Hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp (HEC)

Der HEC basiert auf einer 1979 von DeFronzo et al etablierten Methode zur Bestimmung der Ganzkörper-Insulinsensitivität [1]. Bei mehrmaliger Durchführung mit Applikation unterschiedlicher Insulinspiegel ermöglicht das Verfahren zudem die Erstellung einer vollständigen Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie Rückschlüsse auf die maximale Insulinwirkung der getesteten Person [98]. In der Regel bedarf es eines zwei- bis dreistündigen Versuchsaufbaus, wobei durch eine kontinuierliche, Körpergewichts-adaptierte Insulininfusion hohe Insulinplasmaspiegel hervorgerufen werden. Daraufhin wird die periphere

Glukoseaufnahme (Muskulatur, Fettgewebe, Leber) verstärkt und die endogene Glukoseproduktion (Niere, Leber) weitgehend reduziert. Gesunde Probanden zeigen bei HEC-Durchführung einen deutlichen Anstieg des Glukoseumsatzes sowie eine annähernd komplette Suppression der EGP. Patienten mit T2D weisen hingegen einen geringeren Anstieg des Glukoseumsatzes sowie eine verminderte Suppression der EGP auf [99]. Dem Abfall der BG wird durch eine kontinuierlich angepasste Glukoseinfusion entgegengewirkt. Das Ziel ist die Stabilisierung der BG im euglykämischen Bereich bei konstanten Infusionsraten von Insulin und Glukose (Fließgleichgewicht). Für die Steigerung der Glukoseaufnahme unter HEC-Bedingungen ist die Muskulatur (~ 85 % der gesamten Glukoseaufnahme) hauptverantwortlich [2], sodass häufig von einer Bestimmung der muskulären Insulinsensitivität gesprochen wird. Einer der am häufigsten verwendeten Parameter des HEC zur Beschreibung der Insulinsensitivität ist der M-Wert [1], in dessen Berechnung die Glukoseinfusionsrate (GINF) und der renale Verlust von Glukose (UC) im Fließgleichgewicht sowie eine Korrektur unvermeidbarer, geringer Schwankungen der BG (SC) einfließen [2].

$$\mathbf{M = GINF - UC - SC}$$

Der Insulin-vermittelte Glukoseumsatz unterliegt ausgeprägten Schwankungen (Alter, Körperfettanteil, Tageszeit, Ernährung, körperliche Aktivität, Medikation), sodass Rahmenbedingungen vor und während der Versuchsdurchführung sowie Normierungsfaktoren bei inhomogenen Kohorten von Bedeutung sind [100].

Häufig verwendete Normierungsfaktoren sind Magermasse (FFM), Alter, Ruheenergieumsatz (REE) sowie Insulin-Plasmaspiegel im Fließgleichgewicht. Gegenüber der normalen Nahrungsaufnahme bleiben beim HEC GIT-Hormone sowie sonstige Nahrungsbestandteile, die eine Auswirkung auf Insulinsensitivität und Glukosestoffwechsel haben, unberücksichtigt (Abb. 1).

Trotz der häufigen Verwendung des HEC zur Bestimmung der Insulinsensitivität in klinischen Studien existieren keine allgemein anerkannten Grenzwerte zur Abgrenzung einer IR [20, 29]. Aufgrund der aufwändigen Versuchsdurchführung haben sich verschiedene Parameter zur Annäherung des M-Wertes etabliert. Häufig verwendete Parameter umfassen den HOMA-IR [101] oder QUICKI [102].

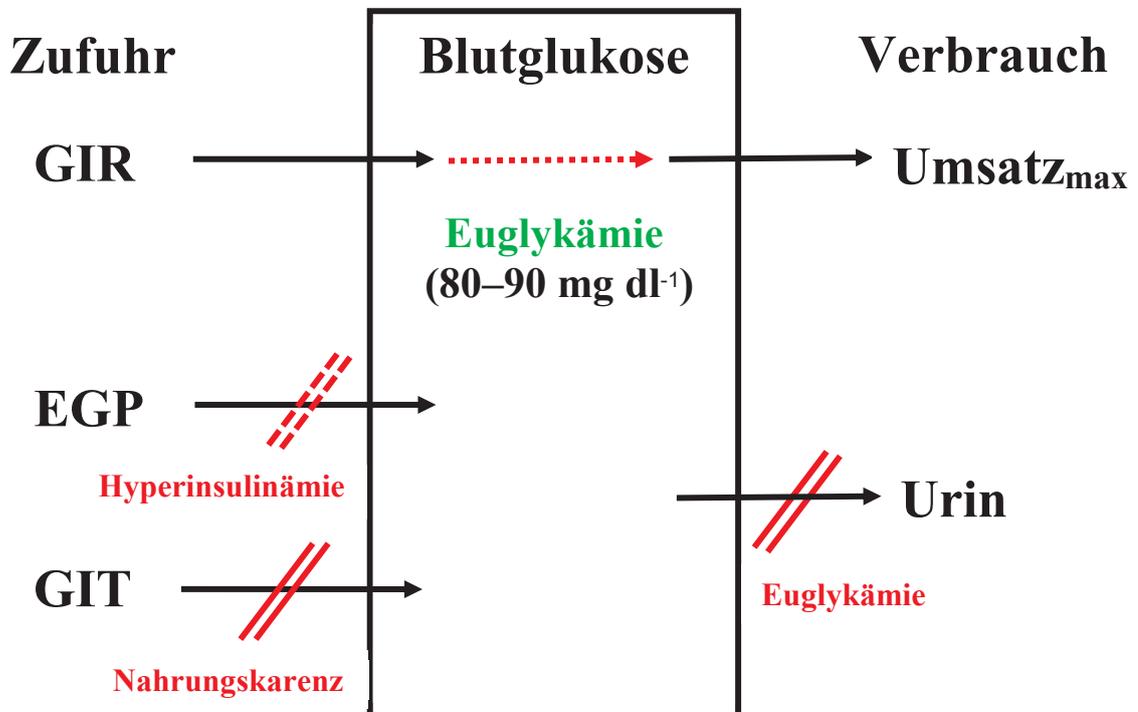


Abb. 1: Schema Fließgleichgewicht des Glukoseumsatzes im HEC Rot: Veränderte Bedingungen im Fließgleichgewicht des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp (HEC); Glukoseinfusionsrate (GIR), endogene Glukoseproduktion (EGP), gastrointestinale Resorption (GIT), Milligramm (mg), Deziliter (dl)

1.6 Ziele der Arbeit

Der Botnia-Clamp ist eine häufig verwendete Testkombination, wobei Auswirkungen des IVGTT auf die Bestimmung der Insulinsensitivität im HEC (M-Wert, EGP / EGP-Suppression) in Patienten mit T2D unzureichend geklärt sind. Die Untersuchungen mit vergleichbarem Studienprotokoll von Perseghin et al [6], Lehto et al [7] und Tripathy et al [8] zeigten an Kollektiven von $n = 8$, $n = 9$ und $n = 10$ eine gute Korrelation der M-Werte beider Varianten (Botnia-Clamp versus HEC) von $r = 0.94$ ($p =$ keine Angabe), $r = 0.953$ ($p < 0,005$) und $r = 0.94$ ($p = 0.0001$). Perseghin et al untersuchten acht gesunde Probanden, wobei vier Versuchsteilnehmer Verwandte ersten Grades mit T2D hatten. Bei Lehto et al

handelte es sich ausschließlich um Verwandte ersten Grades von Patienten mit T2D. Tripathy et al bezogen hingegen fünf Probanden mit T2D sowie vier Probanden mit normaler Glukosetoleranz (NGT) ein. Eine konkrete Einschätzung der Glukosetoleranz des jeweiligen Studienkollektivs findet sich somit nur in einer der drei Untersuchungen, wobei insgesamt nur wenige Probanden mit T2D untersucht wurden. Darüber hinaus nahm keine der erwähnten Studien Stellung zu Auswirkungen des IVGTT auf Stoffwechselfparameter, Entzündungsparameter oder die endogene Glukoseproduktion.

Die vorliegende Studie vergleicht ebenfalls die Einflussnahme eines IVGTT auf den HEC (Botnia-Clamp) mit alleiniger HEC-Durchführung (Kontroll-HEC), wobei ein besonderes Augenmerk auf der Rekrutierung eines homogenen Studienkollektivs sowie auf möglichst vergleichbaren Rahmenbedingungen vor und während der Versuchsdurchführung lag. In Abgrenzung zu den vorherigen Studien [6, 7, 8] wurde zudem ein weitaus größeres Spektrum der analysierten Parameter (EGP, Cortisol, Glukagon, FFA, MCP-1, IL1-RA, TNF α , respiratorischer Quotient, Ruheenergieumsatz, Lipid- / Glukoseoxidation) einbegriffen, um ein möglichst vollständiges Bild aller Diabetes- und Stoffwechsel-relevanten Faktoren abzubilden. Die zu beantwortenden Fragestellungen waren:

- I. Beeinflusst der IVGTT den M-Wert im Botnia-Clamp?
- II. Welche Bedeutung hat eine mögliche Wechselwirkung von IVGTT und M-Wert für die Einteilung in Insulin-sensitive und Insulin-resistente Patienten?
- III. Welche IVGTT-induzierten Veränderungen von Stoffwechselfparametern und Hormonen weisen eine Verbindung zum M-Wert auf?
- IV. Ist eine Auswirkung des Botnia-Clamp auf die EGP / EGP-Suppression nachweisbar?

2 Material und Methoden

Bei der Studie handelt es sich um eine randomisierte, Placebo-kontrollierte, klinische Studie an Patienten mit T2D. Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität genehmigte die Durchführung der Studie am 2.5.2011 unter der Studiennummer 2478 Amendment 6 (Antragsstellerin: Dr. med. Sabine Kahl geb. Link). Im *National Clinical Trial Register* wurde die Studie am 18.7.2011 unter der Nummer NCT01397279 erfasst. Die Datenerhebung erfolgte im Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ, Auf'm Hennekamp 65, 40225 Düsseldorf) von Oktober 2011 bis August 2013.

2.1 Fallzahlkalkulation / Power

Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, wurde vor Testdurchführung eine Kalkulation der Power angestellt. Dieser Berechnung zu Grunde liegende Annahmen beruhen auf verschiedenen zuvor durchgeführten Studien, da keine Angaben eines exakt vergleichbaren Studiendesigns existierten. Zu Hilfe gezogen wurden daher vorherige Bestimmungen des Variationskoeffizienten (CV) bei wiederholter Clamp- und Botnia-Clamp-Durchführung, wofür sich Angaben von ~ 10 % [2] respektive ~ 9 % [8] fanden. Hierauf aufbauend erfolgte die Annahme eines vergleichbaren CV (~ 10 %) bei einem geometrischen Mittel des M-Wert-Quotienten von ≥ 1.1 für den vorliegenden Versuchsaufbau. Dies bedeutet, dass basierend auf dem zweiseitigen gepaarten-t-test der log-transformierten M-Werte für die eingeschlossenen 19 Vergleiche eine Power von 0.98 erreicht wurde.

2.2 Studienkollektiv

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte aus dem Kollektiv der GDC-Studie am DDZ Düsseldorf anhand vorab definierter Ein- und Ausschlusskriterien (Tabelle 7). Potenzielle Teilnehmer wurden zunächst telefonisch kontaktiert und

erhielten bei Interesse das umfangreiche Informationsmaterial. Nach einwöchiger Bedenkzeit wurden im Rahmen eines zweiten Telefonates offene Fragen geklärt sowie ein Termin vereinbart. Beim ersten Besuch am DDZ wurden nach schriftlich dokumentierter Teilnahmebereitschaft nochmals die Ein- und Ausschlusskriterien (Tabelle 6) überprüft, bevor die endgültige Aufnahme ins Studienkollektiv erfolgte.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • T2D [10, 19] • Diagnosestellung < 38 Monate • Diät und / oder Metformin • Alter 35 – 69 Jahre • BMI > 25 kg m⁻² 	<ul style="list-style-type: none"> • Insulintherapie • Autoimmunerkrankung • Hepatitis • Anämie • Niereninsuffizienz • Herzinsuffizienz • Maligne Tumor-Erkrankungen • Suchterkrankungen • Schwangerschaft • Akute Infekte

Tabelle 6: Ein- und Ausschlusskriterien der ClaVa-Studie Typ-2-Diabetes (T2D), *Body mass index* (BMI), Kilogramm (kg), Meter (m)

Zweiundzwanzig Probanden nahmen an zwei Untersuchungsterminen im Abstand von 14 Tagen teil. Alle Probanden erhielten eine Aufwandsentschädigung als Fahrtkostenpauschale.

Das letztendlich ausgewertete Studienkollektiv umfasste 19 Probanden. Gründe, die zum Ausschluss der übrigen drei Probanden führten, war 1) eine unvollständige Versuchsdurchführung (nur ein Versuchstag), 2) eine ausgeprägte Schwankung der BG im gesamten HEC-Verlauf sowie 3) eine paravenöse Infusion der d2-Glukose während eines Versuchstages.

2.3 Studienablauf

Die Versuche wurden im Studienzentrum des Deutschen Diabetes Zentrums (DDZ) durchgeführt und standen unter der ärztlichen Aufsicht von Studienärztin Dr. med Sabine Kahl (geb. Link) sowie der Leitung und Supervision durch Univ.

Prof. Dr. med. univ. Michael Roden. Am ersten Versuchstag erfolgten ein ausführliches Einführungsgespräch sowie eine ärztliche Untersuchung des aktuellen Gesundheitszustandes. Welche der beiden Versuchsvarianten als erstes durchlaufen wurde, entschied sich auf Grundlage einer vor Studienbeginn angefertigten Randomisierungsliste. Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich mittels am DDZ etablierter, standardisierter Routinen (*Standard Operating Procedures (SOPs)*).

2.4 Versuchsvorbereitung

Zur Vergleichbarkeit der individuellen Situation des Glukosestoffwechsels wurden alle Teilnehmer aufgefordert, eine etwaige Metformin-Medikation ab drei Tage vor Versuchsdurchführung zu pausieren. Für denselben Zeitraum sollte zudem eine Kohlenhydrat-reiche Diät (60 % Kohlenhydrate) eingehalten und übermäßige, sportliche Aktivität vermieden werden. Letztendlich galt es, für alle Teilnehmer neben einer mindestens 10-stündigen Nahrungskarenz auch Karenzzeiten für Alkohol (24 Stunden) und Nikotin (8 Stunden) zu berücksichtigen. Der Konsum von Wasser (ohne Zusätze) unterlag hingegen keinen Beschränkungen.

2.5 Versuchstag

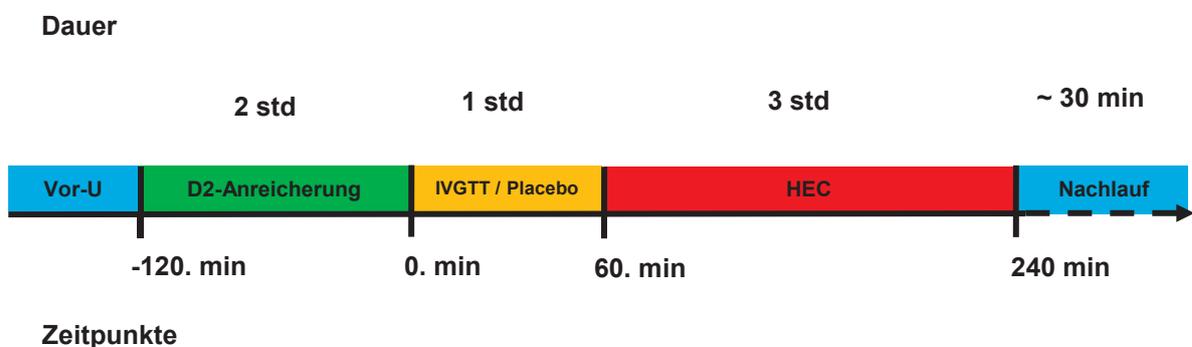


Abb. 2: Gesamtablauf Graphische Darstellung des zeitlichen Ablaufs sowie der einzelnen Bestandteile eines Versuchstages; Voruntersuchungen (Vor-U), intravenöser Glukosetoleranztest mit 30%-Glukosebolus (IVGTT), Placebo mit 0.9%-Natriumchloridbolus (Placebo), hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp (HEC), Minute (min), Stunde (std)

Zunächst fanden an beiden Versuchstagen Voruntersuchungen (siehe 2.6.1) statt, bevor mit der eigentlichen sechs-stündigen Versuchsdurchführung begonnen wurde (Abb. 2). Somit ergab sich ein zeitlicher Gesamtaufwand von ungefähr acht Stunden pro Versuchstag. Alle Probanden wurden am frühen Morgen zwischen sieben und neun Uhr einbestellt. Zum Ausschluss individueller, Tageszeitbedingter Unterschiede wurde zudem auf möglichst identische Startzeitpunkte beider Versuchstage eines Probanden geachtet. Die einzelnen Versuchsteile des Vergleichs von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC wurden stets in identischer Reihenfolge ausgeführt. Der einzige Unterschied beider Varianten (Kontroll-HEC, Botnia-Clamp) bestand in dem einstündigen (0. – 60. Minute) Versuchsteil, zu dessen Beginn ein 0.9 %iger – Natriumchlorid- oder 30 %iger – Glukosebolus appliziert wurde (siehe 2.6.3). Im kompletten sechsstündigen Verlauf wurde von den Probanden, mit Ausnahme eventueller Toilettengänge, Bettruhe eingehalten.

2.5.1 Voruntersuchungen

Die Voruntersuchungen umfassten die Bestimmung von Körpergröße, Körpergewicht, FFM sowie eine Blutentnahme. Das Körpergewicht wurde bei allen Probanden standardmäßig ohne Schuhe sowie schwere Straßengarderobe mittels derselben Waage (Seca Modell 930, Vogel und Halke, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Die Berechnung der FFM erfolgte mittels indirekter Bioimpedanzmessung (BIA, Viasys Vmax Encore 29n Typ MBM-100-33-00, Ser-Nr 65178, CareFusion, Yorba Linda (CA), USA) und diente als Normierungsfaktor zur intra- und interindividuellen Vergleichbarkeit der Clamp-Ergebnisse [103]. Es wurde stets eine Zweifach-Messung durchgeführt, deren Auswertung unter Einbezug anthropometrischer Daten mittels softwaregestützter Rechenmodelle erfolgte (NutriPlus / Vmax, Version 20.7). Die Untersuchung erfolgte an jedem Versuchstag durch speziell geschultes Personal unter Befolgung einer Versuchsvorschrift (SOP_{BIA} Version 1.3). Standardmäßig wurde die Untersuchung am liegenden Probanden bei vollständig entleerter Blase sowie nach zehnminütiger Ruhephase mit Hilfe von vier Elektroden platziert an Hand (zwei, 5 cm Abstand) und Fuß (zwei, 5 cm Abstand) der dominanten Körperseite durchgeführt. Die jeweiligen Hautstellen wurden zunächst gründlich gereinigt und

jedweder Kontakt des Probanden zu metallischen Gegenständen (Schmuck, Liege) ausgeschlossen.

Des Weiteren wurden auf beiden Seiten die Cubital-Venen punktiert und für die Versuchsdauer mit einem intravenösen Katheter (VWK) versorgt. Die erste Blutentnahme am Versuchstag umfasste eine Routinekontrolle des Blutbilds (Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Retikulozyten, Leukozyten, Thrombozyten, MCH, MCV, MCHC) sowie Analysen von BG, Alkohol und Elektrolyten (Natrium, Kalium).

