

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
(Schwerpunkt: Diabetologie, Endokrinologie und Nephrologie)

**Metabolische und zentralnervöse Charakterisierung eines
Glukagonanstiegs nach Glukosebelastung**

+

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Hosenfeld, Elena Maria

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Wagner

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Skardelly

Tag der Disputation: 07.09.2022

Für die Buchstaben des Alphabets,
insbesondere J, A und D

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
1 Einleitung	9
1.1 Diabetes mellitus Typ 2	9
1.2 Das Hormon Glukagon	12
1.2.1 Grundlagen	12
1.2.2 Regulation der Glukagonsekretion	13
1.2.3 Effekte des Hormons Glukagon	13
1.2.3.1 Glukoserelevante Effekte des Hormons Glukagon	14
1.2.3.2 Pleiotrope Effekte des Hormons Glukagon	16
1.2.3.2.1 Wirkung auf den Aminosäurestoffwechsel	16
1.2.3.2.2 Wirkung auf den Lipidstoffwechsel	17
1.2.3.2.3 Wirkung im Gehirn	17
1.2.3.2.4 Wirkung am Herzen	18
1.2.3.2.5 Wirkung auf Grundumsatz und Nahrungsaufnahme	18
1.2.3.2.6 Wirkung auf den Magen-Darm-Trakt	19
1.3 Hintergrund der Studie	20
1.4 Fragestellung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Studienaufbau	22
2.2 Probanden	22
2.2.1 Rekrutierung	22
2.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien	23
2.2.3 Teilnehmer	24
2.3 Versuchsprotokoll	26
2.3.1 Voruntersuchung	26
2.3.2 Hauptuntersuchung	27
2.3.3 Orale Glukosetoleranztest (oGTT)	29
2.3.4 Funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT)	29

2.3.5 Verabreichung von Glukagon	31
2.3.6 Kalorimetrie.....	31
2.4 Materialien	32
2.5 Blutentnahmen.....	32
2.6 Messungen	33
2.6.1 Blutglukosespiegel und HbA1c	33
2.6.2 Laborparameter	33
2.6.3 Glukagon	33
2.7 Berechnungen	34
2.7.1 Dosierung von Glukagon	34
2.7.2 Insulinsensitivität.....	35
2.7.2.1 Formel von Matsuda und DeFronzo	35
2.7.2.2 NEFA-Index	36
2.7.3 Hepatische Insulinclearance.....	36
2.7.4 Body-Mass-Index (BMI)	37
2.7.5 Taille-Hüfte-Verhältnis (WTH-Ratio)	37
2.8 Statistische Auswertung	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Probandencharakteristika	39
3.2 Dynamik metabolischer Parameter nach Glukosebelastung	42
3.2.1 Vergleich Placebo- vs. Glukagoninfusion	42
3.2.1.1 Glukosekonzentration	43
3.2.1.2 Glukagonkonzentration.....	44
3.2.1.3 Insulinkonzentration	45
3.2.1.4 C-Peptidkonzentration	46
3.2.1.5 Triglyceridkonzentration.....	48
3.3 Hepatische Insulinclearance.....	49
3.4 Insulinsensitivität.....	50
3.5 Grundumsatz	52
4 Diskussion	53
4.1 Probandencharakteristika	54

4.2 Dynamik metabolischer Parameter nach Glukosebelastung	56
4.2.1 Glukagon-, Glukose-, Insulin-, C-Peptidkonzentration, Clearance	56
4.2.2 Triglyceridkonzentration.....	63
4.3 Insulinsensitivität.....	64
4.4 Grundumsatz	66
4.5 Limitationen	69
5 Zusammenfassung.....	70
6 Literaturverzeichnis	72
7 Danksagung	88
8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	89

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve/ Fläche unter der Kurve
BE	Blutentnahme
BMI	Body Mass Index
BOLD	blood oxygen level dependent
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
CLR	Insulinclearance
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alii/ und andere
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
fT3	freies Triiodthyronin
fT4	freies Thyroxin
GCCR	Glukagonrezeptor
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
GLP-2	Glucagon-like Peptide 2
Hb	Hämoglobin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICcE	individual calibration control evaluation
ISE	ionenselektive Elektrode
mRNA	messenger Ribonucleinacid
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchloridlösung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
O ₂	Sauerstoff

PC1	Prohormonconvertase 1
PC2	Prohormonconvertase 2
REE	resting energy expenditure/ Ruheenergiebedarf
RIA	Radioimmunoassay
RQ	respiratorischer Quotient
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci
TSH	Thyreotropin
WTH-Ratio.....	Waist-to-hip-ratio/Taille-Hüfte-Verhältnis
Z.n.	Zustand nach

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenfassung der Wirkungen von Glukagon	20
Abbildung 2: Probandenrekrutierung.....	25
Abbildung 3: Versuchsprotokoll Hauptuntersuchung	29
Abbildung 4: Dynamik der Glukosekonzentration über 120 Minuten.	43
Abbildung 5: Dynamik der Glukagonkonzentration über 120 Minuten.	44
Abbildung 6: Dynamik der Insulinkonzentration über 120 Minuten.	45
Abbildung 7: Dynamik der C-Peptidkonzentration über 120 Minuten.....	46
Abbildung 8: Dynamik der Triglyceridkonzentration über 120 Minuten.	48
Abbildung 9: Insulinsensitivität nach Matsuda und DeFronzo.....	50
Abbildung 10: Insulinsensitivität anhand des NEFA-Index.....	51
Abbildung 11: Grundumsatz nach standardisierter oraler Glukosebelastung. ..	52
Tabelle 1: Definition Prädiabetes und Diabetes mellitus nach ADA und WHO. 11	
Tabelle 2: BMI-Grenzwerte nach WHO-Richtlinien	37
Tabelle 3: Probandencharakteristika bei der jeweils ersten Visite.	40
Tabelle 4: Veränderbare metabolische Probandencharakteristika jeweils vor Intervention.	42
Tabelle 5: Hepatische Insulinclearance.....	49
Tabelle 6: Insulinsensitivität nach Matsuda/ DeFronzo sowie anhand des NEFA- Index.	52
Tabelle 7: Grundumsatz nach standardisierter oraler Glukosebelastung.	53

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 2

Die Stoffwechselkrankheit Diabetes mellitus Typ 2 stellt weltweit eine wachsende Belastung für die Gesellschaft dar und hat sich in den letzten Jahrzehnten zur Volkskrankheit entwickelt. Sie ist für über 90% der Diabetesfälle weltweit verantwortlich (1).

Seit 1980 hat die altersstandardisierte Diabetesprävalenz fortwährend zugenommen, sodass sich die Zahl der an Diabetes erkrankten Personen bis zum Jahr 2014 beinahe vervierfacht hat und für das Jahr 2035 auf schätzungsweise circa 591 Millionen Menschen weltweit zunehmen wird.

Vor allem in Ländern mit niedrigem Einkommen ist vor dem Hintergrund steigender Lebenserwartung und vermehrter Urbanisierung ein erheblicher Anstieg der Komplikationen und Todesfälle durch Diabetes mellitus zu erwarten (2)(3). Und nicht nur die Anzahl der an Diabetes erkrankten Personen steigt, auch das Erkrankungsalter sinkt, sodass bereits Jugendliche an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkranken (1).

Diabetes mellitus Typ 2 ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei deren Entstehung sowohl eine genetische Prädisposition, als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen (4). Häufig ist sie mit einem metabolischen Syndrom vergesellschaftet, welches einen Hypertonus, eine stammbetonte Adipositas, eine gestörte Insulinsekretion oder Glukosetoleranz, eine Lipidstoffwechselstörung und eine Mikroalbuminurie umfasst (1).

Als wichtige Risikofaktoren bei der Entstehung sind Übergewicht und sportliche Inaktivität zu nennen(5)(6).

Pathophysiologisch entwickelt sich ein Diabetes mellitus Typ 2 durch eine gestörte Insulinsensitivität der peripheren Gewebe, sowie eine gestörte Insulinsekretion der Betazellen des Pankreas (7). Die insulinsensitiven Gewebe, Muskeln, Fettgewebe und Leber, sprechen nicht mehr adäquat auf Insulin an und es müssen immer größere Mengen produziert werden, um den gewünschten

Effekt, die Glukoseaufnahme in die Zellen, zu erreichen. Die Glukosehomöostase ist somit gestört und die insulinsensitiven Gewebe können die im Blut zirkulierende Glukose nicht suffizient aufnehmen. Zusätzlich wird die hepatische Glukoneogenese nicht ausreichend supprimiert (8)(9)(10). Dieser Zustand wird zum einen der hepatischen Insulinresistenz, zum anderen einer Hypersensibilität gegenüber Glukagon zugeschrieben und führt zu einer gesteigerten endogenen Glukoseproduktion.

Dieser Prozess ist schleichend und entwickelt sich meist über viele Jahre bevor er klinisch durch erhöhte Blutzuckerwerte auffällt. Dieser Übergangszustand wird Prädiabetes genannt und als reversibel betrachtet, bietet also die Möglichkeit durch Gewichtsverlust und eine Lebensstilmodifikation, mit mehr Bewegung und gesünderer Ernährung, den Übergang in einen manifesten Diabetes mellitus zu verhindern (11).

Der schleichende Charakter der Erkrankungsentstehung macht die klinisch eindeutige Diagnosedefinition schwierig. Dies wird auch deutlich, wenn man die Diagnosekriterien für einen Prädiabetes der American Diabetes Association (ADA) und der World Health Organisation betrachtet (11)(12). Die ADA spricht bereits bei Blutzuckerwerten von 5,6 bis 6,9 mmol/L von einer gestörten Nüchternglukose, die unter anderem einen Prädiabetes definiert. Die WHO hingegen betrachtet erst Glukosewerte von 6,1 bis 6,9 mmol/L als beeinträchtigte Nüchternglukose und somit als Prädiabetes. Die weiteren diagnostischen Kriterien eines Prädiabetes und manifesten Diabetes mellitus Typ 2 werden in der folgenden Tabelle (Tabelle 1) dargestellt und sind einheitlich.

Bei Vorliegen eines HbA1c-Wertes über 6,5%, einer Nüchternglukose über 7 mmol/L, einem 2h-oGTT-Wert über 11,1 mmol/L oder Hyperglykämiezeichen, wie Polydypsie und Polyurie oder gar einer Ketoazidose, bei einem beliebigen Glukosewert über 11,1 mmol/L wird die Diagnose eines Diabetes mellitus gestellt (11).

Im Fokus der Diabetesentstehung stand lange Zeit das Hormon Insulin, da man früh den Zusammenhang zwischen Insulinkonzentration und Glukosekonzentration im Blut herstellte. Die jüngere Forschung hingegen zeigt,

dass neben einer gestörten Betazellfunktion und der Insulinresistenz des Muskel-, Leber- und Fettgewebes, auch der Darm, die Niere, das Gehirn und die glukagonproduzierenden Alphazellen Einfluss auf die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 haben. Im Darm trägt ein Inkretinmangel (vor allem GLP-1, möglicherweise auch GIP) beziehungsweise eine in den Zielorganen der Inkretine herrschende Inkretinresistenz zur Entstehung einer Hyperglykämie bei. In der Niere sorgt die gesteigerte Reabsorption von Glukose für den gleichen Effekt. Und auch im Gehirn kommt es zu einer Insulinresistenz, welche zu einer unzureichenden Appetithemmung führt (4).

Die Erkrankung verläuft interindividuell sehr unterschiedlich, wobei mikro- und makroangiopathische Folgeschäden im Vordergrund stehen, die zu einer enormen Morbidität und Mortalität der Patienten führen und die Gesellschaft weltweit durch die anfallenden Behandlungskosten vor eine große Herausforderung stellen (1).

		American Diabetes Association (ADA)	World Health Organisation (WHO)
Prädiabetes	Impaired fasting glucose (IFG)	5,6-6,9 mmol/L	6,1- 6,9 mmol/L
	Impaired glucose tolerance (IGT)	≥7,8 und <11,1 mmol/L	
	HbA1c	5,7-6,4%	
Diabetes mellitus	Nüchtern glukose	≥7,0 mmol/L	
	2-h-oGTT-Wert	≥11,1 mmol/L	
	HbA1c	> 6,5%	
	mit Hyperglykämiezeichen	Beliebiger Wert ≥11,1 mmol/L	

Tabelle 1: Definition Prädiabetes und Diabetes mellitus nach ADA und WHO. Glukosekonzentration bestimmt aus venösem Plasma

1.2 Das Hormon Glukagon

1.2.1 Grundlagen

Die Strukturaufklärung von Glukagon im Jahr 1957 ergab, dass es sich bei Glukagon um ein einkettiges Peptidhormon aus 29 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 3483 Dalton handelt. Glukagon entsteht bei der Spaltung des Vorläuferpeptids Proglukagon, das durch das Proglukagonogen in den Alpha-zellen des Pankreas, den neuroendokrinen L-Zellen des Darmes und Neuronen des Hirnstammes und des Hypothalamus exprimiert wird. Durch die Prohormonconvertase 2 (PC2) wird Proglukagon zu Glukagon prozessiert und in Granula der α -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas gespeichert und auf entsprechende Stimuli hin sezerniert (13). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass auch L-Zellen des Darmes Glukagon sekretieren (14)(15).

Proglukagon kann durch die Prohormonconvertase 1 (PC1) auch zu GLP-1, GLP-2, Oxyntomodulin oder Glycetin prozessiert werden. Diese Prozessierung findet vor allem im Gehirn und im Darm statt (16).

Die Plasmakonzentration von Glukagon in gesunden Individuen beträgt im Nüchternzustand ca. 6-12 pmol/L (20-40 pg/mL) und postprandial 3-5 pmol/L (10-17 pg/mL) (17).

Nach der Sekretion bindet Glukagon an den Glukagonrezeptor (GCGR), einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der in Leber, Gehirn, Herz, Niere, Gastrointestinaltrakt und Fettgewebe exprimiert wird und steigert über das Adenylatzyklasesystem die intrazelluläre cAMP-Konzentration. cAMP phosphoryliert nukleäre und ribosomale Enzyme des Intermediärstoffwechsels und macht so eine Neusynthese von Glukose in der Leber möglich.

Glukagon kann auch therapeutisch eingesetzt werden. Bei schweren Hypoglykämien wird 1mg Glukagon intramuskulär oder subkutan verabreicht, um eine Steigerung der endogenen Glukoseproduktion zu erreichen (13).

1.2.2 Regulation der Glukagonsekretion

Für die Regulation der Glukagonsekretion ist ein komplexes Netzwerk aus parakrinen, endokrinen und neuronalen Mechanismen verantwortlich (18)(17).

Die bekanntesten Regulatoren der Glukagonsekretion sind fallende Insulinkonzentrationen bei niedrigen Blutzuckerwerten und steigende Aminosäure- und Fettsäurekonzentrationen. Dabei scheint nicht ein an sich niedriger Insulinspiegel, sondern ein starker Abfall der Insulinsekretion der entscheidende Impuls zur Glukagonausschüttung zu sein. Studien konnten zeigen, dass die Alphazellen des Pankreas nicht direkt auf die fallende Glukosekonzentration des Blutes mit einer Glukagonsekretion reagierten, sondern indirekt über Änderungen der Insulinkonzentration. Man nennt dies die „switch off“-Hypothese (19)(20).

Auch das Metallion Zink, welches gemeinsam mit Insulin aus den Insulingranula der Betazelle freigesetzt wird, wird als potenzieller, potenter Regulator der Glukagonsekretion diskutiert.

Die Alphazellen zeigen somit eine hohe Sensibilität auf Stoffwechselprodukte der Betazelle (19)(18).

Auf neuronaler Ebene sind glukosesensible Neurone im ventromedialen Hypothalamus für die Aktivierung des Sympathikus sowie des Parasympathikus verantwortlich. Beide sorgen bei einer Stimulation für eine gesteigerte Glukagonsekretion (18)(17).

Aber auch die glukoseunabhängige Sekretion auf einen Stressstimulus, vermittelt über eine Katecholaminsekretion der Nebenniere oder direkt über Neurone des Hypothalamus, ist beschrieben (21)(22)(23).

1.2.3 Effekte des Hormons Glukagon

Glukagon kann seine Wirkung dort entfalten, wo entsprechende Rezeptoren exprimiert werden. Glukagonrezeptoren konnten in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Leber und Niere (24) besitzen besonders viele Rezeptoren, aber auch in Herz, Fettgewebe (25), Nebennieren und Gehirn konnte der Glukagonrezeptor identifiziert werden (26)(27)(28).

Die Vielzahl an Wirkorten erklärt auch die Vielzahl an Wirkungen, die das Hormon Glukagon besitzt. Im Folgenden werden die weithin bekannten glukose-relevanten Effekte und die pleiotropen Effekte von Glukagon, welche erst in letzter Zeit in den Fokus wissenschaftlicher Forschung gerückt sind, genauer beleuchtet.

1.2.3.1 Glukoserelevante Effekte des Hormons Glukagon

Für die Glukosehomöostase scheint der Insulin-Glukagon-Antagonismus wesentlich, was erklärt, warum Glukagon meist als der Insulinantagonist bekannt ist. Eine sinkende Insulinsekretion bei sinkenden Blutglukosekonzentrationen gilt als wichtiger Stimulus für die Glukagonsekretion (18).

Glukagon stimuliert die Glykogenolyse und die Glukoneogenese in der Leber und hemmt die Glykogensynthese und Glykolyse (29)(30)(31).

Schon im Jahr 1921 veröffentlichten die Forscher Banting und Best Daten, die den Insulin-Glukagon-Antagonismus zeigten (32). Doch erst mit der Entwicklung der Somatostatin-Infusionstechnik und neuen Radioimmunoassays wurde es möglich, verlässliche Daten in Bezug auf den Glukosestoffwechsel zu gewinnen (33). Nun rückte auch die Rolle des Hormons Glukagon bei der Diabetesentstehung verstärkt in den Fokus der Wissenschaft. Seit 1970 existieren Erkenntnisse, die darauf hindeuten, dass auch das Hormon Glukagon einen Einfluss auf die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 haben könnte (34)(4)(35)(36).

Im Jahr 2012 postulierten Unger et al. die sogenannte glukagonozentrische Hypothese („glucagonocentric hypothesis“) (29), nach der Insulin nicht allein für die Diabetes mellitus Entstehung verantwortlich ist, sondern Glukagon eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung einnimmt. Bei Diabetespatienten wurden trotz erhöhter Blutglukosespiegel und einer Hyperinsulinämie, physiologisch beides Suppressoren der Glukagonsekretion, eine Hyperglukagonämie nachgewiesen, die in engem Zusammenhang mit einer gesteigerten hepatischen Glukoneogenese stand (35). Auch die hepatische

Insulinresistenz war deutlich ausgeprägter in Anwesenheit von hohen Glukagonkonzentrationen als unter isolierter Glukagonsuppression (35)(37).

Zusätzlich zeigte sich eine Hyperplasie der Alphazellen des Pankreas (38).

Konstatiert wurde, dass die Leber eines Diabetikers empfindlicher auf das Hormon Glukagon reagiere und auf diese Weise die gesteigerte Glukoneogenese erklärt werden könne.

Gegen Ungers glukagonozentrische Hypothese sprechen Daten einer Studie, die bei Gesunden, Diabetikern und Übergewichtigen künstlich eine Hyperglukagonämie durch peripher zugeführtes Glukagon erzeugten. Die induzierte Hyperglukagonämie hatte erst bei Diabetespatienten im Insulinentzug einen blutglukosesteigernden Effekt. In den anderen Studiengruppen konnte keine Auswirkung auf die Glukosehomöostase festgestellt werden. Die orale Glukosetoleranz gesunder Probanden blieb ohne kompensatorische Hyperinsulinämie völlig unbeeinflusst durch die induzierte Hyperglukagonämie (39). Die Hyperglukagonämie führte bei Gesunden lediglich zu einer transienten hepatischen Glukoseproduktion (40), bei Diabetikern allerdings zu einer dauerhaft gesteigerten hepatischen Glukoneogenese (41)(42).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Glukagon allein nicht diabetogen wirkt und erst in Kombination mit einem Insulinmangel seine pathologische Wirkung entfaltet (39).

Interessante Ergebnisse liefern auch Studien mit dualen GLP-1- und Glukagonrezeptor-Agonisten oder dreifach Agonisten (GLP1/GIP/Glukagon), die zusätzlich noch am GIP-Rezeptor wirken. Präklinischen Studien an Mäusen und Ratten mit diesen Substanzen zeigten eine Verbesserung der Glukosetoleranz und Reduktion der Fettleibigkeit der behandelten Tiere. Erste Studien am Menschen bestätigen die verbesserte Betazellfunktion sowie ihr Potential zur Gewichtsreduktion (43)(44). Diese Daten sprechen ebenfalls gegen die von Unger aufgestellte glukagonozentrische Hypothese der Diabetes mellitus Entstehung (45)(46)(47). Sie legen sogar eine eher protektive Wirkung von Glukagon nahe, die von therapeutischem Nutzen sein könnte.

1.2.3.2 Pleiotrope Effekte des Hormons Glukagon

In den letzten Jahren wuchs die Erkenntnis, dass die Effekte des Hormons Glukagon nicht auf die Glukosehomöostase beschränkt sind. Diese Erkenntnisse werden untermauert durch Fallstudien des seltenen Glukagonoms und Patienten mit funktionsunfähigen Glukagonrezeptoren (48)(24), die nicht an einem entgleisten Blutzuckerspiegel leiden, sondern durch ein nekrotisierendes Erythem auffallen.

1.2.3.2.1 Wirkung auf den Aminosäurestoffwechsel

Glukagon ist bekannt dafür, die Aminosäurekonzentration im Blut zu regulieren. Studien zeigen, dass Glukagon die Aminosäurekonzentration im Blut senkt und umgekehrt erhöhte Aminosäurekonzentrationen zu einer gesteigerten Glukagonsekretion, einem gesteigerten Aminosäuredurchsatz und vermehrter Harnstoffsynthese sowie einer Alphazellhyperplasie führen. Diese Beziehung wird häufig als Leber-Alpha-Zell-Achse (liver-alpha-cell-axis) bezeichnet. Sie beschreibt einen wichtigen Regelkreis zwischen Leber und Pankreas zur Regulation der Aminosäurekonzentration im Blut, wobei bestimmte Aminosäuren (z.B. Alanin) als Regulatormolekül der Glukagonsekretion fungieren (49)(24)(14). Die Existenz dieses Regelkreislaufs wird untermauert durch Beobachtungen an Patienten mit einem glukagonproduzierenden Tumor (50)(51). Diese Patienten weisen sehr niedrige Aminosäurekonzentrationen im Blut auf, die mit einem Muskelabbau und einem nekrotisierenden Erythem assoziiert sind. Beide Symptome bessern sich nach Aminosäuregabe.

Ein weiterer Beleg für die Interaktion zwischen Leber und Pankreas sind Erkenntnisse aus Studien mit funktionslosem Glukagonrezeptor, der in der Leber in hohem Maße exprimiert wird. Der Funktionsverlust des Rezeptors, der den Regelkreis zwischen Leber und Pankreas stört, führt zu hohen Aminosäurespiegeln, die als eine Art Wachstumsfaktor für die Alphazellen des Pankreas fungieren. Es kommt zur Alphazellhyperplasie und Hyperglukagonämie, allerdings nicht zu einer gestörten Glukosehomöostase (52)(53).

Einige Forscher bringen die Störung der Leber-Alpha-Zell-Achse in Zusammenhang mit der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2. Wewer et al. untersuchte Probanden mit einer nicht alkoholischen Fettleber und beobachtete eine gesteigerte hepatische Insulin- und Glukagonresistenz, die zu einem gestörten Aminosäurestoffwechsel führte. Die hohen Aminosäurekonzentrationen bedingten eine gesteigerte Glukagonsekretion, welche dann wiederum Einfluss auf den Glukosestoffwechsel haben könnte, indem die hepatische Glukoneogenese induziert wird und eine Hyperglykämie resultiert (24)(49).

