

Received: 2005.04.11
Accepted: 2005.07.26
Published: 2006.01.09

Nowe perspektywy terapii chorych na cukrzycę typu 2 oparte na glukagonopodobnym peptydzie 1 (GLP-1) i żołądkowym peptydzie hamującym (GIP)

New therapeutic approach in patients with type 2 diabetes based on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and gastric inhibitory peptide (GIP)

Joanna Kluz, Rajmund Adamiec

Katedra i Klinika Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Istotą patogenezy cukrzycy typu 2 jest niedostateczne wydzielanie insuliny lub jej niewłaściwe działanie na tkanki obwodowe. Progresja choroby, zależna od narastającego upośledzenia funkcji komórek beta, wydaje się być związana zarówno z postępującą utratą liczby tych komórek, jak również z zaburzoną regulacją hormonalną czynności wysp trzustkowych. Badania ostatnich lat podkreślają podstawowe znaczenie insulinotropowych hormonów jelitowych (tzw. inkretyn): glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1) oraz żołądkowego peptydu hamującego (GIP) dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania komórek beta. Wydzielanie tych hormonów w odpowiedzi na doustne obciążenie glukozą wydaje się głównym czynnikiem warunkującym poposiłkowy wzrost wydzielania insuliny. Jakkolwiek u chorych na cukrzycę typu 2 „efekt inkretynowy” jest wybitnie osłabiony, to zachowanie dobrej odpowiedzi na egzogenny GLP-1 stwarza możliwość nowych rozwiązań terapeutycznych ukierunkowanych na zwiększanie stężenia aktywnych inkretyn w osoczu i w tkankach docelowych. Można to osiągnąć stosując ciągle infuzje natywnego GLP-1 lub jego syntetyczne analogi odporne na rozkład proteolityczny, a także hamując aktywność dipeptydylopeptydazy IV – enzymu odpowiedzialnego za degradację GLP-1 i GIP *in vivo*. Poza zdolnością stymulacji indukowanego posiłkiem wydzielania insuliny, GLP-1, jego analogi oraz GIP mają udokumentowane działanie cytoprotekcyjne w stosunku do komórek beta, polegające na pobudzaniu ich wzrostu, różnicowania, proliferacji oraz przeżycia w warunkach stresu metabolicznego. Podobnie badania przedkliniczne oraz wczesne fazy badań klinicznych, oceniających efektywność i bezpieczeństwo stosowania inhibitorów DP-IV u chorych na cukrzycę typu 2, dostarczyły dowodów potwierdzających korzystny wpływ tych leków na tolerancję glukozy, insulinowrażliwość oraz zdolności sekrecyjne komórek beta.

Słowa kluczowe:

glukagonopodobny peptyd 1 (GLP-1) • żołądkowy peptyd hamujący (GIP) • inhibitory dipeptydylopeptydazy IV • cukrzyca typu 2

Summary

Inadequate secretion of insulin is a very early element in the development of type 2 diabetes and its progression is due to declining beta-cell function. This beta-cell defect is partly related to beta-cell loss, but endocrine regulation of islet function could also be involved. A number of recent studies have highlighted the role of the so-called incretin hormones glucagon-like peptide 1

(GLP-1) and gastric inhibitory peptide (GIP) in beta-cell function and development. Up to two-thirds of the insulin normally secreted in connection with meal intake is thought to be due to the insulinotropic actions of these hormones. Although patients with type 2 diabetes have been demonstrated to exhibit an almost total loss of incretin effect, the glucose-lowering actions of exogenous GLP-1 are well preserved. New therapeutic strategies under investigation include the search for novel agents able to utilize the incretin axis in patients with type 2 diabetes. Two strategies have been applied: the first is treatment with GLP-1, either with chronic infusions or with analogues with diminished clearance, and the second – is inhibiting dipeptidyl peptidase IV, the enzyme that inactivates both GLP-1 and GIP *in vivo*. Inhibition of DP-IV has been shown to raise circulating active incretin levels and thus increase the effective concentrations of these peptides reaching target tissues. Apart from their glucose-dependent manner of stimulating insulin secretion, GLP-1, its analogues, and GIP have been demonstrated to stimulate beta-cell growth, differentiation, proliferation, and survival. Similarly, studies in both humans and in animal models have established DP-IV inhibition as a promising therapeutic approach for the treatment of type 2 diabetes, resulting in an enhancement of glucose tolerance, insulin sensitivity, and beta-cell glucose responsiveness.

Key words: glucagon-like peptide-1 (GLP-1) • gastric inhibitory peptide (GIP) • dipeptidyl peptidase IV inhibitors • type 2 diabetes

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8120.pdf

Word count: 3865

Tables: –

Figures: 1

References: 46

Adres autorki: lek. Joanna Kluz, Klinika Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii AM, ul. Poniatowskiego 2, 50-326 Wrocław; e-mail: joannakluz@wp.pl

Zgodnie z definicją WHO cukrzyca obejmuje przewlekłe zaburzenia metaboliczne o różnorodnej etiologii charakteryzujące się przewlekłą hiperglikemią oraz nieprawidłową przemianą węglowodanów, tłuszczów i białek. Wymienione nieprawidłowości mogą wynikać z upośledzonego wydzielania insuliny, niewłaściwego działania insuliny na tkanki obwodowe lub z jednoczesnego współistnienia obydwu wymienionych zaburzeń.

Stały wzrost zachorowalności spowodowany jest systematycznym wydłużaniem się średniego okresu życia oraz decydującym działaniem czynników środowiskowych, takich jak nadmiar spożywanych kalorii prowadzący do otyłości, dieta obfita w tłuszcze i mała aktywność fizyczna.

Dostępne metody leczenia cukrzycy nie zmieniają w istotny sposób naturalnego przebiegu choroby, skutkiem czego pacjenci cierpią z powodu olbrzymiej liczby przewlekłych, niejednokrotnie śmiertelnych powikłań. Przełomowe, perspektywne badanie UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), prowadzone w latach 1976–1996 u chorych na cukrzycę, wykazało, że żaden ze stosowanych obecnie schematów leczenia nie poprawia znacząco długoterminowego rokowania w przebiegu tej choroby [36]. Optymalnie dobrana terapia powoduje co najwyżej złagodzenie objawów choroby, natomiast nie spowalnia jej progresji, ani nie odraza w czasie chwili rozpoczęcia leczenia insuliną o więcej niż średnio 18 miesięcy. W rezultacie istnieje wielka i niezaspokojona potrzeba wdrożenia nowych metod leczenia, które mogłyby wpływać na mechanizmy patogenetyczne leżące u podłoża choroby, opóźnić w ten

sposób jej postęp, a nawet eliminować konieczność włączenia insulinoterapii.