2.5.2 Anreicherung von 6,6-²H₂-Glukose

Die zweistündige Anreicherung deuterierter 6,6-²H₂-Glukose (d2-Glukose) im Blut, welche zur Bestimmung der EGP benötigt wurde. Hierzu wurde eine d2-Glukose Lösung (d2inf) über einen der beiden intravenösen Zugänge appliziert. Die Substitution erfolgte in zwei Phasen bestehend aus einem 10-minütigen Bolus zur initialen Anreicherung (-120. bis -110. Minute) sowie einer kontinuierlichen Infusionsrate (-110. bis 240. Minute) zur Aufrechterhaltung eines konstanten Plasmaspiegels. Die infundierte Menge der d2-Glukose orientierte sich an Nüchtern-BG und Körpergewicht des jeweiligen Versuchsteilnehmers:

1) 10-Minuten-Bolus Rate (ml h⁻¹) =

$$0.12 \text{ (ml h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ dl mg}^{-1}) \times \text{Körpergewicht (kg)}$$

$$\times \text{Nüchtern-BG (mg dl}^{-1}) \times 0.5$$

$$\text{Entsprechend: } 0.36 \text{ mg d2-Glukose} \times \text{Nüchtern-BG (mmol l}^{-1}) \times (5 \text{ mmol l}^{-1})^{-1} \times \text{Körpergewicht (kg}^{-1}) \times \text{Zeit (min}^{-1})$$

2) Konstante Rate (ml h⁻¹) =

$$0.54 \text{ (ml h}^{-1} \text{ kg}^{-1}) \times \text{Körpergewicht (kg)}$$

$$\text{Entsprechend: } 0.036 \text{ mg d2-Glukose} \times \text{Körpergewicht (kg}^{-1}) \times \text{Zeit (min}^{-1})$$

Nach Erreichen eines konstanten Verhältnisses von infundierter d2-Glukose zu endogen produzierter Glukose im Blut erfolgte die Berechnung der basalen EGP durch Bestimmung des Anteils von d2-Glukose an der Gesamtglukose im Blut (siehe 2.9).

Die d2inf-Lösung diente der Anreicherung sowie der Aufrechterhaltung des d2-Glukose-Spiegels im Blut der Probanden über den gesamten sechsständigen Verlauf (-120. Min bis 240. Min). Die Herstellung der verwendeten Infusion erfolgte am Versuchstag anhand einer detaillierten Vorschrift (Anhang 7.1). Verwendet wurde d2-Glukose-Stocklösung (Profil GmbH, Neuss, Deutschland) mit einem Anteil von 98% 6,6-²H₂-Glukose sowie 0.9%-NaCl-Lösung als Trägersubstanz. Die gewünschte Zielkonzentration der erstellten d2inf betrug 4 mg ml⁻¹ 6,6-²H₂-Glukose. Die zur Berechnung der EGP verwendete Konzentration der d2inf beruhte jedoch auf der gemessenen Konzentration jedes Ansatzes im Labor.

2.5.3 Glukose-Bolus (Botnia-Clamp) / NaCl-Bolus (Kontroll-HEC)

Im Verlauf dieses einstündigen Versuchsabschnitts erhielten die Probanden in Abhängigkeit von der Interventionsvariante einen 30%-Glukose-Bolus (Botnia-Clamp) oder einen 0.9%-NaCl-Bolus (Kontroll-HEC). In beiden Fällen erfolgte die Applikation über den intravenösen Katheter in der rechten Ellenbeuge innerhalb von zwei Minuten. Die Durchführung des IVGTT orientierte sich am Routineprotokoll (SOP IVGTT Version 2.1) des DDZ. Dem Protokoll entsprechend ergab sich ein Körpergewicht-adjustiertes Volumen des Glukosebolus von:

$$\text{Volumen}_{30\% \text{Glukose-Bolus}} [\text{ml}] = 1 [\text{ml kg}^{-1}] \times \text{Körpergewicht} [\text{kg}]$$

sowie eine absolute Glukosemenge von:

$$\text{Glukose} [\text{g}] = \text{Volumen}_{30\% \text{Glukose-Bolus}} [\text{ml}] \times 0,3 [\text{g ml}^{-1}]$$

Im direkten Anschluss an die Bolusgabe erfolgten Blutentnahmen nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60 Minuten. Der alternativ applizierte 0.9%-NaCl-Bolus (154 mmol l⁻¹) diente dem Ausschluss Volumen-assoziierter Veränderungen sowie der

Einhaltung eines für die Probanden möglichst identischen Versuchsablaufs. Der isovolumetrische Bolus berechnete sich entsprechend dem Volumen des Glukosebolus:

$$\begin{aligned} \text{Volumen}_{0,9\% \text{ NaCl-Bolus}} [\text{ml}] &= \text{Volumen}_{30\% \text{ Glukose-Bolus}} [\text{ml}] \\ &= 1 [\text{ml kg}^{-1}] \times \text{Körpergewicht} [\text{kg}] \end{aligned}$$

Abweichend vom IVGTT Protokoll wurden im Verlauf der folgenden 60 Minuten lediglich drei Blutentnahmen bei 0, 30 und 60 Minuten durchgeführt (Abb. 3).

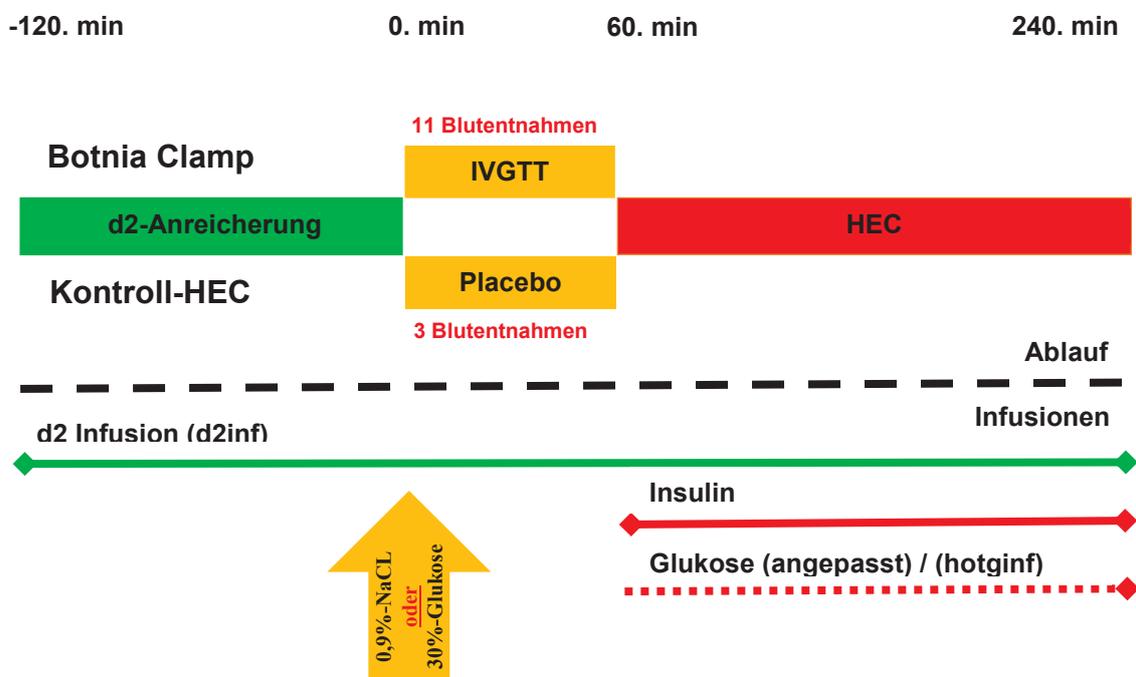


Abb. 3: Darstellung der Unterschiede von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC, hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp (HEC), intravenöser Glukosetoleranztest (IVGTT), deuterierte Glukose (d2), intravenöser Glukosetoleranztest mit 30%-Glukose-Bolus (IVGTT), Placebo mit 0.9%-NaCl-Bolus (Placebo), Minute (min)

Bei IVGTT -Durchführung (Botnia-Clamp) erfolgte ebenfalls eine Anreicherung der verwendeten 30 %igen - Glukose-Lösung mit d2-Glukose, um einer Verminderung des d2-Anteils im Blut entgegenzuwirken. Wie bereits im Rahmen der d2inf-Lösung erwähnt, erfolgte die Substitution anhand einer detaillierten Vorschrift (Anhang 7.1), um letztendlich eine 1.98%-Anreicherung von 6,6-²H₂-Glukose in der verwendeten Injektionslösung zu erzielen. Auf eine d2-Glukose-Anreicherung

des NaCl-Bolus (Kontroll-HEC) wurde aufgrund des geringen Volumens sowie des fehlenden Einflusses auf den Blutglukosespiegel verzichtet.

Die Auswertung des IVGTT erfolgte durch Prof. Dr. Giovanni Pacini (National Research Council - Institute of Biomedical Engineering, Padua, Italien). Aussagen über die β -Zell-Funktion wurden anhand der Sekretionsprodukte (Insulin, C-Peptid) getroffen. Zu Grunde liegt die Berechnung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) für Insulin ($AUC_{2.-10.\text{Minute}}$ (acute insulin response, AIR), $AUC_{0.-60.\text{Minute}}$ (AUC_{In0-60})) und C-Peptid ($AUC_{0.-60.\text{Minute}}$ (AUC_{CP0-60})).

2.5.4 Clamp

Der hyperinsulinämisch-euglykämische Clamp (HEC) [1] stellte den letzten Teil der Untersuchung dar (60.- 240. Minute) und wurde ebenfalls anhand einer SOP (SOP_{HEC} Version 2.1) am ruhenden Probanden durchgeführt.

Um eine Unterbrechung der entscheidenden Endphase dieses dreistündigen Abschnitts zu vermeiden, wurden die Probanden zu Beginn des HEC um eine komplette Blasenentleerung gebeten. Über den rechtsseitigen, intravenösen Katheter erfolgte die kontrollierte Infusion von Humaninsulin (Insuman® Rapid; Sanofi-Aventis; Frankfurt; Deutschland), um einen konstanten, hyperinsulinämischen Plasmaspiegel zu erzeugen. Die Insulingabe wurde hierbei in zwei Stufen durchgeführt. Im Verlauf der ersten 10 Minuten des HEC (60. – 70. Minute) wurden zur Aufsättigung $10 \text{ mU} \times \text{Körpergewicht} (\text{kg}^{-1}) \times \text{Zeit} (\text{min}^{-1})$ verabreicht, an die sich eine kontinuierliche Erhaltungsdosis von $1.5 \text{ mU} \times \text{Körpergewicht} (\text{kg}^{-1}) \times \text{Zeit} (\text{min}^{-1})$ bis zum Versuchsende (240. Minute) anschloss. Mit Clamp-Beginn erfolgte zudem die Applikation der 20%-Glukose-Lösung (hotGinf), welche zur Aufrechterhaltung der Normoglykämie (Zielwert: 5 mmol l^{-1}) kontinuierlich adjustiert wurde. Die Anpassung der GIR wurde anhand des simultan am Patientenbett bestimmten BZ in 5-minütigen Intervallen vorgenommen. Im Verlauf der Untersuchung wurde eine langsame Adjustierung des BZ zum Erreichen eines euglykämischen Fließgleichgewichts von Insulin und Glukose angestrebt. Die Aufrechterhaltung eines mindestens 20-minütigen Fließgleichgewichts von Glukose war für die spätere Auswertung erforderlich.

Während des Fließgleichgewichts im HEC erfolgte zudem die EGP-Bestimmung unter hyperinsulinämisch-euglykämischen Bedingungen. Alle im Verlauf bestimmten Entnahmezeitpunkte und die jeweiligen Blutparameter können dem Blutentnahmeschema entnommen werden (Anhang 7.2, 7.3).

Im Verlauf des HEC wurden zeitgleich drei geschwindigkeitskontrollierte Infusionen verabreicht. Neben der d2inf wurden auch die beiden anderen Infusionslösungen am Versuchstag vorbereitet (Anhang 7.1). Zielkonzentration der Insulininfusion auf Basis von 0.9%-NaCl-Lösung war 1 IE ml⁻¹. Entsprechend der 30%-Glukose-Lösung des IVGTT erfolgte auch eine 6,6-²H₂-Glukose-Anreicherung (Zielkonzentration: 2%) der im Rahmen des HEC verwendeten 20%-Glukose-Lösung (hotginf). Zur Berechnung der EGP wurde wiederum eine Probe der hotginf im Labor analysiert.

Als entscheidender Parameter zum Vergleich der beiden Clamp-Untersuchungen wurde der M-Wert bestimmt, welcher dem peripheren Glukoseumsatz unter HEC-Bedingungen entspricht [2]. Für die Bestimmung des M-Werts wurde von einem vereinfachten Mono-Kompartiment-Modell als Verteilungsvolumen für Insulin und Glukose ausgegangen. Zur Berechnung wurde bei allen Probanden die Magermasse als Normierungsfaktor verwendet. Der renale Glukoseverlust (*urinary loss*) wurde auf Grund der euglykämischen BG-Werte vernachlässigt und folglich nicht zur Berechnung des M-Wertes verwendet [2]. Als Fließgleichgewicht wurde ein mindestens 20-minütiger Zeitraum mit weitgehend konstanter BG am Ende des HEC gewählt.

$$\mathbf{M\text{-Wert}} \text{ [mg (kg}_{\text{FFM}} \text{ min)}^{-1}] = \mathbf{mGIR}_{\text{Fließgleichgewicht des HEC}} \text{ [mg (kg}_{\text{FFM}} \text{ min)}^{-1}] \\ \text{– Space Correction}$$

2.5.5 Versuchsende

Nach Abschluss des HEC wurde bei allen Probanden eine Glukoseinfusion zur Kompensation der Insulinwirkung für mindestens 30 Minuten fortgeführt. Die Probanden nahmen darüber hinaus eine kohlenhydratreiche Mahlzeit zu sich. Eine abschließende BG-Messung stellte den Endpunkt des Versuchstages dar,

woraufhin die Probanden bei konstantem, adäquatem BG-Spiegel aus dem Studienzentrum verabschiedet wurden.

2.6 Abbruchkriterien und Fehlerquellen

Abbruchkriterien waren allergische Reaktionen auf eine applizierte Substanz, akute Beschwerden der Probanden sowie die paravenöse Infusion von mehr als 20 ml (Insulin oder Glukose) bei inkorrekt er VWK-Lage sowie Hypoglykämien von $< 60 \text{ mg dl}^{-1}$. Zudem konnte der Versuch jederzeit auf Wunsch des Probanden beendet werden.

2.7 Blutentnahmen und Laborparameter

Mit Ausnahme der ersten Blutentnahme vor Versuchsdurchführung wurden alle weiteren Blutentnahmen über den linksseitigen, intravenösen Katheter entnommen. Um einen Verschluss des Katheterlumens zwischen den einzelnen Blutentnahmen zu vermeiden, wurde eine kontinuierliche Spülung des Katheters mittels 0.9%-NaCl durchgeführt. Vor jeder Blutentnahme wurde ein Volumen von 0.5 ml entnommen und verworfen, um eine Verdünnung der Blutprobe auszuschließen.

Auf beiden Seiten wurden großkalibrige Venen punktiert, um einer Reizung der Venen durch Infusionen und Blutentnahmen vorzubeugen. Im Rahmen des Aufklärungsgesprächs wurden die Probanden zudem über das Risiko von Blutergüssen, Venenentzündungen sowie der Verletzung eines Hautnervs informiert. Bei paravenöser Infusion von mehr als 20 ml erfolgte ein sofortiger Versuchsabbruch. An jedem Versuchstag wurde im Rahmen der Durchführung ein Blutvolumen von maximal 150 ml entnommen. Abgesehen von der am Patientenbett durchgeführten BG-Bestimmung wurden alle Proben direkt nach Entnahme gekühlt, zeitnah zentrifugiert und die gewonnenen Plasmen bei -20°C aufbewahrt.

Der BG-Bestimmung kam eine besondere Bedeutung bei, da diese einen unmittelbaren Bestandteil der Versuchsdurchführung des HEC darstellte. Die Messung erfolgte als einziger Blutparameter direkt am Patientenbett. Zur Bestimmung wurden zweimalige Analysen in 5-minütigen Intervallen durchgeführt und venöse Blutproben während des gesamten HEC-Verlaufs entnommen. Die dokumentierten Werte waren Mittelwerte der beiden Einzelmessungen. In Ausnahmefällen wurde bei zu großer Abweichung ($> 5\%$) von erster und zweiter Messung eine dritte Bestimmung vorgenommen.

Die Analyse erfolgte mittels Biosen® C-line (EKF Diagnostics GmbH; Barleben/Magdeburg; Deutschland) basierend auf der nass-chemischen Hexokinase-Methode, welche eine hohe Genauigkeit der Messung ermöglicht [104]. Für jede Messung wurde eine Natriumheparin-beschichtete (EKF Diagnostics GmbH; Barleben/Magdeburg; Deutschland) Kapillare mit venösem Vollblut (20 μ l) befüllt. Die Hämolyse des intrakapillären Blutvolumens erfolgte durch Zugabe eines Hämolysates sowie mechanischer Unterstützung (Schütteln). Die exakte Menge und Zusammensetzung des Hämolysates wurde durch den Gerätehersteller (EKF Diagnostics GmbH; Barleben / Magdeburg; Deutschland) garantiert, welcher vorab befüllte Eppendorfgeläße zur Verfügung stellte. Die Bestimmung aller weiteren Blutparameter erfolgte im Labor des DDZ. Eine Aufstellung der gemessenen Parameter und der verwendeten Verfahren ist (Tabelle 7) zu entnehmen. Die Berechnung der FFA-Inhibition erfolgte mit Hilfe des mathematischen Modells von Morbiducci et al [105].

Parameter	Verfahren
Insulin	microparticle enzyme immunoassay (MEIA) AXSYM analyzer (Abbot, Abbot Park, IL, USA)
C-Peptid	chemiluminescence immunoassay Immolute1000 machine (Siemens, Erlangen, Deutschland)
FFA	microfluorimetric method (Wako, Neuss, Deutschland)
Cortisol	fluorescence polarization immunoassay Axsym analyzer (Abbot, Abbot Park, USA).
Glucagon	RIA (Millipore, St. Charles, MO, USA)
MCP-1 / IL1-RA	Quantikine® ELISA (R&D Systems Europe, Abingdon, UK)
TNF α	Quantikine® HS ELISA (R&D Systems Europe, Abingdon, UK)

Tabelle 7: Parameter und Verfahren Gegenüberstellung der im Rahmen der ClaVa-Studie erhobenen Parameter und der jeweils verwendeten Verfahren, freie Fettsäuren (FFA), Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1), Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL1-RA), Tumornekrosefaktor α (TNF α)

2.8 Bestimmung der endogenen Glukoseproduktion (EGP) mittels 6,6-²H₂-Glukose

Zur Berechnung der EGP wurde ein Tracer (6,6-²H₂-Glukose) verwendet, welcher über identische Stoffwechseleigenschaften verfügt wie Glukose. Die Methode setzt zudem eine initiale Anreicherung sowie eine fortlaufende Substitution des Tracers während der gesamten Versuchsdauer voraus. Darüber hinaus musste auf die Anreicherung aller glukosehaltigen Infusionen mit 6,6-²H₂-Glukose geachtet werden. Die Messung des 6,6-²H₂-Glukose Anteils (*tracer-to-tracee ratio*) erfolgte nach Deproteinierung von ²H im Labor des DDZ mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS). Hierzu verwendet wurde ein Hewlett-Packard 6890 Gaschromatograph, ausgestattet mit einer 25-m CPSil5CB Kapillare (Chrompack/Varian, Middelburg, NL) sowie ein Hewlett Packard 5975 Massenspektrometer [106]. Auf diese Weise wurde der 6,6-²H₂-Glukose Anteil der verwendeten Infusionslösungen sowie der abgenommenen Blutproben bestimmt. Mit Hilfe dieser Ergebniss sowie der Infusionsrate des Tracers erfolgte die

Berechnung der EGP sowie der EGP-Suppression nach IVGTT und HEC mit Hilfe eines zuvor etablierten *non-steady state* Modells durch Andrea Mari (Institute of Biomedical Engineering (ISIB – CNR), Padua, Italien) [107].