Eine Interaktion zwischen der Glukagon- und Aminosäurekonzentration im Blut wird somit in allen Studien bestätigt. Ob und welchen Einfluss eine Störung der Leber-Alpha-Zell-Achse auf die Entstehung eines Diabetes mellitus hat, kann nicht abschließend geklärt werden.

1.2.3.2.2 Wirkung auf den Lipidstoffwechsel

Es existieren Daten, die darauf hindeuten, dass Glukagon in der Lage ist die Konzentration von Triglyceriden und Cholesterin im Plasma zu senken (54)(55)(56) und auf vielfältige Weise den Lipidkatabolismus zu beeinflussen. Weitere Studien zeigen, dass eine Fettleber zur Glukagonresistenz führen und auf diese Weise beim Menschen zur Entwicklung einer Hyperlipidämie beitragen kann (57)(58).

Auch die Betaoxidation und die Ketogenese werden durch Glukagon beeinflusst. Eine Steigerung der Glukagonsekretion sorgt für eine Stimulation der Lipolyse weißen Fettgewebes und stellt auf diese Weise Substrate für die Ketogenese bereit. Während langer Fastenperioden wird diese ebenfalls durch hohe Glukagonkonzentrationen induziert und ist in der Lage bis zu Zweidrittel der zerebralen Energieversorgung zu übernehmen (54)(59)(60)(61).

1.2.3.2.3 Wirkung im Gehirn

Neuere Forschung beschäftigt sich mit der Wirkung des Hormons Glukagon im Gehirn. Bewiesen ist, dass Glukagon die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (26) und sich seine Wirkung besonders im Hypothalamus und im Hirnstamm, beides

Regionen zur Regulation des Metabolismus, widerspiegelt (27). In diesen beiden Hirnregionen konnten außerdem die Expression des Glukagon Gens über mRNA nachgewiesen werden, was eine zentrale Synthese des Hormons nahelegt (62). Bei verschiedenen Tierarten konnte belegt werden, dass intraventrikulär injiziertes Glukagon einen Einfluss auf die Glukosekonzentration im Blut hat. Bei Hühnern, Mäusen und Ratten wurde nach intraventrikulärer Injektion eine Hyperglykämie beobachtet (63)(64)(65). Neuere Daten beim Hund legen einen noch differenzierteren Regulationsmechanismus nahe. Im Gegensatz zu seiner peripheren Wirkung hemmte intrazerebrales Glukagon nach einer transient gesteigerten hepatischen Glukoseproduktion die hepatische Glukoneogenese und die Nahrungsaufnahme (42)(27). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine zentrale Glukagonrezeptorblockade die Wirkung von peripherem Glukagon steigerte und zu höheren Glukosekonzentrationen im Blut führte. Die Forscher postulierten, dass eine hypothalamische Glukagonresistenz, die zum Beispiel durch eine fettreiche Ernährung induziert wird, zu gesteigerten Blutglukosewerten führt und ein wichtiger Mechanismus in der Diabetes mellitus Entstehung sein könnte (66).

Vergleichbare Daten beim Menschen existieren noch nicht.

1.2.3.2.4 Wirkung am Herzen

Am Herzen löst Glukagon die typische Fight-or-flight-Reaktion aus und wirkt positiv inotrop und chronotrop. Aufgrund dieser Wirkung nutzt man Glukagon beispielsweise in der Notfallmedizin zur Antagonisierung einer Betablockerüberdosierung (21).

Außerdem verbessert das Hormon die Glukoseaufnahme in die Myozyten und beeinflusst somit die Regulation der kardialen Funktion (67).

1.2.3.2.5 Wirkung auf Grundumsatz und Nahrungsaufnahme

Die anorektische Wirkung von Glukagon beobachtete man schon früh in Studien, bei denen durch hohe Dosen Glukagon ein Sättigungsgefühl erreicht wurde (68)(69). Unklar bleibt auf welche Weise die Appetitregulation stattfindet.

Vorhandene Daten legen eine verlangsamte Magenentleerung als Ursache nahe (70). Andere Studien, die Glukagon intraventrikulär verabreichten, erzielten eine stärkere Appetithemmung als bei peripherer Gabe, was eher für eine neurohumorale Regulation der Appetithemmung durch Glukagon spricht (71). Auch zur Grundumsatzsteigerung, die nach Glukagongabe beschrieben wird, existieren verschiedene Hypothesen. Als Ursachen diskutiert werden die Thermogenese von braunem Fettgewebe, ein gesteigerter Blutfluss sowie erhöhter Sauerstoffverbrauch der Gewebe, induziert durch einen Glukagonanstieg (72)(73)(74)(75). Weiterhin zieht man die Steigerung von Substratzyklen in Betracht, deren Nutzen nicht sofort offenbar wird. Substratzyklen setzen sich meist aus einer anabolen und einer katabolen Stoffwechselreaktion zusammen, deren primäre Aufgabe es ist, unter ATP-Verbrauch Wärmeenergie zu generieren. Im Englischen wird dies häufig als nutzloser Substratzyklus (futile substrate cycle) bezeichnet (21)(76)(77).

1.2.3.2.6 Wirkung auf den Magen-Darm-Trakt

Bereits in den 1950er Jahren wurde ein Effekt von Glukagon auf die Magen-Darm-Beweglichkeit beschrieben. Forscher konnten zeigen, dass sowohl die Magen-, als auch die Dünn- und Dickdarmmotilität durch exogene Glukagonzufuhr inhibiert wird (78)(68)(79)(80). Klinisch macht man sich diese Erkenntnis bei Untersuchungen des Darmes zunutze, um ungewünschte Kontraktionen und Spasmen zu unterdrücken (81). Diskutierte Effekte der gehemmten Magen-Darm-Peristaltik sind eine verlängerte Passagezeit des Nahrungsbreis sowie die Verminderung des Hungergefühls (78)(70).

Auf welche Art und Weise Glukagon auf den Gastrointestinaltrakt wirkt ist noch nicht restlos geklärt. Allerdings scheint eine indirekte Hemmung der Motilität wahrscheinlich, da die intestinalen Kontraktionen erst zeitlich verzögert zur Applikation von Glukagon eintreten. Die gesteigerte Glukagonkonzentration führt zu einer Katecholaminsekretion in den Nebennieren, die wiederum die Magen- und Darmkontraktionen hemmen (79). In einer weiterführenden Studie konnte gezeigt werden, dass der Effekt auf den Darm bei vagotomierten Hunden

wesentlich geringer ausfällt und Glukagon direkt über vagale Neurone zu einer Motilitätsminderung führt (82).

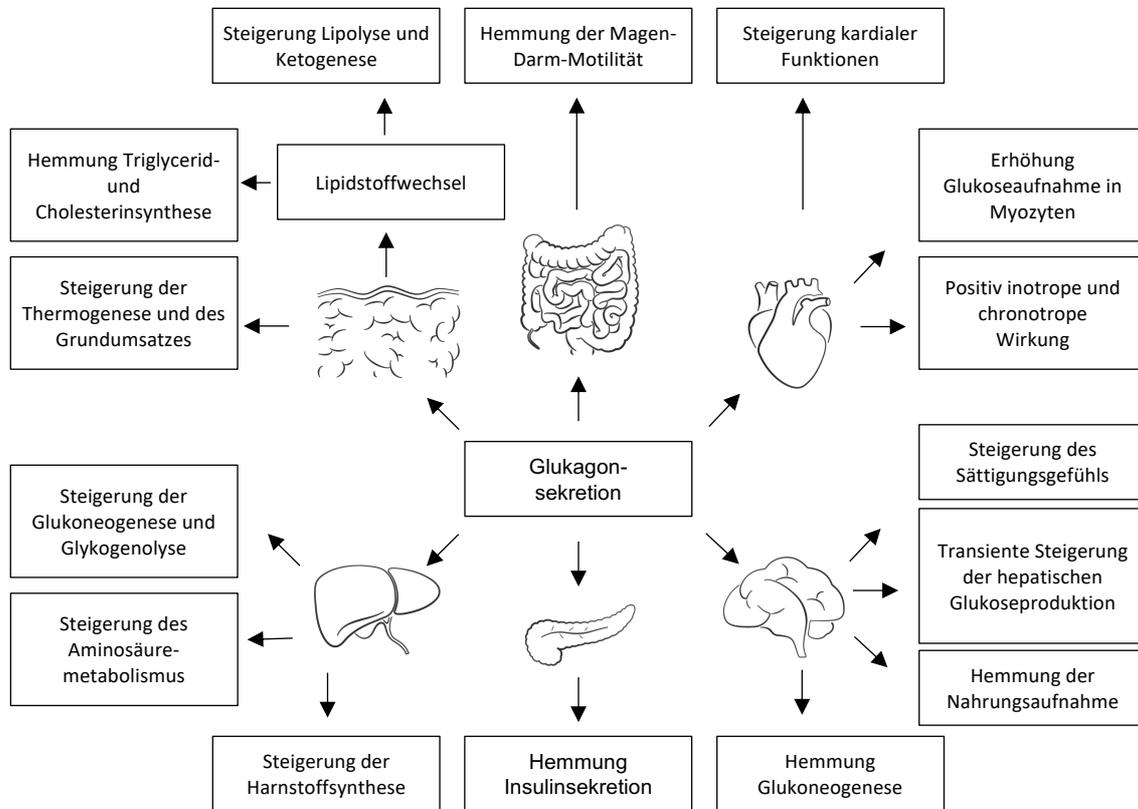


Abbildung 1: Zusammenfassung der Wirkungen von Glukagon auf periphere Organe

1.3 Hintergrund der Studie

Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte bei Datenauswertungen von 4194 Probanden, welche in Zusammenarbeit mit der Tübinger TUEF und TULIP-Studie, der finnischen PPP-BOTNIA-Studie und der schwedischen MDC-Studie im Hinblick auf ihre Glukagonwerte nach oralem Glukosetoleranztest untersucht wurden, bei 20-30% der Probanden einen Anstieg der Glukagonkonzentration nach Glukosebelastung von Minute 0 (nüchtern) auf Minute 120 ($\text{fold-change-glucagon}_{120/0} \geq 1$) feststellen. Anders als initial vermutet, waren die erhöhten Glukagonwerte nicht mit einer gestörten Glukosetoleranz der Probanden verknüpft. In allen drei untersuchten Kohorten präsentierten sich die Probanden

schlanker, mit einer besseren Insulinsensitivität und weniger Leberfett. Eine gestörte Glukosetoleranz (IGT) in der Gruppe mit Glukagonanstieg nach Glukosebelastung wurde seltener nachgewiesen (83).

Eine zentralnervöse und detaillierte metabolische Analyse dieses scheinbar paradoxen Glukagonanstiegs steht noch aus. Ebenso die Untersuchung der Frage, ob ein artifizieller Glukagonanstieg nach Glukosebelastung ähnliche positive Auswirkungen mit sich bringt.

1.4 Fragestellung

Wir haben diese Studie entworfen, um die akuten Effekte eines Glukagonanstiegs während einer Glukosebelastung zu untersuchen. Spezifisch wollten wir die Effekte des Hormons Glukagon auf das Gehirn, die Appetitregulation, die Insulin- und Blutzuckerwerte während der Glukosebelastung, den basalen Energieumsatz sowie die Aminosäurekonzentrationen studieren.

Der primäre Endpunkt unserer Studie war der Unterschied der zerebralen Aktivität in der Verarbeitung von Nahrungsreizen zwischen Probanden mit abfallendem und ansteigendem Glukagon während eines oralen Glukosetoleranztests. In der Gruppe der Probanden mit abfallendem Glukagon wurde der physiologische Glukagonanstieg nachgeahmt und intraindividuelle Unterschiede der zerebralen Aktivität nach Kochsalz- (Placebo-) und Glukagoninfusion untersucht.

Sekundäre Endpunkte waren Unterschiede der beiden Phänotypen bei der Insulinsensitivität, der Glukosetoleranz, des Grundumsatzes, der Aminosäurekonzentrationen und der Hungerbewertung auf einer visuellen Analogskala.

Auch für die sekundären Endpunkte wurden intraindividuelle Unterschiede in der Probandengruppe mit abfallendem Glukagon nach Placebo- und Glukagoninfusion untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Die Studie wurde von der Ethikkommission (Projekt-Nummer:529/2016BO1) der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigt und auf der Plattform ClinicalTrials.gov registriert. Diese US-amerikanische Plattform erfüllt den Zweck, Daten und Ergebnisse von wissenschaftlichen Studien für Probanden, Kliniker, Ethikkommissionen und Nutzer medizinischer Literatur transparent und nachvollziehbar zu gestalten. Die Probanden wurden sowohl mündlich als auch schriftlich über den Ablauf, die möglichen Risiken und die Ziele der Studie aufgeklärt und haben sich mit ihrer Unterschrift zur Teilnahme bereit erklärt. Die Zustimmung zur Teilnahme konnte jederzeit durch die Probanden widerrufen werden.

Die Studie wurde einfach verblindet und placebokontrolliert in der Medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

Bei der Studie handelt es sich um eine Interventionsstudie mit dem Hormon Glukagon.

Im Zuge meiner Doktorarbeit lege ich besonderes Augenmerk auf die Auswertung metabolischer Endpunkte der Studie bei den Probanden, die sowohl eine Kochsalz- (Placebo-) als auch Glukagoninfusion erhielten und ermittele, inwiefern sich metabolische Unterschiede zwischen den Gruppen ergeben.

2.2 Probanden

2.2.1 Rekrutierung

Die Rekrutierung erfolgte zum einen aus der Probandendatenbank des Instituts für Diabetesforschung und Metabolische Erkrankungen und zum anderen durch Emailaufrufe und Zeitungsinsertate. Dementsprechend war bei einem Teil der Probanden ein früherer Glukagonwert bekannt, bei einem anderen Teil nicht.

2.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen in die Studie wurden stoffwechselgesunde Frauen und Männer im Alter zwischen 18 und 70 Jahren und einem Body-Mass-Index (BMI) zwischen 18,5 und 29,9 kg/m². Kriterien für einen Ausschluss von der Studie waren:

Aktuell:

- fieberhafter Infekt mit Temperaturen > 38,5°C in den letzten 14 Tagen
- Blutspende in den letzten 12 Wochen vor Studieneinschluss

Chronische Erkrankungen:

- Diabetes mellitus
- bekannte Lebererkrankungen (Hämochromatose, NASH, Hepatitis B und C)
- chronisch entzündliche Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa)
- chronische Nierenerkrankung
- bekannte maligne Erkrankung
- psychiatrische Diagnosen (Agoraphobie, Psychose, Depression, bipolare Störung)

Stattgehabte Erkrankungen:

- Z.n. Thrombose oder Lungenarterienembolie
- Z.n. Implantation von MRT-untauglichen Gegenständen (z.B. Clips, MRT-untaugliche unfallchirurgische Implantate)

In der körperlichen Untersuchung:

- RR > 160/100 mmHg
- Herzgeräusch lauter als 2/6

In der Blutuntersuchung:

- Nüchtern glukose $\geq 7,0$ mmol/L oder HbA1c > 6,5%

- AST oder ALT > 2,5-fache der oberen Grenze des Referenzbereichs (> 125 U/L)
- Hb < 12 g/dl
- CRP > 5 mg/dl oder
- Leukozyten > 15000/ μ L

2.2.3 Teilnehmer

Nach Friston et al. (84) ist bei MRT-Studien eine Mindestprobandenzahl von 8 nötig, um bei Anwendung des „Random Effect Modells“ gewonnene Erkenntnisse von der Studienpopulation auf die Allgemeinheit übertragen zu können. Aus diesem Grund wurde eine ausreichend große Probandengruppe gebildet, die anschließend in eine Gruppe mit physiologischem Glukagonanstieg und eine Gruppe mit physiologischem Glukagonabfall eingeteilt wurde.

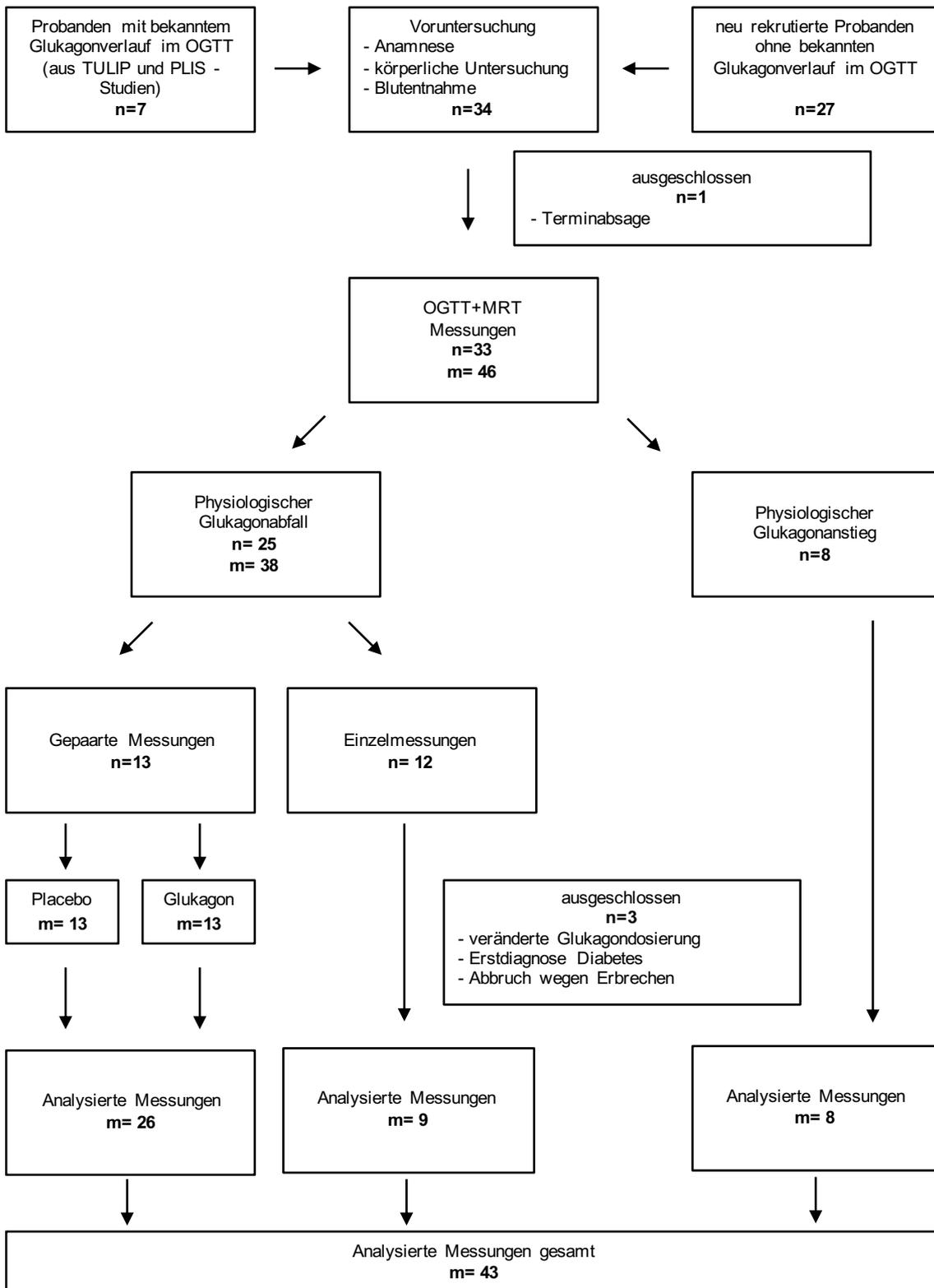


Abbildung 2: Probandenrekrutierung, Anzahl Probanden (n), Anzahl Messungen (m)

2.3 Versuchsprotokoll

Die Studie erforderte je nach Glukagondynamik von jedem Probanden 2 oder 3 Anwesenheitstermine. In einem ersten Termin unterzog sich jeder Proband einer Voruntersuchung, die die Eignung zur Teilnahme feststellte.

Geeignete Probanden wurden dann zur Hauptuntersuchung eingeladen. Bei fallender Glukagondynamik fanden zwei Hauptuntersuchungen in gleicher Weise, bei steigender Glukagondynamik eine Hauptuntersuchung statt. Zu Beginn der Studie wurde eine Messung mit einem Probanden pro Tag durchgeführt. Später fanden Messungen mit zwei Probanden pro Tag parallel statt. Insgesamt wurden 43 Messungen ausgewertet.

2.3.1 Voruntersuchung

Bei der Voruntersuchung führte ein Studienarzt eine körperliche Untersuchung durch, um Grunderkrankungen auszuschließen. Weiterhin wurde geprüft, ob bei den Probanden Kontraindikationen für eine MRT-Untersuchung vorlagen.

Es wurde ein EKG angefertigt, Größe, Gewicht, Hüft- und Taillenumfang dokumentiert, Blutdruck und Puls gemessen, eine Bioimpedanz-Analyse zur Bestimmung des Körperfettanteils und ein Routinelabor angefertigt.

Im Routinelabor enthalten waren folgende Parameter:

- Differentialblutbild
- Elektrolyte
- Nierenfunktionsparameter
- Gerinnungsparameter
- Entzündungsparameter
- Transaminasen
- Nüchtern glukose und HbA1c
- NEFAs

2.3.2 Hauptuntersuchung

Anschließend erschienen die Probanden nüchtern zu ihrer Hauptuntersuchung. Für Probanden mit physiologischem Glukagonanstieg nach oraler Glukosebelastung erfolgte diese einmalig. Bei Probanden mit physiologischem Glukagonabfall wurde die Hauptuntersuchung einmal mit Infusion einer Kochsalzlösung und einmal mit einer Glukagonlösung durchgeführt. Die Kochsalzlösung wird im Folgenden als Placebo bezeichnet.

Es erfolgte an jedem Untersuchungstag die erneute Bestimmung des Gewichts, eine Urinprobe wurde abgegeben und zwei periphere venöse Zugänge gelegt. Einer diente zur Entnahme der Blutproben, der andere zum Infundieren entweder der Glukagon- bzw. Placebolösung.

Danach startete die erste circa 30-minütige funktionelle MRT-Messung (prä-fMRT).

Direkt im Anschluss an die Messung wurde die basale Blutentnahme durchgeführt und der orale Glukosetoleranztest mit der standardisierten 75g Glukoselösung (Accu Check Dextrose, Roche) gestartet. Es folgten Blutentnahmen bei Minute 15, 30, 60, 90, 120 und 150. Die folgenden Laborparameter wurden zu allen Blutentnahmezeitpunkten ermittelt:

- Glukagonkonzentration
- Blutglukosekonzentration
- Insulinkonzentration
- C-Peptid-Konzentration
- Aminosäurekonzentration
- NEFAs
- Triglyceride
- Inkretine

Die basale Blutentnahme diente einer ausführlichen Labordiagnostik, die zusätzlich folgende Werte beinhaltet:

- Differentialblutbild

- Entzündungsparameter
- Elektrolyte
- HbA1c
- Nierenretentionsparameter
- Transaminasen
- Schilddrüsenhormone

Nach 30 und 120 Minuten wurde jeweils eine weitere circa 30-minütige fMRT-Messung durchgeführt (post_30-fMRT; post_120-fMRT).

Bei der letzten Messung forderten wir die Probanden dazu auf, sich Bilder mit wechselnden Motiven (Mahlzeit, Punkt, Kreuz) anzuschauen und bei Erscheinen eines Kreuzes einen bestimmten Knopf auf einem Taster zu bedienen, der ein Signal in den MRT-Schaltraum übermittelte.