BIOLOGICZNE WŁAŚCIWOŚCI GLP-1 I GIP

Aktywność badawcza na przestrzeni ostatnich lat koncentruje się na biologicznej roli hormonów jelitowych (inkretyn), głównie glukagonopodobnego peptydu typu 1 (GLP-1 glucagon-like peptide 1) oraz żołądkowego peptydu hamującego (GIP gastric inhibitory peptide), które okazały się silnymi stymulatorami wydzielania insuliny. Endogenny GLP-1 ma wiele właściwości, które sprawiają, że jest on potencjalnie idealnym czynnikiem przeciwcukrzycowym. Peptyd ten, uwalniany do krążenia z komórek L jelita cienkiego w odpowiedzi na doustne przyjęcie pokarmu, obniża glikemię poposiłkową poprzez wpływ na endokrynną funkcję trzustki, motorykę i wydzielanie przewodu pokarmowego oraz mechanizmy ośrodkowe.

W trzustce GLP-1 pełni rolę hormonu inkretynowego stymulując indukowane posiłkiem uwalnianie insuliny z komórek beta. Powyższe działanie jest glukozozależne, co właściwie eliminuje ryzyko wystąpienia hipoglikemii podczas stosowania egzogennych analogów GLP-1. GLP-1 nie tylko stymuluje egzocytozę ziarnistości zawierających insulinę, ale promuje również poszczególne etapy jej biosyntezy. Niedawno zidentyfikowano jego działanie cytoprotekcyjne w stosunku do komórek beta, polegające na pobudzaniu ich proliferacji, różnicowania się oraz przeżycia w warunkach stresu metabolicznego [29]. Coraz więcej danych wskazuje, że sygnał pochodzący z receptora GLP-

hamuje apoptozę komórek beta, co dodatkowo przyczynia się do zwiększenia masy tych komórek i poprawy ich funkcji wewnątrzwydzielniczej [12,43].

Niezależnie od swego wpływu na sekrecję insuliny, GLP-1 hamuje glukozozależne wydzielanie glukagonu przez komórki alfa wysp trzustkowych, natomiast w przewodzie pokarmowym zwalnia opróżnianie żołądka oraz zmniejsza wydzielanie soku żołądkowego, hamując w ten sposób wchłanianie glukozy przez opóźnianie pasażu pokarmu do jelita cienkiego [25].

Pobudzenie sprzężonego z białkiem G receptora GLP-1, podobnie jak pobudzenie receptora GIP, powoduje aktywację cykazy adenylanowej odpowiedzialnej za wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cyklicznego AMP. Syntetyzowany w komórkach beta cAMP moduluje z kolei aktywność kinazy białkowej A, stymulującej glukozozależną sekrecję insuliny, a następnie podlega szybkiej degradacji pod wpływem swoistych fosfodiesteraz [14]. Poznanie ścieżki transdukcji sygnału z tych receptorów stwarza możliwość nowych rozwiązań terapeutycznych u chorych na cukrzycę typu 2, w przebiegu której dominującym zaburzeniem jest upośledzone wydzielanie insuliny w odpowiedzi na glukozę. Działania ukierunkowane na uzyskanie wzrostu stężenia cAMP w komórkach beta mogą polegać na podawaniu syntetycznych agonistów receptora GLP-1 i GIP, a także na stosowaniu selektywnych inhibitorów fosfodiesterazy 3, która stanowi podstawową izoformę tego enzymu w obrębie trzustki [14].

Egzogenny GLP-1 podawany do tkanek obwodowych działa sycząco. U podłoża powyższego zjawiska wydaje się leżeć zwolnione opróżnianie żołądka oraz znoszenie uczucia głodu o mechanizmie ośrodkowym. U pacjentów z cukrzycą typu 2 ciągła infuzja podskórna GLP-1 prowadzona przez 6 tygodni powodowała wyraźne zmniejszenie apetytu i co za tym idzie istotną redukcję masy ciała w porównaniu z punktem wyjściowym [45]. Ośrodkowe działanie tego peptydu hamuje przyjmowanie pokarmu u gryzoni, co pozwala przypuszczać, iż w warunkach *in vivo*, syntetyzowany na obwodzie GLP-1 może przechodzić przez barierę krew-mózg i reagować z odpowiadającymi sobie receptorami umiejscowionymi w tych obszarach mózgowia, które odpowiadają za regulację apetytu oraz utrzymanie homeostazy energetycznej [25]. Ekspresję GLP-1 stwierdza się również w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Wykazano m.in., iż rozstrzeń żołądka powoduje wzrost biosyntezy oraz uwalniania tego peptydu z neuronów jądra ogoniastego pasma samotnego [41].

Reasumując, wydaje się, że decydujące znaczenie w mechanizmie anorektycznego działania GLP-1, wytwarzanego zarówno centralnie, jak i w tkankach obwodowych, odgrywa stała stymulacja ośrodka sytości w jądrach brzuszno-przyśrodkowych podwzgorza.

Wiele wskazuje na to, że w najbliższych latach syntetyczne analogi GLP-1, podobnie jak szerzej już znane adiponektyna i agoniści receptorów PPAR-gamma, zmniejszającą insulinooporność oraz regulującą neogenezę adipocytów, mogą stać się podstawą farmakologicznego leczenia otyłości. Podobnie określone modyfikacje stosowanej diety, takie jak np. wzbogacenie jej w glutaminę, która stanowi

ważne paliwo metaboliczne dla komórek L oraz stymuluje uwalnianie GLP-1 przez te komórki, może się okazać korzystne u pacjentów z cukrzycą i współistniejącą otyłością [32].

Wyniki doświadczeń na modelach zwierzęcych, podobnie jak spostrzeżenia kliniczne sugerują, iż endogenny GLP-1 odgrywa pewną rolę ochronną w stosunku do układu sercowo-naczyniowego. U zwierząt omawiany peptyd działa bezpośrednio kardioprotekcyjnie, chroniąc mięsień sercowy przed ciężkim niedotlenieniem w warunkach prowadzonym niedokrwienia. Mechanizm tej protekcji polega na aktywacji procesu glikolizy za pośrednictwem systemu kinaz białkowych PKB/Akt [17]. Natomiast u pacjentów z cukrzycą typu 2 i stabilną dławicą piersiową infuzje GLP-1 poprawiają funkcję śródbrzońki naczyniowego, ocenianą na podstawie ultrasonograficznego pomiaru stopnia rozszerzenia tętnicy ramiennej związanego z przepływem krwi (FMD – flow mediated dilation) [28].