2.9 Indirekte Kalorimetrie (IC)

Die indirekte Kalorimetrie beschreibt eine Untersuchungsmethode zur Bestimmung von Ruheenergieumsatz (REE) und respiratorischem Quotienten (RQ) sowie der daraus abgeleiteten Bestimmung von Glukoseoxidation (GOX) und Lipidoxidation (LOX). Intraexperimentell erfolgte die Messung des O₂-Verbrauchs (V_{O₂}) sowie der CO₂-Produktion (V_{CO₂}) über einen 20-minütigen Zeitraum mit Hilfe der Zelt (*Canopy*) - Methode unter Verwendung eines Vmax Encore 29n[®] (MBM-100-33-00, Serien-Nr. 65178, CareFusion, Höchberg, Deutschland) [108].

Im Rahmen der Studie erfolgte die zweimalige Bestimmung der oben genannten Parameter ($RQ = V_{CO_2} / V_{O_2}$; $REE = (3.941 \times V_{O_2} + 1.11 \times V_{CO_2}) \times 1.44$) unter Nüchtern-Bedingungen sowie unter HEC-Bedingungen. Die Berechnung der oxidativen Energielieferanten orientierte sich am Modell von Frayn [109] mit einer Proteinoxidation (POX) (g /Tag) von $0.15 \times REE \text{ (kJ / Tag)} / 16.74$; einer GOX (mg kg [FFM]⁻¹ min⁻¹) von $((4.55 \times V_{CO_2} - 3.21 \times V_{O_2}) \times 1.44) - 0.459 \times POX \times 1000 \times (1440 \text{ kg [FFM]})^{-1}$ sowie einer LOX (mg kg [FFM]⁻¹ min⁻¹) von $((1.67 \times V_{O_2} - (1.67 \times V_{CO_2}) \times 1.44) - 0.307 \times POX) \times 1000 \times (1440 \text{ kg [FFM]})^{-1}$. Der nicht-oxidative Glukoseumsatz wurde wiederum als Differenz von Glukoseverbrauch im Fließgleichgewicht des HEC und oxidativem Glukoseumsatz bestimmt.

2.10 Statistische Auswertung

Statistische Berechnungen und graphische Darstellungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism Version 4.03 (GraphPad Software Inc., LaJolla, USA) sowie SAS for Windows Version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) erstellt. Die Ausgabe der Studienkollektiv-Charakteristika erfolgte stets als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) für normalverteilte Parameter. Alle weiteren Parameter fanden ihre

Darstellung als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Verschiedene Parameter (Insulin, C-Peptid, FFA, Kortisol, GIR, DI, M-Werte, MCP-1, TNF α , IL1-RA) wurden vor weiterführender statistischer Auswertung \log_e transformiert, um eine Normalverteilung zu erreichen.

Zur statistischen Auswertung normalverteilter Parameter wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt und der Bezug mittels Pearson-Korrelation analysiert. Für nicht normalverteilte Ergebnisse kamen Wilcoxon's Rangtest und die Spearman Korrelation zum Einsatz. Für die Analyse des Verlaufs von BZ oder GIR zu verschiedenen Zeitpunkten (BZ bei -5, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 Minuten; GIR bei 60, 90, 120, 150, 180, 210, 235 Minuten) wurden Bonferroni-adjustierte t-Tests durchgeführt. Im Rahmen der Studie wurde von der Hypothese ausgegangen, dass der IVGTT eine Veränderung der verschiedenen Parameter verursacht. Statistische Signifikanz eines vorhandenen Unterschiedes der beiden Varianten wurde für $p < 0.05$ angenommen.

3 Ergebnisse

Kohorte

Das Studienkollektiv (Tabelle 9) umfasste 19 (11 männlich, 8 weiblich) Patienten mit T2D (Zeit seit Diagnosestellung: 21 ± 9 Monate) im Alter von 53 ± 10 Jahren und einem *Body mass index* (BMI) von 32.4 ± 6.1 kg m⁻². Alle Studienteilnehmer wurden zum Zeitpunkt der Studiendurchführung diätetisch und / oder medikamentös (Metformin) behandelt. Im Rahmen der Blutentnahme vor Versuchsbeginn zeigten sich erhöhte Messwerte der NPG 6.6 ± 1.8 mmol l⁻¹ (Referenzbereich: 3.9 – 5.8 mmol l⁻¹), des HbA1c 6.1 ± 1.0 % (Referenzbereich: 4.0 – 6.0 %) sowie der FFA 0.511 ± 0.17 mmol l⁻¹ (Referenzbereich: 0.1 – 0.5 mmol l⁻¹). Die sonstigen Blutparameter unter Nüchtern-Bedingungen lagen im Normbereich (Tabelle 8). Anhand der vor Studienbeginn erstellten Randomisierungsliste durchliefen acht Studienteilnehmer am ersten Versuchstag den Botnia-Clamp, wohingegen bei elf Studienteilnehmer zunächst der Kontroll-HEC durchgeführt wurde. Der zeitliche Abstand zwischen beiden Studientagen lag minimal bei 14 und maximal bei 17 Tagen.

	Messwert	Referenzbereich
Insulin	98.7 ± 49.4 pmol l ⁻¹	30 - 132 pmol l ⁻¹
C-Peptid	1.15 ± 0.36 nmol l ⁻¹	0.33 – 1.49 nmol l ⁻¹
Glukagon	121.1 ± 35.5 ng l ⁻¹	50 - 200 ng l ⁻¹
Cortisol	444.9 ± 146.5 nmol l ⁻¹	110.4 – 551.8 nmol l ⁻¹

Tabelle 8: Ausgangswerte unter Nüchtern-Bedingungen Mittelwert \pm SD; Referenzwerte des DDZ-Labor; Liter (l), Picomol (pmol), Nanomol (nmol), Nanogramm (ng)

Kriterien	Alter [Jahre]	BMI [kg m ⁻²]	Erstdiagnose (T2D)	HbA1c [%]	Therapie
CV001	63 (M)	27.2	08/2010	6.4	Diät
CV003	56 (M)	25.3	05/2010	6.3	Diät
CV005	59 (M)	31.7	05/2010	6.8	Metformin
CV006	41 (M)	33.3	02/2009	5.8	Diät
CV007	45 (F)	41.4	09/2009	5.8	Metformin
CV008	57 (M)	42.9	06/2009	6.7	Diät
CV009	56 (M)	33.3	05/2009	5.8	Metformin
CV010	46 (M)	29.9	12/2009	5.4	Metformin
CV011	39 (M)	32.8	08/2009	6.0	Metformin
CV012	67 (F)	30,0	02/2009	6.8	Metformin
CV013	48 (M)	47.1	02/2011	5.8	Diät
CV014	68 (F)	26.6	11/2010	6.4	Metformin
CV015	47 (F)	30.1	11/2011	4.9	Diät
CV016	48 (M)	28.3	04/2011	5.2	Diät
CV017	36 (M)	24.5	01/2009	4.9	Metformin
CV019	68 (F)	27.0	04/2012	6.1	Diät
CV020	54 (F)	34.4	02/2012	8.9	Metformin
CV021	65 (F)	32.2	06/2012	5.7	Metformin
CV022	45 (F)	36.4	04/2012	5.6	Metformin

Tabelle 9: Probandenkollektiv der ClaVa-Studie Mann (M), Frau (F), Kilogramm (kg), Quadratmeter (m²), Typ-2-Diabetes (T2D), *Body-mass-index* (BMI), Hämoglobin A1c (HbA1c)

Blutglukose

Die Ausgangswerte (-125. Minute) der BG von Kontroll-HEC und Botnia-Clamp betragen 6.22 ± 1.05 mmol l⁻¹ und 6.44 ± 1.04 mmol l⁻¹ ($p = 0.47$) sowie 5.83 ± 1.01 mmol l⁻¹ und 5.92 ± 0.97 mmol l⁻¹ ($p = 0.99$) unmittelbar vor IVGTT-Beginn (0. Minute), weshalb eine vergleichbare Ausgangssituation an beiden Versuchstagen anzunehmen ist. Auch eine getrennte Betrachtung der beiden Versuchsvarianten ergab keine signifikanten Unterschiede der BG vor IVGTT-Durchführung.

Die Körpergewichts-adaptierte Glukosemenge im Rahmen des IVGTT betrug im Mittel 28.8 ± 5.4 g (minimal: 20.8 g; maximal 39.8 g); in der Folge wurden maximale BG-Spiegel von 14.9 ± 0.5 mmol l⁻¹ innerhalb von zwei (14 von 19

Probanden) bis maximal acht Minuten nach Applikation erreicht. Im Anschluss war bei allen Probanden eine kontinuierliche Reduktion der BG-Spiegel auf im Mittel $9.4 \pm 0.5 \text{ mmol l}^{-1}$ nach 60 Minuten zu beobachten. Beim Vergleich mit dem BG-Spiegel des Kontroll-HEC zu Beginn des HEC ($5.8 \pm 0.3 \text{ mmol l}^{-1}$) zeigte sich ein signifikanter ($p < 0.001$) Unterschied der beiden Versuchsvarianten. Unter hyperinsulinämisch-euglykämischen Bedingungen kam es bei allen Probanden zur Annäherung der BG-Spiegel beider Varianten. Im Verlauf der letzten 120 Minuten des Clamps waren keine signifikanten Unterschiede des BG-Spiegels von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC nachweisbar (Abb. 4).

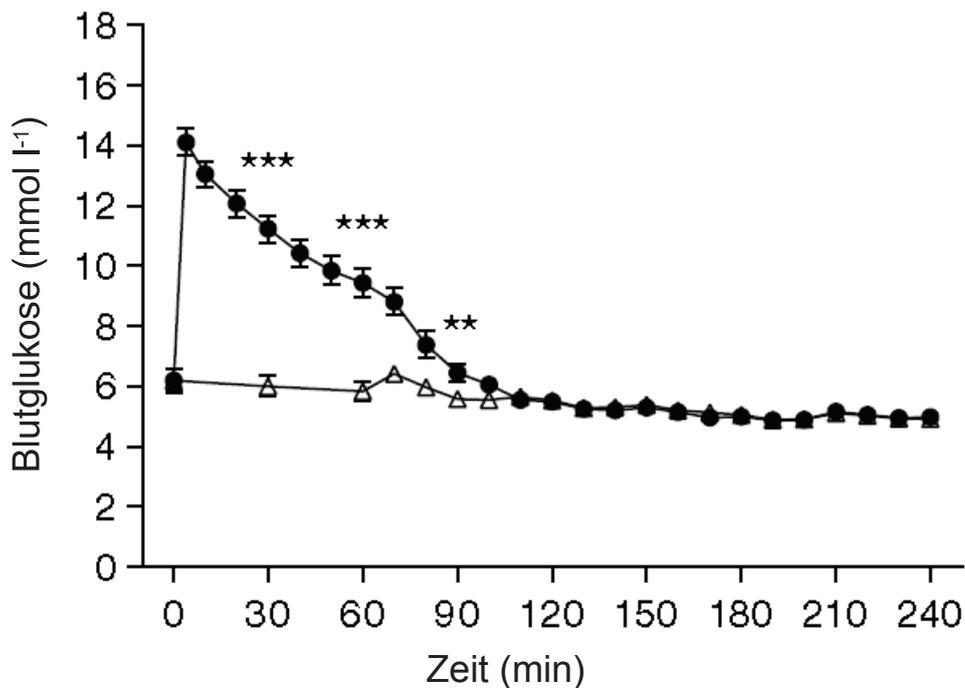


Abb. 4: Verlauf der BG von Kontroll-HEC (Δ) und Botnia-Clamp (●) Mittelwert \pm SEM, $p < 0.01$ (), $p < 0.001$ (***)**, Millimol (mmol), Liter (l), Minute (min)

β -Zell-Funktion

Nach vergleichbaren Ausgangswerten (Tabelle 8) in beiden Varianten zeigte sich eine deutliche Diskrepanz der Insulinspiegel von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC nach intravenöser Glukosegabe (Abb. 5). Zu Beginn des HEC resultierten signifikante Unterschiede mit deutlich erhöhten Insulinplasmaspiegeln in der Botnia-Variante (Botnia-Clamp: 207 ± 27 pmol l⁻¹, Kontroll-HEC: 77 ± 10 pmol l⁻¹, $p < 0.001$). Bereits nach halbstündigem HEC-Verlauf waren jedoch keine eindeutigen Unterschiede der beiden Versuchsvarianten mehr vorzufinden. Im weiteren Verlauf zeigten sich konstante Insulinspiegel, welche auch im Fließgleichgewicht beider Varianten fortbestanden (Abb. 6).

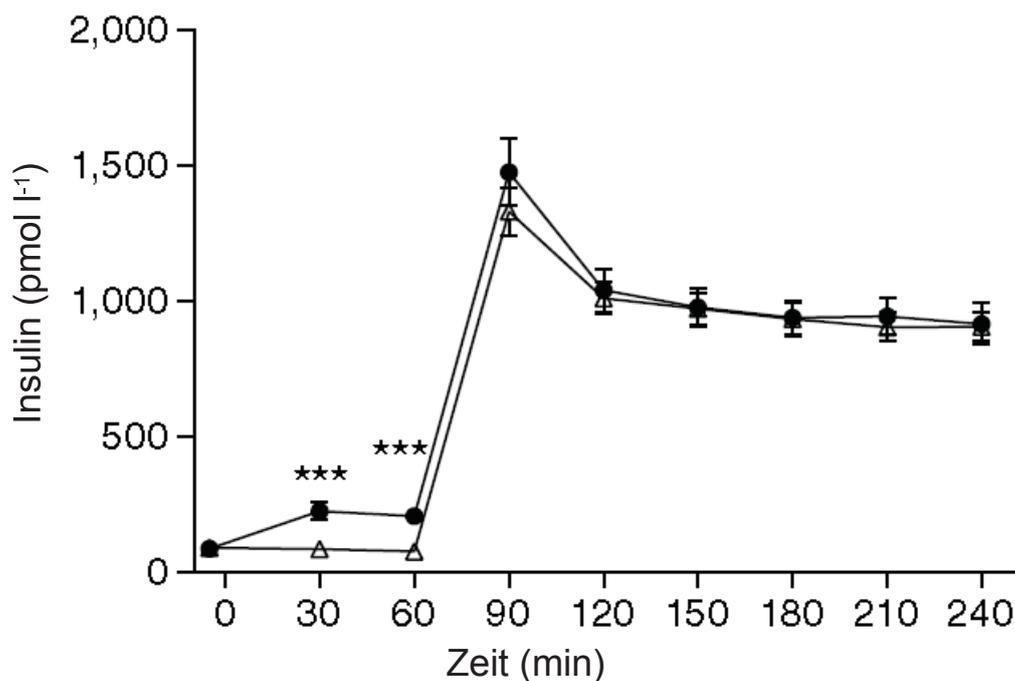


Abb. 5: Verlauf der Insulin-Plasmaspiegel von Kontroll-HEC (Δ) und Botnia-Clamp (\bullet) während IVGTT/NaCl-Bolus (0. – 60. Minute) sowie im HEC (60. – 240. Minute); Mittelwert \pm SEM; $p < 0.001$ (*)**; Picomol (pmol), Liter (l), Minute (min)

Ausgehend von vergleichbaren C-Peptid-Konzentrationen vor Versuchsbeginn (1.16 ± 0.4 und 1.14 ± 0.33 nmol l⁻¹) zeigten sich auch während der D2-Anreicherung entsprechende Plasmaspiegel in beiden Varianten. Im IVGTT zeigte sich ein eingipfligen Verlauf der C-Peptid-Konzentrationen, wobei maximale Plasmaspiegel nach 60 Minuten (2.06 ± 0.61 nmol l⁻¹) erreicht wurden. In der Kontrollvariante fanden sich zeitgleich annähernd konstante Plasmaspiegel (0.98 ± 0.32 nmol l⁻¹). Nach Erreichen der maximalen C-Peptid-Plasmaspiegel setzte auch in der Botnia-Variante eine kontinuierliche Elimination ein, die sich bis zum Ende des HEC fortsetzte. Abgesehen von vergleichbaren Plasmaspiegeln vor IVGTT-Durchführung fanden sich während IVGTT und HEC signifikant höhere C-Peptid-Plasmaspiegel in der Botnia-Variante (Abb. 6). Im Rahmen der Blutentnahme am Ende des Clamp-Experiments (240 min) wurden mittlere C-Peptid-Plasmaspiegel von 0.95 ± 0.42 und 0.77 ± 0.43 nmol l⁻¹ ($p < 0.05$) gemessen.

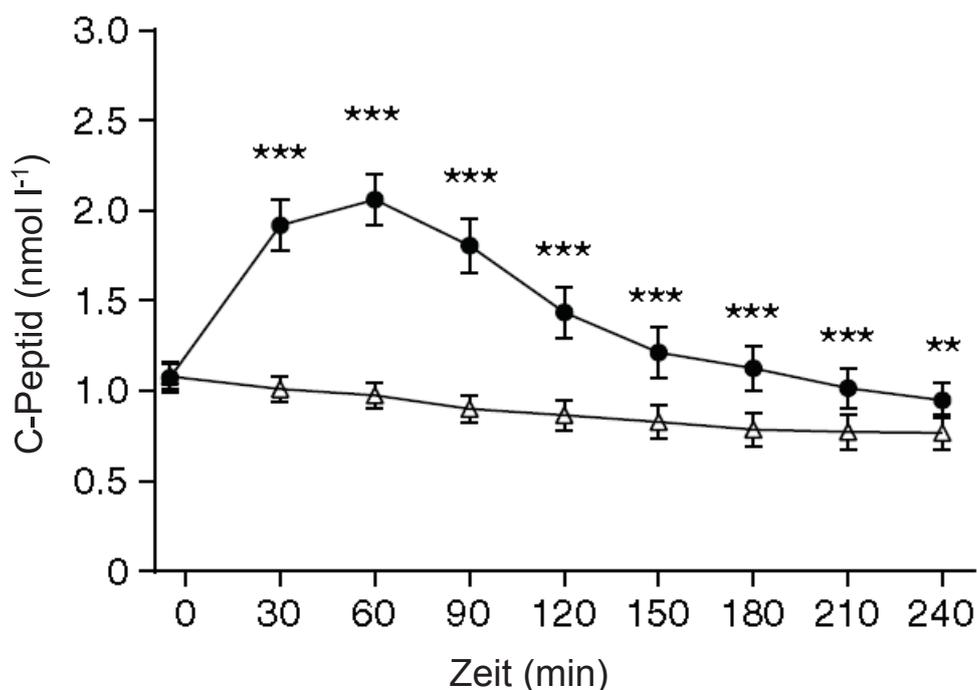


Abb. 6: Verlauf der C-Peptid-Plasmaspiegel von Kontroll-HEC (Δ) und Botnia-Clamp (●)
Mittelwert ± SEM; $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), Nanomol (nmol), Liter (l), Minute (min)

Die AIR des IVGTT betrug im Mittel $158 \pm 32 \text{ pmol l}^{-1}$, wobei eine ausgeprägte Variabilität innerhalb des Studienkollektivs bestand. Bei der Mehrheit ($n = 16$) der Studienteilnehmer war die Abgrenzung eines initialen Anstiegs der Insulinspiegel gefolgt von einer erneuten sekundären Steigerung nicht möglich. Stattdessen zeigte sich ein langsamer, einmaliger Anstieg der Insulinspiegel über den gesamten IVGTT-Verlauf. Lediglich bei drei Studienteilnehmern war nach initialem Anstieg zunächst ein kurzfristiger Rückgang der Insulinspiegel (10. bis 20. Minute) gefolgt von einem erneuten Anstieg zu beobachten. Die Variabilität der Insulinantwort spiegelte sich darüber hinaus vor allem in den maximal erreichten Insulinspiegeln (36.6 pmol l^{-1} bis 822 pmol l^{-1}) sowie den Zeitpunkten der jeweiligen Maxima wider. Bei zwei Probanden wurden maximale Insulin-Plasmaspiegel innerhalb der ersten zehn Minuten (0. – 10. Minute) gemessen, wohingegen sieben Probanden erst im Verlauf der letzten zehn Minuten (50. – 60. Minute) maximale Spiegel erreichten. Siebzehn Probanden erreichten somit maximale Insulinspiegel während der *second phase*. Die AUC für Insulin betrug $12.1 \pm 1.7 \text{ mmol l}^{-1}$ und $108.8 \pm 36.4 \text{ nmol l}^{-1}$ für C-Peptid.

