

Kristine B. Degn¹, Claus B. Juhl¹, Jeppe Sturis², Grethe Jakobsen², Birgitte Brock¹,
Visvanathan Chandramouli³, Joergen Rungby¹, Bernard R. Landau³, Ole Schmitz¹

¹Department of Endocrinology (M&C), University Hospital of Aarhus, Department of Clinical Pharmacology, University of Aarhus, Aarhus, Dania

²Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dania

³Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio, Stany Zjednoczone

Wyraźna poprawa dobowej glikemii oraz funkcji komórek α i β , a także zmniejszenie uwalniania glukozy pochodzenia endogennego u chorych na cukrzycę typu 2 po tygodniowej terapii pochodną glukagonopodobnego peptydu 1 — liraglutydu (NN2211)

One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivate liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and α - and β -cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes

Przedrukowano za zgodą z: *Diabetes* 2004; 53: 1187–1194

STRESZCZENIE

Glukagonopodobny peptyd 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) może być bardzo skuteczny w leczeniu cukrzycy typu 2. Autorzy badali wpływ krótkiego (1 tydzień) stosowania pochodnej GLP-1, liraglutydu (NN2211), na 24-godzinny profil glikemii i stężenia krążących wolnych kwasów tłuszczowych, wydzielanie hormonów przez komórki wysp trzustko-

wych oraz na opróżnianie żołądka podczas posiłków (z użyciem acetaminofenu). Ponadto, oceniali endogenne uwalnianie glukozy na czczo oraz glukoneogenezę (odpowiednio wlew $3\text{-}^3\text{H}$ -glukozy i wypicie $^2\text{H}_2\text{O}$), a następnie zbadali funkcję komórek wysp trzustkowych, stosując homeostatyczny model oceny oraz 1. i 2. fazę wydzielania insuliny z użyciem kłamry hiperglikemicznej (stężenie glukozy w osoczu wynosiło ok. 16 mmol/l). Na szczycie hiperglikemii wykonano test stymulacji argininą. W badaniu przeprowadzonym jako podwójnie ślepa próba w układzie naprzemiennym z grupą kontrolną placebo wzięło udział 13 chorych na cukrzycę typu 2. Liraglutyd podawano podskórnym raz na dobę ($6\ \mu\text{g}/\text{kg}$). Stosowanie leku spowodowało istotne zmniejszenie 24-godzinnego pola pod krzywą dla glukozy ($p = 0,01$) i glukagonu ($p = 0,04$), natomiast pole pod krzywą dla krążących wolnych kwasów tłuszczowych nie uległo zmianie. Dobowe wydzielanie insuliny oceniane na podstawie dekonwolucji stężeń C-peptydu

Adres do korespondencji: Ole Schmitz, MD
Department of Medicine M (Endocrinology & Diabetes)
University Hospital of Aarhus, AKH, Nørrebrogade
42-44 DK-8000 Aarhus C, Denmark
e-mail: ole.schmitz@iekf.au.dk

Copyright © 2004 by American Diabetes Association, Inc.
American Diabetes Association nie odpowiada
za poprawność tłumaczenia

Diabetologia Praktyczna 2004, tom 5, 4, 225–236
Tłumaczenie: lek. Małgorzata Kamińska
Wydanie polskie: Via Medica

w osoczu nie zmieniło się, co wskazuje na jego względny wzrost. Liraglutyd w zastosowanej dawce nie wpłynął na opróżnianie żołądka. Uwalnianie endogennej glukozy na czczo zmniejszyło się ($p = 0,04$) na skutek zahamowania glikogenolizy ($p = 0,01$), natomiast nasilenie glukoneogenezy nie uległo zmianie. Pierwsza faza wydzielania insuliny oraz reakcja na argininę w warunkach hiperglikemii wyraźnie się nasiliły ($p < 0,001$), a współczynnik proinsulina/insulina zmniejszył się ($p = 0,001$). Wskaźnik podatności (*disposition index*) (maksymalne stężenie insuliny po dożylnym podaniu bolusa glukozy pomnożone przez insulinowrażliwość obliczoną za pomocą modelu homeostatycznego) niemal podwoił się w czasie leczenia liraglutylem ($p < 0,01$). W okresie stosowania leku zaobserwowano również zmniejszone wydzielanie glukagonu, zarówno pod wpływem samej hiperglikemii, jak i po podaniu argininy ($p < 0,01$; $p = 0,01$). Stosowanie liraglutylu raz na dobę przez 1 tydzień u chorych na cukrzycę typu 2 poprawia 24-godzinną kontrolę glikemii (również po posiłkach i w nocy). Lek ten działa na zasadzie kilku różnych mechanizmów, między innymi poprawia czynność komórek wysp trzustkowych. W badaniu zwrócono uwagę na GLP-1 i jego pochodne jako nowe i obiecujące leki w terapii cukrzycy typu 2.

Słowa kluczowe: liraglutyd, glukagonopodobny peptyd 1, kontrola glikemii, cukrzyca typu 2

ABSTRACT

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is potentially a very attractive agent for treating type 2 diabetes. We explored the effect of short-term (1 week) treatment with a GLP-1 derivative, liraglutide (NN2211), on 24-h dynamics in glycemia and circulating free fatty acids, islet cell hormone profiles, and gastric emptying during meals using acetaminophen. Furthermore, fasting endogenous glucose release and gluconeogenesis ($3\text{-}^3\text{H}$ glucose infusion and $^2\text{H}_2\text{O}$ ingestion, respectively) were determined, and aspects of pancreatic islet cell function were elucidated on the subsequent day using homeostasis model assessment and first- and second-phase insulin response during a hyperglycemic clamp (plasma glucose ~ 16 mmol/l), and, finally, on top of hyperglycemia, an arginine stimulation test was performed. For accomplishing this, 13 patients with type 2 diabetes were examined in a double-blind, placebo-controlled crossover design. Liraglutide ($6 \mu\text{g}/\text{kg}$) was administered subcutaneously once daily. Liraglutide significantly re-

duced the 24-h area under the curve for glucose ($P = 0.01$) and glucagon ($P = 0.04$), whereas the area under the curve for circulating free fatty acids was unaltered. Twenty-four-hour insulin secretion rates as assessed by deconvolution of serum C-peptide concentrations were unchanged, indicating a relative increase. Gastric emptying was not influenced at the dose of liraglutide used. Fasting endogenous glucose release was decreased ($P = 0.04$) as a result of a reduced glycogenolysis ($P = 0.01$), whereas gluconeogenesis was unaltered. First-phase insulin response and the insulin response to an arginine stimulation test with the presence of hyperglycemia were markedly increased ($P < 0.001$), whereas the proinsulin/insulin ratio fell ($P = 0.001$). The disposition index (peak insulin concentration after intravenous bolus of glucose multiplied by insulin sensitivity as assessed by homeostasis model assessment) almost doubled during liraglutide treatment ($P < 0.01$). Both during hyperglycemia per se and after arginine exposure, the glucagon responses were reduced during liraglutide administration ($P < 0.01$ and $P = 0.01$). Thus, 1 week's treatment with a single daily dose of the GLP-1 derivative liraglutide, operating through several different mechanisms including an ameliorated pancreatic islet cell function in individuals with type 2 diabetes, improves glycemic control throughout 24 h of daily living, i.e., prandial and nocturnal periods. This study further emphasizes GLP-1 and its derivatives as a promising novel concept for treatment of type 2 diabetes.

Key words: liraglutide, glucagon-like peptide 1, glycemic control, type 2 diabetes

Wstęp

Cukrzyca typu 2 charakteryzuje się insulinooportnością i postępującym upośledzeniem czynności komórek wysp trzustkowych, prowadzącym do niedoboru insuliny [1]. Zwiększenie wątrobowej produkcji glukozy, spowodowane przede wszystkim nasileniem glukoneogenezy, jest główną przyczyną hiperglikemii, zarówno na czczo, jak i po posiłkach [2, 3]. Ponadto, często stwierdza się zwiększone stężenie glukagonu [4, 5] i zmniejszone wydzielanie glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) po posiłkach [6].