Anschließend erfolgten in Kooperation mit der Metabolic Neuroimaging Group des Helmholtz Zentrums Münchens kognitive Tests. Den Probanden wurden im Anschluss an die letzte funktionelle MRT-Messung ein weiteres Mal Bilder von Mahlzeiten vorgeführt. Sie wurden aufgefordert, diejenigen Bilder zu identifizieren, die bereits während der fMRT-Messung zu sehen waren. Anschließend führten wir Tests durch, die das Gedächtnis und die Konzentration der Probanden maßen. Dabei mussten beispielsweise Worte aus verschiedenen Wortgruppen erinnert und wiedergegeben werden oder unter Zeitdruck Zahlen in aufsteigender Reihenfolge sortiert und auf dem Papier verbunden werden.

Zum Abschluss jeder Visite fand die Grundumsatzmessung mit dem indirekten Kalorimeter Vyntus CPX (CareFusion, Hoechberg, Germany) statt. Dabei waren die Probanden angehalten, möglichst bewegungslos für circa 15 Minuten unter einer durchsichtigen Plastikhaube zu liegen und ruhig zu atmen.

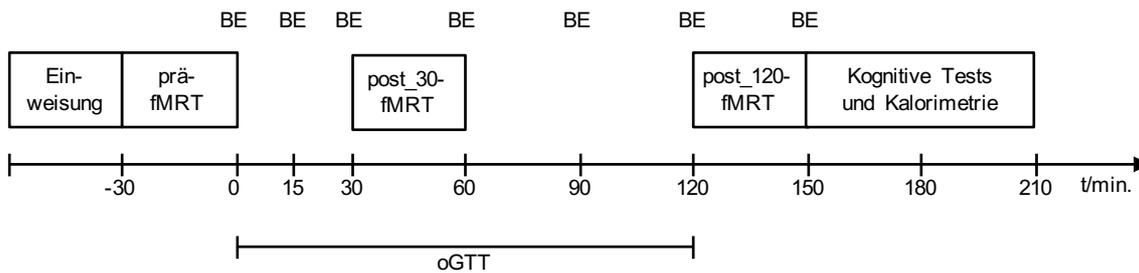


Abbildung 3: Versuchsprotokoll Hauptuntersuchung, Zeit in Minuten, Blutentnahmen (BE)

2.3.3 Oraler Glukosetoleranztest (oGTT)

Der orale Glukosetoleranztest ist ein viel erprobter Test zur Feststellung einer gestörten Glukosetoleranz und wird auch in der Diagnostik des Diabetes mellitus verwendet (12)(85). Der Test ermöglicht die Messung der Glukosehomöostase und Betazellfunktion und wurde in unserer Studie als reproduzierbare Glukosebelastung eingesetzt (4).

Die verwendete standardisierte Glukoselösung (Accu Check Dextrose, Roche) enthält 75g wasserfreie Glukose.

Nach einer basalen Blutentnahme durch eine periphere Venenverweilkanüle (Abbocath 20G) wurde die Glukoselösung nach mindestens 8-stündigem Fasten innerhalb von 3-5 Minuten getrunken. Es erfolgten Blutentnahmen nach 15, 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten. Die Blutproben wurden sofort auf Eis gelagert und in das Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen geschickt.

Die Probanden wurden dazu aufgefordert mindestens 3 Tage vor Durchführung des Tests keine Diät zu halten und ihre normalen Alltagsaktivitäten beizubehalten.

2.3.4 Funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT)

Die funktionelle Magnetresonanztomographie ermöglicht die Darstellung neuronaler Aktivität durch die Messung metabolischer Veränderungen im Gehirn auf der Grundlage des blood oxygen level dependent (BOLD) effect. Dieser Effekt beruht auf dem unterschiedlichen Verhalten von Hämoglobin in einem Magnetfeld abhängig von seinem Oxygenierungszustand.

Man unterscheidet zwischen diamagnetischem und paramagnetischem Verhalten. Oxygeniertes Hämoglobin ist ein Diamagnet und richtet sich in einem Magnetfeld entgegen der Feldrichtung aus.

Desoxyhämoglobin ist ein Paramagnet, der sich entlang eines Magnetfeldes magnetisiert und damit die Feldstärke des Magneten in sich selbst verstärkt. Außerhalb eines Magneten besteht keine magnetische Ordnung, Desoxyhämoglobin ist also kein Spontanmagnet.

Die Eigenschaft ein Magnetfeld in sich selbst zu verstärken, bewirkt im Falle des Desoxyhämoglobins in den Gefäßen, dass das Protonensignal von Wassermolekülen im gefäßumgebenden Gewebe verändert wird. Dies führt zu einem messbaren Kontrast im MRT im Vergleich zu oxygeniertem Hämoglobin.

Die Anwesenheit von paramagnetischen Molekülen verändert die magnetische Leitfähigkeit zwischen Blutgefäß und umgebendem Gewebe, was zu einer Erhöhung der Spinzahl der Moleküle führt. Dies wiederum verursacht eine Zerstreuung der Wasserprotonensignale und ist im MRT-Bild als eine Kontrastabschwächung zu sehen, stellt sich also dunkel dar. Daraus kann gefolgert werden, dass eine erhöhte Signalintensität eine erhöhte Blutoxygenierung anzeigt. Der Kontrast wird also durch die Blutoxygenierung festgelegt und ist bestimmt durch Angebot, in Form von gesteigertem oder vermindertem Blutfluss und Verbrauch (Metabolismus), in Form von gesteigerter oder verminderter Sauerstoffextraktion (O_2 -Extraktion) (86).

Ein gesteigerter Sauerstoffbedarf wird somit mit einem gesteigerten Metabolismus der Neuronen verknüpft und zeigt eine neuronale Aktivität in diesen Arealen an.

In früheren Studien konnte durch Vorführen essensrelevanter und nicht-essensrelevanter Bilder gezeigt werden, dass die Sauerstoffkonzentration in den Hirnarealen, welche essensrelevante Stimuli prozessieren, bei einem essensrelevanten Impuls im Vergleich zu einem nicht-essensrelevanten anstieg (8)(87)(88). Diese Tatsache machten wir uns in der vorliegenden Arbeit zu Nutze. Es wurden Messungen während einer Ruhephase zur Ermittlung des absoluten zerebralen Blutflusses und fMRT-BOLD-Sequenzen durchgeführt. Außerdem

fanden anatomische Messungen statt, die es ermöglichten entsprechend stimulierte Hirnareale zu lokalisieren.

Verwendet wurde ein 3-Tesla MRT der Firma Siemens (Siemens Trio, Erlangen, Germany) mit einer 12-Kanal Kopfspule. Um Kopfbewegungen zu minimieren, wurde die Spule seitlich mit Schaumstoffpolstern ausgestattet. Die Essensbilder wurden über eine Beamer-Spiegelkonstruktion in das MRT projiziert.

2.3.5 Verabreichung von Glukagon

Das Glukagoninfusat wurde über einen Perfusor, der außerhalb des MRT positioniert war, und einen 2,5 m langen Infusionsschlauch kontinuierlich infundiert. Die Infusionslösung wurde mit 2 mL Eigenblut angereichert, um ein Anhaften des Glukagons an der Kunststoffoberfläche der verwendeten Infusionsmaterialien zu vermeiden.

2.3.6 Kalorimetrie

Die indirekte Kalorimetrie ist eine Untersuchungsmethode, die es erlaubt durch die Menge der Atemgase eine Aussage über den Energieumsatz eines Probanden zu machen. Möglich ist diese Methode, da die eingeatmete Sauerstoffmenge proportional ist zum Energieumsatz (89).

Über die Differenzen von Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Sauerstoff (O₂) in der Ein- und Ausatemluft wird der O₂-Verbrauch und die CO₂-Produktion berechnet. Der Energieumsatz wird dann mithilfe der vereinfachten Weir-Formel aus der Sauerstoffaufnahme (V_{O_2}) und der Kohlendioxidabgabe (V_{CO_2}) ermittelt.

Ruheenergieumsatz (resting energy expenditure; REE) nach der vereinfachten Weir-Formel (90):

$$REE \left(\frac{kcal}{d} \right) = (1.106 \times V_{CO_2} + 3.941 \times V_{O_2}) \times 1.44$$

Die Methode erlaubt Rückschlüsse auf die Effizienz der Energieverwertung in Ruhe oder nach Nahrungsaufnahme. Außerdem können Aussagen über die

bevorzugt genutzten Hauptnährstoffe für die Energiegewinnung gemacht werden. Hierzu wird der respiratorische Quotient (RQ) verwendet, der sich wie folgt berechnet:

$$RQ = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}}$$

Um mögliche Limitationen der indirekten Kalorimetrie, die durch die Anwendung unterschiedlicher technischer Geräte und Auswertungsprogramme entstehen, zu vermeiden, verwendeten wir die postkalorische individual calibration control evaluation (ICcE) -Methode. Diese postkalorische Kalibration wurde von Schadewaldt et al. entwickelt, um Ungenauigkeiten durch Geräteunterschiede bei der indirekten Kalorimetrie zu minimieren (91).

Die indirekte Kalorimetrie sollte im Ruhezustand bei liegender Körperhaltung und bei Raumtemperatur stattfinden. In dieser Studie kam die Dilutionsmethode unter Verwendung einer Atemhaube zum Einsatz.

2.4 Materialien

Glukagon	GlucaGen 1mg/mL; Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung; Novo Nordisk
Natriumchloridlösung	NaCl 0,9%, B.Braun Melsungen AG
Glukoselösung	Accu Check Dextrose O.G-T.; 300mL; Roche

2.5 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgten bei der Voruntersuchung durch eine Venenpunktionskanüle und während des oralen Glukosetoleranztests durch eine periphere Verweilkanüle in der Ellenbeuge oder am Unterarm.

Durch Spülen mit 2 mL NaCl 0,9% nach jeder Blutentnahme wurde die Nutzung der Verweilkanüle zur Blutentnahme sichergestellt und ein Verschluss durch

koaguliertes Blut vermieden. Vor jeder Blutentnahme wurden 2 mL des Blutes gesondert abgenommen, um eine Verfälschung der Werte zu verhindern.

Die Blutproben wurden unverzüglich auf Eis gelagert und im Zentrallabor des Universitätsklinikums weiterverarbeitet.

2.6 Messungen

2.6.1 Blutglukosespiegel und HbA1c

Die Messungen der Blutglukosespiegel und des HbA1c-Wertes wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

Glukose wurde mit der Hexokinase-Methode bestimmt. Der HbA1c-Gehalt wurde mithilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aus EDTA-Blut ermittelt.

2.6.2 Laborparameter

Die Analyse der Blutproben erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen. Insulin- und C-Peptidkonzentrationen wurden mittels Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA; Centaur; Siemens) aus dem Serum bestimmt. Die freien Fettsäuren (NEFAs) und Triglyceride wurden mithilfe eines enzymatischen Farbttest aus dem Plasma ermittelt. Ebenfalls enzymatisch wurde Kreatinin bestimmt. CRP wurde anhand der Immunturbidimetrie aus dem Plasma quantifiziert. TSH, fT3 und fT4 wurden ebenso wie Insulin und C-Peptid mit der CLIA-Methode (Centaur;Siemens) ermittelt. Die Transaminasen AST und ALT wurden photometrisch bestimmt. Die Durchflusszytometrie lieferte das Differentialblutbild. Die Elektrolyte Natrium und Kalium wurden aus dem Plasma mit der ISE-Methode (ionenselektive Elektrode) gemessen.

2.6.3 Glukagon

Glukagon wurde in einem EDTA-Röhrchen mit Aprotininzusatz abgenommen und sofort auf Eis gelagert.

Die Glukagonkonzentrationen wurden mit einem kommerziell erwerblichen Glucagon Radioimmunoassay (RIA) Kit (Millipore, Linco Research, St. Charles, MO) bestimmt.

Dieser Radioimmunoassay schnitt als bester von zehn getesteten Assays zur Bestimmung von Glukagon ab. Er zeichnet sich durch sehr geringe Kreuzreaktionen mit andere Peptidhormonen aus, insbesondere Oxyntomodulin, sowie einer Sensitivität von 20 pg/mL bei einem Probenvolumen von 100 µL (92)(93). Zu beachten sind schlechtere Sensitivitäten bei sehr geringen Glukagonkonzentrationen.

Als Glukagonanstieg wird gewertet, wenn der Quotient aus Glukagonwert bei Minute 120 und Minute 0 des oralen Glukosetoleranztests größer oder gleich 1 ist ($\text{fold-chain-glucagon } 120/0 \geq 1$).

2.7 Berechnungen

2.7.1 Dosierung von Glukagon

Die Dosierung von Glukagon für diese Studie wurde auf der Grundlage der Arbeit „Coinfusion of GLP-1 and Glukagon in Man Results in a Reduction in Food Intake“ von Jaimini Cegla et al. im Jahr 2014 (10) kalkuliert. Die Forscher um Cegla infundierten ihren Probanden Glukagon in einer Konzentration von 2,8 pmol/kg/min und erreichten damit einen Plasmaglukagonanstieg von ca. 150 pmol/L. Der in der Studie von Wagner et al. beobachtete physiologische Glukagonanstieg nach Glukosebelastung, der in unserer Studie imitiert werden sollte, war nur etwa ein Drittel so groß, sodass wir schätzten, dass eine um circa dreifach niedrigere Glukagonkonzentration von 1 pmol/kg/min ausreichen würde, um diesen Anstieg bei der Gruppe mit Glukagonabfall nach Glukosebelastung nachzuahmen (83). Im Rahmen einer Probemessung erzielten wir bei Glukagonkonzentrationen von 1 pmol/kg/min bereits einen Glukagonanstieg deutlich über dem physiologischen Maß, sodass wir zur Durchführung der Studie eine Glukagonkonzentration von 0,5 pmol/kg/min festlegten.

Bei einem Probanden von 100 kg Körpergewicht werden so über die Dauer des oGTT von 120 Minuten und der letzten etwa 30-minütigen MRT-Messung insgesamt 7500 pmol (7,5 nmol) infundiert. Die Konzentration wurde durch entsprechende Verdünnung individuell für jeden Probanden bereitgestellt.

Hierfür wurde eine Glukagonstammlösung mit einer Glukagonkonzentration von 0,001 mg/mL hergestellt. Ein Milliliter dieser Lösung enthielt 290 pmol Glukagon. Aus diesen Angaben wurde die Infusionslaufrate über 2,5h in mL/h errechnet.

Für einen 100 kg schweren Probanden betrug die Laufrate 10,4 mL/h.

2.7.2 Insulinsensitivität

Die Insulinsensitivität beschreibt, wie sensibel periphere Gewebe auf Insulin mit der Aufnahme von Glukose in die Zelle reagieren. Eine normale Insulinsensitivität liegt dann vor, wenn bei normal hohen Insulinkonzentrationen ausreichend Glukose aus dem Blut in das Zielgewebe aufgenommen werden kann. Reichen normale Insulinkonzentrationen nicht mehr aus, um Glukose hinreichend in die Zielgewebe zu transportieren, resultiert eine Hyperglykämie mit reflektorischer Hyperinsulinämie. Diesen Zustand nennt man Insulinresistenz (7). Goldstandard der Insulinsensitivitätsmessung ist der Hyperinsulinämische-Euglykämische Clamp (94). Dieser war während unserer Studie, die wiederholte fMRT-Messungen verlangte, nicht durchführbar. Es gibt allerdings viele indirekte Methoden zur Messung der Insulinsensitivität. Zwei davon wurden für diese Studie ausgeführt.

2.7.2.1 Formel von Matsuda und DeFronzo

Die Insulinsensitivität wird einmal nach der Formel von Matsuda und DeFronzo berechnet (95). Benötigt werden die Nüchternkonzentrationen von Glukose und Insulin (fasting glucose and insulin), sowie die Mittelwerte von Glukose und Insulin (mean glucose and insulin) während des oGTTs (Minute 0,30,60,90,120). Die Forscher entwickelten eine Formel für die Insulinsensitivität, die auf der Grundlage der Werte eines oralen Glukosetoleranztests vergleichbare Werte wie

im euglykämischen Insulinclamp, dem Goldstandard der Insulinsensitivitätsmessung, lieferten. Je kleiner der Zahlenwert des Matsuda-Index, desto geringer ist die Insulinsensitivität.

$$IS = \frac{10000}{\sqrt{(fasting\ glucose \times fasting\ insulin) \times (mean\ glucose \times mean\ insulin\ during\ OGTT)}}$$

2.7.2.2 NEFA-Index

Der in unserer Arbeitsgruppe durch Modellierung der Gold-Standard-Messungen entwickelte NEFA-Index ermöglicht eine Berechnung der Insulinsensitivität unabhängig der Glukosekonzentration im Blut. Stattdessen basiert er auf BMI, Insulinkonzentrationen bei Minute 0, 60 und 120 und den NEFAs zu Minute 120 (96). Dieser Index zeigt sich robuster gegenüber veränderten metabolischen Bedingungen z.B. während einer Schwangerschaft oder in verschiedenen Stadien des Prädiabetes. Auch hier gilt je kleiner der Zahlenwert, desto geringer ist die Insulinsensitivität.

$$NEFA - ISI_{0,60,120} = 60 \times e^{(3,853 - 0,9 \times \ln BMI - 0,205 \times \ln insulin_0 - 0,128 \times \ln insulin_{60} - 0,256 \times \ln insulin_{120} - 0,138 \times \ln NEFA_{120})}$$

2.7.3 Hepatische Insulinclearance

Die hepatische Insulinclearance (CLR) ist ein Maß für die Insulinextraktion beim First pass von Insulin in der Leber und kann angenähert werden durch den Quotienten aus der Fläche unter der Kurve (AUC) der C-Peptidkonzentration und der Fläche unter der Kurve (AUC) der Insulinkonzentration (97)(98)(99)(100)(101).

$$CLR = \frac{AUC(C - Peptidkonzentration_{Min.0-120})}{AUC(Insulinkonzentration_{Min.0-120})}$$

2.7.4 Body-Mass-Index (BMI)

Der BMI beschreibt den Quotienten aus Körpergewicht in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern.

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße}^2(\text{m}^2)}$$

Zur Ermittlung des Gewichts wurde bei allen Messungen dieselbe Waage verwendet. Vom Gewicht des angekleideten Probanden wurde 1 kg abgezogen. Der BMI ist ein weit verbreitetes Maß zur Bestimmung von Übergewicht und der Einschätzung des damit einhergehenden Risikos zur Entwicklung von Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskulären Erkrankungen (102).

Zur Beurteilung des BMI wurden die Grenzwerte der WHO herangezogen (103).

Ernährungszustand	BMI
Untergewicht	< 18,5 kg/m ²
Normalgewicht	18,5 – 24,9 kg/m ²
Präadipositas	25,0 – 29,9 kg/m ²
Adipositas Grad I	30,0 – 34,9 kg/m ²
Adipositas Grad II	35,0 – 39,9 kg/m ²
Adipositas Grad III	≥ 40 kg/m ²

Tabelle 2: BMI-Grenzwerte nach WHO-Richtlinien

2.7.5 Taille-Hüfte-Verhältnis (WTH-Ratio)

Das Taille-Hüfte-Verhältnis beschreibt den Quotienten aus Taillenumfang und Hüftumfang.

$$WTH - Ratio = \frac{\text{Taillenumfang (cm)}}{\text{Hüftumfang (cm)}}$$

Die Maße wurden am nüchternen, aufrechtstehenden Probanden mit entspannter Bauchdecke genommen.

Gemessen wurde der Hüftumfang gemäß der WHO-Empfehlung über der Kleidung an der breitesten Stelle des Gesäßes mit zum Boden parallelem Maßband. Der Taillenumfang wurde mittig zwischen unterer Grenze des Rippenbogens und oberem Rand des Beckenkamms gemessen. Kleidungsstücke, die über die Dicke eines T-Shirts hinausgingen, wurden ausgezogen. Verwendet wurde ein nicht elastisches Maßband, welches eng anliegend, aber nicht einschnürend angelegt wurde. (104)

Vermehrtes viszerales Fettgewebe ist assoziiert mit einer größeren Morbidität und Mortalität, besonders mit metabolischen Risikofaktoren wie verminderte Glukosetoleranz, gesteigerte Insulinresistenz und Fettstoffwechselstörungen, welche im besonderen Maße zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskulären Erkrankungen beitragen (102)(105).

Zur Auswertung wurden die Grenzwerte der WHO für eine kaukasische Probandenpopulation genutzt. Bei Männern liegt der Grenzwert des Taille-Hüfte-Verhältnisses bei $\geq 0,9$, bei Frauen bei $\geq 0,85$. Da bei der Auswertung unserer Daten keine Unterscheidung zwischen den Geschlechtern gemacht wurde, wurde der Wert der Frauen als Grenzwert angenommen. Bei Werten oberhalb dieser Grenzwerte liegt ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung metabolischer Komplikationen vor (104).

2.8 Statistische Auswertung

Für die gesamte statistische Auswertung wurde ein Signifikanzniveau von $p=0,05$ festgelegt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware SPSS 27.0 (IBM). Die Ergebnisse werden, falls nicht anders angegeben, als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse zwischen den beiden Gruppen Placeboinfusion vs. Glukagoninfusion erfolgte durch gepaarte t-Tests. Bei Variablen mit Messwiederholungen wurden initial die Flächen unter den

Kurven (AUC) berechnet und anschließend im gepaarten t-Test analysiert. Die AUC wurde mithilfe der Trapezoidformel berechnet.

Auf Normalverteiltheit wurde mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Bei nicht normalverteilten Parametern wurde auf Varianzgleichheit (Homoskedastizität) mit dem Levene-Test getestet. Bei Varianzhomogenität wurde auf eine Transformation der Parameter zur Erreichung der Normalverteiltheit verzichtet und die Rohdaten verwendet.

Zur Ermittlung von Korrelationen erfolgte bei normalverteilten Parametern eine Korrelationsanalyse nach Pearson. Bei nicht normalverteilten Parametern wurde eine Spearman'sche Korrelationsanalyse durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient wird mit r angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Probandencharakteristika

Zu Versuchsbeginn wurden wichtige Probandencharakteristika ermittelt. In Tabelle 3 sind die Charakteristika der Probanden mit gepaarter Messung bei ihrer jeweils ersten Messung dargestellt. Insgesamt erhielten 13 Probanden jeweils eine Messung mit einer Placebolösung und einer Glukagonlösung in zeitlichem Abstand von einigen Monaten.

Normalverteilte Parameter werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Nicht normalverteilte Parameter werden als Median und Interquartilsbereich angegeben.

Probandencharakteristika - erste Visite

n	13	
Geschlecht w [%]	7	53,8
Geschlecht m [%]	6	46,2
Alter [Jahren]	52	[34-59]
Größe [cm]	172,5	± 6
Gewicht [kg]	66,4	[59,7-87,4]
BMI [kg/m ²]	24,4	± 4,5
Taillenumfang [cm]	77,3	[72,5-97,9]
Hüftumfang [cm]	95,8	± 6,5
Taillen-Hüft-Ratio	0,83	[0,77-0,99]
Nüchtern glukose [mmol/L]	4,94	[4,70-5,25]
HbA1c [%]	5,6	± 0,4

Tabelle 3: Probandencharakteristika bei der jeweils ersten Visite. Analysiert wurden die Daten der Probanden mit gepaarter Messung. Das Geschlecht w=weiblich und m=männlich ist in absoluten und relativen Häufigkeiten angegeben, normalverteilte Parameter sind als Mittelwert ± Standardabweichung, nicht normalverteilte Parameter als Median [Interquartilbereich] angegeben. Zur Auswertung des Taillen- und Hüftumfangs sowie der Taillen-Hüft-Ratio lagen nur Werte von 12 Probanden vor.