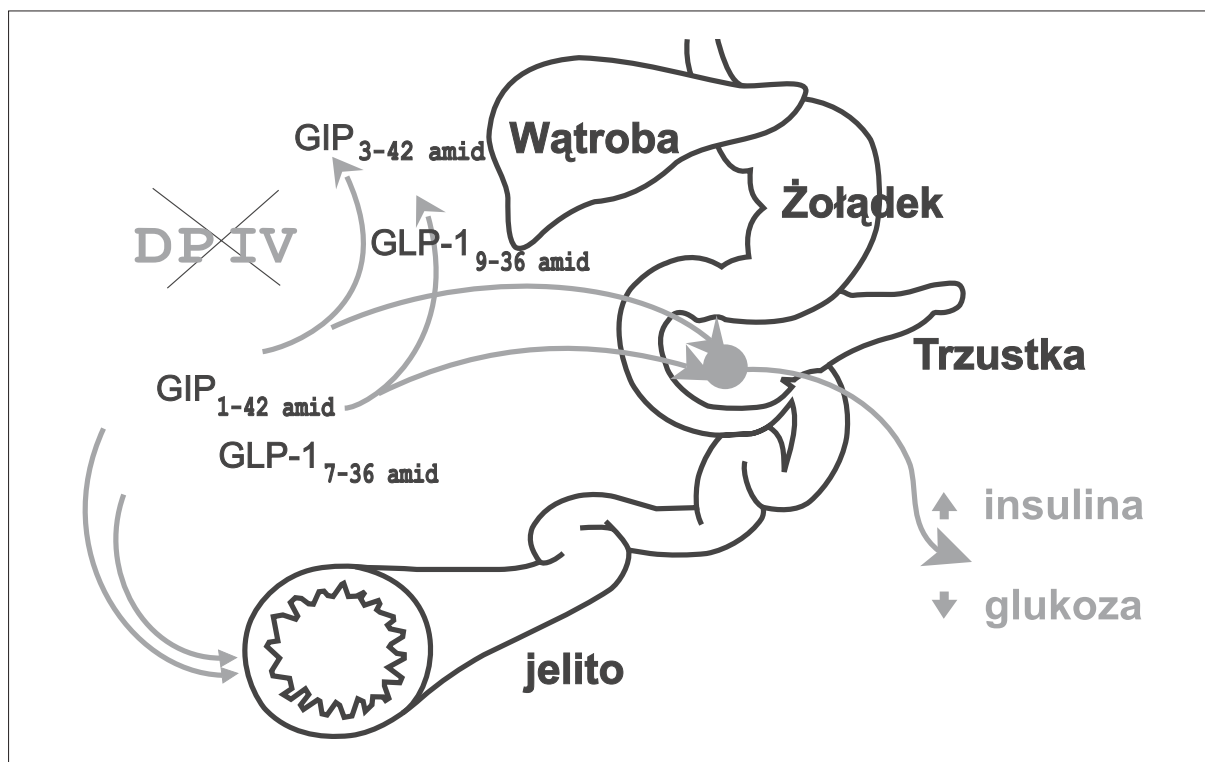
Wydzielanie insulinotropowych hormonów jelitowych związane z przyjęciem posiłku sprawia, iż doustne obciążenie glukozą silniej stymuluje sekrecję insuliny, niż glukoza podana dożylnie. Zjawisko to określa się mianem efektu inkretynowego. U pacjentów z cukrzycą typu 2 efekt inkretynowy jest upośledzony, co przejawia się niedostatecznym wydzielaniem insuliny w odpowiedzi na spożycie pokarmu. Jako, że sekrecja insuliny po podaniu egzogennej GLP-1 jest u tych chorych dobrze zachowana, powyższa patologia wydaje się związana w głównej mierze z niedostatecznym poposiłkowym wydzielaniem endogennego GLP-1 [40].

Interesujące są wyniki badań Naucka i wsp. [26], którzy zaobserwowali zmniejszone wydzielanie insuliny w odpowiedzi na podanie egzogennej GIP u pacjentów z cukrzycą typu 2, a także u prawie 50% ich krewnych pierwszego stopnia z prawidłową tolerancją glukozy, u których wydzielanie endogennego GIP i GLP-1 po doustnym obciążeniu glukozą było prawidłowe i przedstawiało się podobnie, jak w zdrowej grupie kontrolnej. Powyższe spostrzeżenia pozwalają przypuszczać, że osłabiona odpowiedź komórek beta na GIP, zależna od ich defektu wydzielniczego, może mieć istotne znaczenie patogenetyczne we wczesnym etapie rozwoju cukrzycy typu 2.

NOWE PERSPEKTYWY TERAPII CHORYCH NA CUKRZYCĘ TYPU 2 – ROLA GLP-1

Pierwsze próby zastosowania GLP-1 u pacjentów z cukrzycą typu 2 przyniosły obiecujące rezultaty. Ciągła infuzja dożylna GLP-1 zwiększała u tych chorych (w tym u osób z wieloletnią wtórną nieskutecznością pochodnych sulfonylomocznika) sekrecję insuliny oraz normalizowała glikemię na czczo i glikemię poposiłkową [27]. Podobnie korzystne działanie na dobowy profil glikemii wywierały powtarzane iniekcje podskórne oraz ciągła infuzja podskórna GLP-1. W tym ostatnim przypadku leczenie trwające 6 tygodni powodowało również znaczące obniżenie wartości odsetka hemoglobiny glikowanej [45].

Niemniej jednak pojedyncze wstrzyknięcia GLP-1 nie przyniosły spodziewanych wyników w zakresie poprawy kontroli glikemii. Mała efektywność pojedynczych dawek



Ryc.1. Wpływ hamowania aktywności DP-IV na posiłkowe wydzielanie insuliny

GLP-1 okazała się związana z krótkim okresem biologicznego półtrwania tego peptydu, zależnym od jego szybkiego metabolizmu w osoczu przez swoisty enzym – dipeptydylopeptydazę IV (DP-IV). DP-IV pośredniczy w reakcji odłączania N-końcowego dipeptydu z peptydów, takich jak GLP-1 i GIP, w których przedostatnim aminokwasem jest prolina lub alanina. Rozkład proteolityczny GLP-1 przez DP-IV może prowadzić do powstawania nieaktywnych biologicznie metabolitów lub metabolitów działających jako antagoniści receptora GLP-1 [25].

Uwzględniając powyższe obserwacje wysunięto hipotezę, iż DP-IV odgrywa główną rolę w fizjologicznej regulacji aktywności insulinotropowych hormonów jelitowych - GLP-1 i GIP. Rozważania nad możliwościami wykorzystania tego mechanizmu w farmakoterapii cukrzycy doprowadziły do podjęcia dwóch niezależnych inicjatyw badawczych – zsyntetyzowania analogów GLP-1, które byłyby odporne na rozkład enzymatyczny przez DP-IV oraz stworzenia selektywnych inhibitorów tego enzymu, które miałyby hamować degradację GLP-1 i GIP *in vivo*, a co za tym zwiększać stężenie wymienionych peptydów w osoczu oraz w tkankach docelowych.