Obecnie duże znaczenie w zapobieganiu późnym powikłaniom cukrzycy typu 2 ma intensywne leczenie hipoglikemizujące [7, 8]. Jednak wyniki badania *United Kingdom Prospective Diabetes Study* wy-

każały, że u większości chorych, mimo leczenia przeciwcukrzycowego, nie udaje się uzyskać zadowalającego wyrównania glikemii, co wskazuje na konieczność stosowania bardziej skutecznych metod terapii.

Glukagonopodobny peptyd 1 jest hormonem wydzielanym przez błonę śluzową jelit po spożyciu pokarmu [9]. Stymuluje on wydzielanie insuliny i hamuje wydzielanie glukagonu, oba procesy są zależne od stężenia glukozy. Ponadto, GLP-1 wywiera troficzny wpływ na komórki β -trzustki i hamuje ich apoptozę [10], a także opóźnia opróżnianie żołądka [9, 11]. Przypuszcza się również, że jest czynnikiem sytości. Obserwacje te potwierdzają przydatność GLP-1 jako nowego preparatu w leczeniu cukrzycy typu 2 oraz dowodzą jego korzystnego wpływu na wyrównanie glikemii [12, 13]. Jednak naturalny GLP-1 ma bardzo krótki okres półtrwania, ponieważ jest szybko rozkładany przez znajdujący się w całym organizmie enzym dipeptydylopeptydazę IV (DPP-IV, *dipeptidylpeptidase IV*) [14], co uniemożliwia jego wykorzystanie jako środka leczniczego. Zastosowanie pochodnych opornych na działanie DLP-1 pozwala pokonać tę wadę. Liraglutyd jest acylovaną pochodną GLP-1, która wiąże się z albuminami. Zmniejsza to jej wrażliwość na DPP-IV i opóźnia absorpcję z miejsca podania, dzięki czemu okres półtrwania przedłuża się do około 12 godzin [15, 16]. W badaniu wykazano, że po zastosowaniu jednej dawki na dobę u chorych na cukrzycę typu 2 uzyskuje się istotne obniżenie glikemii na czczo i glikemii poposiłkowej [16]. W kolejnym, trwającym 12 tygodni badaniu, w którym zastosowano wielokrotne dawki liraglutynu, zaobserwowano podobne jak po stosowaniu pochodnej sulfonilomocznika (glimepiryd) zmniejszenie glikemii oraz bardzo małą częstość hipoglikemii [17].

Celem omawianego badania było zebranie dodatkowych informacji na temat przydatności liraglutynu jako nowego leku przeciwcukrzycowego. Preparat podawano przez 7 dni chorym na cukrzycę typu 2 i badano jego wpływ na dobowe profile glikemii oraz stężenia hormonów przy zachowaniu normalnej aktywności życiowej, a także oceniano różne aspekty czynności komórek wysp trzustkowych.

Materiał i metody

Protokół badania zatwierdziła miejscowa komisja etyczna; był on zgodny z Deklaracją Helsińską.

Grupa badana

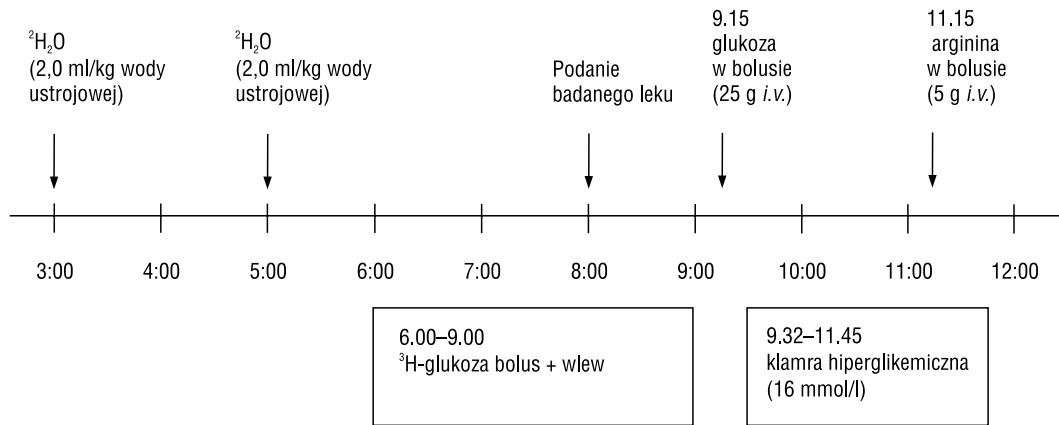
Przebadano 13 chorych na cukrzycę typu 2 (5 kobiet i 8 mężczyzn), którzy spełniali kryteria rozpoznania cukrzycy według Światowej Organizacji

Zdrowia. Wiek chorych wynosił $56,4 \pm 9,2$ roku (średnia \pm SD), wskaźnik masy ciała (BMI, *body mass index*) — $31,2 \pm 3,6$ kg/m², ostatni wynik pomiaru stężenia HbA_{1c} przed włączeniem do badania — $7,3 \pm 0,4\%$ (norma < 6,4%), czas trwania choroby — $3,0 \pm 2,6$ roku (od 5 mies. do 8 lat). Na początku badania u 6 chorych stosowano wyłącznie leczenie dietą, a 7 pacjentów otrzymywało doustne leki hipoglikemizujące (OHA, *oral hypoglycemic agent*; pochodną sulfonilomocznika: n = 3, metforminę: n = 3, pochodną sulfonilomocznika i metforminę: n = 1). Dodatkowo stosowano: inhibitory konwertazy angiotensyny (n = 4), diuretyki tiazydowe (n = 1), leki β -adrenolityczne (n = 1), antagonistów wapnia (n = 1), inhibitory reduktazy HMG-CoA (n = 2) oraz kwas acetylosalicylowy (n = 3). W badanej grupie było 3 chorych z retinopatią prostą i 3 z nefropatią (mikroalbuminurią).

Projekt badania

Badanie przeprowadzono w układzie naprzemiennym, metodą podwójnie ślepej próby, z randomizacją i grupą kontrolną placebo. Chorzy włączeni do próby klinicznej 2 tygodnie przed zastosowaniem badanego leku przerywali leczenie OHA. Liraglutyd (6 μ g/kg mc.) lub placebo wstrzykiwano raz na dobę przez 9 dni w tkankę podskórną brzucha (ok. godz. 7.45), używając wstrzykiwacza NovoPen (1,5 x igłą Novofine 30-G, 0,3 x 8 mm). Po 7 dniach leczenia chorzy przyjeżdżali do kliniki na godzinę 22.00. Przez następne 2 dni (dzień 8. i 9.) przeprowadzano badania, kontynuując podawanie leku.

O godzinie 7.30 w 8. dniu badania do żyły w zgięciu łokciowym wprowadzono kaniulę służącą do pobierania próbek krwi. Chorym podawano 3 standardowe posiłki o godzinach: 8.00, 12.00 i 18.00; ich spożycie trwało do 20 minut. Wartość energetyczna śniadania wynosiła 2660 kJ (białka 14% wartości energetycznej posiłku (E), węglowodany 55%E, tłuszcze 31%E), obiadu — 2865 kJ (białka 16%E, węglowodany 50%E, tłuszcze 34%E), zaś kolacja — 3397 kJ (białka 28%E, węglowodany 53%E, tłuszcze 19%E). Aby ocenić szybkość opróżniania żołądka, podczas śniadania i kolacji podawano chorym 1 g acetaminofenu rozpuszczonego w 150 ml wody [18]. W ciągu następnych 4 godzin co 15–30 minut określano stężenie acetaminofenu w osoczu i obliczano pole pod krzywą (AUC, *area under the curve*) dla tego leku (AUC_{acetaminofen}) oraz czas osiągnięcia jego maksymalnego stężenia (t_{max}). Przez cały 8. dzień w różnych odstępach czasu pobierano próbki krwi w celu oznaczenia stężeń glukozy, insuliny, C-peptydu, proinsuliny (na czczo i po śniadaniu), glukago-



Rycina 1. Zapis procedur wykonanych w 9. dniu badania (szczegółowy opis w tekście)

nu, wolnych kwasów tłuszczowych (FFA, *free fatty acids*) i liraglutytu.