Das Geschlechterverhältnis ist mit 7 Frauen und 6 Männern nahezu ausgeglichen.

Der Median des Alters liegt bei 52 Jahren mit einem Interquartilbereich von 34 bis 59 Jahren. Damit sind 50% der Probanden unter 52 Jahre und 50% der Probanden zwischen 34 und 59 Jahre alt.

Der mittlere BMI mit 24,4 kg/m² liegt im Bereich der Normalgewichtigen nach WHO Definition.

50% der Probanden hatten ein niedrigeres Taille-Hüfte-Verhältnis als 0,83, womit sie unterhalb des Grenzwertes der WHO für Frauen von 0,85 lagen. Der Interquartilsbereich betrug 0,77 bis 0,99.

Der Median der Nüchtern glukose lag bei 4,94 mmol/L. 75% der Probanden hatten eine niedrigere Nüchtern glukose als 5,25 mmol/L. Bei einem Studienteilnehmer wurde eine gestörte Nüchtern glukose von 6,33 mmol/L gemessen. In der durchgeführten Spearman'schen Korrelationsanalyse korrelierte die Nüchtern glukose linear mit dem BMI der Probanden ($p= 0,003$; $r= 0,76$). Eine Korrelation der Nüchtern glukose mit dem Alter konnte nicht nachgewiesen werden ($p= 0,47$; $r= 0,468$).

Der mittlere HbA1c-Wert mit $5,6 \pm 0,4\%$ war hochnormal. Der gemessene Maximalwert des HbA1c lag bei 6,1% und damit im Bereich einer prädiabetischen Stoffwechsellage. In der Analyse wie viele Probanden einen HbA1c oberhalb von 5,7% und damit einen Prädiabetes nach ADA-Definition (12)(106) hatten, wurden bei 46,2% der Probanden Werte größer oder gleich 5,7% gemessen. Der HbA1c korrelierte dabei weder signifikant mit dem BMI ($p= 0,31$; $r= -0,3$) noch mit dem Alter ($p= 0,2$; $r= 0,38$) der Probanden. Es besteht bei keinem Studienteilnehmer Anhalt für eine Stoffwechselstörung in Form eines manifesten Diabetes mellitus.

Da während der ersten und der zweiten Messung der Probanden einige Monate lagen, wurden in Bezug auf die metabolische Situation wichtige Parameter sowohl vor Placebo- als auch Glukagoninfusion erhoben und durch einen t-Test bei verbundenen Stichproben analysiert und deren statistische Signifikanz untersucht ($p \leq 0,05$).

Sowohl die Nüchtern glukosekonzentration ($p= 0,55$) als auch der HbA1c ($p= 0,07$) unterschieden sich nicht signifikant vor Placebo- und Glukagoninfusion. Das Gewicht ($p= 0,93$) und der BMI ($p= 0,91$) der Probanden waren vor den verschiedenen Messungen kaum voneinander verschieden, sodass ein Einfluss dieser Werte auf die untersuchten Parameter unwahrscheinlich ist.

Probandencharakteristika – jeweils vor Intervention

	Placebo		Glukagon		p
n	13		13		
Nüchtern glukose [mmol/l]	4,94	[4,70-5,25]	5,00	[4,62-5,14]	0,55
HbA1c [%]	5,57	± 0,36	5,47	± 0,28	0,07
Gewicht [kg]	66,4	[59,7-84,9]	68,4	[59,3-87,1]	0,93
BMI [kg/m²]	24,3	± 4,4	24,2	± 4,2	0,91

Tabelle 4: Veränderbare metabolische Probandencharakteristika jeweils vor Intervention. Angegeben sind bei normalverteilten Merkmalen der Mittelwert ± Standardabweichung. Bei nicht normalverteilten Parametern wird der Median [Interquartilbereich] angegeben. Das Signifikanzniveau ist mit $p \leq 0,05$ angegeben. Es wurde ein gepaarter t-Test zum Vergleich der Gruppen Placebo- vs. Glukagoninfusion durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Parametern wurde zuvor auf Varianzhomogenität getestet und bei nicht signifikantem Ergebnis auf Normalisierung verzichtet und die Rohdaten verwendet.

3.2 Dynamik metabolischer Parameter nach Glukosebelastung

3.2.1 Vergleich Placebo- vs. Glukagoninfusion

Verglichen werden die Probanden während Placebo- oder Glukagoninfusion im Hinblick auf ihre Dynamik von Glukose-, Glukagon-, Insulin-, C-Peptid- und Triglyceridkonzentration im Blut nach einer standardisierten Glukosebelastung im Rahmen eines oralen Glukosetoleranztests. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung zu den Messpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten. Bei abhängiger Stichprobe und Messwiederholungen werden durch einen gepaarten t-Test die Flächen unter der Kurve (AUC) von Minute 0 bis Minute 120 nach Beginn des oralen Glukosetoleranztests zwischen den Gruppen Placebo- vs. Glukagoninfusion verglichen.

3.2.1.1 Glukosekonzentration

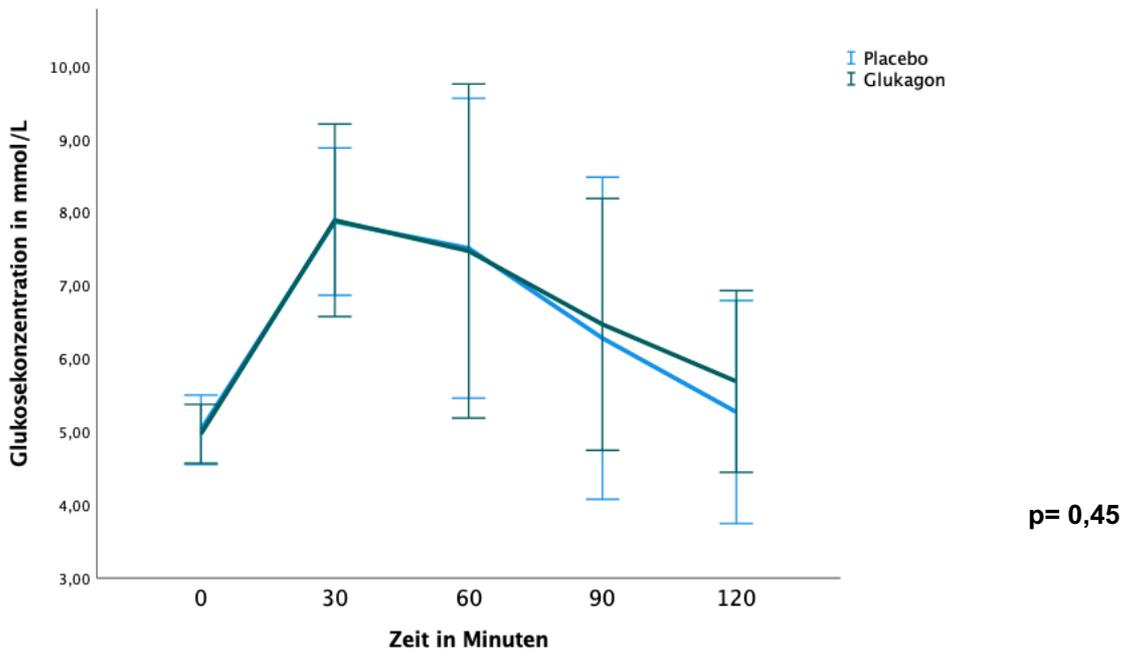


Abbildung 4: Dynamik der Glukosekonzentration über 120 Minuten. Minute 0 markiert den Beginn des oralen Glukosetoleranztests sowie der Placebo- bzw. Glukagoninfusion. Verglichen werden die Gruppen Placebo- (blau) vs. Glukagoninfusion (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe eines gepaarten t-Tests der Flächen unter der Kurve (AUC) der Glukosekonzentration ermittelt.

Die Graphik zeigt den Verlauf der Glukosekonzentration in den Gruppen Placeboinfusion und Glukagoninfusion. Minute 0 markiert den Beginn des oralen Glukosetoleranztests sowie der jeweiligen Infusion. Die Nüchternglukose der beiden Gruppen war mit $5,03 \pm 0,47$ mmol/L in der Placebogruppe und $4,97 \pm 0,40$ mmol/L in der Glukagongruppe auf einem vergleichbaren Ausgangsniveau. Im Verlauf der Glukosebelastung stieg der mittlere Glukosespiegel in beiden Gruppen an und erreichte zu Minute 30 sein Maximum mit $7,87 \pm 1,01$ mmol/L in der Placebogruppe und $7,89 \pm 1,37$ mmol/L in der Glukagongruppe. Deskriptiv zeigte sich ab Minute 60 ein stärkerer Abfall der Glukosekonzentration in der Placebogruppe im Vergleich zur Glukagongruppe. Nach 120 Minuten betrug die mittlere Glukosekonzentration der Placebogruppe $5,27 \pm 1,52$ mmol/L und in der Glukagongruppe $5,69 \pm 1,24$ mmol/L. Die Unterschiede in der

Glukosekonzentration zwischen den Gruppen waren allerdings nicht signifikant ($p_{AUC} = 0,45$).

3.2.1.2 Glukagonkonzentration

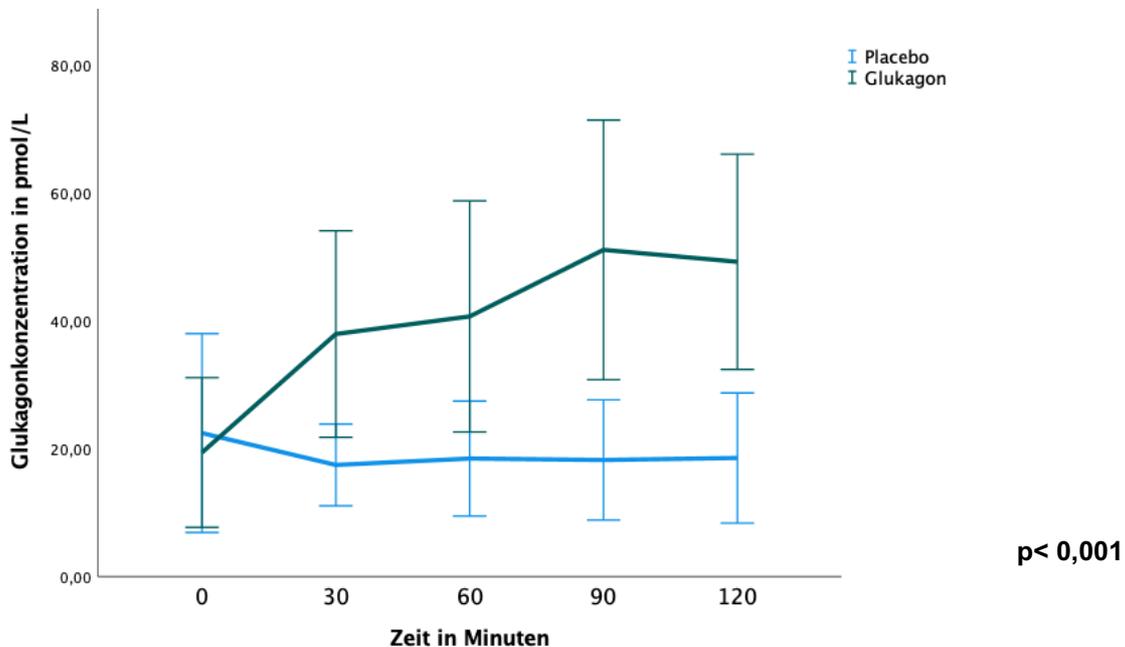


Abbildung 5: Dynamik der Glukagonkonzentration über 120 Minuten. Minute 0 markiert den Beginn des oralen Glukosetoleranztests sowie der Placebo- bzw. Glukagoninfusion. Die Glukagonkonzentration der Infusionslösung betrug 0,5 pmol/kg/min. Die Laufrate wurde gewichtsadaptiert für jeden Probanden einzeln berechnet. Verglichen werden die Gruppen Placebo- (blau) vs. Glukagoninfusion (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe eines gepaarten t-Tests der Flächen unter der Kurve (AUC) der Glukagonkonzentration ermittelt.

Abbildung 5 zeigt die Glukagonkonzentration der verschiedenen Gruppen über 120 Minuten. Zu Minute 0 begann nach erster Blutentnahme die Placebo- bzw. Glukagoninfusion sowie die standardisierte Glukosebelastung. Die Glukagonkonzentration der Glukagoninfusionslösung betrug 0,5 pmol/kg/min. Die Laufrate wurde gewichtsadaptiert für jeden Probanden einzeln berechnet. Die Nüchternglukagonkonzentration der Placebogruppe lag bei $22,41 \pm 15,53$ pmol/L, die der Glukagongruppe bei $19,38 \pm 11,69$ pmol/L und damit leicht niedriger als in der Vergleichsgruppe. In der Placebogruppe sank die Glukagonkonzentration anschließend auf einen 30-Minuten-Wert von $17,44 \pm 6,39$ pmol/L

und schwankte im Verlauf bis zu Minute 120 zwischen $18,21 \pm 9,39$ pmol/L und $18,52 \pm 10,17$ pmol/L.

Unter kontinuierlicher Glukagoninfusion stieg die Glukagonkonzentration bis zu Minute 90 stetig an und erreichte zu diesem Zeitpunkt ein Maximum von $51,03 \pm 20,28$ pmol/L. In Minute 120 wurden mittlere Glukagonkonzentrationen in der Glukagongruppe von $49,17 \pm 16,81$ pmol/L gemessen.

Im Vergleich war die Glukagonkonzentration unter Glukagoninfusion über die Zeit signifikant höher als unter Placeboinfusion ($p_{AUC} < 0,001$).

3.2.1.3 Insulinkonzentration

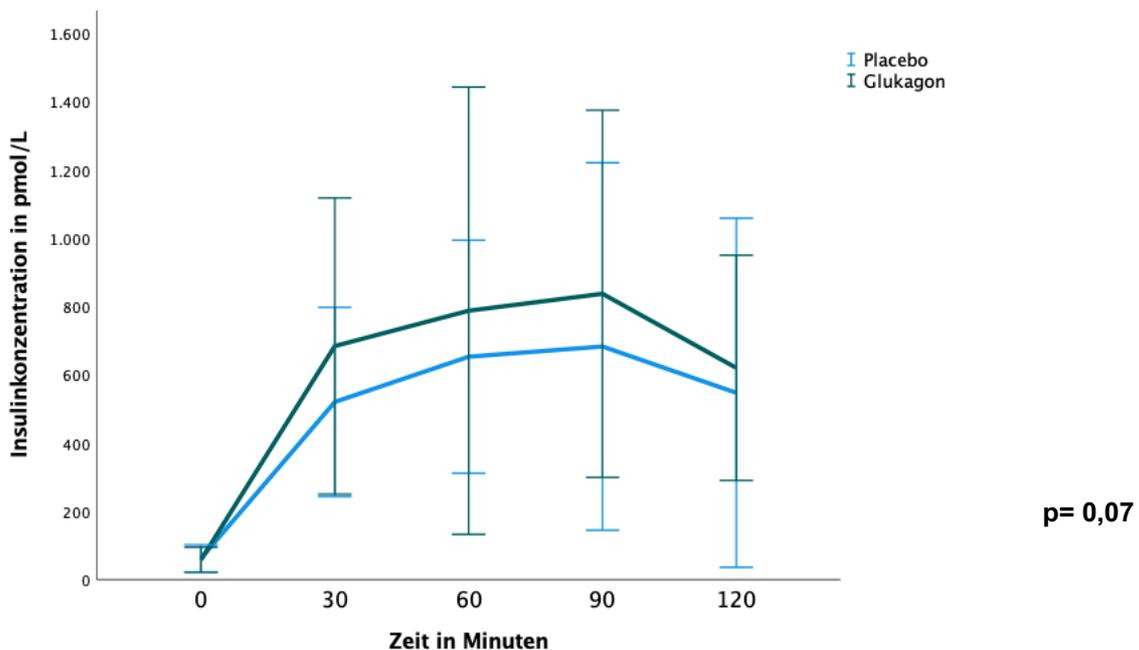


Abbildung 6: Dynamik der Insulinkonzentration über 120 Minuten. Minute 0 markiert den Beginn des oralen Glukosetoleranztests sowie der Placebo- bzw. Glukagoninfusion. Verglichen werden die Gruppen Placebo- (blau) vs. Glukagoninfusion (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe eines gepaarten t-Tests der Flächen unter der Kurve (AUC) der logarithmierten Insulinkonzentration ermittelt.

Die Nüchterninsulinkonzentration in der Placebogruppe lag bei $62,15 \pm 39,83$ pmol/L, in der Glukagongruppe ähnlich bei $57,92 \pm 36,90$ pmol/L. Nach Glukosebelastung stieg die mittlere Insulinkonzentration in beiden Gruppen bis zu Minute

90 an. Zu diesem Zeitpunkt wurde in beiden Gruppen der Maximalwert der Insulinkonzentration innerhalb von 120 Minuten gemessen. In der Placebogruppe lag dieser bei $682,69 \pm 537,96$ pmol/L, in der Glukagongruppe bei $837,08 \pm 537,65$ pmol/L. Anschließend fielen die Insulinkonzentrationen wieder leicht ab, blieben aber weiterhin mit $547,08 \pm 511,24$ pmol/L in der Placebogruppe und $646,25 \pm 330,29$ pmol/L in der Glukagongruppe deutlich über den gemessenen Nüchterninsulinkonzentrationen. Deskriptiv zeigte sich in der Glukagongruppe ein steilerer Anstieg der mittleren Insulinkonzentration nach Glukosebelastung mit kontinuierlich höheren Konzentrationen über die gesamte Zeitspanne von 120 Minuten. Dieser deskriptive Unterschied ist im Vergleich der beiden Gruppen nicht signifikant ($p_{AUC} = 0,07$).

Ab Minute 30 fallen große Standardabweichungen der mittleren Insulinkonzentration auf.

3.2.1.4 C-Peptidkonzentration

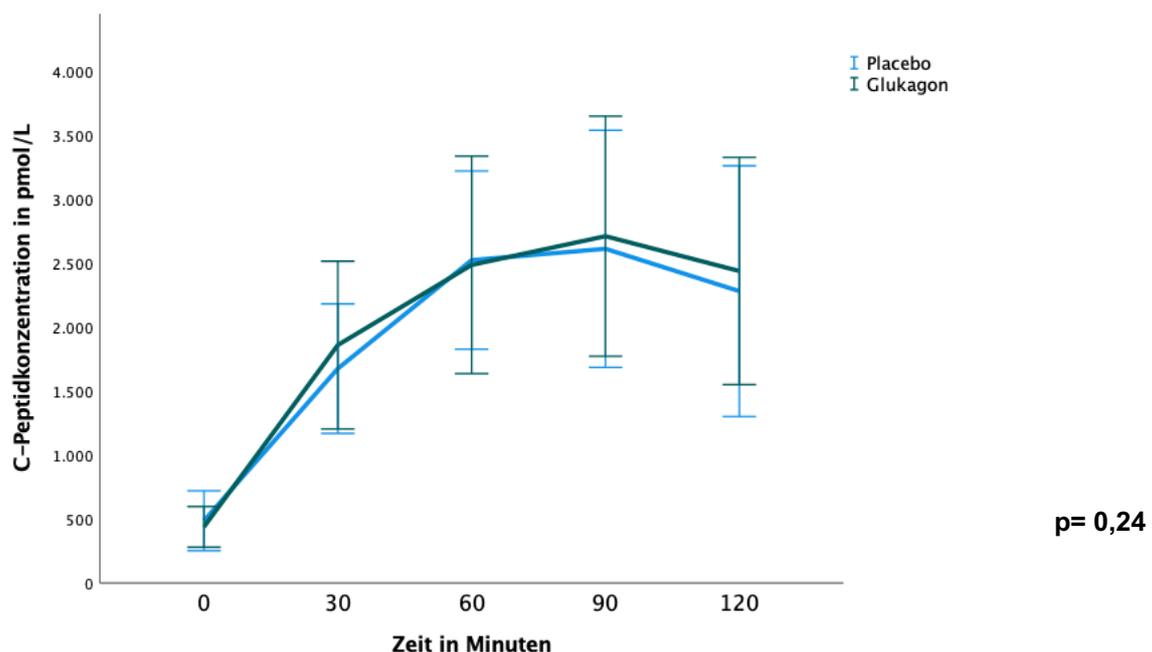


Abbildung 7: Dynamik der C-Peptidkonzentration über 120 Minuten. Minute 0 markiert den Beginn des oralen Glukosetoleranztests sowie der Placebo- bzw. Glukagoninfusion. Verglichen werden die Gruppen Placebo- (blau) vs. Glukagoninfusion (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe eines gepaarten t-Tests der Flächen unter der Kurve (AUC) der C-Peptidkonzentration ermittelt.

Die C-Peptidkonzentration im Nüchternzustand bei Minute 0 lag in der Placebogruppe bei $485,69 \pm 233,77$ pmol/L und in der Glukagongruppe bei $426,15 \pm 163,20$ pmol/L. Nach Beginn des oralen Glukosetoleranztests stieg die C-Peptidkonzentration analog zur Insulinkonzentration deutlich an. Maximalwerte wurden ebenfalls in Minute 90 nach Glukosebelastung gemessen. Diese lagen in der Placebogruppe bei $2609,54 \pm 926,19$ pmol/L und in der Glukagongruppe bei $2630,69 \pm 997,33$ pmol/L. Auch die mittlere C-Peptidkonzentration fiel in Minute 120 wieder leicht ab, blieb aber ebenfalls über den gemessenen Nüchternkonzentrationen mit $2278,77 \pm 979,06$ pmol/L in der Placebogruppe und $2297,08 \pm 980$ pmol/L in der Glukagongruppe. Deskriptiv liegen die Konzentrationskurven der mittleren C-Peptidkonzentrationen der beiden Gruppen auf gleichem Niveau und verlaufen nahezu kongruent. Die Analyse der Fläche unter der Kurve der mittleren C-Peptidkonzentrationen ergab keine Signifikanz ($p_{AUC} = 0,24$).

3.2.1.5 Triglyceridkonzentration

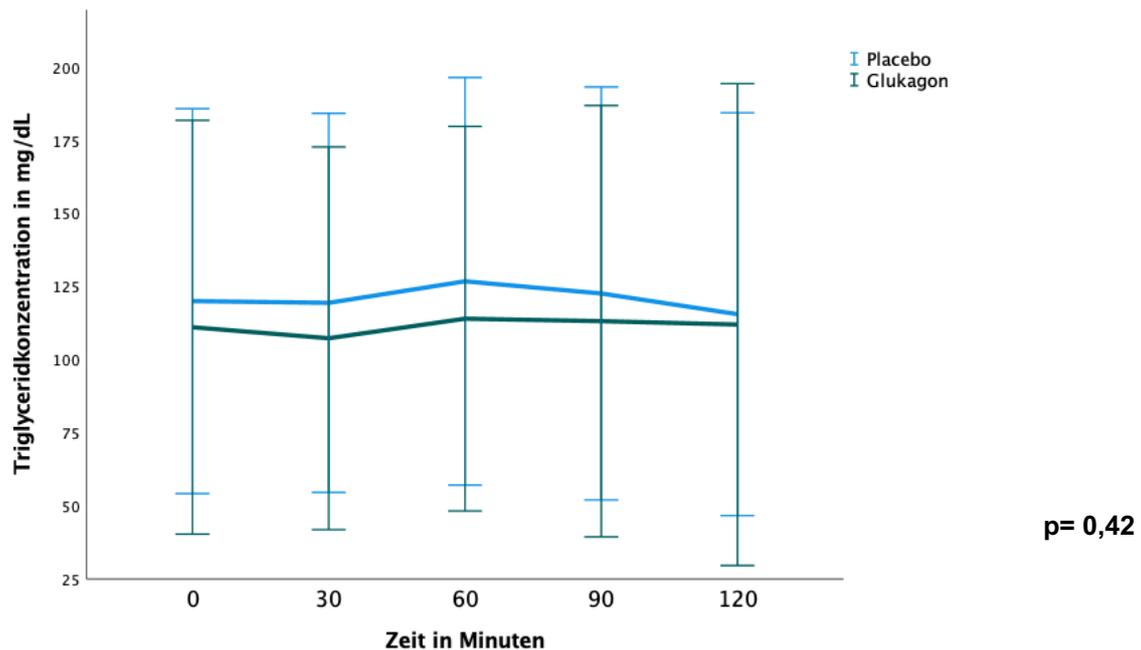


Abbildung 8: Dynamik der Triglyceridkonzentration über 120 Minuten. Minute 0 markiert den Beginn des oralen Glukosetoleranztests sowie der Placebo- bzw. Glukagoninfusion. Verglichen werden die Gruppen Placebo- (blau) vs. Glukagoninfusion (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe eines gepaarten t-Tests der Flächen unter der Kurve (AUC) der Triglyceridkonzentration ermittelt. Die AUC der Triglyceridkonzentration war im Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Im Levene-Test auf Varianzhomogenität wurde keine Signifikanz ermittelt, weshalb auf Normalisierung verzichtet wurde und zur Analyse die Rohdaten verwendet wurden.