WYNIKI BADAŃ EKSPERYMENTALNYCH Z ZASTOSOWANIEM GLP-1 I JEGO ANALOGÓW

W doświadczeniach na modelach zwierzęcych wykazano, iż leczenie GLP-1 i jego analogami zmniejsza ryzyko rozwoju cukrzycy u osobników genetycznie predysponowanych do zachorowania, a także poprawia kontrolę glikemii w przebiegu cukrzycy jawnej klinicznie. Jednym z najlepiej poznanych syntetycznych agonistów receptora GLP-1 jest eksendyna 4 (Ex-4), która dzięki substytucji alaniny

glicyną w przedostatniej pozycji łańcucha peptydowego jest oporna na rozkład enzymatyczny przez DP-IV i w porównaniu z natywnym GLP-1 charakteryzuje się dłuższym okresem biologicznego półtrwania [9].

Jakkolwiek badania *in vitro* wskazują, iż przewlekła stymulacja receptora GLP-1 za pomocą Ex-4 powoduje jego silniejszą desensytyzację niż natywny GLP-1, doświadczenia na zwierzętach zdrowych i transgenicznych nie potwierdziły, by w warunkach *in vivo* powtarzająca się ekspozycja na Ex-4 była związana ze znaczącym spadkiem ekspresji i osłabieniem odpowiedzi tego receptora [4].

Za szczególnie istotne należy uznać wyniki licznych doświadczeń dokumentujących cytoprotekcyjne działanie GLP-1 i jego analogów w stosunku do komórek beta wysp trzustkowych. W eksperymentalnym modelu regeneracji uszkodzonych komórek beta podawanie Ex-4 lub natywnego GLP-1 zwierzętom poddanym toksycznemu działaniu streptozotocyny stymuluje neogenezę tych komórek oraz przywraca homeostazę gospodarki węglowodanowej [39]. Podobnie, stosowanie Ex-4 i GLP-1 w pierwszych dniach życia u szczurów, u których pierwotnym zaburzeniem jest genetycznie uwarunkowany ilościowy niedobór komórek beta, zwiększa liczbę wspomnianych komórek oraz prowadzi do poprawy kontroli glikemii w wieku dorosłym [38]. U szczurzych noworodków z wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu, związanym z postępującą utratą liczby komórek beta, a także u myszy genetycznie predysponowanych do zachorowania na cukrzycę, Ex-4 podawana w okresie przedcukrzycowym hamuje apoptozę oraz stymuluje proliferację komórek beta, co zapobiega ich dysfunkcji wydzielniczej i opóźnia tym samym wystąpienie klinicznie jawnej cukrzycy [35,42].

WYNIKI BADAŃ KLINICZNYCH Z ZASTOSOWANIEM GLP-1 I JEGO ANALOGÓW

Jednego z pierwszych dowodów na kliniczną przydatność analogów GLP-1 dostarczyło badanie Edwardsa i wsp. [9], którzy wykazali, iż u osób zdrowych krótkotrwałe dożylnie infuzje Ex-4 powodują wzrost wydzielania insuliny oraz obniżenie glikemii na czczo i glikemii poposiłkowej. Syntetyczna postać Ex-4 – Eksenatyd (AC2993) jest poddawana ocenie w III fazie badań klinicznych.

U chorych na cukrzycę typu 2 podawanie Eksenatydu do śniadania i do kolacji przez okres 5 dni prowadziło do znaczącego obniżenia glikemii poposiłkowej, niemniej jednak nie wpływało istotnie na wartość glikemii na czczo sugerując, iż czas działania wieczornej dawki leku był zbyt krótki, aby zapewniać zadowalającą kontrolę glikemii w godzinach nocnych [19]. Te wstępne obserwacje znalazły potwierdzenie w kolejnym, trwającym dłużej (30 dni) badaniu, w którym iniekcje Eksenatydu wykonywane raz na dobę okazały się nieskuteczne w normalizowaniu glikemii, natomiast podawanie leku dwukrotnie w ciągu dnia, jakkolwiek nadal nie zapewniało pełnej 24-godzinnej kontroli glikemii, powodowało znaczące obniżenie stężenia hemoglobiny glikowanej, w porównaniu do stężenia przed leczeniem [10].

U pacjentów z niedostatecznym wyrównaniem cukrzycy przy stosowanym leczeniu klasycznymi doustnymi lekami hipoglikemizującymi, takimi jak metformina lub(i) pochodne sulfonilomocznika włączenie jako leku dodatkowego Eksenatydu w iniekcjach 2–3 razy na dobę znacząco poprawiało długoterminową kontrolę glikemii, czego dowodem było obniżenie stężenia fruktozaminy i hemoglobiny glikowanej w surowicy tych chorych [5,13].

Wyniki badań klinicznych prowadzonych u osób z cukrzycą typu 2 nie wskazują, by krótkoterminowe stosowanie Eksenatydu hamowało łaknienie lub powodowało znaczącą redukcję masy ciała [10,13], natomiast tendencja taka jest wyraźnie widoczna u pacjentów poddanych leczeniu dłuższemu, trwającemu kilka tygodni [5].

W zwierzęcym modelu cukrzycy związanej z insulinopornością podawanie innego analogu GLP-1 opornego na degradację przez DP-IV – liraglutytu było związane z poprawą dobowego profilu glikemii oraz ze wzrostem wskaźnika proliferacji komórek beta [34].

U chorych na cukrzycę typu 2 jednorazowe dawki liraglutytu obniżały glikemię na czczo i glikemię poposiłkową [18], jak również powodowały przywrócenie odpowiedzi komórek beta na fizjologiczną hiperglikemię [6]. Zbliżony efekt terapeutyczny, pod postacią obniżenia dobowych wartości glikemii oraz poprawy funkcji komórek beta, obserwowano w odpowiedzi na 7-dniowe leczenie liraglutydem podawanym w iniekcji raz na dobę [8].

W innym randomizowanym, kontrolowanym placebo badaniu z zastosowaniem podwójnie ślepej próby liraglutyd stosowany przez 12-tygodni zapewniał lepsze wyrównanie cukrzycy, niż pochodne sulfonilomocznika [21].

Dostępne dane wskazują, iż leczenie analogami GLP-1 opornymi na działanie proteaz może stanowić skuteczną

i bezpieczną opcję terapeutyczną u pacjentów z cukrzycą typu 2. Stosowanie syntetycznych analogów GLP-1 wydaje się wiązać ze znikomą ilością działań niepożądanych, wśród których najczęściej obserwuje się nudności, wymioty oraz przemijające bóle głowy. Wymienione objawy mają zwykle charakter przejściowy i ustępują po upływie kilku do kilkunastu dni od włączenia leku. Niezwykle istotny z klinicznego punktu widzenia jest brak ciężkich epizodów hipoglikemii podczas stosowania tych leków w monoterapii. Obserwowane pojedyncze przypadki niedocukrzenia były incydentami łagodnymi, niewymagającymi podjęcia szczególnych interwencji [10,19,21].