W 9. dniu badania przeprowadzono następującą procedurę (ryc. 1):

- **Glukoneogenezę.** O godzinie 3.00 i 5.00 podano chorym do wypicia 2 ml $^2\text{H}_2\text{O}$ /kg wody ustrojowej (99,9% H; *Sigma Aldrich*; przyjęto, że u kobiet woda stanowi 50%, a u mężczyzn 60% całkowitej masy ciała). Wodę, którą chorzy pili później bez ograniczeń, wzbogacono 0,4% $^2\text{H}_2\text{O}$, aby utrzymać stałe stężenie izotopu wodoru. O godz. 8.00, 8.30 i 9.00 pobrano krew w celu oceny glukoneogenezy (GHG, *gluconeogenesis*).
- **Endogenne uwalnianie glukozy** (EGR, *endogenous glucose release*) określano, stosując izotopową metodę rozcieńczeń. O godzinie 6.00 chorym podano $3\text{-}^3\text{H}$ -glukozę w bolusie (obliczanie dawki wstępnej: $6 \mu\text{Ci} \times \text{stężenie glukozy w osoczu w mmol/l}$), a następnie do godziny 9.00 we wlewie ciągłym ($0,3 \mu\text{Ci}/\text{min}$). Próbkę krwi pobrano przed podaniem bolusa, a następnie co 15 minut od godziny 8.00 do 9.00 w celu określenia specyficznej aktywności glukozowego ^3H . Średnie wartości specyficznej aktywności glukozy w tym okresie utrzymywały się na stałym poziomie w obu grupach i wynosiły o godzinie 8.00, 8.30 i 9.00 odpowiednio: 2078, 2180, 2160 cpm/mg u leczonych liraglutylem i 1927, 1822, 1906 u otrzymujących placebo.
- **Pierwszą fazę wydzielania insuliny** określano po dożylnym podaniu bolusa glukozy. O godzinie 9.15 podano dożylnie 25 g glukozy w ciągu 2 minut. Następnie do godziny 9.32 co 2–5 minut pobierano próbki krwi w celu oznaczenia stężeń glukozy i insuliny.
- **Kłamerę hiperglikemiczną.** Od godziny 9.32 do 11.45 podawano 20-procentowy roztwór gluko-

zy we wlewie dożylnym, aby utrzymać stężenie glukozy w osoczu na poziomie 16 mmol/l. Po 75 minutach (po ustabilizowaniu się glikemii), co 10 minut (od 10.45 do 11.15) pobierano próbki krwi w celu oznaczenia stężeń glukozy w osoczu oraz insuliny, C-peptydu i proinsuliny w surowicy.

- **Próbkę stymulacji argininy.** O godzinie 11.15 przez 30 sekund podawano dożylnie bolus 5 g argininy, a następnie do godziny 11.45 co 5 minut pobierano próbki krwi w celu oznaczenia stężeń glukozy, insuliny, C-peptydu, glukagonu i proinsuliny.
- **Ocenę bezpieczeństwa.** W ciągu całego badania kontrolowano zdarzenia niepożądane, czynności życiowe, parametry hematologiczne i biochemiczne.

Badania

Powtórzono wszystkie badania biochemiczne. Stężenie glukozy w osoczu mierzono glukometrem (*Beckman Instruments*, Palo Alto, CA) metodą oksydazy glukozy natychmiast po pobraniu krwi. Wszystkie pozostałe próbki surowicy i osocza przechowywano do momentu wykonania badań w temperaturze -20° (C-peptyd w temp. -80°C). Stężenie insuliny w surowicy oznaczano, stosując wysoce czułą i swoistą metodę immunoenzymatyczną (*two-site enzyme-linked immunosorbent assay*) (ELISA; *DAKO Diagnostics*, Cambridgeshire, Wielka Brytania). Stężenie C-peptydu w surowicy mierzono metodą ELISA z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych, z wewnętrznym współczynnikiem zmienności 5,1% (*DAKO Diagnostics*). Stężenie proinsuliny w osoczu oceniano swoistą metodą immunologiczną, w której nie występowały krzyżowe reakcje z insuliną i C-peptydem (*DAKO Diagnostics*). Stężenie acetaaminofenu w surowicy określano po ekstrakcji metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Stę-

zenie glukagonu w osoczu oznaczano za pomocą zestawu do badania radioimmunologicznego (*Linco Research*). Stężenia liraglutylu badano metodą ELISA z użyciem monoklonalnych przeciwciał przeciw GLP-1/liraglutylowi w celu wykrycia związanych przeciwciał i innych monoklonalnych przeciwciał swoistych dla grupy NH_2 na końcu cząsteczki GLP-1/liraglutylu. Przed tym badaniem próbki krwi inkubowano w temperaturze 37°C , co pozwoliło usunąć endogenne GLP-1, nie wpływając na liraglutyl. Metodę badania aktywności $3\text{-}^3\text{H}$ -glukozy opisano wcześniej [19]. Pomiar wzbogacenia deuterem 2. i 5. węgla glukozy przeprowadzono metodą opisaną przez Landaua i wsp. [20]. Rozcieńczono 15 ml krwi w 30 ml odmineralizowanej wody, a następnie odbiałczono, używając 15 ml 0,3 n ZnSO_4 i 15 ml 0,3 n Ba(OH)_2 . Następnie próbki odwirowywano przez 15 minut z prędkością 2000 obr./min, po czym osad rozcieńczono w 15 ml odmineralizowanej wody, aby wypłukać pozostałości glukozy. Za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej wyizolowano glukozę. Aby zbadać wzbogacenie deuterem węgla C_5 , najpierw przekształcono glukozę w ksylozę, a węgiel 5. został odszczepiony przez oksydację nadjodanem do formaldehydu, który następnie skondensowano z wodorotlenkiem amonowym, aby doprowadzić do powstania heksametylenotetraminy (HMT, *hexamethylenetetramine*). Wiązanie ^2H z węglem C_2 glukozy wyizolowano po przekształceniu glukozy w rybitolo-5-fosforan i arabitol-5-fosforan, a następnie poddano reakcjom prowadzącym do uzyskania HMT. Wzbogacenie HMT mierzono przy użyciu spektrometru masowego, porównując próbki badane ze standardowymi.

Obliczenia i statystyka

Wyniki analiz próbek krwi pobranych na czczo o godzinach 7.30 i 8.00 w 8. i 9. dniu badania przedstawiono jako średnie. Ponadto, podano stężenie glukozy w osoczu na czczo w 9. dniu badania. Pole pod krzywą dla substratów i hormonów obliczano, stosując zasadę trapezoidu. Endogenne uwalnianie glukozy obliczono za pomocą równania Steala dla stanu równowagi w modyfikacji Finegooda i wsp. [21]. Udział glukoneogenezy (GNG, *gluconeogenesis*) w produkcji glukozy jest równy stosunkowi liczby wiązań z deuterem przy 5. węglu glukozy do liczby wiązań z deuterem przy 2. węglu. Wskaźnik GNG na czczo uzyskano przez pomnożenie średnich wartości EGR od godziny 8.00 do 9.00 przez średni ułamkowy udział GNG w tym samym czasie. Wskaźnik glikogenolizy (GLY, *glycogenolysis*) obliczono odejmując wskaźnik GNG od całkowitej EGR. Wydziela-

nie insuliny (ISR, *insulin secretion rates*) obliczono za pomocą analizy matematycznej (dekonwolucja) na podstawie stężeń C-peptydu w naczyniach obwodowych, z użyciem modelu opisanego przez Polonsky'ego i wsp. [22] i standardowych parametrów kinetycznych C-peptydu zawartych w publikacji Van Cautera i wsp. [23]. Zastosowanie tego modelu umożliwi dokładne wyliczenie IRS również w stanie nierównowagi. Ocenę czynności komórek β przeprowadzono, wykorzystując także homeostatyczny model matematyczny (HOMA-B i R) [24], wprowadzając stężenia glukozy i insuliny po 14-godzinnym poście i 24 godziny po ostatnim wstrzyknięciu liraglutylu. Insulinooporność wyliczono, dzieląc ilość glukozy podanej podczas stanu równowagi klamry hiperglikemicznej przez średnie stężenie insuliny w surowicy. Ponadto, obliczono odpowiednik wskaźnika podatności, mnożąc $1/\text{HOMA-R}$ przez maksymalne stężenie insuliny w czasie badania 1. fazy jej wydzielenia [25].