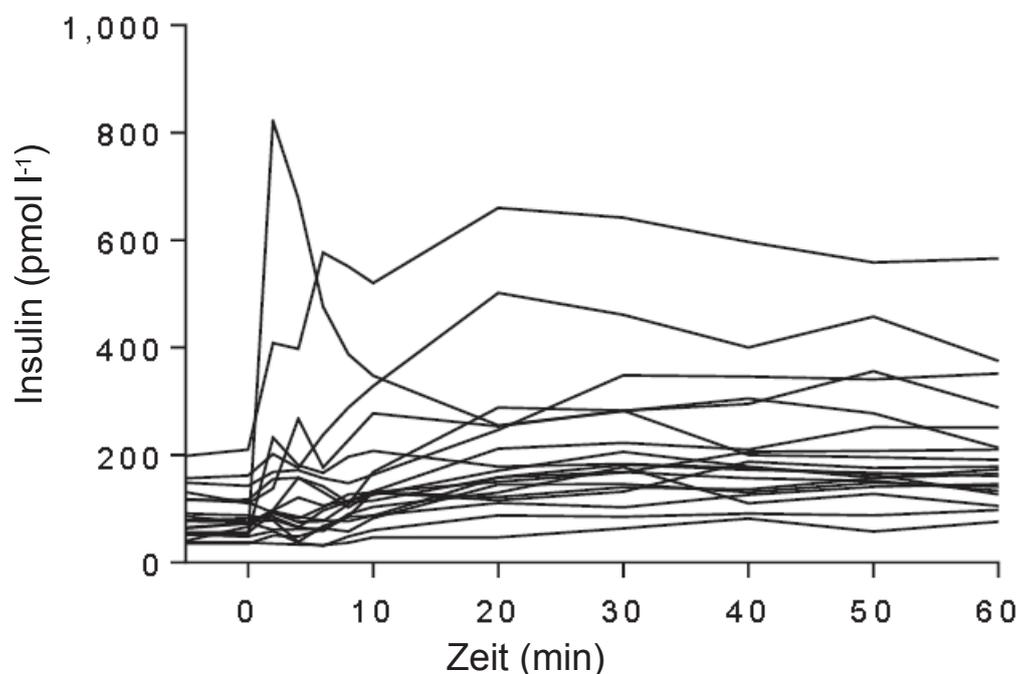


Abb. 7: Verlauf der Insulin-Plasmaspiegel im IVGTT Jede Linie repräsentiert einen Versuchsteilnehmer; Picomol (pmol), Liter (l), Minute (min)

Glukagon, Cortisol und FFA

Ausgehend von vergleichbaren Ausgangswerten ($113 \pm 27.8 \text{ ng l}^{-1}$, $111.5 \pm 21.5 \text{ ng l}^{-1}$) in Botnia-Clamp und Kontroll-HEC war nach Beginn des IVGTT – insbesondere innerhalb der ersten 30 Minuten – eine Reduktion der Glukagon-Plasmaspiegel vorzufinden (Abb. 8). Der größte Unterschied der Glukagonplasmaspiegel von Kontroll-Variante und Botnia-Clamp zeigte sich zu Beginn des HEC ($102 \pm 8 \text{ ng l}^{-1}$, $113 \pm 9 \text{ ng l}^{-1}$, $p < 0.05$). Im HEC-Verlauf kam es frühzeitig zu einer Annäherung der Glukagon-Plasmaspiegel von Kontroll-HEC und Botnia-Clamp, sodass im HEC keine signifikanten Unterschiede nachweisbar waren.

Die Plasmaspiegel von Cortisol wiesen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC auf. Während des IVGTT zeigten sich geringe Abweichung der Cortisol-Plasmaspiegel beider Varianten, wobei im HEC Verlauf vergleichbare Plasmaspiegel in Botnia-Clamp und Kontroll-HEC vorlag (Abb. 9). Im gesamten Verlauf zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Cortisol-Plasmaspiegel von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC.

Die Plasmaspiegel der FFA (Abb. 10) unterlagen einer ausgeprägten Reduktion im IVGTT-Verlauf, wohingegen in der Kontrollvariante konstante Plasmaspiegel bis zum Beginn des HEC zu beobachten waren. Bei HEC-Beginn lag somit ein signifikanter Unterschied der beiden Varianten vor ($0.44 \pm 0.04 \text{ mmol l}^{-1}$, $0.22 \pm 0.02 \text{ mmol l}^{-1}$, $p < 0.001$). Unter hyperinsulinämisch-euglykämischen Bedingungen fand eine deutliche Reduktion und Annäherung der FFA-Plasmaspiegel beider Varianten statt, in deren Folge keine signifikanten Unterschiede von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC nachweisbar waren. Die FFA-Inhibition unter HEC-Bedingungen reichte von 2.32 bis $7.55 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

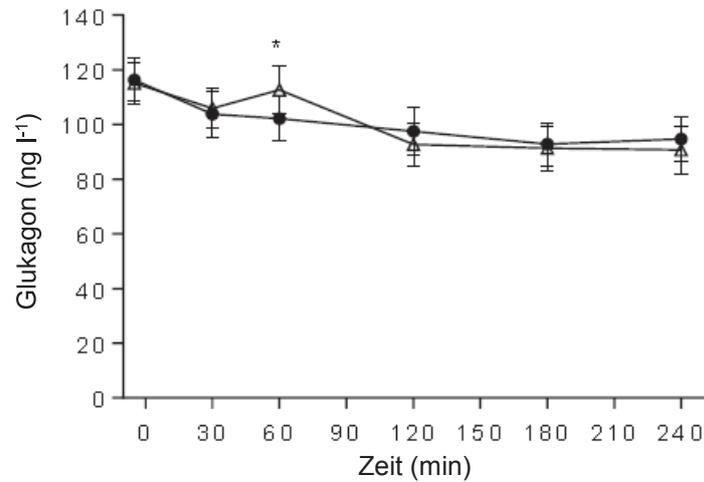


Abb. 8: Verlauf der Glukagon-Plasmaspiegel während Kontroll-HEC (Δ) und Botnia-Clamp (●)
Mittelwert ± SEM; $p < 0.05$ (*), Nanogramm (ng), Liter (l), Minute (min)

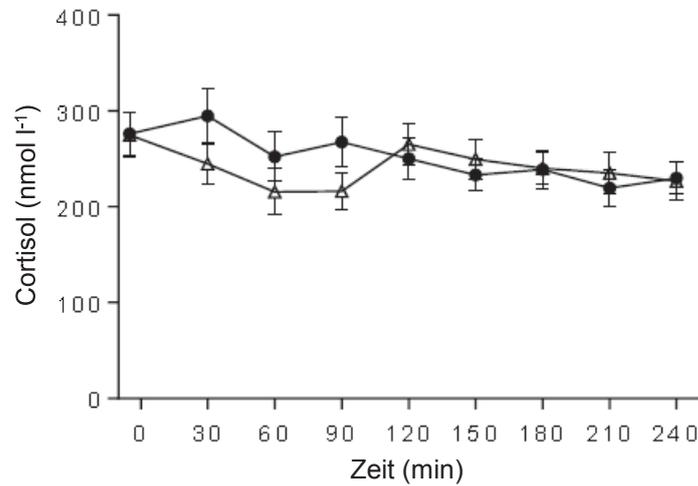


Abb. 9: Verlauf der Cortisol-Plasmaspiegel während Kontroll-HEC (Δ) und Botnia-Clamp (●)
Mittelwert ± SEM, Nanomol (nmol), Liter (l), Minute (min)

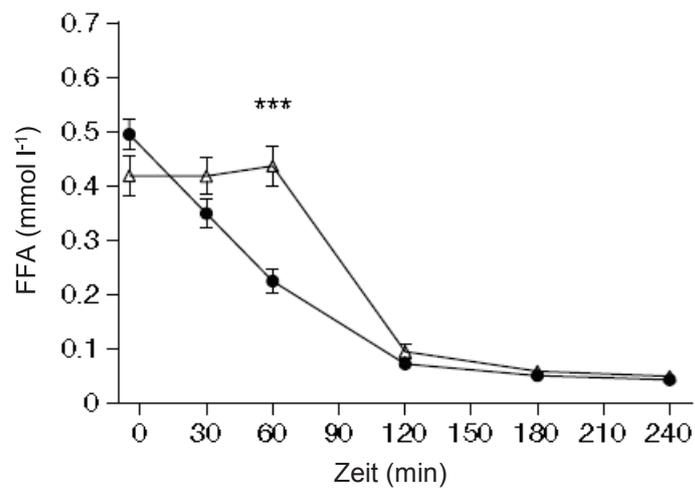


Abb. 10: Verlauf der FFA-Plasmaspiegel während Kontroll-HEC (Δ) und Botnia-Clamp (●)
Mittelwert ± SEM; $p < 0.001$ (***), Millimol (mmol), Liter (l), Minute (min)

Zytokine (TNF- α , MCP-1, IL1-RA)

Die im Rahmen der Studie untersuchten Entzündungsparameter wiesen im gesamten Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede der beiden Varianten auf (Tabelle 10). Die zwischenzeitliche Auswertung der Ergebnisse von 15 Versuchsteilnehmern zeigte keine Unterschiede der Plasmaspiegel der untersuchten Zytokine von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC, sodass die Bestimmung bei den letzten 4 Probanden (CV019, CV020, CV021, CV022) nicht fortgeführt wurde.

Minute	MCP-1 (pg ml ⁻¹)			TNF- α (pg ml ⁻¹)			IL1-RA (pg ml ⁻¹)		
	B	K	B / K	B	K	B / K	B	K	B / K
-120	423 ± 21	435 ± 27	0.97	1.37 ± 0.2	1.53 ± 0.2	0.9	374 ± 63	391 ± 81	0.96
-5	367 ± 19	365 ± 15	1	1.34 ± 0.2	1.35 ± 0.2	1	366 ± 66	407 ± 99	0.9
30	344 ± 15	353 ± 18	0.97	1.26 ± 0.2	1.37 ± 0.2	0.91	382 ± 66	391 ± 96	0.98
60	366 ± 22	375 ± 17	0.97	1.49 ± 0.2	1.43 ± 0.2	1.04	383 ± 67	409 ± 100	0.94
120	372 ± 17	391 ± 15	0.95	1.6 ± 0.3	1.72 ± 0.4	0.93	381 ± 66	402 ± 98	0.95
180	389 ± 17	432 ± 19	0.9	1.4 ± 0.2	1.58 ± 0.3	0.89	381 ± 60	399 ± 92	0.95
240	385 ± 15	400 ± 14	0.96	1.42 ± 0.2	1,37 ± 0.2	1.04	382 ± 64	404 ± 95	0.95

Tabelle 10: Verlauf der Entzündungsparameter Mittelwerte \pm SEM; Botnia-Clamp (B), Kontroll-HEC (K), Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1), Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL1-RA), Tumornekrosefaktor α (TNF α), Picogramm (pg), Milliliter (ml)

**Ruheenergieumsatz (REE), Respiratorischer Quotient (RQ),
Glukoseoxidation (GOX), Lipidoxidation (LOX)**

Der REE wies unter beiden Bedingungen sowie in beiden Varianten vergleichbare Werte auf. Unter HEC-Bedingungen zeigte sich eine geringe Zunahme des REE von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC in beiden Varianten ($\text{Botnia}_{\text{Basal/HEC}} \sim 1.03$; $\text{Kontrolle}_{\text{Basal/HEC}} \sim 1.01$). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied des REE von Basal- und HEC-Bedingungen der Botnia-Variante ($7719 \pm 304 \text{ kJ Tag}^{-1}$, $7987 \pm 322 \text{ kJ Tag}^{-1}$, $p < 0.05$), nicht jedoch für die Kontrollvariante ($7900 \pm 365 \text{ kJ Tag}^{-1}$, $7973 \pm 359 \text{ kJ Tag}^{-1}$). Der RQ wies vergleichbare Ausgangswerte (0.84 ± 0.01 ; 0.85 ± 0.02) sowie signifikante Zunahmen (0.95 , $p < 0.001$; 0.91 , $p < 0.01$) unter HEC Bedingungen in beiden Varianten auf. Die Zunahme des RQ im Botnia-Clamp stellte sich etwas ausgeprägter dar als in der Kontrollvariante (0.11 ± 0.02 ; 0.06 ± 0.02 ; $p < 0.05$). Die Ausgangswerte von GOX (Botnia-Clamp: $2.2 \pm 0.2 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Kontroll-HEC $2.5 \pm 0.3 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$) und LOX (Botnia-Clamp: $0.95 \pm 0.08 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$, Kontroll-HEC: $0.86 \pm 0.13 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$) wiesen keine signifikanten Unterschiede der beiden Varianten auf. Die Zunahme der GOX und Abnahme der LOX unter HEC-Bedingungen lieferte in beiden Varianten Unterschiede im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten (Tabelle 11). Die Veränderungen von GOX ($\Delta\text{GOX}_{\text{Botnia}} 2.2 \pm 0.3 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $\Delta\text{GOX}_{\text{Kontrolle}} 2.1 \pm 0.4 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $p < 0.05$) und LOX ($\Delta\text{LOX}_{\text{Botnia}} -0.82 \pm 0.12 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $\Delta\text{LOX}_{\text{Kontrolle}} -0.44 \pm 0.14 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $p < 0.05$) waren jedoch deutlich stärker ausgeprägt bei Durchführung der Botnia-Variante. Der nicht-oxidative Glukoseumsatz lieferte vergleichbare Werte ($4.6 \pm 0.7 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $4.6 \pm 0.7 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$) in Botnia-Clamp und Kontrollvariante (Abb. 11).

		Botnia-Clamp	Kontroll-HEC
GOX (mg kg [FFM] ⁻¹ min ⁻¹)	Basal	2.2 ± 0.2	2.5 ± 0.3
	Clamp	4.5 ± 0.3	3.7 ± 0.3
	$\Delta(\text{Clamp}, \text{Basal})$	2.2 ± 0.3*	1.2 ± 0.4*
LOX (mg kg [FFM] ⁻¹ min ⁻¹)	Basal	0.95 ± 0.08	0.86 ± 0.13
	Clamp	0.13 ± 0.12	0.42 ± 0.12
	$\Delta(\text{Clamp}, \text{Basal})$	-0.82 ± 0.12*	-0.44 ± 0.14*

Tabelle 11: Glukoseoxidation (GOX) und Lipidoxidation (LOX) in Botnia-Clamp / Kontroll-HEC
Mittelwerte ± SEM, $p_{\text{Botnia versus Kontrolle}} < 0.05$ (*), Milligramm (mg), Kilogramm (kg), Magermasse (FFM), Minute (min)

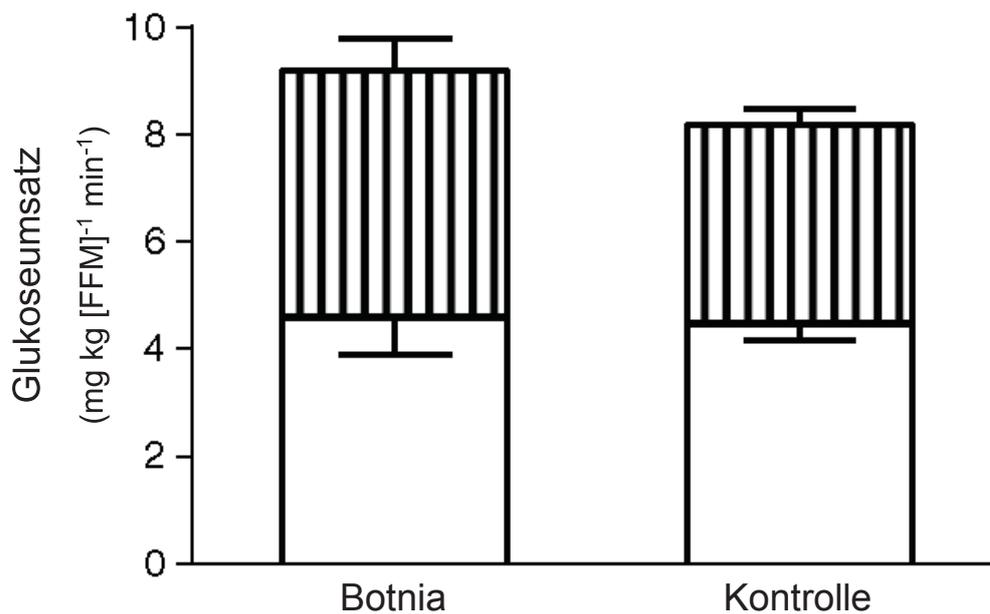


Abb. 11: Zusammensetzung des Glukoseumsatzes im HEC von Botnia-Clamp und Kontroll-Variante oxidativer Glukoseumsatz (gestreifter Bereich), nicht-oxidativer Glukoseumsatz (weißer Bereich); Mittelwert ± SEM; Milligramm (mg), Kilogramm (kg), Magermasse (FFM), Minute (min)

Endogene Glukoseproduktion (EGP)

Der Ausgangswert der EGP vor Gabe von Glukose (IVGTT) oder NaCl (Placebo) betrug in der Botnia Variante $11.6 \pm 1.0 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ und $13.6 \pm 0.8 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ in der Kontrollvariante. In Folge des IVGTT war eine deutliche Suppression ($58 \pm 12 \%$) der EGP mit Ausprägung eines signifikanten Unterschieds zum Ausgangswert ($\text{EGP}_{\text{Botnia60}} 4.8 \pm 1.2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, $p < 0.01$) zu beobachten. Bei Durchführung der Kontroll-Variante zeigte sich ebenfalls eine Suppression der EGP nach 60 Minuten ($22 \pm 10 \%$) ohne signifikanten Unterschied zum Ausgangswert ($\text{EGP}_{\text{Kontrolle60}} 10.1 \pm 1.0 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$). Zu Beginn des HEC lag ein signifikanter ($p < 0.001$) Unterschied der EGP von Botnia-Clamp und Kontrollvariante vor. Im Fließgleichgewicht des HEC fand sich wiederum eine vergleichbare EGP in beiden Varianten ($6.4 \pm 1.0 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; $5.9 \pm 0.7 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) mit einer Suppression der EGP (ΔEGP) von $51.6 \pm 6 \%$ im Botnia-Clamp sowie $66 \pm 4 \%$ im Kontroll-HEC (Abb. 12).