Podstawową wadą syntetycznych agonistów receptora GLP-1 są wysokie koszty produkcji oraz niedostępność doustnej postaci tych leków warunkująca konieczność ich podawania w iniekcji. Stanowiło to bodziec do rozwoju drugiego kierunku badawczego, jakim było zsyntetyzowanie preparatów hamujących degradację endogennego GLP-1 i GIP. Doustne inhibitory DP-IV dawkowane raz na dobę wydają się przedstawiać atrakcyjną, alternatywną metodę leczenia cukrzycy typu 2, pozbawioną niedogodności związanych ze stosowaniem pozajelitowych analogów GLP-1.

WYNIKI BADAŃ EKSPERYMENTALNYCH Z ZASTOSOWANIEM INHIBITORÓW DP-IV

Odkrycie, iż w warunkach *in vivo* natywny GLP-1 jest niezwykle podatny na rozkład proteolityczny przez dipeptydylopeptydazę IV zainicjowało prace nad stworzeniem selektywnego inhibitora tego enzymu. U pacjentów z cukrzycą typu 2 stosowanie inhibitorów DP-IV przeciwdziała inaktywacji insulinotropowych hormonów jelitowych – GLP-1 i GIP w osoczu i tkankach docelowych, prowadząc do wzrostu wydzielania insuliny oraz poprawy kontroli glikemii. Badania przedkliniczne oraz wczesne fazy badań klinicznych, oceniających efektywność i bezpieczeństwo stosowania inhibitorów DP-IV u chorych na cukrzycę, dostarczyły niepodważalnych dowodów dokumentujących hipoglikemizujące działanie tych leków, zależne od przywrócenia właściwej sekrecji oraz obwodowej odpowiedzi na insulinę.

Uzupełniających danych przemawiających za fizjologicznym znaczeniem endogennej DP-IV w utrzymywaniu homeostazy węglowodanowej dostarczają wyniki doświadczeń przeprowadzonych u myszy pozbawionych tego enzymu (DP-IV $-/-$ knockout mouse), u których obserwuje się zwiększone wydzielanie insuliny w odpowiedzi na bodziec hiperglikemiczny oraz zmniejszoną degradację endogennego GLP-1 i GIP [23]. Co więcej, myszy pozbawione DP-IV są względnie odporne na rozwój nietolerancji glukozy i cukrzycy w następstwie kilkumiesięcznego przekarmiania dietą wysokotłuszczową. Pomimo podwyższonej wartości energetycznej posiłków zwierzęta te nie rozwijają otyłości, wykazują zmniejszone przyjmowanie pokarmów i zwiększony wydatek energetyczny oraz są stosunkowo mało wrażliwe na diabetogenne dawki streptozotocyny [23].

Prototypowy inhibitor DP-IV, blokując N-końcową proteolizę GLP-1, nasilał jego działanie insulinotropowe i hipoglikemizujące u myszy z upośledzoną tolerancją gluko-

zy [1]. W innym doświadczeniu hamowanie aktywności DP-IV wiązało się z poprawą tolerancji glukozy zależną od wzrostu stężenia GIP w surowicy badanych zwierząt [7]. Doraźne stosowanie inhibitorów DP-IV u myszy pozbawionych receptorów obu hormonów inkretynowych (DIRKO – double incretin receptor knockout) nie powodowało obniżenia wartości glikemii, co dowodzi, iż za działanie hipoglikemizujące, będące skutkiem krótkotrwałego zahamowania aktywności DP-IV, odpowiadają w głównej mierze zjawiska GLP-1 i GIP-zależne [15].

U szczurów ZDF (Zucker diabetic fatty) z cukrzycą typu 2 związana z otyłością, 3-miesięczna terapia selektywnym inhibitorem DP-IV P32/98 prowadziła do zwiększenia wydzielania insuliny przez komórki beta w odpowiedzi na hiperglikemię. Przewlekłe hamowanie aktywności DP-IV wiązało się również z trwałą poprawą tolerancji glukozy w doustnym teście obciążenia glukozą oraz ze wzrostem obwodowej wrażliwości na insulinę, o którym świadczył zwiększony, podstawowy i stymulowany insuliną, wychwyty glukozy w mięśniach szkieletowych badanych zwierząt [31].

Inhibitor DP-IV o przedłużonym działaniu (FE 999-011), podawany otyłym szczurom genetycznie predysponowanym do zachorowania na cukrzycę, opóźniał wystąpienie klinicznych objawów choroby i przywracał spożycie wody i pokarmu do poziomu z okresu przedcukrzycowego. Jako następstwo stosowanego leczenia obserwowano wzrost stężenia krążącego GLP-1 oraz zwiększoną ekspresję mRNA kodującego trzustkowy receptor GLP-1 przemawiającą za tym, iż badany lek wywołuje zależną od GLP-1 poprawę funkcji komórek beta [37]. U myszy chorujących na cukrzycę przewlekłe podawanie inhibitorów DP-IV również poprawiało tolerancję glukozy oraz zachowywało wewnątrzwydzielniczą funkcję wysp trzustkowych [33].

Wyniki doświadczeń na modelach zwierzęcych wskazują, że długoterminowe stosowanie inhibitorów DP-IV, dzięki ich cytoprotekcyjnemu działaniu w stosunku do komórek beta, może zapobiegać progresji upośledzonej tolerancji glukozy w pełnoobjawową cukrzycę typu 2. Co więcej, w badaniach *in vitro* wykazano, że GLP-1 i GIP zapobiegają apoptotycznej śmierci komórek beta indukowanej przez streptozotocynę. To, że aktywacja szlaku inkretynowego wpływa ochronnie na komórki beta i umożliwia ich regenerację, sugeruje możliwość rozszerzenia potencjału terapeutycznego inhibitorów DP-IV na cukrzycę typu 1 oraz późny okres cukrzycy typu 2 [30].

Dowodów na poparcie powyższej koncepcji dostarczają wyniki eksperymentu przeprowadzonego u szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną, którym przez 7 tygodni podawano inhibitor DP-IV P32/98. W porównaniu z grupą kontrolną, u zwierząt, które otrzymywały badany lek obserwowano zwiększenie tolerancji glukozy, znamienne obniżenie glikemii poposiłkowych oraz powrót stężenia krążącej insuliny do wartości prawidłowych. Pomiar zawartości insuliny w biopsjach trzustkowych ujawniły kilkukrotną poprawę funkcji wydzielniczej komórek beta, a analiza immunohistochemiczna pobranych wycinków wykazała znaczący wzrost liczby wspomnianych komórek, dowodząc, iż farmakologiczne zahamowanie aktywności DP-IV nasila ich neogenezę oraz zdolność do biosyntezy insuliny [30].