Analizy statystyczne przeprowadzono, stosując model mieszany, w którym sekwencja leczenie-wizyta-leczenie stanowiły czynniki stałe, natomiast choroby — czynniki losowe. Różnice uznawano za istotne przy $p < 0,05$. Wszystkie wyniki analiz przedstawiono jako: liraglutyl versus placebo.

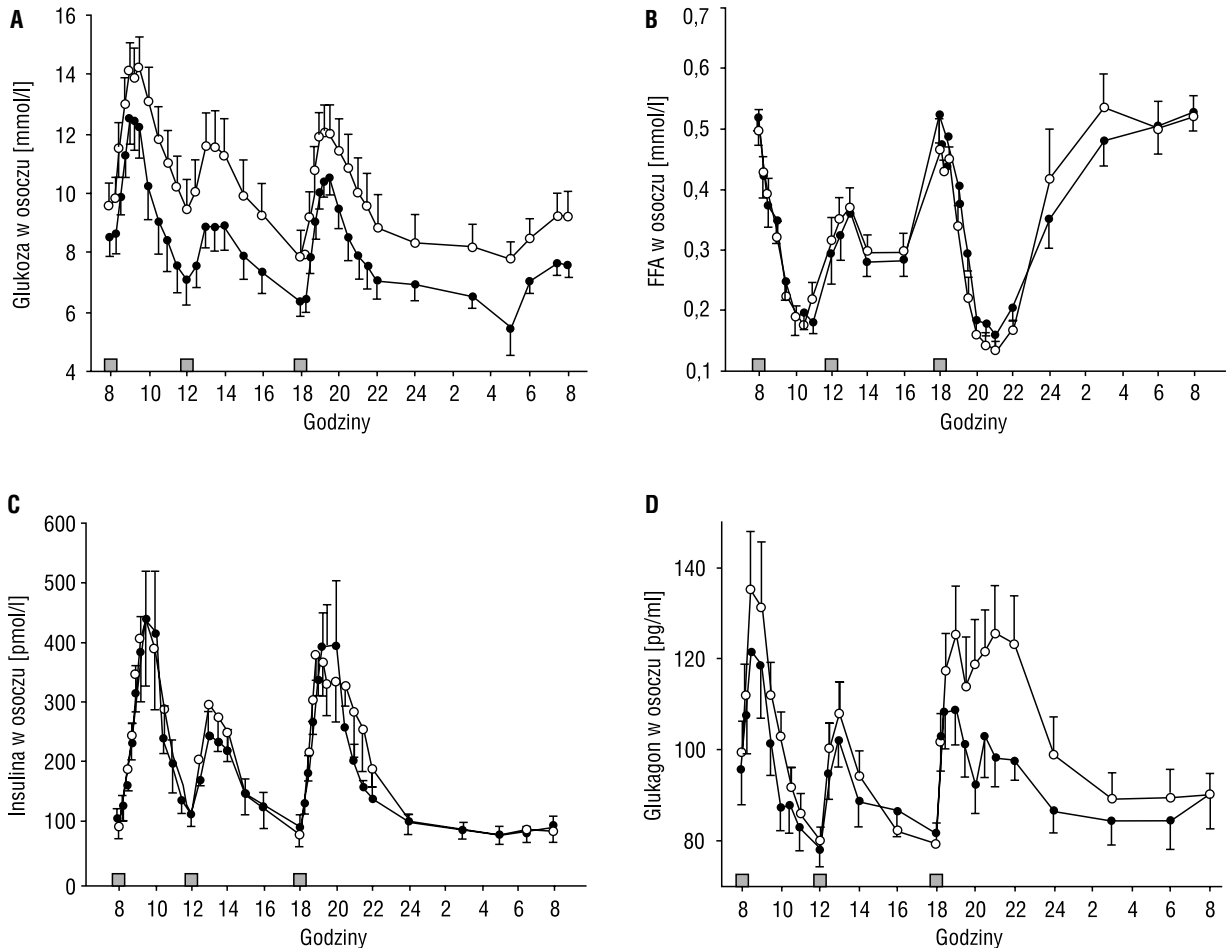
Wyniki

Dobowe profile stężeń substratów i hormonów

Średnie stężenie glukozy w osoczu ($p = 0,01$) w ciągu 24 godzin i po wszystkich 3 posiłkach obniżyły się o około 20% (odpowiednio: $p = 0,01$, $p = 0,02$, $p = 0,02$) w czasie leczenia liraglutydem. Stwierdzono również niższe wartości glikemii na czczo (ryc. 2, tab. 1).

Stężenia krążącej insuliny na czczo, 24-godzinne AUC dla insuliny, poposiłkowe stężenie insuliny oraz IRS były porównywalne po stosowaniu liraglutylu i placebo, poza niższą glikemią podczas aktywnego leczenia, co świadczy o relatywnie większej sekrecji insuliny. Wskaźnik 24-godzinny $\text{AUC}_{\text{insulina}}/\text{AUC}_{\text{glukoza}}$ był istotnie większy podczas stosowania liraglutylu ($p < 0,5$), natomiast w przypadku wskaźnika insulina/glukoza ($p < 0,15$) zaobserwowano jedynie trend. Wskaźniki proinsulina/insulina i proinsulina/insulina po śniadaniu były istotnie zmniejszone w czasie stosowania liraglutylu ($p < 0,01$).

Obecność liraglutylu istotnie zmniejsza 24-godzinne AUC dla glukagonu ($p = 0,04$), głównie na skutek wyraźnej redukcji stężenia glukagonu po wieczornym posiłku bogatym w białko ($p < 0,01$).



Rycina 2. Dwudziestyczerogodzinny profil stężeń glukozy (A), FFA (B), insuliny (C) i glukagonu (D) w osoczu (średnie \pm SEM) w 8. dniu badania; \circ placebo; \bullet liraglutyd; \blacksquare posiłki; FFA (free fatty acids) — wolne kwasy tłuszczowe; (dane statystyczne przedstawiono w tab. 1)

Stężenie glukagonu na czczo pozostało niezmiennione. Nie zaobserwowano istotnych różnic wielkości 24-godzinnej AUC dla wskaźnika insulina/glukagon między chorymi otrzymującymi liraglutyd i placebo ($1,78 \pm 0,28$ pmol/ μ g vs. $1,72 \pm 0,32$ pmol/ μ g; $p = 0,20$). Również 24-godzinne AUC dla stężenia FFA na czczo nie zmieniło się podczas leczenia liraglutylem.

Szybkość opróżniania żołądka

Wielkości $AUC_{\text{acetaminofen}}$ podczas śniadania (210 ± 16 vs. 210 ± 12 μ mol/h) i $AUC_{\text{acetaminofen}}$ podczas kolacji (178 ± 10 vs. 179 ± 9 μ mol/h) były niemal identyczne. Nie wykazano również znaczącej różnicy wartości t_{max} podczas śniadania (40 ± 8 min w czasie stosowania liraglutylu vs. 32 ± 4 min w trakcie stosowania placebo) i kolacji (62 ± 10 vs. 50 ± 7 min).

Endogenne uwalnianie glukozy

Podczas stosowania liraglutylu EGR na czczo istotnie się zmniejszyło ($1,92 \pm 0,06$ vs. $2,13 \pm$

$\pm 0,09$ mg/kg/min; $p = 0,04$). Było to spowodowane zmniejszoną GLY ($0,83 \pm 0,04$ vs. $1,02 \pm 0,04$ mg/kg/min; $p = 0,01$). Z kolei GNG pozostała niezmienniona (ryc. 3).