Die Nüchternkonzentration der Triglyceride zum Zeitpunkt 0 lag in der Placebogruppe bei $119,92 \pm 65,76$ mg/dL und in der Glukagongruppe bei $111,00 \pm 70,69$ mg/dL. Im Verlauf der Glukosebelastung änderte sich die mittlere Triglyceridkonzentration nur geringfügig. Maximalwerte wurden in beiden Gruppen zu Minute 60 mit $126,69 \pm 69,63$ mg/dL in der Placebogruppe und $113,92 \pm 65,70$ mg/dL in der Glukagongruppe gemessen. Die mittleren Triglyceridkonzentrationen lagen deskriptiv in der Placebogruppe während der gesamten Zeit von 120 Minuten oberhalb der mittleren Konzentrationen der Glukagongruppe. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren allerdings nicht signifikant ($p_{AUC} = 0,42$).

3.3 Hepatische Insulinclearance

Hepatische Insulinclearance

	Placebo		Glukagon		p
n	13		13		
Insulinclearance (CLR)	4,19	± 1,68	3,70	± 1,35	0,22

Tabelle 5: Hepatische Insulinclearance. Verglichen werden jeweils die Gruppen Placebo- vs. Glukagoninfusion anhand des Quotienten der AUC der C-Peptidkonzentration und der AUC der Insulinkonzentration jeweils von Minute 0 bis 120. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Das Signifikanzniveau ist mit $p \leq 0,05$ angegeben. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt.

Die hepatische Insulinclearance wurde mithilfe der Ratio der Fläche unter der Kurve (AUC) der C-Peptidkonzentration und der AUC der Insulinkonzentration angenähert. Betrachtet wurden die jeweiligen Konzentrationen von Minute 0 bis Minute 120. Die mittlere Clearance der Placebogruppe betrug $4,19 \pm 1,68$. Der Mittelwert der Clearance in der Glukagongruppe lag mit $3,70 \pm 1,35$ niedriger als in der Vergleichsgruppe. Der im gepaarten T-Test ermittelte p-Wert war mit 0,22 nicht signifikant.

3.4 Insulinsensitivität

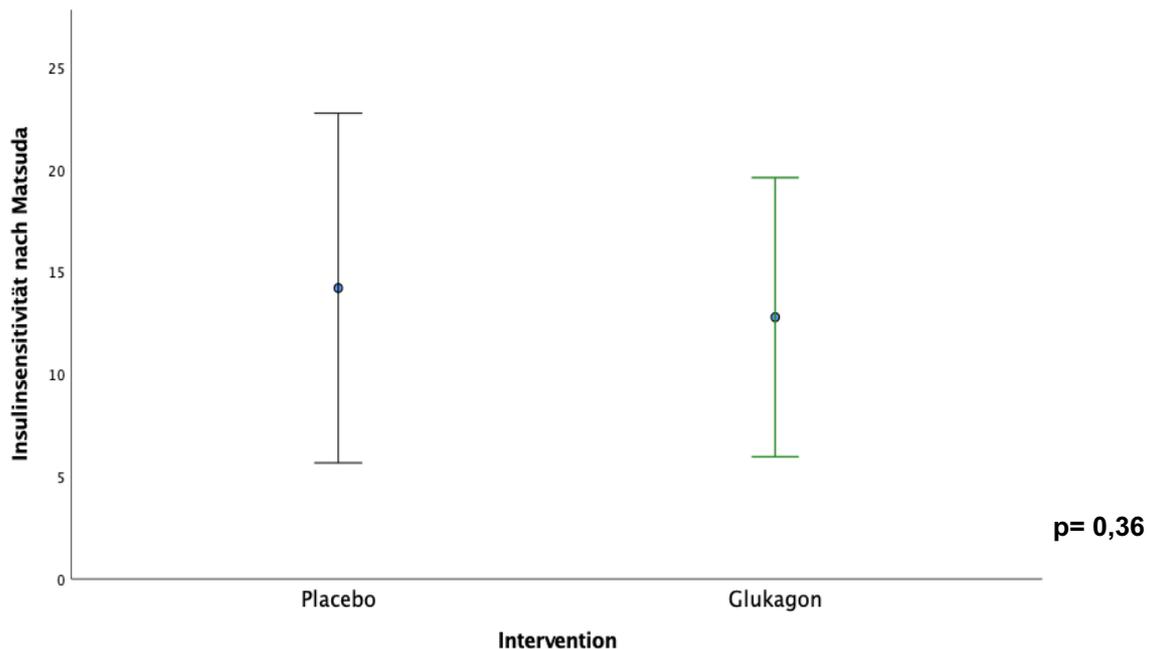


Abbildung 9: Insulinsensitivität nach Matsuda und DeFronzo. Verglichen werden die Gruppen Placebo- (schwarz) vs. Glukagoninfusion (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe eines gepaarten t-Tests ermittelt.

Berechnet wurde die Insulinsensitivität zunächst nach der Formel von Matsuda und DeFronzo. In der Placebogruppe lag die mittlere Insulinsensitivität bei $14,2 \pm 8,53$. In der Glukagongruppe betrug der Insulinsensitivitätsindex im Mittel $12,77 \pm 6,81$. Der durch einen t-Test bei abhängigen Stichproben ermittelte p-Wert lag bei 0,36. Damit ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Insulinsensitivitäten der beiden Gruppen feststellen. Die Insulinsensitivität nach Matsuda und DeFronzo korrelierte nicht signifikant mit dem Alter ($p= 0,58$; $r=0,17$) und dem BMI ($p= 0,23$; $r= -0,36$) der Probanden.

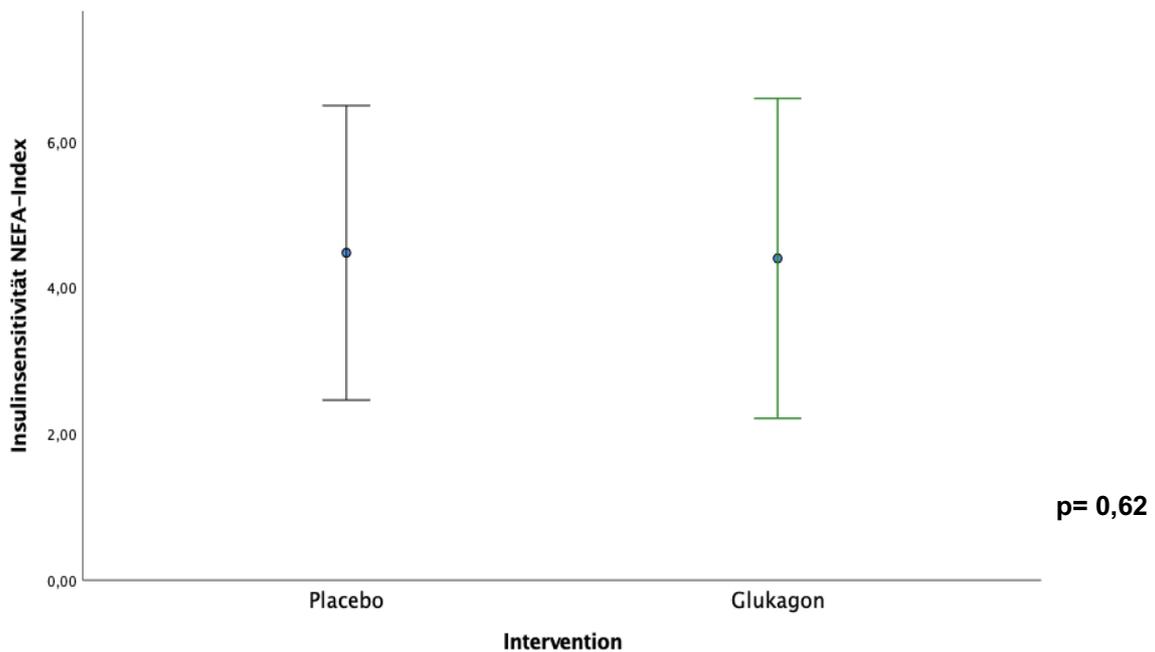


Abbildung 10: Insulinsensitivität anhand des NEFA-Index. Verglichen werden die Gruppen Placebo- (schwarz) vs. Glukagoninfusion (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe eines gepaarten t-Tests ermittelt.

Die anhand des NEFA-Index errechnete Insulinsensitivität lag in der Placebogruppe bei $4,47 \pm 2,01$. In der Glukagongruppe betrug die Insulinsensitivität $4,34 \pm 2,27$. Der anhand eines gepaarten t-Tests ermittelte p-Wert betrug 0,62. Ein Unterschied der Insulinsensitivitäten zwischen den Gruppen Placebo- vs. Glukagoninfusion lag nicht vor. Auch für den NEFA-Index konnte keine Korrelation mit dem Alter ($p= 0,97$; $r= -0,1$) und dem BMI ($p= 0,11$; $r= -4,9$) festgestellt werden.

Insulinsensitivitätsindizes

	Placebo		Glukagon		p
n	13		13		
ISI Mats	14,20	± 8,53	12,77	± 6,81	0,36
ISI NEFA	4,47	± 2,01	4,34	± 2,27	0,62

Tabelle 6: Insulinsensitivität nach Matsuda/ DeFronzo sowie anhand des NEFA-Index. Verglichen werden jeweils die Gruppen Placebo- vs. Glukagoninfusion anhand der Formel nach Matsuda/ DeFronzo (ISI Mats) sowie des NEFA-Index (ISI NEFA). Je niedriger der Zahlenwert, desto niedriger die Insulinsensitivität in beiden Fällen. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Das Signifikanzniveau ist mit $p \leq 0,05$ angegeben. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt.

3.5 Grundumsatz

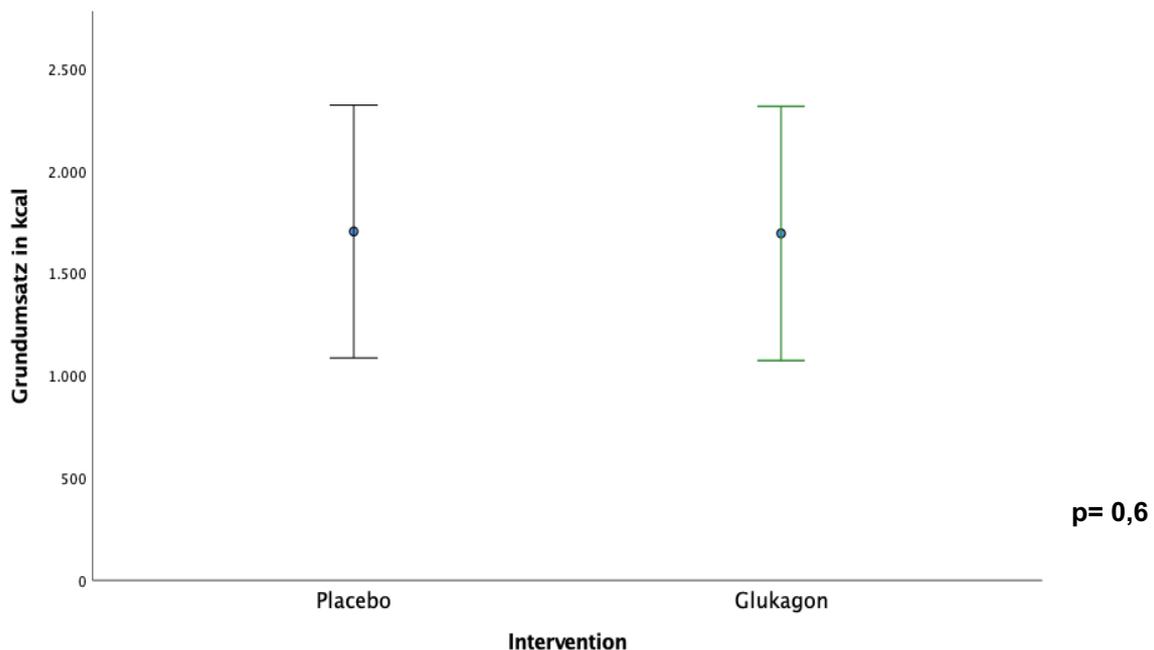


Abbildung 11: Grundumsatz nach standardisierter oraler Glukosebelastung. Verglichen werden die Gruppen Placebo- (schwarz) vs. Glukagoninfusion (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung in kcal. Der p-Wert wurde mithilfe eines gepaarten t-Tests ermittelt. Es wurden 11 gepaarte Messungen analysiert. Die Messungen zweier Probanden wurden aufgrund eines Gerätedefekts an jeweils einem der beiden Versuchstage ausgeschlossen.

Ermittelt wurde der Grundumsatz mithilfe der indirekten Kalorimetrie. Gemessen wurde jeweils nach oralem Glukosetoleranztest und Placebo- oder Glukagoninfusion. Insgesamt wurden 11 gepaarte Messungen ausgewertet, da bei zwei Probanden aufgrund eines Gerätedefekts an jeweils einem Versuchstag keine Messung durchgeführt werden konnte und diese deshalb vollständig von der Auswertung ausgenommen wurden.

Grundumsatz

	Placebo		Glukagon		p
n	11		11		
Grundumsatz [kcal]	1685	± 317	1713	± 317	0,6

Tabelle 7: Grundumsatz nach standardisierter oraler Glukosebelastung. Verglichen werden die Gruppen Placebo- vs. Glukagoninfusion. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung in kcal. Das Signifikanzniveau ist mit $p \leq 0,05$ angegeben. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt.

Der mittlere Grundumsatz in der Placebogruppe war mit 1685 ± 317 kcal minimal niedriger als in der Glukagongruppe mit 1713 ± 317 kcal. Im t-Test für abhängige Stichproben konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p=0,6$).

4 Diskussion

Die vorgelegte Arbeit untersuchte an gesunden Probanden akute metabolische Effekte einer Glukagonsteigerung nach Glukosebelastung und erbrachte als zentrales Ergebnis Hinweise darauf, dass eine Steigerung der Glukagonkonzentration eine Hyperinsulinämie ohne Steigerung der Insulinsekretion verursacht. Ursächlich für die Hyperinsulinämie scheint am ehesten eine Steigerung der Insulinclearance. Vor dem Hintergrund bestehender Literatur werden im Folgenden die Ergebnisse der Studie diskutiert

4.1 Probandencharakteristika

Unser Ziel war es, die akuten Effekte eines Glukagonanstiegs während einer Glukosebelastung zu untersuchen. Um zu verhindern, dass die Ergebnisse durch Vorerkrankungen der Probanden beeinflusst werden, wurden Probanden mit bekannten chronischen Erkrankungen ausgeschlossen. Zur Studie waren Probanden zwischen 18 und 70 Jahren zugelassen, was eine große Altersspanne darstellt. Der jüngste Proband war 23 Jahre, der älteste 60 Jahre alt. Der Altersmedian von 52 Jahren mit einem Interquartilbereich von 34 bis 59 Jahren spiegelt eine ausgewogene Altersverteilung in der untersuchten Kohorte wider. Auch das Geschlechterverhältnis war mit 7 Frauen und 6 Männern nahezu ausgeglichen, sodass Unterschiede zwischen den Geschlechtern in gleichem Verhältnis in die Analyse mit einfließen.

Essenziell war weiterhin, einen noch nicht diagnostizierten gestörten Glukosestoffwechsel der Probanden zu erkennen, da ein Diabetes mellitus häufig mit einer veränderten Insulin- (107)(1)(7)(108)(109) und Glukagonsekretion (35)(39) einhergeht und die Analyse der Daten verfälscht hätte. In der Auswertung der Daten zur Nüchternglukose fiel ein Maximalwert von 6,33 mmol/L und damit ein Wert im Bereich der gestörten Nüchternglukose auf. Bei Betrachtung des zugehörigen 2-h-oGTT-Glukosewertes konnte eine gestörte Glukosetoleranz allerdings ausgeschlossen werden. Die übrigen Nüchternglukosewerte lagen im Normbereich.

Die Auswertung der HbA1c-Werte lieferte einen mittleren HbA1c von $5,6 \pm 0,4\%$ und lag somit im hochnormalen Bereich nach Definition der WHO und der American Diabetes Association (12)(106). Bei detaillierter Analyse der einzelnen Probanden wurde bei 46,2% ein HbA1c-Wert $\geq 5,7\%$ gemessen, der nach ADA- und WHO-Definition (12)(106) in den prädiabetischen Bereich fällt. Im Hinblick auf den HbA1c-Wert zur Diagnose eines Prädiabetes und Diabetes mellitus ist bekannt, dass der glykolysierte Hämoglobingehalt auch bei metabolisch gesunden Probanden mit dem Alter ansteigt (110)(111)(112)(113)(114). In zwei Studien von Roth et al. (110) und Masuch et al. (111) an großen deutschen Kohorten wurden altersadaptierte Referenzbereiche implementiert, welche auch

in die Praxisempfehlung der Deutschen Diabetesgesellschaft zur Diagnostik eines Diabetes mellitus (115) aufgenommen wurden. Wendet man diese auf die Probanden unserer Kohorte an, liegen alle HbA1c-Werte der Probanden im Referenzbereich ihrer Alterskohorte. Dass die Anwendung altersadaptierter Referenzwerte sinnvoll ist, zeigt auch die Tatsache, dass bei Analyse der zugehörigen 2-h-oGTT-Glukosewerte der Probanden mit einem HbA1c $\geq 5,7\%$ kein Hinweis auf eine gestörte Glukosetoleranz bestand.

Zu überdenken wäre vor diesem Hintergrund zudem, ob anstelle von altersadaptierten Referenzbereichen eine generelle Anhebung des HbA1c-Wertes zur Diagnose eines Diabetes mellitus und dementsprechend eines Prädiabetes in Betracht gezogen werden sollte. Dafür sprächen die Daten der Framingham Offspring Study (FOS) und NHANES 2001-2004 (112) sowie der NHANES III Kohorte (116), ausgewertet im Hinblick auf die Altersabhängigkeit des HbA1c-Wertes. Letztere zeigte zusätzlich eine ethnien-spezifische Abhängigkeit des HbA1c mit höheren Werten in beispielsweise der schwarzen Bevölkerung bei vergleichbaren Glukosekonzentrationen (116). Weiterhin liegen Daten vor, die eine Abnahme der Spezifität des HbA1c zur Diagnose eines Diabetes mellitus und insbesondere eines Prädiabetes mit zunehmenden Alter nahelegen (117). Vor dem Hintergrund des fortschreitenden demographischen Wandels und einer zunehmend diversen Gesellschaft und der damit einhergehenden Gefahr einer Überdiagnostik in diesen Bevölkerungsgruppen sowie dem Wissen, dass klinisch relevante mikrovaskuläre Schädigungen selten bei HbA1c-Werten $< 7\%$ auftreten (118)(119)(120)(121)(122), könnte eine Anhebung des HbA1c gemäß des Vorschlags von Davidson et al. (116) zur Diagnose eines Prädiabetes auf 6,1-6,9% sowie zur Diagnose eines Diabetes mellitus auf 7% sinnvoll sein.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des HbA1c vom Alter der Probanden in unserer Kohorte erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Spearman, welche keine signifikante Korrelation erbrachte ($r=0,38$; $p=0,2$). Dass eine statistisch signifikante Korrelation in dieser Kohorte nicht nachgewiesen werden konnte, liegt möglicherweise an der kleinen Stichprobe von 13 Probanden, da bei kleinen

Stichproben sehr starke Korrelationen vorliegen müssen, um signifikant zu werden.

Abschließend lässt sich feststellen, dass in der untersuchten Kohorte kein Anhalt für eine gestörte Glukosetoleranz oder einen manifesten Diabetes mellitus besteht.

Da Übergewicht und insbesondere übermäßiges viszerales Fettgewebe ein Risikofaktor für die Entstehung eines Diabetes mellitus beziehungsweise einer gestörten Glukosetoleranz sind (1)(5)(6)(123)(124)(125)(126), wurden BMI und das Taille-Hüfte-Verhältnis ebenfalls vor Versuchsbeginn analysiert. Der mittlere BMI lag nach WHO-Kriterien (103) im Bereich der Normalgewichtigen, sodass ein Einfluss auf die erhobenen metabolischen Parameter unwahrscheinlich ist. Wie zu erwarten, korrelierte der BMI signifikant mit der Nüchternglukosekonzentration der Probanden ($p=0,003$; $r=0,76$).

Bei der Analyse des Taille-Hüfte-Verhältnis (WHR) wurde der Grenzwert der WHO für Frauen herangezogen (104), da dieser mit 0,85 niedriger liegt als der Grenzwert für Männer mit 0,9. Mit 0,83 [0,77-0,99] lag das Verhältnis im oberen Normalbereich.

Um zu verhindern, dass es zu signifikanten Abweichungen der Nüchternglukosekonzentration, des HbA1c, des Gewichts und BMI zwischen den zum Teil Monate auseinanderliegenden Versuchstagen kam, wurden diese mittels gepaartem t-Test verglichen.

Die Kohorten waren in ihren Eigenschaften weitestgehend homogen, sodass Vergleiche zwischen den Gruppen möglich sind.

4.2 Dynamik metabolischer Parameter nach Glukosebelastung

4.2.1 Glukagon-, Glukose-, Insulin-, C-Peptidkonzentration, Clearance

Die erhobenen Nüchternglukagonkonzentrationen der verschiedenen Gruppen ($\text{Gluk0}_{\text{Plac}}=22,41\pm 15,53$ pmol/L; $\text{Gluk0}_{\text{Gluk}}=19,38 \pm 11,69$ pmol/L) sind in ihrer Höhe vergleichbar mit Nüchternglukagonkonzentrationen in der Literatur, welche

im Bereich zwischen 14-36 pmol/L liegen und ebenfalls mittels Radioimmunoassay bestimmt wurden (127)(83)(128)(129).

Es wurde durch kontinuierliche Infusion von Glukagon in einer Konzentration von 0,5 pmol/kg/min das Ziel erreicht einen signifikanten Glukagonanstieg ($p_{AUC} < 0,001$) im Vergleich zur Placebogruppe zu erzeugen. Die maximale Höhe des Anstiegs ($Gluk_{90_{Gluk}} = 51,03 \pm 20,28$ pmol/L) lag im Bereich der Glukagonkonzentration, die auch durch Aufnahme einer Proteinmahlzeit erzielt (129)(130) sowie im Insulinentzug bei Typ 1 Diabetikern gemessen werden kann (131)(60). Sie lag gleichsam niedriger als im Zustand einer diabetischen Ketoazidose (132) und leicht höher als bei andauerndem Fasten (128).