WYNIKI BADAŃ KLINICZNYCH Z ZASTOSOWANIEM INHIBITORÓW DP-IV

Wstępne raporty z badań klinicznych potwierdzają skuteczność doustnych inhibitorów DP-IV w leczeniu pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej. W randomizowanym, kontrolowanym placebo badaniu przeprowadzonym przez Ahrena i wsp. [3] krótko działający inhibitor DP-IV (NVP DPP728), stosowany przez 4 tygodnie w 2 lub 3 dawkach na dobę, istotnie poprawiał kontrolę glikemii oraz obniżał stężenie hemoglobiny glikowanej u chorych na cukrzycę typu 2 o łagodnym przebiegu.

Kolejnym inhibitorem DP-IV, poddawanym ocenie w III fazie badań klinicznych, jest LAF237, który w porównaniu z NVP DPP728 charakteryzuje się dłuższym biologicznym okresem półtrwania. 4-tygodniowa terapia z podawaniem tego leku raz na dobę powodowała znaczącą poprawę przewlekłego wyrównania cukrzycy, przejawiającą się zmniejszeniem wartości odsetka hemoglobiny glikowanej oraz obniżeniem glikemii poposiłkowej, zależnej od wzrostu stężenia krążącego GLP-1 [2]. W porównaniu z wynikami w grupie kontrolnej, stężenia glukagonu w surowicy pacjentów otrzymujących LAF237 były znamienne obniżone, co sugeruje, iż hamowanie uwalniania glukagonu pod wpływem GLP-1, niezależnie od zasadniczych właściwości insulinotropowych tego peptydu, może odgrywać istotną rolę w mechanizmie działania hipoglikemizującego leków potęgujących „efekt inkretynowy” [2].

Dostępne dane wskazują, iż doustne inhibitory DP-IV są lekami stosunkowo bezpiecznymi. Zarówno NVP DPP728, jak i LAF237 były dobrze tolerowane i nie wywoływały poważniejszych objawów niepożądanych. W pojedynczych przypadkach stosowanie wymienionych leków wiązało się z występowaniem uporczywego świądu, ponadto u niewielkiego odsetka pacjentów stwierdzano przemijające stany zapalne nosogardzieli [2,3]. Podczas stosowania LAF237 w monoterapii, a także w przebiegu terapii skojarzonej z glibenklamidem, nie obserwowano istotnych klinicznie epizodów hipoglikemii [11]. Pomimo sugestywnych przesłanek teoretycznych, opierających się na zmniejszających łaknienie właściwościach GLP-1, wyniki przeprowadzonych dotychczas badań nie potwierdzają, by przewlekłe hamowanie aktywności DP-IV powodowało znaczącą redukcję masy ciała u chorych z cukrzycą.

Pojawiające się w piśmiennictwie sugestie, iż długotrwałe leczenie inhibitorami DP-IV może się wiązać z potencjalnym ryzykiem wystąpienia określonych działań niepożądanych, zależnych od hamowania degradacji innych niż GLP-1 i GIP endogennych substratów tego enzymu, nie znalazły potwierdzenia w próbach przedklinicznych, ani w badaniach klinicznych u ludzi. Należy zaznaczyć, iż GLP-1 i GIP nie są jedynymi substratami dipeptydylopeptydazy IV. Do substancji, które w badaniach kinetycznych *in vitro* zostały zidentyfikowane jako substraty DP-IV należą m.in. wazoaktywny peptyd jelitowy, somatoliberyna, neuropeptyd Y oraz peptyd uwalniający gastrynę. Nie wiadomo jednak, które z wymienionych, potencjalnych substratów DP-IV są w rzeczywistości metabolizowane przez ten enzym *in vivo*. Ponadto nie jest pewne, czy DP-IV jest głównym czynnikiem pośredniczącym w ich inaktywacji, czy może związki te podlegają również eliminacji innymi sposobami [25].

Kolejnym, nie do końca rozstrzygniętym zagadnieniem jest problem przewlekłego hamowania aktywności DP-IV w aspekcie prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego. Sugeruje się, iż jedna z postaci DP-IV, związana z błoną komórkową limfocytów T oraz znana w tej postaci jako antygen CD26, może odgrywać istotną rolę w procesie aktywacji i proliferacji komórek T. Niemniej jednak nie wyjaśniono, czy aktywność katalityczna *per se* jest niezbędnym warunkiem prawidłowego funkcjonowania CD26, a nawet, czy sama obecność CD26 jest w istocie konieczna do prawidłowego przebiegu funkcji immunologicznych organizmu. Skądinąd wiadomo, iż myszy pozbawione DP-IV (DP-IV –/– knockout mouse) rozwijają się w sposób niezakłócony, bez cech niedoboru odpornościowego [23].

Uwzględniając mechanizm działania inhibitorów DP-IV, powodujący zwiększenie stymulowanego posiłkiem wydzielania insuliny, wydaje się, iż leki te znajdują najszerze zastosowanie w leczeniu wczesnych i średnio zaawansowanych postaci cukrzycy typu 2, natomiast mogą okazać się mniej skuteczne u pacjentów z wieloletnim przebiegiem choroby, u których doszło do rozwoju ciężkiej insulinooporności oraz wyczerpania zdolności sekrecyjnej wysp trzustkowych.

W doświadczeniach na modelach zwierzęcych wykazano, iż aktywność krążącej DP-IV u osobników starszych z ciężką hiperglikemią jest z namiennie wyższa, niż u osobników młodych z cukrzycą we wczesnym stadium, co może stanowić dodatkową przyczynę mniejszej efektywności inhibitorów DP-IV w leczeniu zaawansowanych postaci tej choroby [24].

GLP-1 A KLASYCZNE DOUSTNE LEKI PRZECIWCUKRZYCOWE – PERSPEKTYWY LECZENIA SKOJARZONEGO

Dostępne dane literaturowe analizujące wpływ doustnych leków przeciwcukrzycowych na aktywność endogennej DP-IV są skromne i nie do końca spójne.