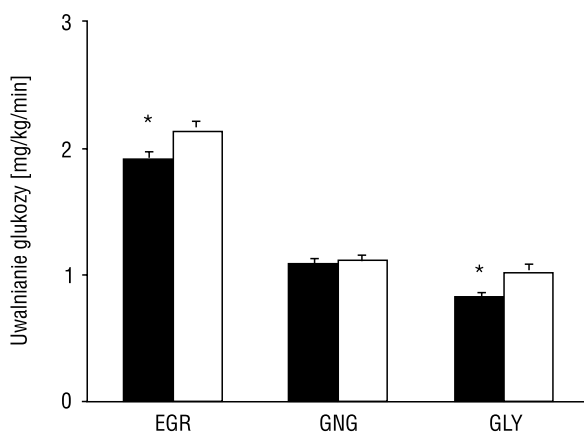
Czynność komórek wysp trzustkowych

Czynność komórek β na czczo, oceniana z użyciem modelu HOMA-B, wzrosła o 30% podczas stosowania liraglutylu ($p = 0,01$). Pierwsza faza reaktywnego wydzielania insuliny po podaniu dożylnie bolusa glukozy zwiększyła się o około 60% ($p < 0,01$). Podczas stabilizacji glikemii w czasie klamry hiper-glikemicznej zaobserwowano 2–3,5-krotne zwiększenie średniego stężenia insuliny, natomiast średnie stężenie krążącego glukagonu zmniejszyło się o około 20% ($p < 0,01$). Podobnie, wydzielanie insuliny w odpowiedzi na wlew argininy wzrosło istotnie po zastosowaniu liraglutylu ($p < 0,01$), natomiast zmniejszyło się reaktywne wydzielanie glukagonu ($p = 0,01$). Po podaniu liraglutylu, podczas klamry

Tabela 1. Wartości badanych parametrów — dobowe i na czczo

	Liraglutyd	Placebo	p
Na czczo			
Glukoza w osoczu [mmol/l]	8,06 ± 0,52	9,39 ± 0,76	0,078
Glukoza w osoczu w 9. dniu [mmol/l]	7,56 ± 0,42	9,20 ± 0,78	0,025
FFA [mmol/l]	0,52 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,536
Insulina [pmol/l]	95,6 ± 15,1	87,2 ± 17,9	0,513
ISR (nmol/h)	17,7 ± 2,0	16,1 ± 2,1	0,206
Stosunek proinsulina/insulina	0,17 ± 0,04	0,27 ± 0,05	0,009
Glukagon [pg/ml]	92,8 ± 7,2	94,5 ± 5,6	0,586
Całkowite dobowe AUC			
Glukoza w osoczu [mmol/h]	187,5 ± 14,0	232,3 ± 21,9	0,014
FFA [mmol/h]	8,54 ± 0,51	8,65 ± 0,68	0,876
Insulina [pmol/h]	3854 ± 581	4154 ± 881	0,375
ISR [nmol]	566,1 ± 55,1	561,6 ± 72,6	0,982
Glukagon [pg/h]	2179 ± 118	2371 ± 135	0,037
Całkowite poposiłkowe AUC			
Glukoza w osoczu 8.00–12.00 [mmol/h]	38,66 ± 3,52	47,51 ± 3,95	0,010
Glukoza w osoczu 12.00–16.00 [mmol/h]	32,52 ± 2,92	41,89 ± 4,54	0,017
Glukoza w osoczu 18.00–22.00 [mmol/h]	33,76 ± 2,50	41,10 ± 3,94	0,016
Insulina 8.00–12.00 [pmol/h]	999 ± 173	1056 ± 253	0,512
Insulina 12.00–16.00 [pmol/h]	723 ± 107	808 ± 162	0,312
Insulina 18.00–22.00 [pmol/h]	1017 ± 160	1117 ± 221	0,392
Stosunek proinsulina/insulina 8.00–12.00	0,12 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,008
Glukagon 8.00–12.00 [pg/h]	383,0 ± 22,8	413,4 ± 25,6	0,080
Glukagon 12.00–16.00 [pg/h]	362,6 ± 18,6	374,2 ± 19,5	0,384
Glukagon 18.00–22.00 [pg/h]	397,3 ± 23,9	470,1 ± 35,2	0,009

Dane przedstawiono jako średnie ± SEM. Dobowe pole pod krzywą AUC (*area under the curve*) obliczono na podstawie analiz próbek krwi pobranych w godzinach 8.00–8.00. Parametry na czczo obliczono na podstawie analiz próbek krwi pobranych w 8. i 9. dniu badania w godzinach 7.30 i 8.00.



Rycina 3. Endogenne uwalnianie glukozy, GNG i glikogenezoliza na czczo w 9. dniu badania; dane przedstawiono jako średnie ± SEM; □ placebo; ■ liraglutyd; *p < 0,05, liraglutyd vs. placebo; EGR (*endogenous glucose release*) — endogenne uwalnianie glukozy; GNG (*gluconeogenesis*) — glukoneogeneza; GLY (*glycogenolysis*) — glikogenezoliza

hiperglikemicznej (ryc. 4, tab. 2), wskaźnik proinsulina/insulina zmniejszył się o 40–50%.

Insulinowrażliwość i wskaźnik podatności

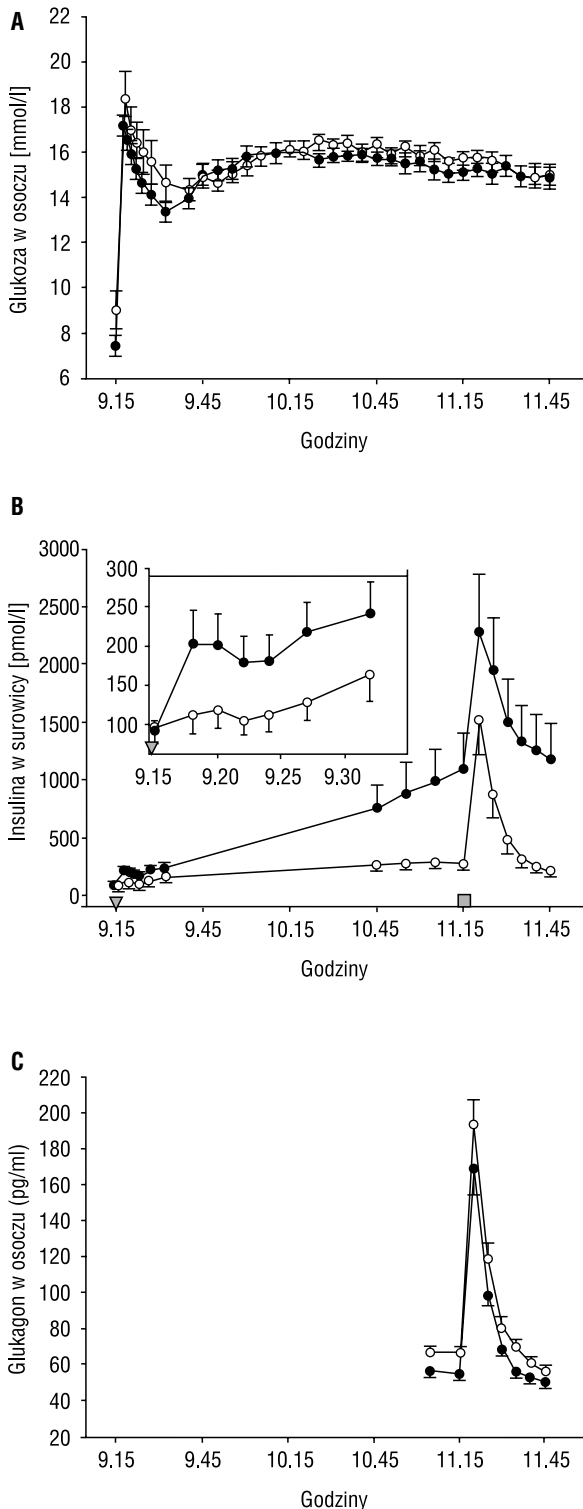
Po zastosowaniu liraglutylu nie zaobserwowano zmian insulinowrażliwości (obliczonej za pomocą modelu HOMA-R i stosunku wielkość wlewu glukozy/średnie stężenie insuliny), natomiast wskaźnik podatności znacznie wzrósł, niemal podwajając swoją wartość po podaniu leku (p < 0,01) (tab. 2).

Właściwości farmakokinetyczne

Czas półtrwania liraglutylu w stanie równowagi wynosił 17,9 godziny, a t_{max} wynosił $10,1 \pm 3$ godziny (ryc. 5).