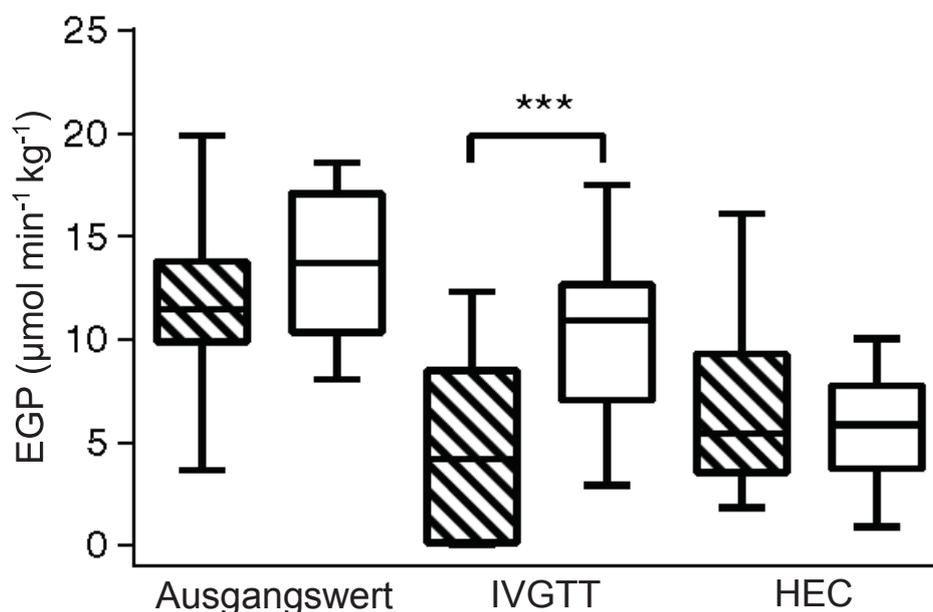


Abb. 12: Vergleich der EGP von Botnia-Clamp (schraffierte Blöcke) und Kontroll-Variante (weiße Blöcke) Ausgangswert: ~ 0. Minute, intravenöser Glukosetoleranztest (IVGTT): ~ 60. Minute, hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp (HEC): ~ 240. Minute; obere/untere Quartile, Median (Box, Strich), kompletter Wertebereich (Antennen); $p < 0.001$ (***), Kilogramm (kg), Minute (min), Micromol (μmol)

Hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp (HEC)

Die BG-Spiegel im Fließgleichgewicht des HEC beliefen sich auf $4.97 \pm 0.15 \text{ mmol l}^{-1}$ (Botnia-Clamp) und $4.99 \pm 0.11 \text{ mmol l}^{-1}$ (Kontroll-HEC), wodurch in beiden Varianten die Zielkonzentration von 5 mmol l^{-1} erreicht wurde. Zu Beginn des HEC wurde zunächst eine signifikant ($p < 0.001$) höhere GIR im Kontroll-HEC zur Aufrechterhaltung der Normoglykämie benötigt (Abb. 13). Im weiteren Verlauf näherten sich die GIR beider Varianten an, sodass keine signifikanten Unterschiede während der letzten 120 Minuten zu beobachten waren. Allerdings war eine geringfügig höhere GIR – verglichen mit dem Kontroll-HEC – im Botnia-Clamp notwendig, um den gewünschten Zielwert der BG aufrechtzuhalten (Abb. 13). Sechs Probanden wiesen jedoch eine höhere GIR in der Kontroll-Variante auf, sodass es sich nicht um einen einheitlichen Trend aller Probanden handelte (Abb. 14). Die mittleren M-Werte des HEC von ($8.7 \pm 0.8 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $8.1 \pm 0.7 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$) Botnia-Clamp und Kontroll-HEC waren vergleichbar, wobei es einen signifikanten Zusammenhang der beiden Varianten gab ($r = 0.87$; $p < 0.001$). Tabelle 12 liefert eine Übersicht der erhobenen M-Werte eines jeden Probanden. Der CV der M-Werte von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC betrug 11.0 %. Bei Verwendung der mittleren Insulinspiegel im Fließgleichgewicht des HEC zur Normierung der M-Werte (M/I) zeigte sich eine Steigerung der Korrelation beider Varianten ($1.09 \pm 0.14 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1} (\text{pmol l}^{-1})^{-1}$, $0.98 \pm 0.13 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1} (\text{pmol l}^{-1})^{-1}$, $r = 0.93$, $p < 0.001$), wobei gleichzeitig eine höhere individuelle Streuung (CV 12.8%) auftrat.

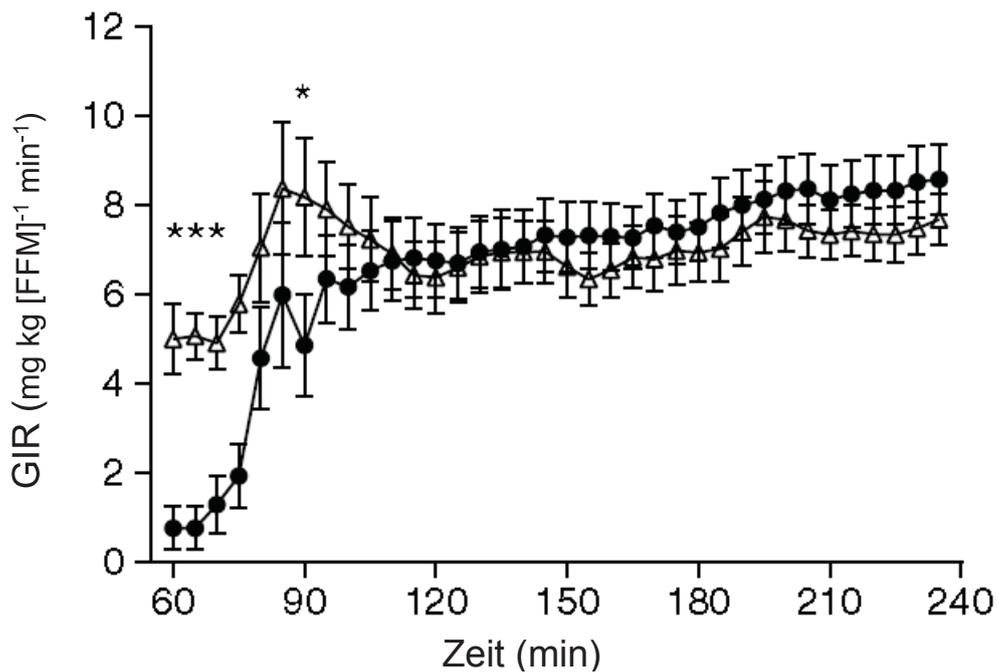


Abb. 13: Glukoseinfusionsrate (GIR) im HEC von Kontroll-Variante (Δ) und Botnia-Clamp (●)
Mittelwert ± SEM; $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (***), Milligramm (mg), Kilogramm (kg), Magermasse (FFM), Minute (min)

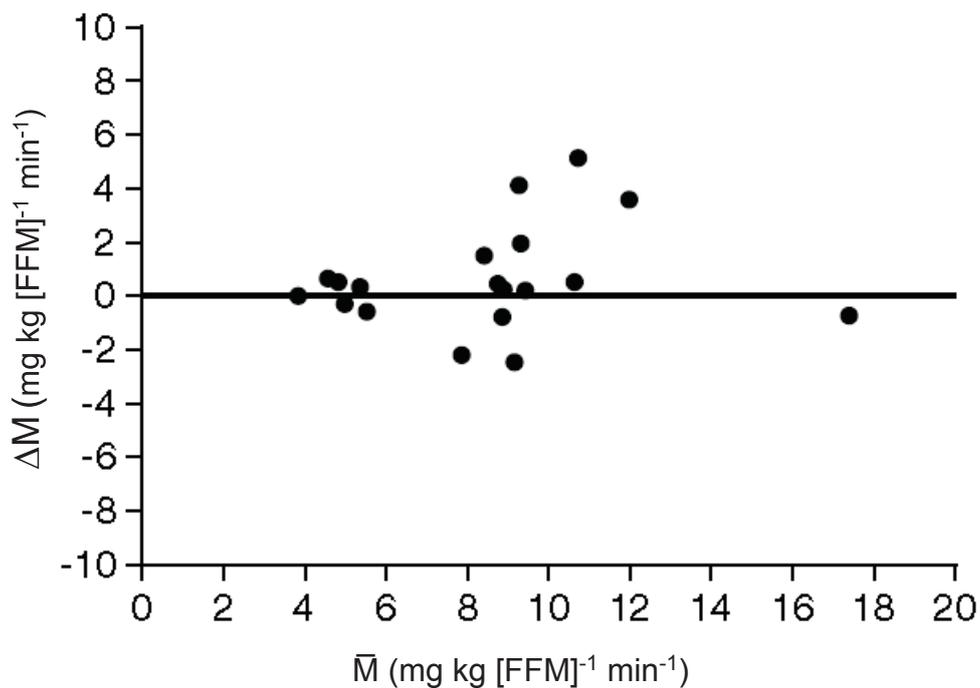


Abb. 14: Beziehung der M-Werte von Kontroll-HEC und Botnia-Clamp Mittelwert ± SEM;
Mittelwerte der individuellen M-Werte (\bar{M}), Differenz der individuellen M-Werte (ΔM), Milligramm (mg), Kilogramm (kg), Magermasse (FFM), Minute (min)

Probanden	M _{Botnia-Clamp} mg kg [FFM] ⁻¹ min ⁻¹	M _{Kontroll-HEC} mg kg [FFM] ⁻¹ min ⁻¹
CV001	9.53	9.32
CV003	11.33	7.21
CV005	8.98	8.52
CV006	4.83	5.12
CV007	13.30	8.16
CV008	5.24	5.81
CV009	9.01	8.77
CV010	10.90	10.38
CV011	9.17	7.66
CV012	4.91	4.24
CV013	5.53	5.19
CV014	13.79	10.19
CV015	8.47	9.25
CV016	7.94	10.39
CV017	10.30	8.34
CV019	6.76	8.96
CV020	5.09	4.57
CV021	3.84	3.84
CV022	17.03	17.75

Tabelle 12: Übersicht der individuellen M-Werte Milligramm (mg), Kilogramm (kg), Magermasse (FFM), Minute (min)

Korrelation der Insulinsensitivität mit metabolischen Parametern

Zur Überprüfung einer Einflussnahme auf die Insulinsensitivität wurden verschiedene Parameter bezüglich ihrer Verbindung zum M-Wert analysiert. Im Fokus standen Parameter, die einer signifikanten Beeinflussung durch den IVGTT unterlagen (Glukagon, FFA, Glukose, Δ GOX, Δ LOX, Δ RQ, EGP) wobei der Quotienten_{Botnia/Kontrolle} des M-Wertes und des jeweiligen Parameters auf eine mögliche Korrelationen untersucht wurden. Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang von M-Wert und Indices der β -Zell-Funktion (AIR, AUC_{Insulin}, AUC_{C-Peptid}, DI) überprüft.

Für EGP_{HEC}, AIR, AUC_{Insulin}, AUC_{C-Peptid}, DI sowie für die Quotienten_{B/K} Δ Glukagon_{60min}, Δ GOX, Δ LOX, Δ RQ, Δ EGP_{Basal/HEC}, Δ EGP_{50-58min} konnte keine Verbindung zum M-Wert gefunden werden. Hinweise eines möglichen

Zusammenhangs (Abb. 15) fanden sich jedoch für die Quotienten_{Botnia/Kontroll} von M-Wert und FFA_{60. Minute} ($r = -0.60$, $p < 0.01$). Die getrennte Analyse einer Korrelation der Plasmaspiegel (FFA_{60. Minute}) mit dem M-Wert der jeweiligen Versuchsvariante bestätigte den Zusammenhang (Botnia $r = -0.86$, $p < 0.001$; Kontrolle: $r = -0.69$, $p < 0.01$). Darüber hinaus wurde die Korrelation der basalen FFA-Spiegel vor IVGTT-Durchführung mit dem M-Wert bestimmt (Botnia: $r = -0.58$, $p < 0.01$; Kontrolle: $r = -0.59$, $p < 0.01$). Eine Korrelation von M-Wert und FFA-Inhibition war hingegen nicht nachweisbar. Ein Zusammenhang mit der FFA-Inhibition zeigte sich hingegen für AUC_{CP0-60} ($r = 0.68$, $p < 0.01$), AUC(Insulin)_{0.-60. Minute} ($r = 0.51$, $p < 0.05$) und AIR ($r = 0.79$, $p < 0.001$). Für den Quotienten_{Botnia/Kontrolle} von Glukose_{60. Minute} konnte ebenfalls eine Korrelation mit dem M-Wert_{Botnia/Kontrolle} gefunden werden ($r=0.59$, $p=0.0077$).

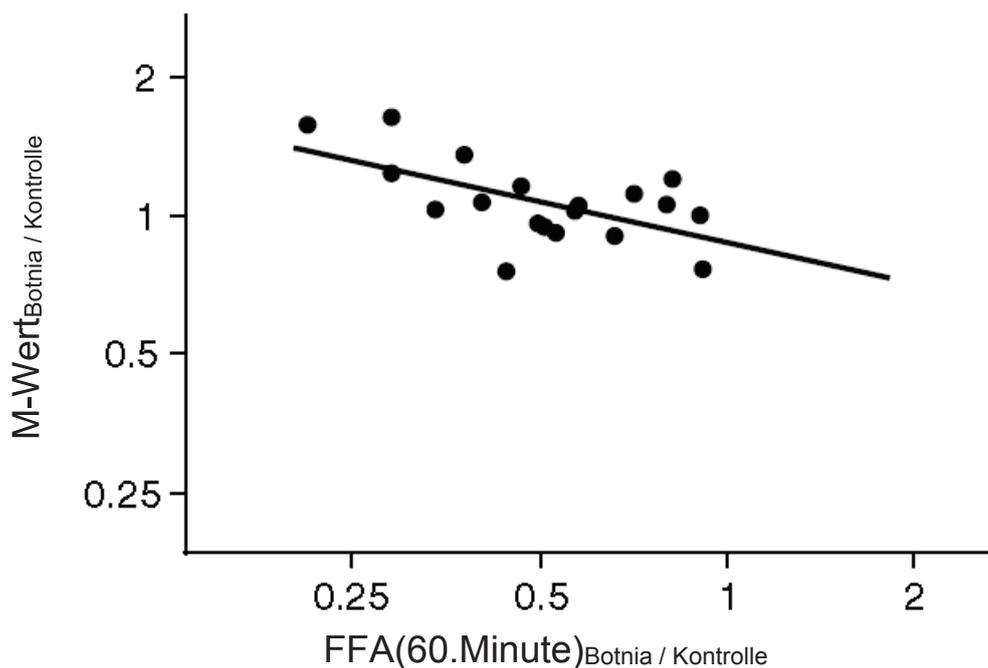


Abb. 15: Korrelation M-Wert_{Botnia / Kontrolle} mit FFA(60. Minute)_{Botnia/Kontrolle} Regressionsgerade, $r = -0.6$, $p < 0.01$; x-Achse und y-Achse sind log 2 skaliert; freie Fettsäuren (FFA)

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie sollte geklärt werden, ob die Kombination von IVGTT und HEC bei Patienten mit T2D eine Auswirkung auf das Ergebnis der Insulinsensitivität (M-Wert) hat. In verschiedenen Studien [6, 7, 8] wurde dieser Zusammenhang bereits untersucht, jedoch handelte es sich lediglich um Subgruppen-Untersuchungen größere Studien, wobei kleine Studienkollektive mit einem heterogenem / unbekanntem Bild der individuellen Glukosetoleranz untersucht wurden. Darüber hinaus wurden Auswirkungen des IVGTT auf metabolische oder endokrinologische Parameter (z.B. Cortisol, Glukagon, FFA, Insulin, TNF- α , MCP-1, IL1-RA) sowie die Insulin-medierte Unterdrückung der EGP als Maß der hepatischen Insulinsensitivität nicht berücksichtigt. Die vorliegende Studie stellt daher die erste Placebo-kontrollierte Untersuchung eines homogenen Studienkollektivs bestehend aus Patienten mit T2D dar, bei dem eine umfassende Aussage bezüglich möglicher IVGTT-assoziiierter Veränderungen im Mittelpunkt stand.

Die erbrachten Ergebnisse bestätigten die bereits zuvor [6, 7, 8] aufgezeigte Korrelation der M-Werte von Botnia-Clamp und Kontrollvariante, wobei in der vorliegenden Studie ein geringfügig höherer Glukoseumsatz im Fließgleichgewicht des HEC nach vorherigem IVGTT vorlag. Unter den analysierten Parametern wiesen FFA- und BG-Plasmaspiegel bei HEC-Beginn (60. Minute) eine signifikante Korrelation zum M-Wert auf. Die hepatische Insulinsensitivität (EGP) zeigte indes keinen Unterschied zwischen Botnia-Clamp und Kontroll-HEC, wies jedoch eine deutlich stärkere Variabilität der gemessenen EGP_{HEC} in der Botnia-Variante auf.

4.1 Einordnung der Studienergebnisse anhand der bestehenden Literatur

Studien	Studienkollektiv	Ergebnis
Perseghin et al [6]	n = 8 → 4 Verwandte 1. Grades von Patienten mit T2D (ohne Insulin-T.) → unbekannte Glukosetoleranz → 4 Kontroll-Probanden (NGT)	r = 0.95 p: keine Angabe
Lehto et al [7]	n = 10 → Verwandte 1. Grades von Patienten mit T2D (ohne Insulin-T.) → unbekannte Glukosetoleranz	r = 0.94 p < 0.0001
Tripathy et al [8]	n = 9 → 5 Patienten mit T2D → 4 Kontroll-Probanden (NGT)	r = 0.95 p < 0.005
Vorliegende Studie	n = 19 → 19 neu-diagnostizierte Patienten mit T2D	r = 0.87 p < 0.001

Tabelle 13: Vergleich mit vorherigen Studien zur Korrelation der Insulinsensitivität (M-Wert) von Botnia Clamp und alleinigem HEC Anzahl der Versuchsteilnehmer (n), Korrelationskoeffizient (r), Signifikanzniveau (p), Typ-2-Diabetes (T2D), Insulintherapie (Insulin-T.), normale Glukosetoleranz (NGT)

Eine kurze Übersicht zur Einordnung der erbrachten Ergebnisse anhand der bisherigen Studienlage ermöglicht Tabelle 13. In allen aufgeführten Studien wurde die Korrelation der Insulinsensitivität (M-Wert) im Rahmen eines HEC mit beziehungsweise ohne vorherigen IVGTT bestimmt. Allerdings bestehen Unterschiede der jeweiligen Studienprotokolle, weshalb eine detaillierte Betrachtung und Einordnung der Ergebnisse notwendig ist.

Perseghin et al [6] untersuchten vier Verwandte 1. Grades von T2D-Patienten mit unbekannter Glukosetoleranz sowie vier Probanden mit NGT und ohne T2D-Patienten in der Familie. Der Versuchsaufbau bestand aus einem 20-minütigen IVGTT (0.3 g[Glukose] kg[KG]⁻¹ / 20%ige Glukoselösung) gefolgt von einem 150-minütigen HEC in der Botnia-Variante. Detaillierte Informationen zum Ablauf der Kontrollvariante wurden nicht angegeben. Die Infusionsrate von Insulin im HEC-Verlauf betrug 1 mU kg⁻¹ min⁻¹, wobei sich in der Veröffentlichung keine Angaben bezüglich eines initialen Insulinbolus finden. Die Ziel-Glukosespiegel im Fließgleichgewicht des HEC orientierten sich am individuellen Ausgangswert. Als

Ergebnis wurde ein Unterschied der mittleren M-Werte von $4 \pm 11 \%$ ohne Angabe einer Tendenz zu niedrigeren oder höheren M-Werten in einer der beiden Varianten dokumentiert. Die Korrelation der M-Werte von Botnia-Clamp und Kontroll-SHEC betrug $r = 0.95$, sodass eine relevante Beeinflussung des M-Wertes durch den vorherigen IVGTT in der Botnia-Variante ausgeschlossen wurde.