W opinii Hinkego i wsp. [16] metformina nie ma zdolności hamowania enzymatycznej degradacji GLP-1 *in vitro*, podczas gdy Lenhard i wsp. [20], powołujący się na wyniki doświadczeń *in vivo* u zwierząt chorych na cukrzycę donoszą, że leczenie metforminą, podobnie jak pioglitazonem powoduje zmniejszenie aktywności krążącej DP-IV, nasilając w ten sposób hipoglikemizujące działanie endogennej GLP-1 i GIP. Nie obserwowano tego natomiast podczas stosowania pochodnej sulfonilomocznika – gliburydu [20]. W innym badaniu obejmującym osoby otyłe bez cukrzycy krótkotrwała terapia metforminą wiązała się z większym wzrostem wydzielania GLP-1 w odpowiedzi na doustne obciążenie glukozą, niż u osób z grupy kontrolnej, które nie otrzymały leku [22].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahren B., Holst J.J., Martensson H., Balkan B.: Improved glucose tolerance and insulin secretion by inhibition of dipeptidyl peptidase IV in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2000; 404: 239–245
- [2] Ahren B., Landin-Olsson M., Jansson P.A., Svensson M., Holmes D., Schweizer A.: Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycaemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004; 89: 2078–2084

Ze względu na to, iż kwestia hamowania enzymatycznego rozkładu GLP-1 przez biguanidy nie została jednoznacznie rozstrzygnięta, należy również brać pod uwagę możliwość potęgowania przez te leki działania inkretynowego przez pobudzanie uwalniania GLP-1 z komórek L przewodu pokarmowego [22]. Jak dotąd, nie opublikowano jednak wyników dużych badań klinicznych oceniających stężenia krążącego GLP-1 i aktywność endogennej DP-IV u pacjentów z cukrzycą typu 2 przed oraz w trakcie przewlekłego leczenia metforminą.

Udokumentowano natomiast silne działanie addycyjne w zakresie obniżania glikemii podczas skojarzonej terapii polegającej na łącznym stosowaniu metforminy i GLP-1 u chorych z niedostatecznym wyrównaniem cukrzycy przy prowadzonej uprzednio monoterapii metforminą [46]. Podobnie stosowanie pioglitazonu jednocześnie z ciągłymi, podskórnymi wlewami GLP-1 powodowało sumowanie się działania hipoglikemizującego wspomnianych leków, w porównaniu z wynikami uzyskiwanymi podczas monoterapii [44].

PODSUMOWANIE

Badania dokumentujące zachowanie u chorych na cukrzycę typu 2 prawidłowego wydzielania insuliny w odpowiedzi na podanie egzogennej GLP-1, w połączeniu z doniesieniami, iż przewlekłe stosowanie agonistów receptora GLP-1 oraz inhibitorów DP-IV – enzymu inaktywującego GLP-1 i GIP *in vivo* – stymuluje neogenezę komórek beta, stanowiły teoretyczne podstawy do stworzenia nowej generacji leków przeciwcukrzycowych, których mechanizm działania polega na potęgowaniu efektu inkretynowego.

Badania przedkliniczne bezspornie dowiodły, iż stosowanie wymienionych leków korzystnie wpływa na tolerancję glukozy u zwierząt chorujących na cukrzycę oraz zmniejsza ryzyko zachorowania u osobników genetycznie predysponowanych do rozwoju tej choroby.

Analogicznie, wyniki pierwszych badań klinicznych przyniosły obiecujące rezultaty, sugerując, iż monoterapia syntetycznymi analogami GLP-1 oraz inhibitorami DP-IV, podobnie jak terapia skojarzona, polegająca na stosowaniu wymienionych leków w połączeniu z klasycznymi doustnymi lekami hipoglikemizującymi, może stanowić atrakcyjną, alternatywną metodę leczenia cukrzycy typu 2, będącą nie tylko postępowaniem objawowym, lecz wpływającą również na mechanizmy patogenezę choroby.

W celu ostatecznego rozstrzygnięcia kwestii, jak doustne inhibitory DP-IV działają w porównaniu z podawanymi pozajelitowo analogami GLP-1 konieczne jest przeprowadzenie szeroko zaprojektowanych badań klinicznych, bezpośrednio porównujących obie grupy leków w odpowiednio dobranych i odpowiadających sobie populacjach pacjentów.

- [3] Ahren B., Simonsson E., Larsson H., Landin-Olsson M., Torgeirsson H., Jansson P.A., Sandqvist M., Bavenholm P., Efendic S., Eriksson J.W., Dickinson S., Holmes D.: Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2002; 25: 869–875