Bezpieczeństwo

W czasie badania nie odnotowano żadnych epizodów hipoglikemii. U 3 chorych w okresie przy-



Rycina 4. Stężenia glukozy w osoczu (**A**) i insuliny w surowicy (**B**) po dożylnym podaniu glukozy w bolusie, podczas klamry hiperglikemicznej i testu stymulacji argininą w 9. dniu badania. ○ placebo; ● liraglutyd; ▽ bolus glukozy (25 g); ■ bolus argininy (5 g). Przedstawiono stężenie glukagonu w osoczu od godziny 11.05; stan stabilizacji glikemii podczas pętli hiperglikemicznej odbywał się w godzinach 10.45–11.15; w okienku umieszczonym w środkowym wykresie przedstawiono w powiększeniu 1. fazę reaktywnego wydzielania insuliny; dane przedstawiono jako średnie ± SEM (szczegółowe dane statystyczne zawarto w tab. 2).

mowania leku wystąpiły żołądkowo-jelitowe objawy niepożądane (nudności i bóle brzucha). U 2 pacjentów objawy te ustąpiły po pierwszych dniach leczenia, natomiast u 3 — dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego stopniowo stawały się mniej nasilone w ciągu tygodnia. Te 3 osoby to chorzy, u których stężenie liraglutynu w osoczu było największe. Nie odnotowano innych niepokojących symptomów związanych ze stosowaniem leku.

Dyskusja

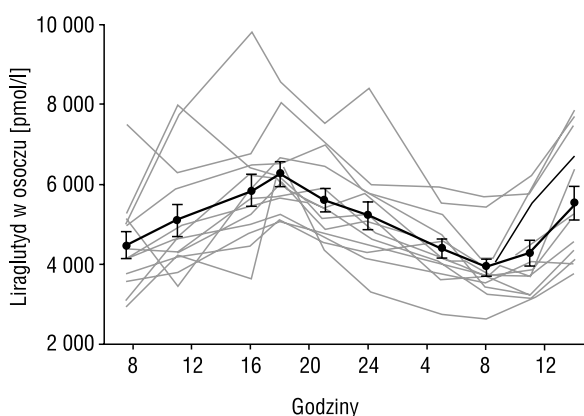
Autorzy badali wpływ tygodniowej terapii pochodną GLP-1, liraglutynem (NN2211) na dobowe profile stężeń substratów i hormonów, EGR oraz czynność komórek wysp trzustkowych w warunkach codziennego życia. Najistotniejszym działaniem leku zaobserwowanym podczas badania było istotne obniżenie stężeń glukozy w ciągu doby — na czczo, po posiłkach i w nocy. Oceniając średnią redukcję stężenia glukozy w osoczu (ok. 2 mmol/l), należy podkreślić, że u 6 z 13 chorych stężenie glukozy w osoczu na czczo wynosiło poniżej 8,3 mmol/l (graniczna wartość glikemii, powyżej której należy podjąć leczenie), nawet po odstawieniu OHA [26]. Ponadto, badanie trwało tylko 1 tydzień, co jest przypuszczalnie zbyt krótkim okresem, aby ujawniły się dodatkowe korzyści, na przykład poprawa w zakresie insulinooporności, wynikająca ze zmniejszenia toksycznego wpływu glukozy. Ponadto, wszyscy badani otrzymali taką samą dawkę liraglutynu (6 μ g/kg mc.). Prawdopodobnie u niektórych osób po zwiększeniu dawki nastąpiłoby dalsze obniżenie glikemii. Omawiane badanie potwierdza, że liraglutyd działa podobnie korzystnie jak GLP-1 na stężenie glukozy u chorych na cukrzycę typu 2 [12, 13, 27] i wykazuje, że dawkowanie raz na dobę zapewnia 24-godziną skuteczność (patrz poniżej, farmakokinetyka). Należy również podkreślić, że podczas badania nie odnotowano żadnych epizodów hipoglikemii, chociaż u niektórych pacjentów stosujących liraglutyd uzyskano dobrą kontrolę glikemii.

Poprawa wyrównania glikemii podczas leczenia liraglutynem prawdopodobnie jest spowodowana zmianami sekrecji insuliny i glukagonu. Podstawowe i poposiłkowe wartości ISR nie zmieniły się mimo wyraźnego zmniejszenia glikemii, co wyraźnie wskazuje na poprawę czynności komórek β w warunkach życia codziennego. Obserwacje te są zgodne z wynikami wcześniejszych badań, w których analizowano działanie naturalnego GLP-1 [12, 13, 27] i świadczą o tym, że GLP-1 i/lub jego pochodne poprawiają wydzielanie komórek β w odpo-

Tabela 2. Badanie czynności komórek wyspowych, wrażliwości na insulinę i wskaźnika podatności

	Liraglutyd	Placebo	p
Dożylny test tolerancji glukozy			
Całkowite AUC dla insuliny 9.15–9.32 [pmol/h]	55,45 ± 9,93	34,26 ± 6,4	0,008
Maksymalne stężenie insuliny 9.15–9.32 [pmol/l]	262,6 ± 47,5	166,5 ± 32,4	0,007
Klamra hiperglikemiczna, stan stabilny			
Stężenie insuliny [pmol/l]	929,6 ± 262,9	271,9 ± 53,3	0,015
Stosunek proinsulina/insulina	0,09 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,001
Stężenie glukagonu [pg/ml]	55,5 ± 3,7	66,7 ± 3,5	0,005
GIR/średnie stężenie insuliny w surowicy (jednostki bezwzględne)	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,392
Test stymulacji arginina			
Całkowite AUC dla argininy 11.15–11.45 [pmol/h]	799,6 ± 190	307,2 ± 65,5	0,004
Maksymalne stężenie insuliny [pmol/l]	2539 ± 523	1518 ± 296	0,005
Całkowite AUC dla glukagonu 11.15–11.45 [pg/h]	40,7 ± 2,5	48,7 ± 3,0	0,012
Maksymalne stężenie glukagonu [pg/ml]	162,0 ± 13,7	193,4 ± 14	0,034
Analiza HOMA			
Czynność komórek β (% normy)	59,95 ± 8,84	46,07 ± 9,86	0,010
Insulinooporność (wzrost w stosunku do normy)	4,09 ± 0,84	4,74 ± 1,15	0,373
Wskaźnik podatności (pmol/l*HOMA-R)	80,4 ± 14	41,9 ± 5	0,008

Dane przedstawiono jako średnie ± SEM — GIR (*glucose infusion rate*); wielkość wlewu glukozy; AUC (*area under the curve*) — pole pod krzywą



Rycina 5. Profile stężeń liraglutylu. Czas podawania leku — 7.30; szare linie odpowiadają profilom stężeń u poszczególnych chorych; czarna linia przedstawia średnie ± SEM

wiedzi na bodźce związane z posiłkiem, czyli wzrost glikemii i zmiany stężenia glukozy.

Kolejnym ważnym wnioskiem z badania jest fakt, że liraglutyd istotnie obniża dobowe stężenie krążącego glukagonu. Wyraźnemu zmniejszeniu uległ przede wszystkim duży wyrzut glukagonu, po

obfitującym w białko posiłku wieczornym. W cukrzycy typu 2 często upośledzone jest hamowanie wydzielania glukagonu [5, 28], co jest główną przyczyną poposiłkowej hiperglikemii [4]. Hiperglikemia *per se* hamuje sekrecję glukagonu. Po podaniu liraglutylu, mimo niskiej glikemii, obserwowano zmniejszenie stężenia glukagonu w osoczu.