Es wurden allerdings auch höhere Konzentrationen erreicht, als zuvor auf Basis der Arbeit von Cegla et al. (127) berechnet. Kalkuliert war ein Anstieg auf etwa 30 pmol/L, was in etwa einem Sechstel des Glukagonanstiegs der Cegla-Studie entspricht.

Dieser Anstieg war auf Grundlage der Arbeit von Wagner et al. (83) als in etwa vergleichbar mit einem physiologischen Glukagonanstieg nach Glukosebelastung ermittelt worden. Hier waren zu Minute 120 nach oraler Glukosebelastung bei circa 20-30% der Probanden die Glukagonkonzentrationen um circa 20% zur Nüchternglukagonkonzentration angestiegen. Die in unserer Arbeit erreichten Glukagonkonzentrationen in Minute 120 ($Gluk_{120_{Gluk}} = 49,17 \pm 16,81$ pmol/L) lagen damit etwas höher, als bei einem physiologischen Glukagonanstieg nach Glukosebelastung erwartet.

Hier zeigt sich, dass trotz ausführlicher Planung und vorheriger Berechnung physiologische Glukagonkonzentrationen schwer zu generieren sind, da Glukagon in sehr geringen Mengen im Blut vorliegt und diese artifiziell schwer nachahmbar sind.

Wir hatten uns durch die höheren Glukagonkonzentrationen in den untersuchten metabolischen Parametern versprochen, deutlichere Unterschiede beobachten zu können.

Die beobachtete Glukosekonzentrationskurve während des oGTT in beiden Gruppen ist monophasisch mit Maximalwerten bei Minute 30 und entspricht damit

dem Glukosekonzentrationsverlauf eines Großteils der nicht diabetischen Individuen während eines oralen Glukosetoleranztests (133)(134)(135)(136).

Da die Reproduzierbarkeit des Glukosetoleranztest in der Vergangenheit häufig in der Kritik stand (137)(138)(139)(140)(141)(142)(143), wurde zum Erreichen größtmöglicher Vergleichbarkeit auf strikte Einhaltung des WHO Durchführungsprotokolls (144) und auf sorgsame Verarbeitung der Proben direkt nach Abnahme sowie im Labor geachtet (145).

Bei Betrachtung der Glukosekonzentrationskurven der beiden Kohorten zeigte sich ein nahezu kongruenter Verlauf. Die durchgeführten oralen Glukosetoleranztests waren bei allen Probanden reproduzierbar. Als reproduzierbar wird gewertet, wenn der Glukosetoleranztest wiederholt nach Definition der WHO (144) und wie in Studien zur Reproduzierbarkeit des oGTT angewandt (137) das gleiche Ergebnis liefert, also entweder eine normale Glukosetoleranz, gestörte Glukosetoleranz oder ein Diabetes mellitus diagnostiziert wird.

Bei Vergleich der AUCs der Glukosekonzentration über 120 Minuten ließ sich kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen über die Zeit in den Gruppen Placeboinfusion und Glukagoninfusion feststellen ($p_{AUC} = 0,45$). Dieses Ergebnis war unter Berücksichtigung der physiologischen Wirkungen von Glukagon in dieser Weise nicht zu erwarten, da Glukagon bekannt für seine Funktion der Glykogenolyse- und Glukoneogenesestimulation ist (146)(147). Somit wäre in der Gruppe mit Glukagoninfusion eine gesteigerte hepatische Glukoseproduktion mit einhergehender Steigerung der Blutglukosekonzentration nach Glukagongabe zu vermuten gewesen. Sowohl im Tiermodell als auch in Studien mit gesunden Individuen konnte eine Steigerung der Glukosekonzentration im Blut unter exogener Glukagonzufuhr nachgewiesen werden. Diese Steigerung der Glukosekonzentration war zwar nur vorübergehend, aber dennoch messbar (40)(41)(148). Unter exogener Glukagonzufuhr wurden in diesen Studien höhere Glukagonkonzentrationen erreicht als in der hier diskutierten Studie (62-172 pmol/L vs. $51,03 \pm 20,28$ pmol/L), sodass nicht ausgeschlossen werden kann,

dass die hier verabreichte Glukagonmenge zu niedrig war, um einen Einfluss auf die Glukosekonzentration auszuüben.

Bomboy et al. und Felig et al. (41)(40), welche einen transienten Glukoseanstieg während kontinuierlicher Glukagoninfusion zeigten, postulierten, dass der Abfall nach initialem Anstieg der Glukosekonzentration nicht durch einen Anstieg der Insulinsekretion zu erklären sei. Insbesondere in der Studie von Bomboy et al. wird dies durch einen gleichartigen transienten Glukoseanstieg während Glukagoninfusion bei insulinabhängigen Diabetikern erklärt, die nicht durch gesteigerte Insulinsekretion auf den Stimulus Glukagon reagieren konnten (41). Ein wesentlicher Unterschied im Design dieser Studien zu der hier diskutierten ist, dass alle Parameter entweder im Nüchternzustand nach nächtlichem Fasten oder nach 45-minütiger kontinuierlicher Glukoseadministration mit einer Laufrate von 2 mg/kg/min und nicht wie in der vorgelegten Arbeit nach standardisierter Glukosebelastung gemessen wurden.

Der hier verwendete Ansatz simuliert die kompensatorischen metabolischen Mechanismen nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit im Alltag, wohingegen die Arbeiten von Bomboy et al. und Felig et al. insbesondere zur isolierten Betrachtung der hepatischen Glukoseproduktion geeignet sind.

In einer Arbeit von Sherwin et al. (39) wurde nach 3-stündiger kontinuierlicher Glukagoninfusion ein oraler Glukosetoleranztest an gesunden Probanden mit fortgesetzter exogener Glukagonzufuhr durchgeführt. Hier zeigte sich, wie auch in der vorliegenden Arbeit, kein Unterschied in der Glukosekonzentration im Vergleich zur Placebogruppe, bei vergleichbar hohen Glukagonkonzentrationen wie in den Studien von Bomboy et al. (41) und Felig et al. (40). Damit kann eine zu niedrige Glukagondosis als Erklärung der ausbleibenden Glukosekonzentrationssteigerung ausgeschlossen werden.

Möglicherweise hat die bolusartige Glukoseingestion im Rahmen des oGTT einen Einfluss auf die Glukosehomöostase unter Glukagoninfusion. Bei enteraler Glukoseaufnahme ist ein Einfluss der Inkretine, insbesondere GLP-1, auf die Glukosekonzentration denkbar. GLP-1, ein im Darm gebildetes Peptidhormon, steigert unter anderem glukoseabhängig die Insulinsekretion und verbessert die

Insulinsensitivität der Gewebe (149)(150)(151)(152)(153). Im Rahmen unseres Versuchs könnte die Sekretion von GLP-1 nach enteraler Glukosebelastung den glukosekonzentrationssteigernden Effekten von Glukagon entgegenwirken und so die ausbleibende Glukosesteigerung nach Glukagongabe erklären, die Bomboy et al. Und Felig et al. in ihren Studien mit intravenöser Glukosegabe nachweisen konnten. Eine weitere zu diskutierende Möglichkeit, die den fehlenden Glukoseanstieg nach Glukagoninfusion erklären könnte, ist die sogenannte ‚Glucose Effectivness‘. Glucose effectiveness beschreibt die Fähigkeit von Glukose an sich die Glukoseverwertung zu steigern und die hepatische Glukoseproduktion zu drosseln und damit große Glukoseexkursionen nach Glukosebelastung abzumildern, ohne dass sich die Insulinkonzentration ändert (154)(155)(156)(157)(158)(159). In der vorliegenden Arbeit könnte diese Glukoseeffektivität erklären, warum die Glukosekonzentration stabil bleibt, obwohl Glukagon infundiert wird. Die Glukoseeffektivität ist allerdings eine umstrittene Größe, da einerseits die Mechanismen zur Glukoseregulation auf molekularer Ebene nicht intensiv erforscht und definiert sind (160) und andererseits die Messung der ‚Glucose Effectiveness‘ schwierig ist. Eine häufig verwendete Methode ist die Minimal Model Methode, die 1979 von Richard Bergmann und Claudio Cobelli entwickelt wurde (161). Die Bestimmung beruht auf einem mathematischen Model, welches auf Grundlage eines intravenösen Glukosetoleranztests die Insulinsensitivität und Glukoseeffektivität abschätzt. Es existieren allerdings Studien, die zeigen, dass die ‚Glucose Effectiveness‘ auf diese Weise überschätzt wird und nicht vollständig unabhängig von der Insulinkonzentration betrachtet werden kann (162)(163)(164).

Ebenfalls als Regulationsmechanismus denkbar wäre eine kompensatorische Hyperinsulinämie zur Erhaltung der Glukosetoleranz. Eine solche konnten die Forscher um Sherwin (39) nicht nachweisen.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit legen allerdings einen Einfluss einer gesteigerten Insulinkonzentration in der Glukagongruppe zur Erhaltung der Glukosehomöostase nahe.

Die Insulinkonzentration über die Zeit war in den Gruppen Placebo- und Glukagoninfusion zwar nicht signifikant voneinander verschieden, ein Trend war jedoch bei einem p-Wert von 0,07 erkennbar. Betrachtet man die Konzentrations-Zeit-Kurven in den verschiedenen Gruppen fällt über die Zeit, nach anfänglich vergleichbaren Nüchterninsulinkonzentrationen, deskriptiv in der Glukagongruppe eine durchgehend höhere Insulinkonzentration auf als in der Placebogruppe. Anfänglich lag die Insulinkonzentration in der Placebogruppe bei $62,15 \pm 39,83$ pmol/L und damit nur ganz leicht über den $57,92 \pm 36,90$ pmol/L in der Glukagongruppe. Bereits in Minute 30 war ein deutlicher Unterschied messbar mit $520,25 \pm 277,18$ pmol/L in der Placebogruppe und $646,50 \pm 430,47$ pmol/L in der Glukagongruppe. Die Differenz zeigte sich in Minute 60 mit $652,77 \pm 341,25$ pmol/L (Placebo) in und $787,46 \pm 655,05$ pmol/L (Glukagon) noch größer und erreichte in Minute 90 mit $682,69 \pm 537,96$ pmol/L (Placebo) und $837,08 \pm 537,65$ pmol/L (Glukagon) ihr Maximum. In Minute 120 lag die Insulinkonzentration mit $547,08 \pm 511,24$ pmol/L in der Placebogruppe weiterhin unter der Konzentration in der Glukagongruppe ($646,25 \pm 330,29$ pmol/L). Da die Insulinkonzentration venös bestimmt wurde, kann durch isolierte Betrachtung der Insulinkonzentration nicht eruiert werden, ob es sich um eine Steigerung der Insulinsekretion im Pankreas oder eine Drosselung der Insulin-clearance in der Leber handelt.

C-Peptid ist als guter Marker zur Evaluation der endogenen Insulinsekretion bekannt. Es entsteht in äquimolarer Menge zu Insulin aus Proinsulin und wird gleichzeitig mit Insulin aus den Betazellen des Pankreas sezerniert. Dabei unterliegt es einem vernachlässigbarem First-Pass durch die Leber mit gleichzeitig konstantem peripheren Abbau (165)(166)(167)(168)(169)(170)(171)(172). Vorsicht ist bei Nierenfunktionsstörungen geboten, da C-Peptid in diesen Fällen in falsch erhöhten Konzentrationen vorliegt (173). Probanden mit chronischen Nierenfunktionsstörungen wurden zu dieser Studie nicht zugelassen, sodass von einer Beeinträchtigung der Werte nicht auszugehen ist.

Betrachtet man nun die Konzentrationen von C-Peptid im Serum über die Zeit, fällt auf, dass sich die bei der Insulinkonzentration beobachteten Unterschiede in

den Konzentrations-Zeit-Kurven nicht finden. Diese Beobachtung legt nahe, dass sich der Unterschied in der Insulinkonzentration in den verschiedenen Gruppen nicht durch eine Steigerung der Insulinsekretion im Pankreas erklären lässt, da in diesem Falle auch die C-Peptidkonzentration in der Gruppe mit Glukagoninfusion erhöht sein müsste.

An dieser Stelle rückt nun die Insulinclearance in der Leber in den Fokus. Die hepatische Insulinclearance ist ein wichtiges Werkzeug des Körpers zur Regulation der Insulinkonzentration. Beim First-Pass durch die Leber werden ungefähr 50% des sezernierten Insulins bereits metabolisiert und stehen dem Körper nicht mehr zur Steuerung der Glukosehomöostase zur Verfügung (168)(169). Eine mögliche Erklärung für die verschiedenen Insulinkonzentrationen in den beiden Gruppen wäre bei unveränderter Insulinsekretion im Pankreas eine Drosselung der hepatischen Insulinclearance in der Gruppe mit Glukagoninfusion. In der vorgelegten Arbeit wurde die hepatische Insulinclearance durch den Quotienten der AUC der C-Peptidkonzentration und der AUC der Insulinkonzentration über 120 Minuten angenähert und anschließend durch einen gepaarten T-Test verglichen. Die Clearance betrug in der Placebogruppe $4,19 \pm 1,68$ und in der Glukagongruppe $3,70 \pm 1,35$. Deskriptiv zeigt sich in der Glukagongruppe also eine niedrigere Clearance als in der Vergleichsgruppe. Im gepaarten T-Test ist dieser Unterschied allerdings nicht signifikant ($p_{AUC} = 0,22$). Es ist zu beachten, dass die auf diese Weise ermittelte Insulinclearance nur eine Annäherung an die tatsächliche hepatische Insulinclearance darstellt (98)(97). In Folgestudien sollten modellbasierte Messungen zur exakteren Bestimmung der hepatischen Insulinclearance angewandt werden. Da bei Betrachtung der Insulinkonzentrationen ein deutlicher Trend zur Hyperinsulinämie in der Glukagongruppe erkennbar ist und bei Vergleich der Clearance in dieser Studie nur eine Annäherung an die tatsächliche Clearance der Leber verwendet wurde, sollte in Folgestudien die Hypothese, dass die durch Clearancesteigerung erreichte Hyperinsulinämie die durch Glukagon stimulierte hepatische Glukoneogenese mit einhergehend steigenden

Glukosekonzentrationen kompensiert und so die stabilen Glukosekonzentrationen erklärt, erneut geprüft werden.

4.2.2 Triglyceridkonzentration

Zur Beeinflussung der Triglyceridkonzentration durch Glukagon liegen bereits einige Studien vor, die eine Senkung der Triglyceridkonzentration nach Glukagongabe zeigen. Viele dieser Studien sind im Tiermodell an Ratten durchgeführt worden (55)(56)(174). Diese erhielten über 3 Wochen 20µg Glukagon subkutan appliziert, was zu einer 40%igen Reduktion der Triglyceride führte. Diese Glukagonkonzentrationen liegen weit über dem physiologischen Glukagonanstieg nach Glukosebelastung beim Menschen.

Es existieren nur wenige Daten mit kleinen Kohorten zur Beeinflussung der Triglyceridkonzentration durch Glukagon beim Menschen(175)(176)(54). In den an gesunden Probanden durchgeführten Studien wurden ebenfalls deutlich höhere Glukagonkonzentrationen als in der vorliegenden Arbeit (1 mg Glukagon i.v. (175); 0,1-2,0 µg/kg (176)) im Bolus appliziert, welche dann Veränderungen der Triglyceridkonzentration hervorriefen. Interessant ist weiterhin, dass in der Arbeit von Schaded et al. (176) Konzentrationen von 0,1µg/kg einen transienten Triglyceridanstieg erzeugten und erst in höheren Dosierungen der zuvor am Tiermodell beschriebene Triglyceridabfall zu beobachten war. Die Frage blieb, ob sehr geringe Glukagonanstiege, wie beim paradoxen Glukagonanstieg nach Glukosebelastung, einen Effekt auf die Triglyceridkonzentration haben und ob es sich dabei um einen Anstieg oder Abfall der Triglyceride handelt. Wir untersuchten die Triglyceridkonzentration im 30- minütigen Abstand im Rahmen des oralen Glukosetoleranztest mit kontinuierlicher Glukagon- oder Placeboinfusion. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ergab sich nicht ($p_{AUC} = 0,42$). Dabei bleibt aufgrund des Versuchsaufbaus unklar, ob sich eine Veränderung der Triglyceridkonzentration in den ersten Minuten nach Beginn der Glukagongabe messen ließe, vergleichbar mit der zuvor beschriebenen Studie von Schaded et al., in der sich alle zu messenden Unterschiede zwischen Minute 2-10 nach Applikation des Glukagon ergaben.

Eine anhaltende Veränderung der Triglyceridkonzentration konnte in der hier diskutierten Studie bei Infusion von 0,5 pmol/kg/min Glukagon nicht nachgewiesen werden. In weiterführenden Studien müsste untersucht werden, ob eine chronische Applikation von niedrigen Glukagondosen einen signifikanten Einfluss auf den Triglyceridkatabolismus hat.

Eine weitere Möglichkeit, weshalb die Triglyceridkonzentration nach Glukagoninfusion nicht sinkt, wäre die durch Glukagoninfusion ausgelöste Hyperinsulinämie. Bekannt ist, dass bei vielen Diabetikern, auch bei nicht adipösen, eine Hyperinsulinämie mit einer Hypertriglyceridämie vergesellschaftet ist (177)(178)(179). Denkbar wäre, dass die durch die Glukagoninfusion ausgelöste Hyperinsulinämie zu einer Steigerung der Triglyceridkonzentration führt und so die Triglyceridsenkung durch die Glukagongabe ausgleicht, weshalb keine messbaren Unterschiede in beiden Gruppen zu finden sind.

Dagegen spricht allerdings, dass die beschriebene Hypertriglyceridämie bei Hyperinsulinämie nur bei chronisch erhöhten Insulinkonzentrationen gemessen werden konnte und bei akuter Hyperinsulinämie die Triglyceridkonzentration sogar sank (177)(180). Da in der vorliegenden Studie eine akute Hyperinsulinämie durch Glukagongabe provoziert wurde, ist davon auszugehen, dass diese eher zu einem weiteren Absinken der Triglyceridkonzentration beigetragen hätte. Allerdings ist auch dies nicht messbar.

4.3 Insulinsensitivität

Die Insulinsensitivität gibt an wie sensitiv periphere Gewebe, also Muskeln, Fettgewebe, Leber etc. gegenüber Insulin sind und damit wie effizient die im Blut befindliche Glukose in die Zielgewebe aufgenommen wird. Eine niedrige Insulinsensitivität ist mit einer gestörten Glukosetoleranz und einem erhöhten Risiko an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken verbunden (7)(181). In der medizinischen Forschung hat sich die Messung der Insulinsensitivität als Anhaltspunkt der aktuellen metabolischen Situation der Probanden etabliert und es wurden viele verschiedene Methoden entwickelt diese zu bestimmen. Goldstandard ist

weiterhin der hyperinsulinämisch-euglykämische Clamp, der immer als Vergleichsmedium für indirekt ermittelte Insulinsensitivitäten dient.

Die verschiedenen indirekten Insulinsensitivitätsindizes haben unterschiedliche Stärken. Nüchtern ermittelte Indizes berücksichtigen vermehrt die hepatische Insulinsensitivität, oGTT-basierte Indizes berücksichtigen sowohl die hepatische als auch die periphere Insulinsensitivität. Die Korrelation zum hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp ist allerdings in allen von Otten et al. in einer Metaanalyse untersuchten Indizes moderat (182)(183). In der von uns durchgeführten Studie konnte ein hyperinsulinämischer-euglykämischer Clamp nicht in Kombination mit regelmäßigen fMRT-Messungen durchgeführt werden, sodass wir zwei indirekte Insulinsensitivitätsindizes auswählten, welche für das vorliegende Studiendesign die validesten Ergebnisse versprachen.

Um sowohl hepatische als auch periphere Insulinsensitivität abzubilden, entschieden wir uns einmal für einen oGTT-basierten Insulinsensitivitätsindex, den ISI_{Mats} nach Matsuda und DeFronzo, welcher bereits viel erprobt ist (95).

Als zweiter Index wurde der Nefa-Index gewählt. Dieser im Jahr 2016 von Wagner et al. entwickelte Index zeigt sich in der Analyse robuster als herkömmlich verwendete Insulinsensitivitätsindizes. Auch in der Schwangerschaft, einem Zustand der physiologischen Insulinresistenz, liefert er belastbare Ergebnisse, wohingegen die meisten anderen Insulinsensitivitätsindizes nur für gesunde Probanden erprobt sind (96).

In der zuvor genannten Arbeit von Wagner et al., in welcher eine Probandenpopulation identifiziert werden konnte, die physiologisch mit der Glukagonkonzentration nach Glukosebelastung anstieg, war die Insulinsensitivität signifikant höher als in der Vergleichsgruppe mit Glukagonabfall nach Glukosebelastung (83). Die Insulinsensitivität war ebenfalls nach der Methode von Matsuda und DeFronzo berechnet worden, sodass wir uns die größtmögliche Vergleichbarkeit der Daten versprachen.

In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings der signifikante Unterschied der Insulinsensitivitäten durch den artifiziell hergestellten Glukagonanstieg nach

Glukosebelastung im Vergleich zur Placeboinfusion nicht nachgewiesen werden ($p_{\text{ISI}_{\text{mats}}}= 0,36$; $p_{\text{ISI-NEFA}}= 0,62$).

Es handelte sich in unserem Fall um eine akut induzierte Steigerung der Glukagonkonzentration nach Glukosebelastung und nicht wie im oben beschriebenen Setting um einen physiologischen wiederkehrenden Glukagonanstieg nach Nahrungsaufnahme. Dies könnte erklären, warum kein signifikanter Unterschied der Insulinsensitivität nachgewiesen werden konnte. In darauffolgenden Studien müsste die Wirkung auf eine chronische oder intermittierend nach Nahrungsaufnahme induzierte Glukagonsteigerung weiter untersucht werden, um herauszufinden, ob dies zu einer verbesserten Insulinsensitivität der Probanden führen würde. Die Durchführung eines hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps ist zur Überprüfung der Hypothese, ob eine niedrig dosierte Glukagoninfusion nach oraler Glukosebelastung die Insulinsensitivität verändert, mit dem aktuellem Versuchsaufbau nicht durchführbar, sodass das Zurückgreifen auf indirekte Indizes notwendig ist.

Da das Alter und der BMI die Insulinsensitivität beeinflussen - diese sinkt nämlich auch bei gesunden Individuen mit steigendem Alter und BMI (184)(185) - wurden für unsere Kohorte Abhängigkeiten von Alter und BMI auf die Insulinsensitivität überprüft. Es ließ sich für die untersuchte Kohorte keine signifikante Korrelation zwischen Insulinsensitivität und Alter ($p= 0,58$; $r=0,17$) sowie BMI ($p= 0,23$; $r= -0,36$) feststellen. Auch hier ist zu beachten, dass es sich bei einer Kohorte von 13 Probanden um eine sehr kleine Stichprobe handelt und Korrelationen sehr ausgeprägt sein müssten, um signifikant zu werden.

4.4 Grundumsatz

Die erwartete Steigerung des Grundumsatzes nach Glukagoninfusion im Vergleich zur Placeboinfusion nach oraler Glukosebelastung konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden ($p_{\text{AUC}}=0,6$).

Die Literatur zur Evaluation des Grundumsatzes nach Glukagongabe liefert viele Daten aus dem Tiermodell, aber nur wenige am Menschen (186)(187).