- [4] Baggio L.L., Kim J.G., Drucker D.J.: Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization *in vitro* but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis *in vivo*. *Diabetes*, 2004; 53(Suppl.3): S205-S214
- [5] Baron A., Poon T., Taylor K., Nielsen L., Boies S., Zhou J., Zhuang D., Varns A., Kim D., Fineman M., Kolterman O.: Exenatide (synthetic extendin-4) showed marked Hb[A.sub.1c] decline over 5 months in patients with type 2 diabetes falling oral agents in an open-label study (Abstract). Presented at the 63rd Scientific Sessions of the American Diabetes Association, New Orleans, LA, 13-17 June 2003
- [6] Chang A.M., Jakobsen G., Sturis J., Smith M.J., Bloem C.J., An B., Galecki A., Halter J.B.: The GLP-1 derivative NN2211 restores beta-cell sensitivity to glucose in type 2 diabetic patients after a single dose. *Diabetes*, 2003; 52: 1786-1791
- [7] Deacon C.F., Wamberg S., Bie P., Hughes T.E., Holst J.J.: Preservation of active incretin hormones by inhibition of dipeptidyl peptidase IV suppresses meal-induced incretin secretion in dogs. *J. Endocrinol.*, 2002; 172: 355-362
- [8] Degn K.B., Juhl C.B., Sturis J., Jakobsen G., Brock B., Chandramouli V., Rungby J., Landau B.R., Schmitz O.: One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2004; 53: 1187-1194
- [9] Edwards C.M., Stanley S.A., Davis R., Brynes A.E., Frost G.S., Seal L.J., Ghatei M.A., Bloom S.R.: Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Endocrinol. Metab.*, 2001; 281: E155-E161
- [10] Egan J.M., Meneilly G.S., Elahi D.: Effects of 1-mo bolus subcutaneous administration of exendin-4 in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2003; 284: E1072-E1079
- [11] El-Ouaghli A., Rehling E.R., Schweizer A., Holmes D., Nauck M.A.: The dipeptidyl peptidase IV inhibitor, LAF237 does not accentuate reactive hypoglycaemia caused by the sulphonylurea glibenclamide administered before an oral glucose load in healthy subjects (Abstract). *Diabetes*, 2003; 52(Suppl.1): A118
- [12] Farilla L., Bulotta A., Hirshberg B., Li Calzi S., Khoury N., Nousehr H., Bertolotto C., Di Mario U., Harlan D.M., Perfetti R.: Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology*, 2003; 144: 5149-5158
- [13] Fineman M.S., Bicsak T.A., Shen L.Z., Taylor K., Gaines E., Varns A., Kim D., Baron A.D.: Effect on glycemic control of exenatide (synthetic extendin-4) additive to existing metformin and/or sulphonylurea treatment in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2003; 26: 2370-2377
- [14] Furman B., Pyne N., Flatt P., O'Harte F.: Targeting beta-cell cyclic 3'5'-adenosine monophosphate for the development of novel drugs for treating type 2 diabetes mellitus. A review. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004; 56: 1477-1492
- [15] Hansotia T., Baggio L.L., Delmeire D., Hinke S.A., Yamada Y., Tsukiyama K., Seino Y., Holst J.J., Schuit F., Drucker D.J.: Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes*, 2004; 53: 1326-1335
- [16] Hinke S.A., Kuhn-Wache K., Hoffmann T., Pederson R.A., McIntosh C.H., Demuth H.U.: Metformin effects on dipeptidylpeptidase IV degradation of glucagon-like peptide-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 291: 1302-1308
- [17] Huisamen B., Genade S., Lochner A.: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) protects the heart against ischaemia by activating glycolysis. *Cardiovasc. J. S. Afr.*, 2004; 15 (4 Suppl.1): S15
- [18] Juhl C.B., Hollingdal M., Sturis J., Jakobsen G., Agero H., Veldhuis J., Porksen N., Schmitz O.: 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
- [19] Kolterman O.G., Buse J.B., Fineman M.S., Gaines E., Heintz S., Bicsak T.A., Taylor K., Kim D., Aisporna M., Wang Y., Baron A.D.: Synthetic extendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003; 88: 3082-3089
- [20] Lenhard J.M., Croom D.K., Minnick D.T.: Reduced serum dipeptidyl peptidase-IV after metformin and pioglitazone treatments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 324: 92-97
- [21] Madsbad S., Schmitz O., Ranstam J., Jakobsen G., Matthews D.R., NN2211-1310 International Study Group: Improved glycemic control with no weight increase in patients with type 2 diabetes after once-daily treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 analog liraglutide (NN2211): a 12-week, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care*, 2004; 27: 1335-1342
- [22] Mannucci E., Ognibene A., Cremasco F., Bardini G., Mencucci A., Pierzazuoli E., Ciani S., Messeri G., Rotella C.M.: Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care*, 2001; 24: 489-494
- [23] Marguet D., Baggio L., Kobayashi T., Bernard A.M., Pierres M., Nielsen P.F., Ribel U., Watanabe T., Drucker D.J., Wagtmann N.: Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 6874-6879
- [24] Nagakura T., Yasuda N., Yamazaki K., Ikuta H., Tanaka I.: Enteroinular axis of db/db mice and efficacy of dipeptidyl peptidase IV inhibition. *Metabolism*, 2003; 52: 81-86
- [25] Nauck M.A., Baller B., Meier J.J.: Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes*, 2004; 53(Suppl.3): S190-S196
- [26] Nauck M.A., El-Ouaghli A., Gabrys B., Hucking K., Holst J.J., Deacon C.F., Gallwitz B., Schmidt W.E., Meier J.J.: Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul. Pept.*, 2004; 122: 209-217
- [27] Nauck M.A., Sauerwald A., Ritzel R., Holst J.J., Schmiegel W.: Influence of glucagon-like peptide 1 on fasting glycemia in type 2 diabetic patients treated with insulin after sulfonylurea secondary failure. *Diabetes Care*, 1998; 21: 1925-1931
- [28] Nystrom T., Gutniak M.K., Zhang Q., Zhang F., Holst J.J., Ahren B., Sjöholm A.: Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2004; 287: E1209-E1215
- [29] Perfetti R., Zhou J., Doyle M.E., Egan J.M.: Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*, 2000; 141: 4600-4605
- [30] Pospisilik J.A., Martin J., Doty T., Ehes J.A., Pamir N., Lynn F.C., Piteau S., Demuth H.U., McIntosh C.H., Pederson R.A.: Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 2003; 52: 741-750
- [31] Pospisilik J.A., Stafford S.G., Demuth H.U., Brownsey R., Parkhouse W., Finegood D.T., McIntosh C.H., Pederson R.A.: Long-term treatment with the dipeptidyl peptidase IV inhibitor P32/98 causes sustained improvements in glucose tolerance, insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and beta-cell glucose responsiveness in VDF (fa/fa) Zucker rats. *Diabetes*, 2002; 51: 943-950
- [32] Reimann F., Williams L., da Silva Xavier G., Rutter G.A., Gribble F.M.: Glutamine potentially stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia*, 2004; 47: 1592-1601
- [33] Reimer M.K., Holst J.J., Ahren B.: Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves glucose tolerance and preserves islet function in mice. *Eur. J. Endocrinol.*, 2002; 146: 717-727
- [34] Rolin B., Larsen M.O., Gotfredsen C.F., Deacon C.F., Carr R.D., Wilken M., Knudsen L.B.: The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2002; 283: E745-E752
- [35] Stoffers D.A., Desai B.M., DeLeon D.D., Simmons R.A.: Neonatal exendin-4 prevents the development of diabetes in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetes*, 2003; 52: 734-740
- [36] Stratton I.M., Adler A.I., Neil H.A., Matthews D.R., Manley S.E., Cull C.A., Hadden D., Turner R.C., Holman R.R.: Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*, 2000; 321: 405-412
- [37] Sudre B., Broqua P., White R.B., Ashworth D., Evans D.M., Haigh R., Junien J.L., Aubert M.L.: Chronic inhibition of circulating dipeptidyl peptidase IV by FE 999011 delays the occurrence of diabetes in male Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*, 2002; 51: 1461-1469
- [38] Tourrel C., Bailbe D., Lacorne M., Meile M.J., Kergoat M., Portha B.: Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes*, 2002; 51: 1443-1452
- [39] Tourrel C., Bailbe D., Meile M.J., Kergoat M., Portha B.: Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes*, 2001; 50: 1562-1570
- [40] Vilsboll 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

- [41] Vrang N., Phifer C.B., Corkern M.M., Berthoud H.R.: Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2003; 285: R470–R478
- [42] Wang Q., Brubaker P.L.: Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia*, 2002; 45: 1263–1273
- [43] Wang Q., Li L., Xu E., Wong V., Rhodes C., Brubaker P.L.: Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. *Diabetologia*, 2004; 47: 478–487
- [44] Zander M., Christiansen A., Madsbad S., Holst J.J.: Additive effects of glucagon-like peptide 1 and pioglitazone in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2004; 27: 1910–1914
- [45] 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
- [46] Zander M., Taskiran M., Toft-Nielsen M.B., Madsbad S., Holst J.J.: Additive glucose-lowering effects of glucagon-like peptide-1 and metformin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2001; 24: 720–725