In die Studie von Lehto et al [7] wurden zehn Familienmitglieder von T2D-Patienten mit unbekannter Glukosetoleranz eingeschlossen. Dem einstündigen IVGTT ($0.3 \text{ g [Glukose] kg [KG]}^{-1} / 50\%$ ige Glukoselösung) folgte ein zweistündiger HEC mit einer kontinuierlichen Insulininfusionsrate von $45 \text{ mU m}^{-2} \text{ min}^{-1}$ ($\sim 1 \text{ mU kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Angaben bezüglich eines Insulinbolus zu Beginn des HEC finden sich nicht. Die Zielkonzentration der Blutglukose im Fließgleichgewicht wurde auf 5.5 mmol l^{-1} festgelegt. Auch hier zeigte sich eine enge Korrelation der M-Werte ($r = 0.94$; $p = 0.0001$) von Botnia-Clamp und HEC (ohne IVGTT) ohne signifikante Unterschiede. Im Mittel war jedoch eine 7% höhere GIR bei Durchführung des Botnia-Clamps zu beobachten.

Die zuletzt veröffentlichte Studie von Tripathy et al [8] aus dem Jahr 2003 umfasste ein Studienkollektiv von fünf Patienten mit T2D sowie vier Probanden mit NGT. Das Studienprotokoll bestand aus einem einstündigen IVGTT ($0.3 \text{ g [Glukose] kg [KG]}^{-1} / 20\%$ ige Glukoselösung) sowie einem zweistündigen HEC (BG-Zielwert 5.5 mmol l^{-1}). Die Insulinsubstitution erfolgte in zwei Phasen bestehend aus einer Bolusrate zu Beginn des HEC – ohne nähere Angaben (Zeit, Konzentration) – und einer kontinuierlichen Infusionsrate von $45 \text{ mU m}^{-2} \text{ min}^{-1}$. Abermals wurde eine enge Korrelation ($r = 0.95$; $p < 0.005$) beider Varianten dokumentiert, wobei tendenziell niedrigere ($M_{\text{Kontrolle}} 7.79 \pm 1,14 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $M_{\text{Botnia}} 7.23 \pm 1.14 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $M_{B/K} 0.93$) mittlere M-Werte in der Botnia-Variante gemessen wurden.

In die ClaVa-Studie wurden nach sorgfältiger Auswahl 19 Patienten (8 Frauen; 11 Männer) mit kürzlich diagnostiziertem T2D eingeschlossen. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien wurde auf eine möglichst homogene Kohorte bezüglich Glukosetoleranz, Erkrankungsdauer, Gewicht und Therapieform geachtet. Mit Hilfe von Verhaltensregeln vor Versuchsdurchführung wurde darüber hinaus versucht, möglichst vergleichbare Bedingungen bei allen Probanden zu Versuchsbeginn zu

gewährleisten. Das speziell auf den Vergleich der muskulären (M-Wert) und hepatischen (EGP) Insulinsensitivität von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC ausgelegte, Placebo-kontrollierte Versuchsprotokoll, ermöglichte zudem eine weitreichende Übereinstimmung der Versuchsbedingungen. Dies ist aufgrund der Variabilität und Abhängigkeit des M-Wertes von verschiedenen Faktoren entscheidend [2, 101] und wurde in den zuvor aufgeführten Studien nicht berücksichtigt, beziehungsweise in den Veröffentlichungen nicht dokumentiert. Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal der vorliegenden Studie besteht in der Analyse verschiedener endokrinologischer und metabolischer Parameter. Die Auswahl der untersuchten Parameter orientierte sich an ihrer Relevanz für den Glukosestoffwechsel sowie den T2D und ermöglicht somit eine umfangreiche Aussage bezüglich des IVGTT-Einflusses auf verschiedene T2D-assoziierte Parameter. Der Ablauf von IVGTT und HEC entsprach weitgehend jenem der vorherigen Studien [6, 7, 8], wobei eine Substitution von 6,6-²H₂-Glukose zur EGP-Bestimmung benötigt wurde. Der Glukosebolus im IVGTT belief sich entsprechend den vorherigen Studien auf 0.3 g [Glukose] kg [Körpergewicht]⁻¹ (30%ige Glukoselösung). Die Insulinsubstitution des dreistündigen HEC erfolgte in zwei Phasen, bestehend aus einem zehnmütigen Bolus (10 mU kg [Körpergewicht]⁻¹ min⁻¹) zu Beginn des HEC und einer kontinuierlichen Infusionsrate (1.5 mU (kg [Körpergewicht] min)⁻¹) zur Aufrechterhaltung der Hyperinsulinämie. Im Vergleich zu den zuvor erwähnten Studien [6, 7, 8] wurde eine geringfügig höhere Insulinsubstitution gewählt, wodurch erhöhte M-Werte auftreten könnten. Allerdings handelte es sich bei der ClaVa-Studie ausschließlich um manifeste T2D-Patienten, bei denen eine stärker ausgeprägtere IR (vergleiche Tabelle 14) zu vermuten ist. Als Zielwert der BG im Fließgleichgewicht des HEC wurde entsprechend den vorherigen Studien ein Plasmaspiegel von 5.0 mmol l⁻¹ angestrebt.

4.2 Auswirkungen des IVGTT auf den M-Wert

Die aufgezeigte Korrelation ($r = 0.87$, $p < 0.001$) der M-Werte von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC bestätigte die Ergebnisse der vorherigen Studien [6, 7, 8] und spricht gegen einen relevanten Einfluss des IVGTT auf die muskuläre Insulinsensitivität (M-Wert). Bei 13 der 19 Probanden zeigte sich jedoch eine Steigerung der GIR nach IVGTT-Durchführung, wodurch im Mittel höhere M-Werte im Botnia-Clamp dokumentiert wurden ($\text{Quotient}_{\text{Botnia/Kontrolle}} 1.07$). Die übrigen sechs Probanden wiesen hingegen einen reduzierten Glukoseumsatz nach IVGTT-Durchführung auf. Letztendlich fand sich kein signifikanter Zusammenhang von IVGTT und gesteigerten M-Werten beim Vergleich von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC.

Lehto et al berichteten bereits zuvor über einen entsprechenden Anstieg der M-Werte von 7 % im Botnia-Clamp bei Vergleich mit einem alleinigen HEC [7]. Es finden sich allerdings keine Angaben bezüglich des individuellen Verhaltens der M-Werte innerhalb des Studienkollektivs. Im Gegensatz zu höheren M-Werten im Botnia-Clamp bei Lehto et al sowie der ClaVa-Studie dokumentierten Tripathy et al [8] erniedrigte M-Werte ($M_{\text{Kontrolle}} 7.79 \pm 1,14 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $M_{\text{Botnia}} 7.23 \pm 1.14 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $M_{\text{B/K}} 0.93$) in der Botnia-Variante bei vergleichbarem Studienprotokoll (siehe 4.1). Der markanteste Unterschied zwischen den erwähnten Studien bestand in den jeweils eingeschlossenen Studienkollektiven von Tripathy et al (NGT: $n = 4$, T2D: $n = 5$), Lehto et al (unbekannte Glukosetoleranz: $n = 10$) und der ClaVa-Studie: (T2D: $n = 19$), auf Grund derer die Möglichkeit einer Assoziation von M-Wert-Zunahme und Ausprägung eines T2D besteht. Versuchsteilnehmer mit besonders niedrigen M-Werten ($M\text{-Wert} < 6 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$) – entsprechend einer fortgeschrittenen IR – wiesen jedoch keinen ausgeprägten Unterschied der M-Werte von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC auf. Es war hingegen auffällig, dass insbesondere Probanden mit mittleren M-Werten zwischen $8 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und $12 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$ eine deutliche Veränderung des M-Wertes von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC aufzeigten. Patienten mit entsprechenden M-Werten ($8 - 12 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$) könnten somit als besonders sensibel bezüglich einer intravenösen Glukosegabe sowie anderen metabolischen Einflüssen gelten.

Abgesehen von einer möglichen Beeinflussung des M-Wertes durch den IVGTT muss zudem die Verfahrens-bedingte Variabilität berücksichtigt werden. Der Variationskoeffizient (CV) gilt in diesem Zusammenhang als Maß der zu erwartenden Variabilität des M-Wertes trotz eines identischen Versuchsprotokolls. Zuvor dokumentierte Angaben des CV ergaben eine mittlere Abweichung von ungefähr 10 % (Roden [2]: 10 %, Tripathy et al [8]: 9,0 %, Le et al [110]: 10,3%). Die Bestimmung des Variationskoeffizienten der vorliegenden Studie lieferte ein vergleichbares Ergebnis (11 %), welches wiederum eine natürliche HEC-assoziierte Begründung der vorgefundenen Schwankungen nahelegt. Eine entsprechende Schlussfolgerung unterstützt der uneinheitliche Trend der M-Werte beim Vergleich der beiden Versuchsvarianten (M-Wert_{B<K}: 6 Probanden, M-Wert_{B>K}: 13 Probanden).

Trotz der weit verbreiteten Verwendung des HEC zur Einschätzung der individuellen Insulinsensitivität existieren keine international anerkannten Grenzwerte zur Abgrenzung einer IR. Verschiedene Studien lieferten jedoch Hinweise bezüglich der zu erwartenden M-Werte. Ferrannini et al [111] dokumentierten unter anderem einen mittleren M-Wert von $8.1 \pm 3.3 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei Analyse von über 500 übergewichtigen Probanden ($\text{BMI } 29.34 \pm 4.4 \text{ kg m}^{-2}$) mit NGT (Insulininfusion_{HEC}: $1 \text{ mU kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Die ClaVa-Kohorte stimmte in BMI ($32.4 \pm 6.1 \text{ kg m}^{-2}$) sowie M-Wert (Kontroll-HEC: $8.1 \pm 0.7 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$) weitgehend mit den Angaben von Ferrannini et al überein. Im Gegensatz zu Ferrannini et al handelte es sich bei der ClaVa-Studie jedoch um Patienten mit manifestem T2D bei denen eine geringfügig höhere Insulininfusion_{HEC} ($1.5 \text{ mU kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) verwendet wurde. Die Betrachtung der Ergebnisse beider Studien zeigt, dass eine T2D-vergleichbare, muskuläre IR auch bei übergewichtigen Patienten mit NGT bestehen kann. Eine Übersicht (Tabelle 14) von M-Werten verschiedener Studienkollektive soll die Abhängigkeit der M-Werte von der verwendeten Insulinsubstitution_{HEC} sowie Einschränkungen der Verbindung von M-Wert und Glukosetoleranz aufzeigen.

Studie	Kollektiv-Charakteristika	M-Wert (mg kg [FFM] ⁻¹ min ⁻¹)
Tam et al [113]	Normale Glukosetoleranz Übergewicht Insulin ~ 2 mU kg ⁻¹ min ⁻¹	10.8 ± 4.0
Vorliegende Studie	Typ 2 Diabetes Adipositas Insulin 1.5 mU kg ⁻¹ min ⁻¹	8.41 ± 3.3
Ferranini et al [111]	Normale Glukosetoleranz Normalgewicht Insulin 1 mU kg ⁻¹ min ⁻¹	7.1 ± 2.1
Ferranini et al [111]	Normale Glukosetoleranz Übergewicht Insulin 1 mU kg ⁻¹ min ⁻¹	5.5 ± 2.0
Bavenholm et al [114]	Gestörte Glukosetoleranz Übergewicht Insulin 1 mU kg ⁻¹ min ⁻¹	5.4 ± 0.9
Bavenholm et al [114]	Typ 2 Diabetes Übergewicht Insulin 1 mU kg ⁻¹ min ⁻¹	4.7 ± 1.4
Tam et al [113]	Typ 2 Diabetes Adipositas Insulin ~ 2 mU kg ⁻¹ min ⁻¹	3.3 ± 0.7

Tabelle 14: Übersicht der mittleren M-Werte verschiedener Studienkollektive *Body mass index* 25-30 kg m⁻² (Übergewicht), *Body mass index* > 30 kg m⁻² (Adipositas), Milligramm (mg), Kilogramm (kg), Magermasse (FFM), Minute (min), Milliunits (mU)

Einen ersten Versuch der Definition klarer Grenzwerte des M-Wertes Abgrenzung einer IR unternahmen Bergman et al [112] bereits 1985 durch die Auswertung verschiedener Studien. Zuletzt versuchten Tam et al [113] einen erneuten Anlauf durch Auswertung der Ergebnisse von Probanden mit NGT (n = 116) sowie Patienten mit manifestem T2D (n = 51), wobei eine Insulininfusion von 120 mU m⁻² min⁻¹ (~ 3 mU kg⁻¹ min⁻¹) gewählt wurde. Der vorgeschlagene Grenzwert zur Differenzierung einer Insulinsensitivität / Insulinresistenz eines Probanden wurde unter diesen Bedingungen mit 7.3 mg kg [FFM]⁻¹ min⁻¹ bei einer Sensitivität von 71 % und einer Spezifität 72 % angegeben. Zusätzlich durchliefen 86 Probanden (NGT: n = 75, T2D: n = 11) einen dreistündigen HEC mit einer Insulininfusion von 80 mU m⁻² min⁻¹ und einem angestrebten BG-Spiegel von 5.0 – 5.6 mmol l⁻¹. Unter

diesen Bedingungen ermittelten Tam et al einen Grenzwert des Insulin-induzierten Glukoseumsatzes von $5.3 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Sensitivität: 83 %, Spezifität: 96 %). Der zuletzt genannte Versuchsaufbau entspricht annähernd den Rahmenbedingungen der vorliegenden Studie (Dauer: 3 Stunden; Insulindosierung: $1.5 \text{ mU kg}^{-1} \text{ min}^{-1} \sim 68.6 \text{ mU m}^{-2} \text{ min}^{-1}$, $\text{BG}_{\text{Zielwert}} 5 \text{ mmol l}^{-1}$), sodass eine Anwendung des vorgeschlagenen Grenzwertes auf das Ergebnis des M-Wertes der ClaVa-Studie – mit geringen Einschränkungen – möglich erscheint. Unter Berücksichtigung des von Tam et al vorgeschlagenen Grenzwertes, ergab sich für zwei Probanden der ClaVa-Studie ($\text{CV008}_{\text{Botnia}}: 5.24 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$ versus $\text{CV008}_{\text{Kontrolle}}: 5.81 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $\text{CV013}_{\text{Botnia}}: 5.53 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$ versus $\text{CV013}_{\text{Kontrolle}}: 5.19 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$) eine abweichende Einschätzung der Insulinsensitivität anhand der M-Werte aus Botnia-Clamp und Kontrollvariante. Gemessen am Gesamtkollektiv entspricht dies annähernd 10 % aller Probanden. Verglichen mit den Abweichungen der übrigen Studienteilnehmer handelte es sich bei beiden Probanden lediglich um geringe Abweichungen der M-Werte beider Varianten, sodass ein ausgeprägter Einfluss des IVGTT fraglich erscheint. Auf Grund der etwas geringeren Insulininfusionsrate im Rahmen der ClaVa-Studie (Tam et al: $80 \text{ mU m}^{-2} \text{ min}^{-1}$; ClaVa-Studie: $1.5 \text{ mU kg}^{-1} \text{ min}^{-1} \sim 68.6 \text{ mU m}^{-2} \text{ min}^{-1}$) ist zudem ein etwas niedrigerer Grenzwert des Insulin-induzierten Glukoseumsatzes zu vermuten. Die M-Werte in diesem Bereich ($< 8 \text{ mg kg [FFM]}^{-1} \text{ min}^{-1}$) wiesen jedoch ebenfalls nur geringe Abweichungen von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC auf. Darüber hinaus ist zu vermuten, dass Varianten-unabhängige Schwankungen des M-Wertes – auf Grund der natürlichen, HEC-assoziierten M-Wert-Variabilität (CV: $\sim 10 \%$) [2, 8, 110] – ein ebenbürtiges Risiko für die Einteilung von Insulin-sensitiven und Insulin-resistenten Probanden darstellt. Letztendlich erscheint das Risiko einer verfälschten Einschätzung der Insulin-Sensitivität durch einen vorherigen IVGTT gering.

4.3 Einfluss des IVGTT auf Stoffwechselfparameter und Hormone

Neben den Parametern der β -Zell-Funktion (AIR, AUC_{Insulin} , $AUC_{\text{C-Peptid}}$, DI) – die keine nachweisbare, direkte Verbindung zum M-Wert aufwiesen – konnte in der ClaVa-Studie für verschiedene Parameter, die einer IVGTT-induzierten Veränderung unterlagen, ein signifikanter Bezug zum Insulin-induzierten Glukoseumsatz im Fließgleichgewicht des HEC gefunden werden.

4.3.1 Einfluss von Insulin auf den M-Wert

Für Insulinspiegel im IVGTT-Verlauf zeigte sich keine Verbindung zum M-Wert, allerdings führte die Adjustierung der M-Werte durch die jeweiligen Insulinspiegel (Quotienten $_{M/I}$) im Fließgleichgewicht des HEC zu einer Steigerung der Korrelation von Botnia-Clamp und Kontrollvariante (M/I: $r = 0.93$; $p < 0.001$ versus M-Wert: $r = 0.87$, $p < 0.001$). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Schwankungen der Insulinkonzentration einen Einfluss auf die M-Werte besitzen. DeFronzo et al [115] zeigten bereits zuvor, dass erhöhte Insulinspiegel im Fließgleichgewicht des HEC – trotz ausgeprägter Hyperinsulinämie – zu einer Steigerung des induzierten Glukoseumsatzes führen.

Eine direkte Assoziation mit dem IVGTT ist auf Grund fehlender Unterschiede der peripheren Insulinspiegel im Fließgleichgewicht beider Versuchsvarianten fraglich. Denkbar wäre jedoch eine langfristig gesteigerte, endogene Insulinproduktion in Folge des IVGTT, welches sich anhand signifikant erhöhter C-Peptid-Plasmaspiegel im gesamten HEC-Verlauf des Botnia-Clamps nachweisen lässt. Eine portal-venöse Bestimmung der Hormonkonzentration könnte über eine gesteigerte endogene Glukoseproduktion im HEC des Botnia-Clamps Aufschluss geben, wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Studie nicht durchgeführt.

4.3.2 Einfluss von Glukose auf den M-Wert

Nach den IVGTT-induzierten Unterschieden der Glukosespiegel beider Varianten konnte die BG im Fließgleichgewicht des HEC bei allen Probanden sowie in beiden Varianten auf vergleichbare Werte eingestellt werden. Für die Glukosespiegel im IVGTT-Verlauf zeigte sich hierbei keine Verbindung zum M-

Wert. Allerdings fanden sich Hinweise auf eine Korrelation der Quotienten_{Botnia/Kontrolle} von M-Wert und BG_{60. Minute} ($r = 0.59$, $p = 0.0077$). Dass Glukose selbst eine wichtige Rolle bei der Regulation der Glukosehomöostase einnimmt, wurde in verschiedenen Studien gezeigt und wird als *Glucose effectiveness* bezeichnet [116]. Vergleichbar mit Insulin, vermitteln gesteigerte Glukosespiegel eine Stimulation der peripheren Glukoseaufnahme sowie eine Inhibition der EGP [116]. Manche Autoren beschreiben sogar eine vergleichbare beziehungsweise stärkere Regulation der Glukoseaufnahme durch Glukose als durch Insulin [117]. Die zeitlich versetzte Auswirkung eines intravenösen Glukosebolus (z.B. 30%-Glukosebolus im IVGTT) auf die Glukosehomöostase im Fließgleichgewicht eines dreistündigen HEC wurde unserer Kenntnis nach bislang nicht untersucht. Die vorliegende Studie liefert Anhaltspunkte, dass eine langfristige Beeinflussung der muskulären Glukoseaufnahme durch einen Glukosebolus möglich ist.