Hamujący wpływ naturalnego GLP-1 na motorykę górnego odcinka przewodu pokarmowego został dobrze poznany [29]. W badaniu z zastosowaniem liraglutylu podawanego raz na dobę odnotowano również opóźnienie opróżniania żołądka [16]. Natomiast w opisywanym badaniu nie stwierdzono wpływu liraglutylu na motorykę żołądka. Wyniki badania szybkości opróżniania żołądka z zastosowaniem acetaminofenu były zgodne z rezultatami analiz wykonanych dużo bardziej skomplikowanymi metodami [30]. Prawdopodobnie wyraźne rozbieżności między wcześniejszymi danymi a rezultatami otrzymanymi przez autorów były spowodowane tachyfilaksją. Jednak podczas dwóch badań działania liraglutylu/naturalnego GLP-1 u zwierząt [31] i ludzi [12] obserwowano wpływ na opróżnianie żołąd-

ka po kilku tygodniach terapii. Możliwe, że brak wpływu na motorykę żołądka w badaniu autorów był spowodowany zbyt małą dawką leku. Prawdopodobnie zależności dawka-reakcja są odmienne dla działania hipoglikemizującego i opóźniania opróżniania żołądka, z odchyleniem w prawo dla opóźnienia opróżniania żołądka.

Innym zjawiskiem zaobserwowanym po raz pierwszy jest zmniejszenie EGR po podaniu liraglutytu, co może być spowodowane wzrostem wskaźnika insulina/glukagon. Jednak we krwi obwodowej nie stwierdzono jego istotnego wzrostu. Należy zaznaczyć, że nie odnotowano zmian w stężeniach krążących FFA. U chorych na cukrzycę uczestniczących w badaniu EGR na czczo stężenie to mieściło się w granicach normy. Przypuszczalnie było to spowodowane wpływem 10-procentowej redukcji EGR na czczo (ok. 10 g glukozy w ciągu nocy). Biorąc pod uwagę znaczenie zmian stężenia krążącego glukagonu na wątrobowe przemiany glukozy po posiłkach, uzasadnione jest założenie, że w ciągu dnia wystąpi znacznie większe zmniejszenie EGR [4, 32, 33].

Autorzy zbadali również wpływ stosowania liraglutytu na udział GNG i GLY na EGR. Przyjęta metoda pozwalała jedynie na zbadanie kinetyki stężenia glukozy na czczo. Według kilku autorów zwiększone EGR u chorych na cukrzycę typu 2 wiąże się przede wszystkim z nasiloną GNG [2, 3, 34, 35]. W omawianym badaniu wykazano, że hamujący wpływ pochodnej GLP-1 — liraglutytu — na EGR na czczo był spowodowany wyłącznie ograniczeniem GLY, natomiast GNG na czczo się nie zmieniła. Oczekiwać można było przeciwnych rezultatów, to znaczy zahamowania GNG. Jednak inne badania, przeprowadzone na przykład przez Cherringtona i wsp. [36], wykazały, że hamujący wpływ fizjologicznych stężeń glukozy (w przeciwieństwie do podwyższonej glikemii) na wątrobową produkcję glukozy jest spowodowany głównie zmniejszoną GLY, natomiast w mniejszym stopniu zależy od bezpośredniego działania insuliny. Pobudzający wpływ glukagonu na wątrobowe uwalnianie glukozy wynika przede wszystkim z rozkładania glikogenu, natomiast wpływ hormonów na GNG odgrywa mniejszą rolę [36, 37]. Bardzo duże stężenie insuliny w żyłce wrotnej może zahamować wątrobową GNG, jednak może to być spowodowane głównie pośrednim wpływem zmniejszonej lipolizy i zaburzenia stężenia FFA w osoczu [36].

Biorąc pod uwagę obniżenie glikemii, stężenie insuliny i glukagonu na czczo musiało być odpowiednio zwiększone lub zmniejszone, chociaż nie zaobserwowano istotnych zmian. Ponadto stężenia hor-

monów w krwi obwodowej mogą nieznacznie różnić się od stężeń w żyłce wrotnej. Dotychczas nie zbadano, jaki wpływ u chorych na cukrzycę typu 2 z gorzej wyrównaną cukrzycą (z powodu istotnego nasilenia EGR) wywiera GLP-1 lub jego pochodne na GLY i GNG.

Główną cechą cukrzycy typu 2 jest postępujące upośledzenie czynności komórek β , prowadzące do niedoboru insuliny [1, 38]. Wydaje się, że do pogorszenia funkcji komórek wysp trzustkowych przyczynia się zarówno zmniejszenie masy komórek β , jak i ich nieprawidłowe działanie [39]. Jest to prawdopodobnie aktywny proces, na który niewielki wpływ wywiera leczenie hipoglikemizujące [38]. Pierwszym objawem uszkodzenia komórek β jest zanik pierwszej fazy wydzielania insuliny w reakcji na wzrost stężenia glukozy, później w miarę postępu choroby zmniejsza się podstawowe wydzielanie insuliny i spada wyrzut hormonu w 2. fazie wydzielania reaktywnego [39, 40]. Dodatkowo, występuje nieprawidłowy dobowy profil wydzielania glukagonu [5, 33], dlatego w leczeniu cukrzycy typu 2 należy przeciwdziałać zaburzeniom funkcji komórek α i β .

Poprawę czynności komórek β u chorych na cukrzycę typu 2, ocenianą na podstawie 1. i 2. fazy reaktywnego wydzielania insuliny, zaobserwowano po 6–12 godzinach po infuzji GLP-1 [41]. W trwającym 6 tygodni badaniu stwierdzono podobny wpływ GLP-1 na czynność komórek β , wyraźnie potwierdzając utrzymywanie się jego korzystnego działania [12]. Po 8 dniach stosowania liraglutytu odnotowano wyraźną poprawę czynności komórek β , co świadczy o wpływie GLP-1 na pierwszą i drugą fazę reaktywnego wydzielania insuliny oraz o osiągnięciu (nieomal) maksymalnej zdolności wydzielniczej. Ponadto, autorzy zaobserwowali niemal 50-procentowe zmniejszenie wskaźnika proinsulina/insulina we krwi na czczo i po stymulacji. To spostrzeżenie może świadczyć o poprawie przetwarzania insuliny w komórkach β . W omawianym badaniu stosowanie liraglutytu spowodowało, że wskaźnik proinsulina/insulina na czczo osiągnął wartości zbliżone do prawidłowych. Zwiększenie wskaźnika proinsulina/insulina jest podstawową cechą cukrzycy typu 2 i stanu przedcukrzycowego [42, 43] i uznaje się je za dobry wyznacznik dysfunkcji komórek β [44]. Ponadto, leczenie liraglutylem powoduje niemal podwojenie wskaźnika podatności, który odzwierciedla zdolność komórek β do dostosowania się do aktualnego stanu insulinooporności (allostaza glukozy) [45]. Fakt ten potwierdza silny wpływ GLP-1 i jego pochodnych na komórki β .

Zaobserwowano również, że liraglutyd reguluje czynność trzustki przez istotne hamowanie wydzielania glukagonu podczas hiperglikemii, a zwłaszcza podczas infuzji argininy, co świadczy o tym, że liraglutyd skutecznie poprawia czynność wydzielniczą komórek α i β u chorych na cukrzycę typu 2. Można oczekiwać, że to korzystne działanie utrzyma się również podczas długotrwałego stosowania leku. Bardzo możliwe, że wpływ pochodnych GLP-1 na czynność komórek wysp trzustkowych, a w konsekwencji na wyrównanie glikemii, przyniesie kolejne korzystne efekty, związane z długotrwałym leczeniem, zarówno bezpośrednio przez troficzny wpływ GLP-1 na komórki β , jak i działanie pośrednie, związane z redukcją toksycznego wpływu hiperglikemii.

Farmakokinetyczne właściwości liraglutylu oceniano na podstawie 30-godzinne go profilu w osoczu podczas stanu stabilizacji glikemii. Okres półtrwania w osoczu wynosił około 18 godzin, a t_{max} — około 10 godzin. W czasie badania podawano lek rano, a maksymalne stężenie w osoczu obserwowano około godziny 18.00. Zarówno korzystne działanie leku na wartości glikemii, jak i jego stosunkowo wysokie stężenie w osoczu utrzymywały się przez całą dobę, co wskazuje na to, że podawanie leku raz na dobę jest wystarczające. Istnieje również możliwość podawania leku wieczorem. Należy zbadać, czy takie dawkowanie okaże się korzystniejsze niż przyjmowanie leku w godzinach porannych.