Schon in den 50er Jahren konnte an Ratten ein erhöhter Sauerstoffverbrauch nach intravenöser Gabe von 1 mg Glukagon im Vergleich zur Placebogabe nachgewiesen werden, was als Zeichen eines gesteigerten Energieumsatzes gewertet wurde (188).

Im Jahr 1984 stellte auch die Arbeitsgruppe um Chan et al. die Hypothese auf, dass die chronische Gabe von Glukagon zur Steigerung des Energieumsatzes führe. Dies postulierten die Forscher auf Grundlage der Beobachtung, dass in Zucker Ratten, bei welchen eine genetische Form des Übergewichts vorliegt, nach Gabe von Glukagon (0,33 mg/kg; 2xtgl. s.c.) über 14 Monate im Vergleich zur Placebogruppe eine Gewichtsabnahme nachzuweisen war, obwohl die Tiere sich in der aufgenommenen Nahrungsmenge nicht unterschieden (189). Neben der Tatsache, dass diese Daten im Tiermodell ermittelt wurden und die Intervention über einen wesentlich längeren Zeitraum erfolgte, ist zu beachten, dass deutlich höhere Glukagondosen als in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, um den beobachteten Effekt zu erzeugen.

Wesentlich niedrigere Konzentrationen eines eigens für das Studium Glukagon vermittelter Wirkungen entwickelten Glukagonagonisten (10 nmol/kg/d) verwendete die Arbeitsgruppe um Habegger et al. im Mausmodell an FGF21-Knock-out-Mäusen bzw. FXR-Knock-out-Mäusen. Auch hier konnten die Forscher einen signifikant gesteigerten Grundumsatz nach 17-tägiger subkutaner Glukagongabe in Wildtypmäusen nachweisen (190)(191). Aber auch diese niedrigeren Dosierungen liegen noch deutlich über den physiologisch gemessenen Glukagonkonzentrationen im Menschen und den in dieser Arbeit verabreichten Glukagondosen zur Simulation eines physiologischen Anstiegs nach Glukosebelastung.

Die erste Studie am Menschen zu diesem Thema führte Nair et al. 1987 durch. Die Arbeitsgruppe konnte an gesunden männlichen und weiblichen Probanden durch die indirekte Kalorimetrie zeigen, dass der Grundumsatz durch Glukagongabe über 210 Minuten gesteigert wurde. Dazu wurde die endogene Insulin- und Glukagonsekretion durch Somatostatin gehemmt und anschließend exogen Glukagon mit einer Konzentration von 0,2µg/kg/h für 210 Minuten infundiert. Es

wurden maximale Glukagonkonzentrationen von 161 pmol/L erreicht, welche circa dreimal so hoch waren wie in unserer Studie ($\text{Glukagon}_{\text{max}} = 51,03 \pm 20,28$ pmol/L) (192).

Es ist also möglich, dass die in der vorliegenden Arbeit erzielten maximalen Glukagonkonzentrationen nicht ausreichen, um zu einer signifikanten Steigerung des Grundumsatzes zu führen.

Einen weiteren Einflussfaktor auf die Grundumsatzsteigerung nach Glukagonapplikation beschrieben 1994 Calles-Escandon et al.. Deren Arbeit zeigte, dass es nur unter insulininsuffizienter Hyperglukagonämie zu einer Steigerung des Grundumsatzes kam. Die Forscher unterdrückten die endogene Insulin- und Glukagonproduktion durch Somatostatingabe und maßen in verschiedenen Testsettings durch indirekte Kalorimetrie den Grundumsatz der Probanden. Im Setting mit isolierter Hyperglukagonämie (6ng/kg/min) stieg der Grundumsatz der Probanden um $7,1 \pm 2,3\%$. Diese Steigerung war zwar nicht signifikant, aber ein Trend war erkennbar. Im Setting mit kombinierter Hyperinsulinämie und Hyperglukagonämie war dieser Trend nicht mehr nachweisbar.

Die während der kombinierten Hyperinsulinämie-Hyperglukagonämie erzeugten maximalen Insulinkonzentrationen lagen bei 778 ± 25 pmol/L (193). Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde durch den oralen Glukosetoleranztest eine Hyperinsulinämie verursacht. Die maximalen Insulinkonzentrationen ($\text{Insulin}_{\text{max}} = 837,08 \pm 537,65$ pmol/L) waren in etwa vergleichbar mit denen bei Calles-Escandon.

Möglicherweise erklärt also auch die im oralen Glukosetoleranztest induzierte Hyperinsulinämie das Ausbleiben eines erhöhten Grundumsatzes in der Kohorte mit Glukagoninfusion.

Die von Calles-Escandon et al. maximal erreichten Glukagonkonzentrationen lagen bei circa 140 pmol/L und somit fast dreimal höher als in der vorliegenden Arbeit.

In der Studie von Cegla et al. hingegen, welche zur Berechnung der Glukagoninfusionsrate für diese Studie herangezogen worden war, zeigte sich

eine Steigerung des Grundumsatzes nach Glukagoninfusion, obwohl Insulin nicht zuvor durch Somatostatingabe supprimiert wurde. Allerdings erfolgte die indirekte Kalorimetrie als Baselinemessung und nach Hormoninfusion jeweils im Nüchternzustand. Die Insulinkonzentration nach Glukagongabe stieg maximal auf circa 30 mU/L (208 pmol/L) an und war somit in etwa ein Viertel so hoch wie in der vorliegenden Arbeit (127). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass aufgrund der niedrigen Glukagonkonzentration und der vorliegenden Hyperinsulinämie keine Steigerung des Grundumsatzes messbar war.

Zu spekulieren bleibt aktuell, ob Glukagon als Therapeutikum besonders vor langen Fastenperioden (nachts) effektiv eingesetzt werden kann und, ob eine proteinreiche Mahlzeit kombiniert mit Glukagongabe auch im niedrigen Dosisbereich, die gewünschte Grundumsatzsteigerung bringt.

4.5 Limitationen

In unserer Studie wurden insbesondere die akuten Effekte einer Glukagonsteigerung nach oraler Glukosebelastung getestet.

Langzeitwirkungen erhöhter Glukagonwerte werden erst in Zukunft mit der Einführung von Glukagonrezeptoragonisten auswertbar sein. Dann können auch valide Aussagen über den Langzeitverlauf von Insulinsensitivität und Grundumsatz und damit Körpergewicht getroffen werden.

Erste Daten für unimolekulare duale GLP-1-Rezeptor/Glukagonrezeptor-Agonisten bestätigen bereits die verbesserte Beta-Zellfunktion und Insulinsensitivität bei Typ 2 Diabetikern (43)(194)(44)(195). Die Erkenntnisse beruhen allesamt auf einem dualen Rezeptoragonismus, da als nachteiliger Effekt einer Glukagonwirkung der gesteigerte Glukosespiegel angeführt wird. In Dosierungen, wie sie in dieser Studie vorliegen, ist ein Effekt auf die periphere Glukosekonzentration nicht beobachtbar. Interessant wäre deshalb auch die Wirkung einer Monotherapie mit einem niedrig dosierten Glukagonagonisten, insbesondere bei adipösen Patienten zu untersuchen.

Eine weitere Limitation der Studie ist die Tatsache, dass die Glukagonkonzentrationen eines physiologischen Glukagonanstiegs überschritten wurden

und somit nicht exakt die gleichen Bedingungen zum Vergleich der metabolischen Parameter vorlagen. Allerdings ließen sich die positiven metabolischen Eigenschaften, die bei einem physiologischen Glukagonanstieg vorlagen, schon bei den hier erzielten höheren Konzentrationen nicht reproduzieren.

Ebenfalls zu erwähnen ist, dass bei Konzeption der Studie zur Berechnung der Clearance eine Formel ausgewählt wurde, die lediglich eine Annäherung an die tatsächliche hepatische Clearance liefert. Eine exaktere modellbasierte Methode sollte in Folgestudien verwendet werden, um die hier vorgebrachte Hypothese zu überprüfen.

Da aus anderen Studien unseres Institutes nicht ausreichend viele Probanden mit bekannter Glukagondynamik zu rekrutieren waren, erfolgte in den meisten Fällen zuerst die Intervention mit Placebo zur Ermittlung der Glukagondynamik.

5 Zusammenfassung

Allgemein gilt Glukagon als Gegenspieler von Insulin, weshalb nach einer Glukoseingestion von einer abfallenden Glukagonkonzentration ausgegangen wird.

Allerdings existieren Daten aus verschiedenen europäischen Ländern an gesunden Probanden, die einen paradoxen Glukagonanstieg nach oraler Glukosebelastung bei circa 20-30% der untersuchten Probanden feststellen und diesen mit einem geringeren Risiko zur Entwicklung einer gestörten Glukosetoleranz, einer höheren Insulinsensitivität und schlankem Körperbau assoziieren. Genaue metabolische Profile und Wirkungen im Gehirn wurden bisher noch nicht untersucht.

Diese Studie hatte zum Ziel, eine dezidierte zentralnervöse und metabolische Charakterisierung eines Glukagonanstiegs, physiologisch und pharmakologisch induziert, zu liefern. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung und den

Vergleich wichtiger metabolischer Parameter nach Placebo- oder Glukagoninfusion.

Es wurde ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt und an unterschiedlichen Versuchstagen entweder Glukagon mit einer Laufrate von 0,5 pmol/kg/min oder Natriumchlorid infundiert. Während des oGTT fanden regelmäßige Blutentnahmen und fMRT-Messungen statt. Nach Beendigung des oGTT wurde zur Bestimmung des Grundumsatzes eine indirekte Kalorimetrie durchgeführt.

In der Glukagongruppe zeigte sich eine höhere Insulinkonzentration als in der Placebogruppe, bei nicht verschiedener C-Peptidkonzentration als Marker der Insulinsekretion. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p_{AUC} = 0,07$), ein Trend jedoch erkennbar, was für eine Beeinflussung der hepatischen Insulin-clearance durch Glukagoninfusion nach Glukosebelastung spricht. Eine Annäherung der Clearance erbrachte keinen signifikanten Unterschied ($p_{AUC} = 0,22$). In einem nächsten Schritt sollten deshalb mit exakteren Methoden diese neuen Erkenntnisse wichtiger metabolischer Regulationsmechanismen genauer untersucht werden.

In beiden Gruppen zeigte sich kein Einfluss auf Insulinsensitivität ($p_{IS_{\text{mats}}} = 0,36$; $p_{IS_{\text{nefa}}} = 0,62$), Grundumsatz ($p = 0,6$) und Triglyceridkonzentration ($p_{AUC} = 0,42$) durch Glukagoninfusion im Vergleich zu Placeboinfusion. Insgesamt wurden die akuten Effekte einer Glukagonsteigerung nach Glukosebelastung untersucht, wobei wichtige Erkenntnisse über Regulationsmechanismen des Stoffwechsels bei Glukagonanstieg nach Glukosebelastung gewonnen wurden. Langzeitwirkungen eines niedrig dosierten Glukagonanstiegs können mit dieser Studie nicht abgeschätzt werden und sollten im Folgenden untersucht werden. Ebenso sollte die Hypothese der gesteigerten hepatischen Insulin-clearance mit konsekutiver Hyperinsulinämie bei Glukagonanstieg nach Glukosebelastung in weiteren Studien mit geeigneten Methoden überprüft werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. Dezember 2001;414(6865):782–7.
2. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*. Februar 2014;103(2):137–49.
3. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *The Lancet*. April 2016;387(10027):1513–30.
4. DeFronzo RA. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 1. April 2009;58(4):773–95.
5. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, Bachman VF, Biryukov S, Brauer M, u. a. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. Dezember 2015;386(10010):2287–323.
6. Krug EG. Trends in diabetes: sounding the alarm. *The Lancet*. April 2016;387(10027):1485–6.
7. Lorenzo C, Wagenknecht LE, D’Agostino RB, Rewers MJ, Karter AJ, Haffner SM. Insulin Resistance, β -Cell Dysfunction, and Conversion to Type 2 Diabetes in a Multiethnic Population: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care*. 1. Januar 2010;33(1):67–72.
8. Ketterer C, Tschritter O, Preissl H, Heni M, Häring H-U, Fritsche A. Insulin sensitivity of the human brain. *Diabetes Res Clin Pract*. August 2011;93:S47–51.
9. Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci*. 1. Juni 2002;5(6):514–6.
10. Rojas JM, Schwartz MW. Control of hepatic glucose metabolism by islet and brain. *Diabetes Obes Metab*. September 2014;16(S1):33–40.
11. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1. Januar 2010;33(Supplement_1):S62–9.
12. Alberti KGMM, Zimmet PZ, WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet Med*. Juli 1998;15(7):539–53.

13. Bromer WW, Sinn LG, Staub A, Behrens OK. The Amino Acid Sequence of Glucagon. *Diabetes*. 1. Mai 1957;6(3):234–8.
14. Knop FK. EJE PRIZE 2018: A gut feeling about glucagon. *Eur J Endocrinol*. Juni 2018;178(6):R267–80.
15. Wewer Albrechtsen NJ, Hartmann B, Veedfald S, Windeløv JA, Plamboeck A, Bojsen-Møller KN, u. a. Hyperglucagonaemia analysed by glucagon sandwich ELISA: nonspecific interference or truly elevated levels? *Diabetologia*. 1. September 2014;57(9):1919–26.
16. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. Mai 2007;132(6):2131–57.
17. Campbell JE, Drucker DJ. Islet α cells and glucagon—critical regulators of energy homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. Juni 2015;11(6):329–38.
18. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. α -Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research but the Enigma Remains. *Endocr Rev*. Februar 2007;28(1):84–116.
19. Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera P-L, Wollheim CB. Islet β -cell secretion determines glucagon release from neighbouring α -cells. *Nat Cell Biol*. April 2003;5(4):330–5.
20. Zhou H, Tran POT, Yang S, Zhang T, LeRoy E, Oseid E, u. a. Regulation of β -Cell Function by the α -Cell During Hypoglycemia in Wistar Rats: the „Switch-off“ Hypothesis. *Diabetes*. 1. Juni 2004;53(6):1482–7.
21. Jones BJ, Tan T, Bloom SR. Minireview: Glucagon in Stress and Energy Homeostasis. *Endocrinology*. März 2012;153(3):1049–54.
22. Vieira E, Liu Y-J, Gylfe E. Involvement of β_1 and β_2 -adrenoceptors in adrenaline stimulation of the glucagon-secreting mouse β -cell. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1. Februar 2004;369(2):179–83.
23. Jansen ASP, Hoffman JL, Loewy AD. CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Res*. August 1997;766(1–2):29–38.
24. Wewer Albrechtsen NJ, Pedersen J, Galsgaard KD, Winther-Sørensen M, Suppli MP, Janah L, u. a. The liver-alpha cell axis and type 2 diabetes. *Endocr Rev* [Internet]. 28. März 2019 [zitiert 5. April 2019]; Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/edrv/advance-article/doi/10.1210/er.2018-00251/5421016>
25. Christophe J. Glucagon and Its Receptor in Various Tissues. *Ann N Y Acad Sci*. 17. Dezember 2006;805(1):31–42.
26. Banks WA, Kastin AJ. Peptides and the blood-brain barrier: Lipophilicity as a predictor of permeability. *Brain Res Bull*. September 1985;15(3):287–92.
27. Abraham MA, Lam TKT. Glucagon action in the brain. *Diabetologia*. 1. Juli 2016;59(7):1367–71.

28. Svoboda M, Tastenoy M, Vertongen P, Robberecht P. Relative quantitative analysis of glucagon receptor mRNA in rat tissues. *Mol Cell Endocrinol.* November 1994;105(2):131–7.
29. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest.* 3. Januar 2012;122(1):4–12.
30. Roden M, Perseghin G, Petersen KF, Hwang JH, Cline GW, Gerow K, u. a. The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans. *J Clin Invest.* 1. Februar 1996;97(3):642–8.
31. Stevenson RW, Steiner KE, Davis MA, Hendrick GK, Williams PE, Lacy WW, u. a. Similar dose responsiveness of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucagon in vivo. *Diabetes.* März 1987;36(3):382–9.
32. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J.* März 1922;12(3):141–6.
33. Sakurai H, Dobbs R, Unger RH. Somatostatin-Induced Changes in Insulin and Glucagon Secretion in Normal and Diabetic Dogs. *J Clin Invest.* 1. Dezember 1974;54(6):1395–402.
34. Unger RH, Aguilar-Parada E, Müller WA, Eisentraut AM. Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest.* 1. April 1970;49(4):837–48.
35. Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of Hyperglucagonemia in Maintenance of Increased Rates of Hepatic Glucose Output in Type II Diabetics. *Diabetes.* 1. März 1987;36(3):274–83.
36. Consoli A, Nurjhan N, Reilly JJ, Bier DM, Gerich JE. Mechanism of increased gluconeogenesis in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of alterations in systemic, hepatic, and muscle lactate and alanine metabolism. *J Clin Invest.* 1. Dezember 1990;86(6):2038–45.
37. Revers RR, Fink R, Griffin J, Olefsky JM, Kolterman OG. Influence of hyperglycemia on insulin's in vivo effects in type II diabetes. *J Clin Invest.* 1. März 1984;73(3):664–72.
38. Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia.* 1. Mai 1983;24(5):366–71.
39. Sherwin RS, Fisher M, Hendler R, Felig P. Hyperglucagonemia and Blood Glucose Regulation in Normal, Obese and Diabetic Subjects. *N Engl J Med.* mi;294(9):455–61.
40. Felig P, Wahren J, Hendler R. Influence of physiologic hyperglucagonemia on basal and insulin-inhibited splanchnic glucose output in normal man. *J Clin Invest.* 1. September 1976;58(3):761–5.

41. Bomboy JD, Sinclair-Smith BC. Transient Stimulatory Effect of Sustained Hyperglucagonemia on Splanchnic Glucose Production in Normal and Diabetic Man. 1977;26(3):8.
42. Mighiu PI, Yue JTY, Filippi BM, Abraham MA, Chari M, Lam CKL, u. a. Hypothalamic glucagon signaling inhibits hepatic glucose production. *Nat Med*. Juni 2013;19(6):766–72.
43. Visentin R, Schiavon M, Göbel B, Riz M, Cobelli C, Klabunde T, u. a. Dual glucagon-like peptide-1 receptor/glucagon receptor agonist SAR425899 improves beta-cell function in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. April 2020;22(4):640–7.
44. Ambery P, Parker VE, Stumvoll M, Posch MG, Heise T, Plum-Moerschel L, u. a. MEDI0382, a GLP-1 and glucagon receptor dual agonist, in obese or overweight patients with type 2 diabetes: a randomised, controlled, double-blind, ascending dose and phase 2a study. *The Lancet*. Juni 2018;391(10140):2607–18.
45. Finan B, Yang B, Ottaway N, Smiley DL, Ma T, Clemmensen C, u. a. A rationally designed monomeric peptide triagonist corrects obesity and diabetes in rodents. *Nat Med*. Januar 2015;21(1):27–36.
46. Pocai A, Carrington PE, Adams JR, Wright M, Eiermann G, Zhu L, u. a. Glucagon-like peptide 1/glucagon receptor dual agonism reverses obesity in mice. *Diabetes*. Oktober 2009;58(10):2258–66.
47. Day JW, Ottaway N, Patterson JT, Gelfanov V, Smiley D, Gidda J, u. a. A new glucagon and GLP-1 co-agonist eliminates obesity in rodents. *Nat Chem Biol*. Oktober 2009;5(10):749–57.
48. Eldor R, Glaser B, Fraenkel M, Doviner V, Salmon A, Gross DJ. Glucagonoma and the glucagonoma syndrome - cumulative experience with an elusive endocrine tumour: Glucagonoma and the glucagonoma syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Mai 2011;74(5):593–8.
49. Wewer Albrechtsen NJ, Færch K, Jensen TM, Witte DR, Pedersen J, Mahendran Y, u. a. Evidence of a liver-alpha cell axis in humans: hepatic insulin resistance attenuates relationship between fasting plasma glucagon and glucagonotropic amino acids. *Diabetologia*. 2018;61(3):671–80.
50. Norton JA. Amino Acid Deficiency and the Skin Rash Associated with Glucagonoma. *Ann Intern Med*. 1. August 1979;91(2):213.
51. Alexander EK, Robinson M, Staniec M, Dluhy RG. Peripheral amino acid and fatty acid infusion for the treatment of necrolytic migratory erythema in the glucagonoma syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Dezember 2002;57(6):827–31.
52. Solloway MJ, Madjidi A, Gu C, Eastham-Anderson J, Clarke HJ, Kljavin N, u. a. Glucagon Couples Hepatic Amino Acid Catabolism to mTOR-

- Dependent Regulation of α -Cell Mass. *Cell Rep.* 21. Juli 2015;12(3):495–510.
53. Larger E, Wewer Albrechtsen NJ, Hansen LH, Gelling RW, Capeau J, Deacon CF, u. a. Pancreatic α -cell hyperplasia and hyperglucagonemia due to a glucagon receptor splice mutation. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* [Internet]. 2016 [zitiert 12. April 2019];2016. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5118975/>
 54. Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R, Tschöp MH. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat Rev Endocrinol.* Dezember 2010;6(12):689–97.
 55. Guettet C, Mathe D, Riottot M, Lutton C. Effects of chronic glucagon administration on cholesterol and bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* November 1988;963(2):215–23.
 56. Guettet C, Mathé D, Navarro N, Lecuyer B. Effects of chronic glucagon administration on rat lipoprotein composition. *Biochim Biophys Acta.* 17. Oktober 1989;1005(3):233–8.
 57. Charbonneau A, Couturier K, Gauthier M-S, Lavoie J-M. Evidence of hepatic glucagon resistance associated with hepatic steatosis: reversal effect of training. *Int J Sports Med.* August 2005;26(6):432–41.
 58. Eaton RP, Schade DS. Glucagon resistance as a hormonal basis for endogenous hyperlipaemia. *Lancet Lond Engl.* 5. Mai 1973;1(7810):973–4.
 59. Nair KS, Welle SL, Halliday D, Campbell RG. Effect of beta-hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *J Clin Invest.* Juli 1988;82(1):198–205.
 60. Gerich JE, Lorenzi M, Bier DM, Schneider V, Tsalikian E, Karam JH, u. a. Prevention of human diabetic ketoacidosis by somatostatin. Evidence for an essential role of glucagon. *N Engl J Med.* 8. Mai 1975;292(19):985–9.
 61. Pégorier JP, Garcia-Garcia MV, Prip-Buus C, Duée PH, Kohl C, Girard J. Induction of ketogenesis and fatty acid oxidation by glucagon and cyclic AMP in cultured hepatocytes from rabbit fetuses. Evidence for a decreased sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to malonyl-CoA inhibition after glucagon or cyclic AMP treatment. *Biochem J.* 15. November 1989;264(1):93–100.
 62. Drucker DJ, Asa S. Glucagon gene expression in vertebrate brain. *J Biol Chem.* 25. September 1988;263(27):13475–8.
 63. Amir S. Central glucagon-induced hyperglycemia is mediated by combined activation of the adrenal medulla and sympathetic nerve endings. *Physiol Behav.* Januar 1986;37(4):563–6.