4.3.3 Einfluss von FFA auf den M-Wert

Abgesehen von Insulin und Glukose unterlagen insbesondere FFA-Plasmaspiegel einer deutlichen IVGTT-induzierten Veränderung und wiesen die stärkste Korrelation zum M-Wert auf. Nach vergleichbaren Ausgangswerten in beiden Varianten war eine deutliche Reduktion der FFA-Plasmaspiegel bei IVGTT-Durchführung gegenüber der Kontroll-Variante zu beobachten. Die maximale Diskrepanz der beiden Varianten wurde unmittelbar vor HEC-Beginn gemessen. Zu diesem Zeitpunkt (60. Minute) konnte ein Zusammenhang der Quotienten_{Botnia/Kontrolle} von FFA_{60. Minute} und M-Wert nachgewiesen werden ($r = -0.60$, $p < 0.01$). Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass Unterschiede der FFA-Plasmaspiegel vor Beginn der Clamp-Untersuchung (FFA_{60. Minute}) einen abweichenden Glukoseumsatz im Fließgleichgewicht induzieren. Perseghin et al [118] untersuchten bereits zuvor eine entsprechende Verbindung von Nüchtern-FFA-Plasmaspiegeln und M-Wert an 57 Probanden (keine Adipositas, NGT), wobei eine signifikante Korrelation ($r = -0.58$, $p < 0.0001$) der beiden Parameter aufgezeigt wurde. Diese Beobachtung lässt sich im Rahmen der ClaVa-Studie mit vergleichbarer Ausprägung (Botnia: $r = -0.58$, $p < 0.01$; Kontrolle: $r = -0.59$,

$p < 0.01$) auch an Patienten mit T2D beobachten. Allerdings wiesen die $FFA_{60\text{.Minute}}$ insbesondere in der Botnia Variante (Botnia $r = -0.86$, $p < 0.001$; Kontrolle: $r = -0.69$, $p < 0.01$) eine noch engere Korrelation zum M-Wert auf. Folglich scheinen reduzierte FFA-Plasmaspiegel in Folge des IVGTT einen engeren Bezug zum M-Wert aufzuweisen als basale oder unveränderte (Kontrollvariante) FFA-Spiegel. Die Korrelation der FFA-Spiegel vor HEC-Beginn mit dem M-Wert im Botnia-Clamp liefern entsprechende Anhaltspunkte für einen möglichen Einfluss des IVGTT auf die Bestimmung der Insulinsensitivität. Unter experimentellen Bedingungen wurden zuvor Veränderungen der Insulinsensitivität durch Steigerung [84] oder Reduktion [119] der zirkulierenden FFA-Plasmaspiegel beschrieben. Santomauro et al [119] untersuchten den Effekt einer Acipimox-induzierten, langanhaltenden Reduktion der FFA-Spiegel auf den M-Wert. Gefunden wurde eine deutliche Steigerung des Insulin-vermittelten Glukoseumsatzes durch die medikamentös verminderten FFA-Spiegel. Roden et al [86] zeigten zudem, dass unter kontinuierlicher, intravenöser FFA-Applikation signifikante Auswirkungen auf den M-Wert bereits nach 160 Minuten auftreten. Ein vergleichbarer Rückgang des Insulin-induzierten Glukoseumsatzes (M-Wert) wurde darüber hinaus auch für eine einmalige, orale Applikation von FFA / TAG in Form von 100 ml Sojaöl aufgezeigt [120]. Gemeinsam betrachtet unterstützen diese Studien die Vermutung, dass eine kurzfristige Reduktion der FFA-Spiegel im IVGTT-Verlauf zu einer Zunahme des Insulin-induzierten Glukoseumsatzes führen könnte.

4.3.4 Auswirkungen des IVGTT auf den Energiestoffwechsel im HEC

Auf Grund der vorhandenen Auswirkungen des IVGTT auf zwei entscheidende Energieträger (Glukose, FFA) sowie deren Bezug zum M-Wert ist eine Anpassung des zellulären Energiestoffwechsel im Fließgleichgewicht des HEC zu vermuten. Folglich könnte nach IVGTT-Durchführung auf Grund der gesteigerten BG eine Reduktion der Lipidoxidation bei gleichzeitiger Steigerung Glukoseoxidation auftreten. Diese Anpassung des zellulären Energiestoffwechsels an verschiedene Energielieferanten wird als metabolische Flexibilität bezeichnet [121]. Bei Insulin-resistenten Probanden ist wiederum mit einer Störung dieser zellulären

Anpassung zu rechnen [121]. Da es sich in der vorliegenden Studie um kürzlich diagnostizierte Typ-2-Diabetiker handelt, ist auch hier eine Einschränkung der metabolischen Flexibilität möglich.

Bei der Auswertung von Messdaten der indirekten Kalorimetrie zeigten sich bei allen Versuchsteilnehmern vergleichbare Tendenzen (Ausgangswert versus HEC-Bedingungen) der Parameter (REE \uparrow , RQ \uparrow , GOX \uparrow , LOX \downarrow) in Botnia-Clamp und Kontroll-HEC, wobei der IVGTT eine Verstärkung der jeweiligen Veränderungen bewirkte. Die signifikant stärkere Zunahme von Δ RQ ($p < 0.05$) und Δ GOX ($p < 0.05$) sowie die ebenfalls signifikant stärkere Abnahme der Δ LOX ($p < 0.05$) nach vorherigem IVGTT zeigen bei vergleichbarem REE eine deutliche Verschiebung zu Gunsten von Glukose als Energielieferant im Botnia-Clamp. Folglich ist ein signifikanter Unterschied der verstoffwechselten Energielieferanten im Fließgleichgewicht von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC nachweisbar.

4.4 Auswirkung des IVGTT auf die EGP / EGP-Suppression im HEC

Neben dem M-Wert als Maß des Insulin-induzierten Glukoseumsatzes, welcher hauptsächlich die muskuläre Insulinsensitivität widerspiegelt, gilt die EGP_{HEC} beziehungsweise die EGP-Suppression (Δ EGP) als Parameter der hepatischen Insulinsensitivität. Das physiologische Ausmaß der Insulin-induzierten EGP-Suppression unter HEC-Bedingungen bei gesunden Probanden bezifferten Boden et al auf annähernd 86 % [122]. Bei Ausprägung einer hepatischen IR ist wiederum mit einer eingeschränkten Suppression der EGP durch Insulin zu rechnen [63].

In der vorliegenden Studie war eine Einschränkung der EGP-Suppression unter HEC-Bedingungen in Botnia-Clamp (51.6 %) und Kontroll-HEC (66.4 %) – entsprechend einer hepatischen IR der Versuchsteilnehmer – zu beobachten. Der Unterschied der EGP-Suppression von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC beruhte vor allem auf unterschiedlichen Ausgangswerten der EGP beider Varianten, da im Fließgleichgewicht des HEC letztendlich vergleichbare Werte der EGP_{HEC}

(6.4 ± 1.0 versus $^{-1}$; $5.9 \pm 0.7 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}$, Abb. 12) imponierten. Im Botnia-Clamp zeigte sich allerdings bei allen Probanden eine deutliche Reduktion der EGP in Folge des IVGTT, wodurch bei HEC-Beginn ein ausgeprägter Unterschied der $\text{EGP}_{60. \text{Minute}}$ beider Varianten vorlag. Eine relevante Veränderung der Insulin-induzierten EGP-Reduktion im HEC durch einen vorherigen IVGTT erscheint jedoch auf Grund der oben erwähnten Ergebnisse der EGP_{HEC} als unwahrscheinlich.

Als Anhaltspunkte eines möglichen Einflusses des IVGTT auf die EGP könnte allerdings die größere Schwankungsbreite der EGP_{HEC} (Abb. 12) unter Botnia-Bedingungen zu interpretieren sein. Hierfür verantwortlich könnte eine residuale Insulinsekretion der β -Zellen – trotz ausgeprägter Hyperinsulinämie – im Fließgleichgewicht des HEC sein. Diesbezügliche Hinweise liefern die signifikant erhöhten C-Peptid-Plasmaspiegel im Botnia-Clamp. Roden et al [123] zeigten, dass Hepatozyten über eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber geringen Insulinspiegel-Schwankungen verfügen, sodass eine mögliche Auswirkung des IVGTT in einer geringen Steigerung der residualen Insulinproduktion bestehen könnte. Die vergleichbaren, peripher-venösen Insulinspiegel beider Varianten in der vorliegenden Studie sprechen jedoch gegen eine entsprechende Beziehung. Ein endgültiger Ausschluss wäre nur durch Bestimmung der portal-venösen Insulinkonzentration möglich, welche nicht durchgeführt wurde.

Eine dem M-Wert entsprechende Verbindung mit Plasmaspiegeln der FFA ($\text{FFA}_{\text{Nüchtern}}$, $\text{FFA}_{60. \text{Minute}}$) konnte für die EGP_{HEC} oder ΔEGP nicht nachgewiesen werden. Dass Veränderungen der Lipidspiegel zu einer signifikanten (-3.1 versus $-9.2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, $p < 0.05$) Reduktion der Hyperinsulinämie-induzierten EGP-Suppression im HEC führen können, zeigten Boden et al für eine kontinuierliche Lipidinfusion [122]. Verantwortlich hierfür ist möglicherweise eine verminderte Suppression der Glykogenolyse durch Insulin [122], allerdings existieren ebenfalls Hinweise bezüglich einer Steigerung der hepatischen Glukoneogenese durch erhöhte Lipidspiegel [86]. Eine kurzfristige Reduktion der FFA-Plasmaspiegel in Folge des IVGTT führte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht zu einem relevanten Unterschied der EGP oder ΔEGP im Vergleich zur Kontrollvariante.

Eine mögliche, IVGTT-induzierte Veränderung von Glykogenolyse und Glukoneogenese wurde nicht bestimmt.

4.5 Glukagon, Cortisol und Entzündungsparameter

Glukagon

Myers et al [124] zeigten eine eindeutige Auswirkung bereits geringer Unterschiede des Glukagon-Plasmaspiegels auf den Glukosestoffwechsel unter HEC-Bedingungen. Hierbei wurde eine kontinuierliche Infusion von Glukagon im HEC durchgeführt, worunter eine gesteigerte Glukoseproduktion sowie eine verminderte EGP-Suppression beobachtet wurden [124]. Auswirkungen eines einmaligen Glukagon-Bolus in einem zur ClaVa-Studie vergleichbaren zeitlichen Abstand vor Bestimmung von EGP und M-Wert wurden unserer Kenntnis nach bislang nicht beschrieben. In der ClaVa-Studie fand sich trotz signifikanter Unterschiede der Glukagonplasmaspiegel (60. Minute; Abb. 9) keine Verbindung von Glukagon mit EGP oder M-Wert.

Cortisol

Rooney et al zeigten bei vergleichbarer Hyperinsulinämie im HEC eine Reduktion des M-Wertes nach 24-stündiger Cortisolinfusion, jedoch keine Auswirkung auf die EGP-Suppression im HEC [125]. Für die Cortisol-Plasmaspiegel im Rahmen der ClaVa-Studie bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der beiden Varianten. Auch fand sich kein Zusammenhang des Cortisolspiegels mit EGP oder M-Wert.

Entzündungsparameter (TNF- α , MCP-1, IL1-RA)

Die Auswahl der im Rahmen der ClaVa-Studie untersuchten Entzündungsparameter und Zytokine orientierte sich an Ergebnissen vorheriger Studien. Auf intrazellulärer Ebene konnte insbesondere für erhöhte Plasmaspiegel von TNF- α , eine Aktivierung des NF κ B-Signalwegs mit Ausprägung einer IR beobachtet werden [126, 127]. Zeyda et al wiesen zudem auf die Rolle von TNF- α , MCP-1, IL1-RA als Aktivatoren von Makrophagen sowie als Produkt von

aktivierten Fettgewebs-Makrophagen bei Patienten mit T2D hin [128]. Insbesondere für TNF- α konnte ein gesteigerter Plasmaspiegel auch bei kurzfristiger Hyperglykämie im Rahmen eines OGTT bei Patienten mit metabolischem Syndrom gezeigt werden [129, 130]. In der ClaVa-Studie zeigte sich hingegen kein signifikanter Effekt des IVGTT auf die genannten Zytokine und Entzündungsparameter.

5 Schlussfolgerung

Das Ziel der ClaVa-Studie bestand in einer detaillierten Aussage bezüglich der Auswirkung eines IVGTT auf die Bestimmung der Insulinsensitivität in einem Botnia-Clamp. Hierzu wurden Bestimmungen von M-Wert, EGP sowie verschiedenen metabolischen Parametern, die im Rahmen eines Botnia-Clamps erhoben wurden, mit den Ergebnissen eines Placebo-kontrollierten, standardisierten HEC verglichen. Beide Versuchsvarianten wurden an 19 Probanden mit T2D in einem zeitlichen Abstand von je zwei Wochen durchgeführt, wobei auf eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Rahmenbedingungen an beiden Tagen geachtet wurde. Gegenüber vorherigen Studien lag das Augenmerk auf einer breit angelegten Analyse möglicher Einflussfaktoren, der Auswahl eines möglichst homogenen Studienkollektivs sowie den weitgehend übereinstimmenden Rahmenbedingungen.

Die Ergebnisse der M-Werte wiesen eine signifikante Korrelation von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC auf, wobei höhere M-Werte im Rahmen des Botnia-Clamps gemessen wurden. Dies beruht am wahrscheinlichsten auf einer Reduktion der FFA-Plasmaspiegel im Rahmen des vorherigen IVGTT. Die aufgezeigte Verbindung der IVGTT-induzierten Reduktion der FFA-Plasmaspiegel mit gesteigerten M-Werten im HEC ermöglicht jedoch keine allgemeingültige Aussage für andere Studienprotokolle. Der direkte Einfluss gesteigerter Glukosespiegel während und nach IVGTT-Durchführung stellt eine weitere mögliche Auswirkung des IVGTT auf den M-Wert dar. Die aufgezeigte Korrelation könnte im Rahmen der zuvor beschriebenen *Glucose effectiveness* zu interpretieren sein. Die Auswirkungen des IVGTT auf FFA und Glukose lassen sich zudem anhand der signifikant stärkeren Verschiebung des Energiestoffwechsels zu Gunsten von Glukose als Hauptenergielieferant im Fließgleichgewicht des Botnia-Clamps beobachten. Die Adjustierung der M-Werte durch die Plasmaspiegel von Insulin im Fließgleichgewicht ermöglichte eine Steigerung der Korrelation (M/I) von Botnia-Clamp und Kontroll-HEC. Die Ursache könnte in einer langfristig gesteigerten Insulinproduktion in Folge des IVGTT liegen, wofür die signifikant gesteigerten C-Peptid-Plasmaspiegel im gesamten

HEC-Verlauf des Botnia-Clamps sprechen. Allerdings könnten die Abweichungen der Insulinspiegel auch Ausdruck von Schwankungen der exogenen Insulinzufuhr sein. Für andere Parameter, die im Rahmen der ClaVa-Studie bestimmt wurden, waren hingegen keine IVGTT-induzierten Veränderungen nachweisbar, die einen Bezug zu M-Wert oder EGP aufweisen.

Am Beispiel des Grenzwertes zur Einteilung von Insulin-sensitiven und Insulin-resistenten Individuen aus der Arbeit von Tam et al [112] konnte gezeigt werden, dass bei ungefähr einem Zehntel der eingeschlossenen Probanden eine abweichende Zuordnung der ClaVa-Teilnehmer erfolgen würde. Allerdings sind im Bereich des vorgeschlagenen Grenzwertes lediglich geringe Veränderungen der M-Werte durch den IVGTT zu erwarten.

Die EGP unterlag einer deutlichen Suppression bei IVGTT-Durchführung, welche jedoch ohne Auswirkungen auf die im Anschluss erhobene absolute EGP sowie EGP-Suppression unter HEC-Bedingungen blieb. Einzig eine ausgeprägtere Schwankung der EGP_{HEC} innerhalb des Studienkollektivs zeichnete die Botnia-Variante gegenüber der Kontrollvariante aus.

Letztendlich zeigte die ClaVa Studie keine signifikanten Auswirkungen des IVGTT auf Bestimmungen der muskulären (M-Wert) oder hepatischen (EGP) Insulinsensitivität. Es fanden sich lediglich Anhaltspunkte für eine mögliche Einflussnahme des IVGTT, die in anderen Studienprotokollen und Studienkollektiven von Bedeutung sein könnten. Auf Grund ihrer signifikanten Korrelation zum M-Wert sollten insbesondere Plasmaspiegel von FFA, BG und Insulin bei Vergleich von M-Werten verschiedener Studienprotokolle als mögliche Einflussfaktoren berücksichtigt werden.