Podsumowując, autorzy stwierdzili, że stosowanie przez 1 tydzień raz na dobę pochodnej GLP-1 — liraglutylu — u chorych na cukrzycę typu 2 powoduje: 1) istotne zmniejszenie glikemii w ciągu doby spowodowane relatywnym wzrostem sekrecji insuliny i spadkiem stężenia glukagonu; 2) zmniejszenie EGR na skutek ograniczenia GLY; 3) wyraźną poprawę AIR (*acute insulin response*, szybki wzrost wydzielania insuliny w odpowiedzi na stymulację) i uzyskanie maksymalnej zdolności do wydzielania insuliny. Podczas dłuższego leczenia oprócz działania przeciwcukrzycowego mogą wystąpić dodatkowe korzyści w postaci wzrostu masy komórek β i zmniejszenia masy ciała.

Podziękowania

Finansowe wsparcie badania zapewniły następujące instytucje: *Danish Diabetes Association; Institute of Experimental Clinical Research; University of Aarhus; Novo Nordisk A/S, Kopenhaga; National Institutes of Health* (grant 14507).

Autorzy dziękują Annette Mengel, Lene Ring i Elsebeth Hornemann za pomoc techniczną.

PIŚMIENNICTWO:

- Ferrannini E.: Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr. Rev.* 1998; 19: 477–490.
- Consoli A., Nurjhan N., Capani F., Gerich J.: Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* 1989; 38: 550–557.
- Magnusson I., Rothman D.L., Katz L.D., Shulman R.G., Shulman G.I.: Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 1323–1327.
- Shah P., Vella A., Basu A., Basu R., Schwenk W.F., Rizza R.A.: Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85: 4053–4059.
- Reaven G.M., Chen Y.D., Golay A., Swislocki A.L., Jaspas J.B.: Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987; 64: 106–110.
- Viltsboll T., Krarup T., Deacon C.F., Madsbad S., Holst J.J.: Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2001; 50: 609–613.
- Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33): U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352: 837–853.
- Gaede P., Vedel P., Larsen N., Jensen G.V., Parving H.H., Pedersen O.: Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 383–393.
- Nauck M.A.: Is glucagon-like peptide 1 an incretin hormone? *Diabetologia* 1999; 42: 373–379.
- Stoffers D.A., Kieffer T.J., Hussain M.A. i wsp.: Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 2000; 49: 741–748.
- Flint A., Raben A., Astrup A., Holst J.J.: Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 515–520.
- Zander M., Madsbad S., Madsen J.L., Holst J.J.: Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 2002; 359: 824–830.
- Meneilly G.S., Grieg N., Tildesley H., Habener J.F., Egan J.M., Eliha D.: Effects of 3 months of continuous subcutaneous administration of glucagon-like peptide 1 in elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2835–2841.
- Deacon C.F., Nauck M.A., Toft-Nielsen M., Pridal L., Willms B., Holst J.J.: Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 1995; 44: 1126–1131.
- Agerso H., Jensen L.B., Elbrond B., Rolan P., Zdravkovic M.: The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men. *Diabetologia* 2002; 45: 195–202.
- Juhl C.B., Hollingdal M., Sturis J. i wsp.: Bedtime administration of NN2211, a long-acting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 424–429.
- Matthews D., Madsbad S., Schmitz O., Lagendorf K.W., Jakobsen G.: The long-acting GLP-1 derivative, NN2211, a new agent for the treatment of type 2 diabetes (Abstract). *Diabetes* 2002; 51 (supl. 2): A84.

18. Clements J.A., Heading R.C., Nimmo W.S., Prescott L.F.: Kinetics of acetaminophen absorption and gastric emptying in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1978; 24: 420–431.
19. Hother-Nielsen O., Mengel A., Moller J., Rasmussen O., Schmitz O., Beck-Nielsen H.: Assessment of glucose turnover rates in euglycaemic clamp studies using primed-constant [3-3H]-glucose infusion and labelled or unlabelled glucose infusates. *Diabet. Med.* 1992; 9: 840–849.
20. Landau B.R., Wahren J., Chandramouli V., Schumann W.C., Ekberg K., Kalhan S.C.: Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 378–385.
21. Finegood D.T., Bergman R.N., Vranic M.: Estimation of endogenous glucose production during hyperinsulinemic-euglycemic glucose clamps: comparison of unlabeled and labeled exogenous glucose infusates. *Diabetes* 1987; 36: 914–924.
22. Polonsky K.S., Licinio-Paixao J., Given B.D. i wsp.: Use of bio-synthetic human C-peptide in the measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and type I diabetic patients. *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 98–105.
23. Van Cauter E., Mestrez F., Sturis J., Polonsky K.S.: Estimation of insulin secretion rates from C-peptide levels: comparison of individual and standard kinetic parameters for C-peptide clearance. *Diabetes* 1992; 41: 368–377.
24. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C.: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412–419.
25. Kahn S.E., Prigeon R.L., McCulloch D.K. i wsp.: Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 1993; 42: 1663–1672.
26. American Diabetes Association: Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2002; 25 (supl. 1): S33–S49.
27. Larsen J., Hylleberg B., Ng K., Damsbo P.: Glucagon-like peptide-1 infusion must be maintained for 24 h/day to obtain acceptable glycemia in type 2 diabetic patients who are poorly controlled on sulphonylurea treatment. *Diabetes Care* 2001; 24: 1416–1421.
28. Butler P.C., Rizza R.A.: Contribution to postprandial hyperglycemia and effect on initial splanchnic glucose clearance of hepatic glucose cycling in glucose-intolerant or NIDDM patients. *Diabetes* 1991; 40: 73–81.
29. Nauck M.A., Wollschlager D., Werner J. i wsp.: Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7–36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 1546–1553.
30. Naslund E., Bogefors J., Gryback P., Jacobsson H., Hellstrom P.M.: Gastric emptying: comparison of scintigraphic, polyethylene glycol dilution, and paracetamol tracer assessment techniques. *Scand. J. Gastroenterol.* 2000; 35: 375–379.
31. Ribel U., Larsen M.O., Rolin B. i wsp.: NN2211: a long-acting glucagon-like peptide-1 derivative with anti-diabetic effects in glucose-intolerant pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 451: 217–225.
32. Singhal P., Caumo A., Carey P.E., Cobelli C., Taylor R.: Regulation of endogenous glucose production after a mixed meal in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002; 283: E275–E283.
33. Dinneen S., Alzaid A., Turk D., Rizza R.: Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 337–343.
34. Wajngot A., Chandramouli V., Schumann W.C. i wsp.: Quantitative contributions of gluconeogenesis to glucose production during fasting in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2001; 50: 47–52.
35. Gastaldelli A., Baldi S., Pettiti M. i wsp.: Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes* 2000; 49: 1367–1373.
36. Cherrington A.D.: Banting Lecture 1997: control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 1999; 48: 1198–1214.
37. Magnusson I., Rothman D.L., Gerard D.P., Katz L.D., Shulman G.I.: Contribution of hepatic glycogenolysis to glucose production in humans in response to a physiological increase in plasma glucagon concentration. *Diabetes* 1995; 44: 185–189.
38. Turner R., Cull C., Holman R.: United Kingdom Prospective Diabetes Study 17: a 9-year update of a randomized, controlled trial on the effect of improved metabolic control on complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124: 136–145.
39. Porte D. Jr: Banting Lecture 1990: β -cells in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 1991; 40: 166–180.
40. Mahler R.J., Adler M.L.: Clinical review 102: type 2 diabetes mellitus: update on diagnosis, pathophysiology, and treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 1165–1171.
41. Ahren B., Larsson H., Holst J.J.: Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82: 473–478.
42. Nyholm B., Walker M., Gravholt C.H. i wsp.: Twenty-four-hour insulin secretion rates, circulating concentrations of fuel substrates and gut incretin hormones in healthy offspring of type II (non-insulin-dependent) diabetic parents: evidence of several aberrations. *Diabetologia* 1999; 42: 1314–1323.
43. Kahn S.E., Halban P.A.: Release of incompletely processed proinsulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM. *Diabetes* 1997; 46: 1725–1732.
44. Roder M.E., Porte D. Jr, Schwartz R.S., Kahn S.E.: Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired β cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 604–608.
45. Stumvoll M., Tataranni P.A., Stefan N., Vozarova B., Bogardus C.: Glucose allostasis. *Diabetes* 2003; 52: 903–909.