Anhangsverzeichnis

7.1	Infusionsvorschrift	79
7.2	Blutentnahmeschema: CLAVA ohne IVGTT (Kontrollvariante)	80
7.3	Blutentnahmeschema: CLAVA mit IVGTT (Botnia-Variante)	81
7.4	Probenverarbeitung	82

6 Quellenverzeichnis

- 1 DeFronzo RA et al. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. (1979) *Am J Physiol*, 237:E214-E223
- 2 Roden M. *Clinical Diabetes Research - Methods and Techniques* (2007) Wiley, Chichester
- 3 Weyer C et al. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. (1999) *J Clin Invest*, 104:787-794
- 4 Beck-Nielsen H et al. Metabolic and genetic characterization of prediabetic states: sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. (1994) *J Clin Invest*, 94:1714-1721
- 5 Kahn SE et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and β -cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function. (1993) *Diabetes*, 42:1663-1672
- 6 Perseghin G et al. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study. (1997) *Diabetes*, 46:1001-1009
- 7 Lehto M et al. Characterization of the MODY3 phenotype: early-onset diabetes caused by an insulin secretion defect. (1997) *J Clin Invest*, 99:582-591
- 8 Tripathy D et al. Importance of obtaining independent measures of insulin secretion and insulin sensitivity during the same test: results with the Botnia clamp. (2003) *Diabetes Care*, 26:1395-1401
- 9 American Diabetes Association. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. (2014) *Diabetes Care*, 37:S81-S90
- 10 Schloot N. LADA-Latent Autoimmune Diabetes of the Adult. (13/8/2014) Diapedia 2104458121 rev. No. 36 [<http://www.diapedia.org/type-1-diabetes-mellitus/2104458121/lada-latent-autoimmune-diabetes-of-the-adult>; Zugriff am 10/5/2015]
- 11 Kim C et al. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: A systematic review. (2002) *Diabetes Care*, 25:1862-1868

- 12 World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of WHO consultations 1999. (1999) Geneve, OMS
- 13 Danaei G et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. (2011) *Lancet*, 378:31-40
- 14 Shaw JE et al. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. (2010) *Diabetes Res Clin Pract*, 87:4-14
- 15 World Health Organization. World Health Statistics 2011. (2011) World Health Orgn, Genf
- 16 Whiting DR et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. (2011) *Diabetes Res Clin Pract*, 94:311-321
- 17 diabetesDE - Deutsche Diabetes-Hilfe. Deutscher Gesundheitsbericht: Diabetes 2011 (2011) Kirchheim, Mainz
- 18 Köster I et al. The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany – the CoDiM Study. (2006) *Diabetologia*, 49:1498-1504
- 19 Alberti KG et al. International Diabetes Federation: The metabolic syndrome - a new worldwide definition. (2005) *Lancet*, 366:1059-1062
- 20 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2014 (2014) *Diabetes Care*, 37:S14-S80
- 21 Sturmvoll M et al. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. (2005) *Lancet*, 365:1333-1346
- 22 Kahl S et al. An update on the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. (2012) *Ham Med J*, 5:1-24
- 23 Häring H. Diabetologie in Klinik und Praxis (6. Auflage) (2011) Thieme, Stuttgart
- 24 Haller H et al. The role of hyperglycemia and hyperinsulinemia in the pathogenesis of diabetic angiopathy. (1996) *Clin Nephrol*, 46:246-255
- 25 Gärtner V et al. Pathogenesis of diabetic macro- and microangiopathy. (2008) *Clin Nephrol*, 70:1-9

- 26 Zatz R et al. Pathogenesis of diabetic microangiopathy. The hemodynamic view. (1986) *Am J of Mdicine*, 80:443-453
- 27 DiCarli ME et al. Should we screen for occult coronary disease among asymptomatic patients with diabetes? (2005) *J Am Coli Cardiol*, 45:50-53
- 28 Kerner W et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus (2013) *Diabetologie*, 8:S104-S107
- 29 International Diabetes Federation – Clinical Guideline Task Force. Global guideline for type 2 diabetes (2012) IDF, Brussels
- 30 Blundell TL et al. Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals. (1971) *Nature*, 231:506-511
- 31 Rahier J et al. Pancreatic β -cell mass in european subjects with type 2 diabetes. (2008) *Diabetes Obes Metab*, 10:32-42
- 32 Seshah V et al. Insulin kinetics. (1998) *Int J Diab Dev Countries*, 18:19-22
- 33 Duckworth WC et al. Insulin metabolism and degradation. (1981) *Endocr Rev*, 2:210-213
- 34 Najjar S. *Encyclopedia of Life Sciences* (2001) Wiley, Chichester
- 35 Eaton RP et al. Prehepatic insulin production in man: kinetic analysis using peripheral connecting peptide behaviour. (1980) *Journal of Clinical Endocrinol Metabolism*, 51:520-528
- 36 Adeghate E et al. L-arginine stimulates insulin secretion from pancreas of normal and diabetic rats. (2001) *Amino Acids*, 21:205-209
- 37 Boyle PJ et al. Insulin glucagon and catecholamines in prevention of hypoglycemia during fasting. (1989) *Am J Physiol*, 256:E651-661
- 38 Itoh Y et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. (2003) *Nature*, 422:173-176
- 39 Ashcroft SJ. Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis. (1980) *Diabetologia*, 18:5-15
- 40 Elahi D et al. The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects. (1994) *Regul Pept*, 51:63-74

- 41 Saltiel AR et al. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. (2001) *Nature*, 414:799-806
- 42 Nystrom FH et al. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. (1999) *Cell Signal*, 11:563-574
- 43 Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? (2005) *Science*, 307:380-384
- 44 Ferrannini E et al. β -Cell function in type 2 diabetes. (2014) *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63:1217-1227
- 45 Bingley PJ et al. Standardization of IVGTT to predict IDDM. (1992) *Diabetes Care*, 15:1313-1316
- 46 Pfeifer MA et al. Insulin secretion in diabetes mellitus. (1981) *Am J Med*, 70:579-588
- 47 Heni M et al. Pancreatic fat is negatively associated with insulin secretion in individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance: a nuclear magnetic resonance study. (2010) *Diabetes Metab Res Rev*, 26:200-205
- 48 Tushuizen ME et al. Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. (2007) *Diabetes Care*, 30:2916-2921
- 49 Knowles NG et al. Insulin and amylin release are both diminished in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. (2002) *Diabetes Care*, 25:292-297
- 50 Robertson RP et al. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. (2004) *Diabetes*, 53:S119-S124
- 51 Cnop M et al. An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. (2008) *Biochem Soc Trans*, 36:909-915
- 52 Pascoe J et al. Free fatty acids block glucose-induced beta-cell proliferation in mice by inducing cell cycle inhibitors p16 and p18. (2012) *Diabetes*, 61:632-641
- 53 Porte D et al. β -Cell dysfunction and failure in type 2 diabetes. (2001) *Diabetes*, 50:S160-S163
- 54 Ferrannini E et al. The disposal of an oral glucose load in healthy subjects. A quantitative study. (1985) *Diabetes*, 34:580-588

- 55 Shulman GI et al. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by C13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. (1990) *N Engl J Med*, 322:233-228
- 56 Abdul-Ghani MA et al. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. (2010) *J Biomed Biotechnol*, 2010:476279
- 57 Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. (2008) *Int J Obes*, 32:S52-S54
- 58 Cline GW et al. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. (1999) *N Engl J Med*, 341:240-246
- 59 Mari A et al. Glucose absorption and production following oral glucose: comparison of compartmental and arteriovenous difference methods. (1994) *Metabolism*, 43:1419-1425
- 60 Gastaldelli A et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. (2007) *Gastroenterology*, 113:496-506
- 61 Roden M, Bernroider E. Hepatic glucose metabolism in humans - its role in health and disease. (2003) *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 17:365-383
- 62 Basu R et al. Obesity and type 2 diabetes impair insulin-induced suppression of glycogenolysis as well as gluconeogenesis. (2005) *Diabetes*, 54:1942-1948
- 63 Gastaldelli A et al. Effect of physiological hyperinsulinemia on gluconeogenesis in nondiabetic subjects and in type 2 diabetic patients. (2001) *Diabetes*, 50:1807-1812
- 64 Krssak M et al. Alterations in post prandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. (2004) *Diabetes*, 53:3048-3056
- 65 Gastaldelli A et al. Insulin resistance, adipose depots and gut: interactions and pathological implications. (2010) *Dig Liver Dis*, 42:310-319
- 66 Summers SA et al. Insulin signalling in the adipocyte. (2000) *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24:S67-S70

-
- 67 Boden G et al. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. (2002) *Eur J Clin Invest*, 32:S14-S23
- 68 Weisberg SP et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. (2003) *J Clin Invest*, 112:1796-1808
- 69 Ouchi N et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. (2011) *Nat Rev Immunol*, 11:85-97
- 70 Alexandraki K et al. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. (2006) *Ann N Y Acad Sci*, 1084:89-117
- 71 Shulman GI. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia and cardiometabolic disease. (2014) *N Engl J Med*, 371:1131-1141
- 72 McEwen BS et al. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. (2004) *Eur J Pharmacol*, 490:13-24
- 73 Ketterer C et al. Insulin sensitivity of the human brain. (2011) *Diabetes Res Clin Pract*, 93:S47-S51
- 74 Kodl CT et al. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. (2008) *Endocr Rev*, 29:494-511
- 75 Anthony K et al. Attenuation of insulin-evoked responses in brain networks controlling appetite and reward in insulin resistance: the cerebral basis for impaired control of food intake in metabolic syndrome? (2006) *Diabetes*, 55:2986-2992
- 76 Vidarsdottir S et al. Glucose ingestion fails to inhibit hypothalamic neuronal activity in patients with type 2 diabetes. (2007) *Diabetes*, 56:2547-2550
- 77 Tschritter O et al. The cerebrocortical response to hyperinsulinemia is reduced in overweight humans: a magnetoencephalographic study. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:12103-12108
- 78 Koch L et al. Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice. (2008) *J Clin Invest*, 118:2132-2147
- 79 Pagotto U. Where does insulin resistance start? The brain. (2009) *Diabetes Care*, 32:S147-S174

- 80 Donnelly KL et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. (2005) *J Clin Invest*, 115:1343-1351
- 81 Yu C et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. (2002) *J Biol Chem*, 277:50230-50236
- 82 Samuel VT et al. Lipid-induced insulin resistance; unravelling the mechanism. (2010) *Lancet*, 375:2267-2277
- 83 Roden M et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. (1996) *J Clin Invest*, 97:2859-2865
- 84 Roden M et al. Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. (1999) *Diabetes*, 48:358-364
- 85 Roden M et al. Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. (2000) *Diabetes*, 49:701-707
- 86 Zhou H et al. Inhibition of AKT kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. (1998) *J Biol Chem*, 273:16568-16575
- 87 Hommelberg PP et al. Inflammatory signalling in skeletal muscle insulin resistance: green signal for nutritional intervention? (2010) *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13:647-655
- 88 Szendroedi J et al. Muscle mitochondrial ATP synthesis and glucose transport/phosphorylation in type 2 diabetes (2007) *PLoS Med*, 4:e154
- 89 Szendroedi J et al. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. (2011) *Nat Rev Endocrinol*, 8:92-103
- 90 Barazzoni R et al. Fatty acids acutely enhance insulin-induced oxidative stress and cause insulin resistance by increasing mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation and nuclear factor-kappaB inhibitor (I κ B)-nuclear factor-kappaB (NF κ B) activation in rat muscle, in the absence of mitochondrial dysfunction. (2012) *Diabetologia*, 55:773-782

- 91 Ozcan U et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. (2004) *Science*, 306:457-461
- 92 Roden M. Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of T2D (2005) *Int J Obes*, 29:S111-S115
- 93 Ross CW et al. The determination of glucose tolerance (1938) *Arch Dis Child*, 13:289-309
- 94 Lundabeak K et al. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. (1962) *Br Med L*, 1:1507-1513
- 95 Nauck MA et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptid responses. (1986) *J Clin Endocrinol Metab*, 63:492-498
- 96 Druet C et al. Characterization of insulin secretion and resistance in type 2 diabetes of adolescents. (2006) *J Clin Endocrinol Metab*, 91:401-404
- 97 Revers RR et al. Influence of hyperglycemia on insulin's in vivo effects in type II diabetes. (1984) *J Clin Invest*, 73:664-72
- 98 DeFronzo RA et al. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. (2004) *Med Clin N Am*, 88:787-835
- 99 Morgan LM et al. Diurnal variations in peripheral insulin resistance and plasma non-esterified fatty acid concentrations: a possible link? (1999) *Ann Clin Biochem*, 36:447-450
- 100 Matthews DR et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. (1985) *Diabetologia*, 28:412-419
- 101 Katz A et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. (2000) *J Clin Endocrinol Metab*, 85:2402-2410
- 102 Segal KR et al. Lean body mass estimation by bioelectrical impedance analysis: a four site cross validation study. (1988) *Am J Clin Nutr*, 47:7-14

- 103 Nowotny B et al. Precision and accuracy of blood glucose measurements using three different instruments. (2012) *Diabet Med*, 29:260-265
- 104 Morbiducci U et al. Identification of a model of non-esterified fatty acids dynamics through genetic algorithms: The case of women with a history of gestational diabetes. (2011) *Comput Biol Med*, 41:146-153
- 105 Krebs M et al. Free fatty acids inhibit the glucose-stimulated increase of intramuscular glucose-6-phosphate concentration in humans. (2001) *J Clin Endocrinol Metab*, 86:2153-2160
- 106 Mari A et al. A circulatory model for calculating non-steady-state glucose fluxes. Validation and comparison with compartmental models. (2003) *Comput Methods Prog Biomed*, 71:269–281
- 107 Schadewaldt P et al. Indirect calorimetry in humans: a post-calorimetric evaluation procedure for correction of metabolic monitor variability. (2013) *Am J Clin Nutr*, 97:763-773
- 108 Frayn KN. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. (1983) *J Appl Physiol*, 55:628-634
- 109 Le DS et al. Repeatability and reproducibility of the hyperinsulinemic euglycemic clamp and the tracer dilution technique in a controlled in patient setting. (2009) *Metabolism*, 58:304-310
- 110 Ferrannini E et al. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. (1997) *J Clin Invest*, 100:1166-1173
- 111 Bergman RN et al. Assessment of insulin sensitivity in vivo. (1985) *Endocr Rev*, 6:45-86
- 112 Tam CS et al. Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. (2012) *Diabetes Care*, 35:1605-1610
- 113 Bavenholm PN et al. Insulin sensitivity of suppression of endogenous glucose production is the single most important determinant of glucose tolerance. (2001) *Diabetes*, 50:1449-1454
- 114 DeFronzo RA et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. (1981) *Diabetes*, 30:1000-1007

- 115 Tonelli J et al. The regulation of glucose effectiveness: how glucose modulates its own production. (2005) *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 8:450-456
- 116 Best JD et al. Role of glucose effectiveness in the determination of glucose tolerance. (1996) *Diabetes Care*, 19:1018-1030
- 117 Perseghin G et al. Incorporation of the fasting plasma FFA concentration into QUICKI improves its association with insulin sensitivity in nonobese individuals. (2001) *J Clin Endocrinol Metab*, 86:4776-81
- 118 Santomauro AT et al. Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. (1999) *Diabetes*, 48:1836-1841
- 119 Nowotny B et al. Mechanisms underlying the onset of oral lipid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. (2013) *Diabetes*, 62:2240-2248
- 120 Galgani JE et al. Metabolic flexibility and insulin resistance (2008) *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295:E1009-E1017
- 121 Boden G et al. FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. (2002) *Am J of Physio Edocr Metab*, 283:E12-E19
- 122 Roden M et al. The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans. (1996) *J Clin Invest*, 97:642-648
- 123 Myers SR et al. Effects of small changes in glucagon on glucose production during a euglycemic, hyperinsulinemic clamp. (1991) *Metabolism*, 40:66-71
- 124 Rooney PD et al. The effect of cortisol on glucose/glucose-6-phosphate cycle activity and insulin action. (1993) *J Clin Endocrinol Metab*, 77:1180-1183
- 125 Kim-Anne Lê et al. Subcutaneous adipose tissue macrophage infiltration is associated with hepatic and visceral fat deposition, hyperinsulinemia, and stimulation of NF- κ B stress pathway. (2011) *Diabetes*, 60:2802-2809

-
- 126 Tanti JF et al. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. (2009) *Curr Opin Pharmacol*, 9:753-762
 - 127 Zeyda M et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. (2007) *Internat J of Obes*, 31:1420-1428
 - 128 Kempf K et al. Inflammation in metabolic syndrome and type 2 diabetes: Impact of dietary glucose. (2006) *Ann N Y Acad Sci*, 1084:30-48
 - 129 Esposito K et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. (2002) *Circulation*, 106:2067-2072

7 Anhang

7.1 Infusionsvorschrift

<u>Deuterierte Glukoseinfusion (d2inf)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 5 ml d2Glukose (2 g) auftauen • Aus 500 ml NaCl 0,9% 5 ml entnehmen und verwerfen • 5 ml d2Glukose aufziehen und zu den 495 ml NaCl-Infusion geben • gut mischen <p>Gesamtvolumen 500ml d2Glu-Konz.: 0,4%</p>
<u>IVGTT – 30%-Glukose -Bolus</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Sterilfilter auf gelbe Kanüle aufstecken, in leere sterile 500ml Flasche stechen und Flasche so entlüften. • 2,5 ml d2Glukose (1g) auftauen, gut mischen • In sterile Flasche • 84 ml 20%Glukose einfüllen • 81,5 ml 40%Glukose zugeben • 2,5 ml d2Glukose zugeben • gut mischen <p>Gesamtvolumen 168 ml d2Glu-Konz.: 1,98%</p>
<u>HEC – 20%-Glukose-Infusion (hotginf)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 4,5 ml d2Glukose (2g) auftauen, • Gut mischen • Aus 500 ml 20%-Glukose 9 ml entnehmen und verwerfen • 4,5 ml 0,9% NaCl in 10ml-Spritze aufziehen und mit der gleichen Spritze 4,5 ml d2-Glukose aufziehen • 9 ml d2Glukose-NaCl-Gemisch zu den 491 ml 20%Glukose geben • Gut mischen <p>Gesamtvolumen 500ml d2Glu-Koz.:1,8%,</p>

7.2 Blutentnahmeschema: CLAVA mit IVGTT (Botnia-Clamp)

Time	min				BG	InsCP Cort.	D2 GLU	FFA	GLU	BB	BGA	EtOH	
06:55	-125				X	X	X	X	X	X			
07:00	-120	D2-Infusion	IVGTT (30%-Glukose-Bolus + d2)										
08:00	-60				X		X						
08:35	-25							X					
08:45	-15							X					
08:55	-5					X	X	X	X	X			
09:00	0					X	X	X	X				
09:02	2					X	X						
09:04	4					X	X	X	X				
09:06	6					X	X						
09:08	8					X	X						
09:10	10					X	X	X	X				
09:20	20					X	X	X	X				
09:30	30					X	X	X	X	X			
09:40	40					X	X	X	X				
09:50	50					X	X	X	X				
10:00	60					X	X	X	X	X			
10:20	80					X(4)							
10:30	90					X(2)	X	X					
10:40	100			X(2)									
11:00	120			X(4)	X	X	X	X					
11:20	140			X(4)									
11:30	150			X(2)	X	X							
11:40	160			X(2)									
12:00	180			X(4)	X	X	X	X					
12:20	200			X(4)									
12:30	210			X(2)	X	X							
12:40	220			X(2)		X							
12:50	230			X(2)		X							
13:00	240			X(2)	X	X	X	X	X	X			
13:30	270												
	ml je BE				1	2	1	1	2,5	1	1	1	
	n				49	20	20	14	7	2	1	1	
	ml Gesamt				49	40	20	14	17,5	2	1	1	

Entnahmevermögen 144,5 ml

7.3 Blutentnahmeschema: CLAVA ohne IVGTT (Kontrollvariante)

Time	min			BG	InsCP Cort.	D2 GLU	FFA	GLU	BB	BGA	EtOH	
06:55	-125	D2-Infusion		X	X	X	X	X	X			
07:00	-120											
08:00	-60				X		X					
08:35	-25						X					
08:45	-15						X					
08:55	-5				X	X	X	X	X			
09:00	0				X							
09:02	2		Placebo (0.9%-NaCl-Bolus)									
09:04	4											
09:06	6											
09:08	8											
09:10	10											
09:20	20											
09:30	30				X	X	X	X	X			
09:40	40											
09:50	50											
10:00	60				X	X	X	X	X			
10:20	80	HEC (20%-Glukose-Infusion + d2)		X(4)								
10:30	90			X(2)	X	X						
10:40	100			X(2)								
11:00	120			X(4)	X	X	X	X				
11:20	140			X(4)								
11:30	150			X(2)	X	X						
11:40	160			X(2)								
12:00	180			X(4)	X	X	X	X				
12:20	200			X(4)								
12:30	210			X(2)	X	X						
12:40	220		X(2)		X							
12:50	230		X(2)		X							
13:00	240		X(2)	X	X	X	X	X	X	X		
13:30	270											
	ml je BE			1	2	1	1	2,5	1	1	1	
	n			41	11	14	8	7	2	1	1	
	ml Gesamt			41	22	14	8	17,5	2	1	1	

Entnahmevolumen 106,5 ml

7.4 Probenverarbeitung

		Farbe	ml Blut	Serum/Zusatz	µl Zusatz	Temp.	n	Versorgung	TKS
Glukose 20% + d2- Glukose	Hotginf		-	-	-	EIS	1		- 20°C
Glukose 30% + d2- Glucose	HotIVGTT		-	-	-	EIS	1		- 20°C
Infusion d2-Glukose	Inf2		-	-	-	EIS	1		- 20°C
D2O per os	oD2O		-	-	-	EIS	1		
Blutglukose		-	0,5	-	-	RT	49	EKF	-
Insulin+C-Pept + Cortisol	INS-CP	blau	2	Serum	-	RT	23	1	- 20°C
Deut. Glukose	d2GLU	gelb	1	KF/EDTA	40	EIS	23	1	- 20°C
freie Fettsäuren	FFA	grün	1	Na-EDTA/Orlistat	20/40	EIS	17	1	- 20°C
Glucagon	GLU	rot	2,5	Na- Heparin/Aprotinin	20/40	EIS	7	2	- 20°C
<u>Blutbild (Hb)</u>	<u>BB</u>		-	-	-	RT		HA	
BGA	BGA		-	-	-	RT		HA	

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Berlin 12.01.2016, Simon Piepel