64. Honda K, Kamisoyama H, Uemura T, Yanagi T, Saito N, Kurose Y, u. a. The mechanism underlying the central glucagon-induced hyperglycemia and anorexia in chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* November 2012;163(3–4):260–4.
65. Marubashi S, Tominaga M, Katagiri T, Yamatani K, Yawata Y, Hara M, u. a. Hyperglycaemic effect of glucagon administered intracerebroventricularly in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh).* Januar 1985;108(1):6–10.
66. Quiñones M, Al-Massadi O, Gallego R, Fernø J, Diéguez C, López M, u. a. Hypothalamic CaMKK β mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Mol Metab.* Dezember 2015;4(12):961–70.
67. Harney JA, Rodgers RL. Insulin-like stimulation of cardiac fuel metabolism by physiological levels of glucagon: involvement of PI3K but not cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Juli 2008;295(1):E155–61.
68. Schulman JL, Carleton JL, Whitney G, Whitehorn JC. Effect of glucagon on food intake and body weight in man. *J Appl Physiol.* November 1957;11(3):419–21.
69. Penick SB, Hinkle LE. Depression of food intake induced in healthy subjects by glucagon. *N Engl J Med.* 4. Mai 1961;264:893–7.
70. Chernish SM, Brunelle RR, Rosenak BD, Ahmadzai S. Comparison of the effects of glucagon and atropine sulfate on gastric emptying. *Am J Gastroenterol.* Dezember 1978;70(6):581–6.
71. Honda K. Glucagon-related peptides and the regulation of food intake in chickens: GLUCAGON-RELATED PEPTIDES IN CHICKENS. *Anim Sci J.* September 2016;87(9):1090–8.
72. Calles-Escandón J. Insulin dissociates hepatic glucose cycling and glucagon-induced thermogenesis in man. *Metabolism.* August 1994;43(8):1000–5.
73. Joel CD. Stimulation of metabolism of rat brown adipose tissue by addition of lipolytic hormones in vitro. *J Biol Chem.* 25. Februar 1966;241(4):814–21.
74. Billington CJ, Briggs JE, Link JG, Levine AS. Glucagon in physiological concentrations stimulates brown fat thermogenesis in vivo. *Am J Physiol.* August 1991;261(2 Pt 2):R501-507.
75. Edwards CI, Howland RJ. Adaptive changes in insulin and glucagon secretion during cold acclimation in the rat. *Am J Physiol.* Juni 1986;250(6 Pt 1):E669-676.
76. Samoilov M, Plyasunov S, Arkin AP. Stochastic amplification and signaling in enzymatic futile cycles through noise-induced bistability with oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. Februar 2005;102(7):2310–5.

77. Miyoshi H, Shulman GI, Peters EJ, Wolfe MH, Elahi D, Wolfe RR. Hormonal control of substrate cycling in humans. *J Clin Invest.* Mai 1988;81(5):1545–55.
78. Stunkard AJ, Van Itallie TB, Reis BB. The mechanism of satiety: effect of glucagon on gastric hunger contractions in man. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* Juni 1955;89(2):258–61.
79. Patel GK, Whalen GE, Soergel KH, Wu WC, Meade RC. Glucagon effects on the human small intestine. *Dig Dis Sci.* Juli 1979;24(7):501–8.
80. Taylor I, Duthie HL, Cumberland DC, Smallwood R. Glucagon and the colon. *Gut.* 1. Dezember 1975;16(12):973–8.
81. Mochiki E, Suzuki H, Takenoshita S, Nagamachi Y, Kuwano H, Mizumoto A, u. a. Mechanism of inhibitory effect of glucagon on gastrointestinal motility and cause of side effects of glucagon. *J Gastroenterol.* 5. November 1998;33(6):835–41.
82. Petzold A, Ottinger A, Hammer J, Walter J. [Effect of gastrointestinal hormones on duodenal motility in acute experiments]. *Gastroenterol J Organ Ges Gastroenterol DDR.* 1991;51(2):81–92.
83. Wagner R, Hakaste LH, Ahlqvist E, Heni M, Machann J, Schick F, u. a. Nonsuppressed Glucagon After Glucose Challenge as a Potential Predictor for Glucose Tolerance. *Diabetes.* Mai 2017;66(5):1373–9.
84. Friston KJ, Holmes AP, Price CJ, Büchel C, Worsley KJ. Multisubject fMRI Studies and Conjunction Analyses. *NeuroImage.* 1. Oktober 1999;10(4):385–96.
85. WHO_TRS_646.pdf [Internet]. [zitiert 16. März 2019]. Verfügbar unter: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41399/WHO_TRS_646.pdf?sequence=1&isAllowed=y
86. Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci.* 1. Dezember 1990;87(24):9868–72.
87. Porubská K, Veit R, Preissl H, Fritsche A, Birbaumer N. Subjective feeling of appetite modulates brain activity. *NeuroImage.* September 2006;32(3):1273–80.
88. Guthoff M, Grichisch Y, Canova C, Tschritter O, Veit R, Hallschmid M, u. a. Insulin Modulates Food-Related Activity in the Central Nervous System. *J Clin Endocrinol Metab.* Februar 2010;95(2):748–55.
89. Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: A review. *Metabolism.* März 1988;37(3):287–301.
90. Weir JBDB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol.* August 1949;109(1–2):1–9.

91. Schadewaldt P, Nowotny B, Straßburger K, Kotzka J, Roden M. Indirect calorimetry in humans: a postcalorimetric evaluation procedure for correction of metabolic monitor variability. *Am J Clin Nutr.* 1. April 2013;97(4):763–73.
92. Bak MJ, Albrechtsen NW, Pedersen J, Hartmann B, Christensen M, Vilsbøll T, u. a. Specificity and sensitivity of commercially available assays for glucagon and oxyntomodulin measurement in humans. *Eur J Endocrinol.* April 2014;170(4):529–38.
93. PROTOCOL_FOR_IFU-GL-32K_GL-32K.pdf.
94. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 1. September 1979;237(3):E214.
95. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care.* 1. September 1999;22(9):1462–70.
96. Wagner R, Fritsche L, Heni M, Fehlert E, Stefan N, Staiger H, u. a. A novel insulin sensitivity index particularly suitable to measure insulin sensitivity during gestation. *Acta Diabetol.* 1. Dezember 2016;53(6):1037–44.
97. Piccinini F, Bergman RN. The Measurement of Insulin Clearance. *Diabetes Care.* September 2020;43(9):2296–302.
98. Polonsky KS, Rubenstein AH. C-Peptide as a Measure of the Secretion and Hepatic Extraction of Insulin: Pitfalls and Limitations. *Diabetes.* 1. Mai 1984;33(5):486–94.
99. Uwaifo GI, Fallon EM, Chin J, Elberg J, Parikh SJ, Yanovski JA. Indices of Insulin Action, Disposal, and Secretion Derived From Fasting Samples and Clamps in Normal Glucose-Tolerant Black and White Children. *Diabetes Care.* 1. November 2002;25(11):2081–7.
100. Madison LL. Role of Insulin in the Hepatic Handling of Glucose. *Arch Intern Med.* 1. März 1969;123(3):284.
101. Shapiro ET, Tillil H, Miller MA, Frank BH, Galloway JA, Rubenstein AH, u. a. Insulin Secretion and Clearance: Comparison After Oral and Intravenous Glucose. *Diabetes.* 1. Dezember 1987;36(12):1365–71.
102. Huxley R, Mendis S, Zheleznyakov E, Reddy S, Chan J. Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk—a review of the literature. *Eur J Clin Nutr.* Januar 2010;64(1):16–22.
103. WHO/Europe | Nutrition - Body mass index - BMI [Internet]. [zitiert 28. Februar 2020]. Verfügbar unter: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>

104. World Health Organization. Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation, Geneva, 8-11 December 2008. Geneva: World Health Organization; 2011.
105. Qiao Q, Nyamdorj R. Is the association of type II diabetes with waist circumference or waist-to-hip ratio stronger than that with body mass index? *Eur J Clin Nutr.* Januar 2010;64(1):30–4.
106. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1. Januar 2010;33(Supplement_1):S62–9.
107. Thomas DD, Corkey BE, Istfan NW, Apovian CM. Hyperinsulinemia: An Early Indicator of Metabolic Dysfunction. *J Endocr Soc.* 1. September 2019;3(9):1727–47.
108. Reaven GM, Hollenbeck CB, Chen Y-DI. Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia* [Internet]. Januar 1989 [zitiert 20. Juni 2021];32(1). Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/BF00265404>
109. Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. β -Cell Function in Subjects Spanning the Range from Normal Glucose Tolerance to Overt Diabetes: A New Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* Januar 2005;90(1):493–500.
110. Roth J, Müller N, Lehmann T, Heinemann L, Wolf G, Müller U. HbA1c and Age in Non-Diabetic Subjects: An Ignored Association? *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 24. Mai 2016;s-0042-105440.
111. Masuch A, Friedrich N, Roth J, Nauck M, Müller UA, Petersmann A. Preventing misdiagnosis of diabetes in the elderly: age-dependent HbA1c reference intervals derived from two population-based study cohorts. *BMC Endocr Disord.* Dezember 2019;19(1):20.
112. Pani LN, Korenda L, Meigs JB, Driver C, Chamany S, Fox CS, u. a. Effect of Aging on A1C Levels in Individuals Without Diabetes: Evidence from the Framingham Offspring Study and the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004. *Diabetes Care.* 1. Oktober 2008;31(10):1991–6.
113. Pieri M, Pignalosa S, Zenobi R, Callà C, Martino FG, Menichella G, u. a. Reference intervals for HbA1c partitioned for gender and age: a multicenter study. *Acta Diabetol.* Dezember 2016;53(6):1053–6.
114. Ma Q, Liu H, Xiang G, Shan W, Xing W. Association between glycated hemoglobin A1c levels with age and gender in Chinese adults with no prior diagnosis of diabetes mellitus. *Biomed Rep.* Juni 2016;4(6):737–40.
115. Nauck M, Gerdes C, Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Freckmann G, u. a. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*: Update 2020. :10.

116. Davidson MB, Schriger DL. Effect of age and race/ethnicity on HbA_{1c} levels in people without known diabetes mellitus: Implications for the diagnosis of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* März 2010;87(3):415–21.
117. Dubowitz N, Xue W, Long Q, Ownby JG, Olson DE, Barb D, u. a. Aging is associated with increased HbA_{1c} levels, independently of glucose levels and insulin resistance, and also with decreased HbA_{1c} diagnostic specificity. *Diabet Med.* August 2014;31(8):927–35.
118. Skyler JS. DIABETIC COMPLICATIONS. *Endocrinol Metab Clin North Am.* Juni 1996;25(2):243–54.
119. Krolewski AS, Laffel LMB, Krolewski M, Quinn M, Warram JH. Glycosylated Hemoglobin and the Risk of Microalbuminuria in Patients with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 11. Mai 1995;332(19):1251–5.
120. Warram JH, Scott LJ, Hanna LS, Wantman M, Cohen SE, Laffel LM, u. a. Progression of microalbuminuria to proteinuria in type 1 diabetes: nonlinear relationship with hyperglycemia. *Diabetes.* 1. Januar 2000;49(1):94–100.
121. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, u. a. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract.* Mai 1995;28(2):103–17.
122. Tanaka Y, Atsumi Y, Matsuoka K, Onuma T, Tohjima T, Kawamori R. Role of Glycemic Control and Blood Pressure in the Development and Progression of Nephropathy in Elderly Japanese NIDDM Patients. *Diabetes Care.* 1. Januar 1998;21(1):116–20.
123. Gray N, Picone G, Sloan F, Yashkin A. Relation between BMI and Diabetes Mellitus and Its Complications among US Older Adults. *South Med J.* Januar 2015;108(1):29–36.
124. Bays HE, Chapman RH, Grandy S, the SHIELD Investigators' Group. The relationship of body mass index to diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia: comparison of data from two national surveys: Relation of BMI to diabetes mellitus. *Int J Clin Pract.* 10. April 2007;61(5):737–47.
125. Astrup A, Finer N. Redefining Type 2 diabetes: „Diabesity“ or „Obesity Dependent Diabetes Mellitus“? *Obes Rev.* Oktober 2000;1(2):57–9.
126. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, u. a. Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. *N Engl J Med.* 13. September 2001;345(11):790–7.
127. Cegla J, Troke RC, Jones B, Tharakan G, Kenkre J, McCullough KA, u. a. Coinfusion of Low-Dose GLP-1 and Glucagon in Man Results in a Reduction in Food Intake. *Diabetes.* November 2014;63(11):3711–20.

128. Marliss EB, Aoki TT, Unger RH, Soeldner JS, Cahill GF. Glucagon levels and metabolic effects in fasting man. *J Clin Invest.* Dezember 1970;49(12):2256–70.
129. Müller WA, Faloona GR, Aguilar-Parada E, Unger RH. Abnormal Alpha-Cell Function in Diabetes: Response to Carbohydrate and Protein Ingestion. *N Engl J Med.* 16. Juli 1970;283(3):109–15.
130. Sherwood LM, Parris EE, Unger RH. Glucagon Physiology and Pathophysiology. *N Engl J Med.* 19. August 1971;285(8):443–9.
131. Gerich JE, Tsalikian E, Lorenzi M, Karam JH, Bier DM. PLASMA GLUCAGON AND ALANINE RESPONSES TO ACUTE INSULIN DEFICIENCY IN MAN. *J Clin Endocrinol Metab.* März 1975;40(3):526–9.
132. Müller WA, Faloona GR, Unger RH. Hyperglucagonemia in diabetic ketoacidosis. *Am J Med.* Januar 1973;54(1):52–7.
133. Zhao X, Peter A, Fritsche J, Elcnerova M, Fritsche A, Häring H-U, u. a. Changes of the plasma metabolome during an oral glucose tolerance test: is there more than glucose to look at? *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* Februar 2009;296(2):E384–93.
134. Knopf CF, Cresto JC, Dujovne IL, Ramos O, Majo SF. Oral glucose tolerance test in 100 normal children. *Acta Diabetol Lat.* Mai 1977;14(3–4):95–103.
135. Chandalia HB, Boshell BR. Diagnosis of Diabetes: The Size and Nature of Carbohydrate Load. *Diabetes.* 1. November 1970;19(11):863–9.
136. Type 1 Diabetes TrialNet Study Group, Ismail HM, Xu P, Libman IM, Becker DJ, Marks JB, u. a. The shape of the glucose concentration curve during an oral glucose tolerance test predicts risk for type 1 diabetes. *Diabetologia.* Januar 2018;61(1):84–92.
137. Ko GTC, Chan JCN, Woo J, Lau E, Yeung VTF, Chow C-C, u. a. The Reproducibility and Usefulness of the Oral Glucose Tolerance Test in Screening for Diabetes and other Cardiovascular Risk Factors. *Ann Clin Biochem Int J Lab Med.* Januar 1998;35(1):62–7.
138. McDonald GW, Fisher GF, Burnham C. Reproducibility of the Oral Glucose Tolerance Test. *Diabetes.* 1. August 1965;14(8):473–80.
139. Ganda OP, Day JL, Soeldner JS, Connon JJ, Gleason RE. Reproducibility and Comparative Analysis of Repeated Intravenous and Oral Glucose Tolerance Tests. *Diabetes.* 1. Juli 1978;27(7):715–25.
140. Troxler RG, Trabal JF, Lancaster MC. Interpretation of an abnormal oral glucose tolerance test encountered during multiphasic laboratory screening. *Aviat Space Environ Med.* Mai 1975;46(5):729–35.
141. Nelson RL. Oral Glucose Tolerance Test: Indications and Limitations. *Mayo Clin Proc.* März 1988;63(3):263–9.

142. Home P. The OGTT: Gold that Does not Shine. *Diabet Med.* 6. Mai 1988;5(4):313–4.
143. Toeller M, Knußmann R. Reproducibility of oral glucose tolerance tests with three different loads. *Diabetologia.* April 1973;9(2):102–7.
144. Diabetes mellitus : report of a WHO study group [meeting held in Geneva from 11 to 16 February 1985] [Internet]. [zitiert 29. Juni 2021]. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39592>
145. Mooy JM, Grootenhuis PA, de Vries H, Kostense PJ, Popp-Snijders C, Bouter LM, u. a. Intra-individual variation of glucose, specific insulin and proinsulin concentrations measured by two oral glucose tolerance tests in a general Caucasian population: the Hoorn Study. *Diabetologia.* März 1996;39(3):298–305.
146. Beale E, Andreone T, Koch S, Granner M, Granner D. Insulin and Glucagon Regulate Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) mRNA in Rat Liver. *Diabetes.* 1. April 1984;33(4):328–32.
147. Lok S, Kuijper JL, Jelinek LJ, Kramer JM, Whitmore TE, Sprecher CA, u. a. The human glucagon receptor encoding gene: structure, cDNA sequence and chromosomal localization. *Gene.* März 1994;140(2):203–9.
148. Eigler N, Saccà L, Sherwin RS. Synergistic interactions of physiologic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog: a model for stress-induced hyperglycemia. *J Clin Invest.* Januar 1979;63(1):114–23.
149. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* Oktober 2007;87(4):1409–39.
150. Kreymann B, Ghatgei MA, Williams G, Bloom SR. GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 7-36: A PHYSIOLOGICAL INCRETIN IN MAN. *The Lancet.* Dezember 1987;330(8571):1300–4.
151. Ørskov C, Wettergren A, Holst JJ. Secretion of the Incretin Hormones Glucagon-Like Peptide-1 and Gastric Inhibitory Polypeptide Correlates with Insulin Secretion in Normal Man Throughout the Day. *Scand J Gastroenterol.* Januar 1996;31(7):665–70.
152. Lamont BJ, Li Y, Kwan E, Brown TJ, Gaisano H, Drucker DJ. Pancreatic GLP-1 receptor activation is sufficient for incretin control of glucose metabolism in mice. *J Clin Invest.* Januar 2012;122(1):388–402.
153. Mojsov S, Weir GC, Habener JF. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest.* Februar 1987;79(2):616–9.
154. Hu S, Lu Y, Tura A, Pacini G, D’Argenio DZ. An Analysis of Glucose Effectiveness in Subjects With or Without Type 2 Diabetes via Hierarchical Modeling. *Front Endocrinol.* 29. März 2021;12:641713.

155. Ader M, Ni TC, Bergman RN. Glucose effectiveness assessed under dynamic and steady state conditions. Comparability of uptake versus production components. *J Clin Invest.* 15. März 1997;99(6):1187–99.
156. Alford FP, Henriksen JE, Rantza C, Beck-Nielsen H. Glucose effectiveness is a critical pathogenic factor leading to glucose intolerance and type 2 diabetes: An ignored hypothesis. *Diabetes Metab Res Rev.* Mai 2018;34(4):e2989.
157. Dube S, Errazuriz-Cruzat I, Basu A, Basu R. The Forgotten Role of Glucose Effectiveness in the Regulation of Glucose Tolerance. *Curr Diab Rep.* Juni 2015;15(6):31.
158. Tonelli J, Kishore P, Lee D-E, Hawkins M. The regulation of glucose effectiveness: how glucose modulates its own production: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* Juli 2005;8(4):450–6.
159. Ader M, Pacini G, Yang YJ, Bergman RN. Importance of Glucose Per Se to Intravenous Glucose Tolerance: Comparison of the Minimal-Model Prediction with Direct Measurements. *Diabetes.* 1. November 1985;34(11):1092–103.
160. Ahrén B, Pacini G. Glucose effectiveness: Lessons from studies on insulin-independent glucose clearance in mice. *J Diabetes Investig.* Mai 2021;12(5):675–85.
161. Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR, Cobelli C. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 1. Juni 1979;236(6):E667.
162. Cobelli C, Bettini F, Caumo A, Quon MJ. Overestimation of minimal model glucose effectiveness in presence of insulin response is due to undermodeling. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 1. Dezember 1998;275(6):E1031–6.
163. Caumo A, Vicini P, Cobelli C. Is the minimal model too minimal? *Diabetologia.* August 1996;39(8):997–1000.
164. Quon MJ, Cochran C, Taylor SI, Eastman RC. Non-Insulin-Mediated Glucose Disappearance in Subjects With IDDM: Discordance Between Experimental Results and Minimal Model Analysis. *Diabetes.* 1. Juli 1994;43(7):890–6.
165. Jones AG, Hattersley AT. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabet Med.* Juli 2013;30(7):803–17.
166. Polonsky KS, Licinio-Paixao J, Given BD, Pugh W, Rue P, Galloway J, u. a. Use of biosynthetic human C-peptide in the measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and type I diabetic patients. *J Clin Invest.* 1. Januar 1986;77(1):98–105.
167. Licinio-Paixao J, Polonsky KS, Given BD, Pugh W, Ostrega D, Frank BF, u. a. Ingestion of a Mixed Meal Does Not Affect the Metabolic Clearance

- Rate of Biosynthetic Human C-Peptide*. *J Clin Endocrinol Metab.* August 1986;63(2):401–3.
168. Field JB. Extraction of Insulin by Liver. *Annu Rev Med.* Februar 1973;24(1):309–14.
 169. Brundin T. Splanchnic and extrasplanchnic extraction of insulin following oral and intravenous glucose loads. *Clin Sci Lond Engl* 1979. Oktober 1999;97(4):429–36.
 170. Shapiro ET, Tillil H, Rubenstein AH, Polonsky KS. Peripheral Insulin Parallels Changes in Insulin Secretion More Closely Than C-Peptide After Bolus Intravenous Glucose Administration*. *J Clin Endocrinol Metab.* November 1988;67(5):1094–9.
 171. Eaton RP, Allen RC, Schade DS, Erickson KM, Standefer J. Prehepatic Insulin Production in Man: Kinetic Analysis Using Peripheral Connecting Peptide Behavior*. *J Clin Endocrinol Metab.* September 1980;51(3):520–8.
 172. Cauter EV, Mestrez F, Sturis J, Polonsky KS. Estimation of Insulin Secretion Rates from C-Peptide Levels: Comparison of Individual and Standard Kinetic Parameters for C-Peptide Clearance. *Diabetes.* 1. März 1992;41(3):368–77.
 173. Covic AMC, Schelling JR, Constantiner M, Iyengar SK, Sedor JR. Serum C-peptide concentrations poorly phenotype type 2 diabetic end-stage renal disease patients. *Kidney Int.* Oktober 2000;58(4):1742–50.
 174. Guettet C, Rostaqui N, Navarro N, Lecuyer B, Mathe D. Effect of Chronic Glucagon Administration on the Metabolism of Triacylglycerol-Rich Lipoproteins in Rats Fed a High Sucrose Diet. *J Nutr.* 1. Januar 1991;121(1):24–30.
 175. Caren R, Corbo L. Depression of plasma lipid fractions and inhibition of platelet aggregation by action of glucagon. *Metabolism.* November 1971;20(11):1057–64.
 176. Schaded DS, Philip Eaton R. Modulation of Fatty Acid Metabolism by Glucagon in Man: I. Effects in Normal Subjects. *Diabetes.* 1. Mai 1975;24(5):502–9.
 177. Steiner G, Lewis G. Hyperinsulinemia and Triglyceride-Rich Lipoproteins. *Diabetes.* 1. Juli 1996;45(Supplement_3):S24–6.
 178. Tobey TA, Greenfield M, Kraemer F, Reaven GM. Relationship between insulin resistance, insulin secretion, very low density lipoprotein kinetics, and plasma triglyceride levels in normotriglyceridemic man. *Metabolism.* Februar 1981;30(2):165–71.
 179. Reaven GM. Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, Hypertriglyceridemia, and Hypertension: Parallels Between Human Disease and Rodent Models. *Diabetes Care.* 1. März 1991;14(3):195–202.

180. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B, Steiner G. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J Clin Invest.* 1. Januar 1995;95(1):158–66.
181. Mari A, Tura A, Natali A, Anderwald C, Balkau B, Lalic N, u. a. Influence of Hyperinsulinemia and Insulin Resistance on In Vivo β -Cell Function: Their Role in Human β -Cell Dysfunction. *Diabetes.* 1. Dezember 2011;60(12):3141–7.
182. Otten J, Ahrén B, Olsson T. Surrogate measures of insulin sensitivity vs the hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp: a meta-analysis. *Diabetologia.* 1. September 2014;57(9):1781–8.
183. Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Balas B, DeFronzo RA. Muscle and Liver Insulin Resistance Indexes Derived From the Oral Glucose Tolerance Test. *Diabetes Care.* 1. Januar 2007;30(1):89–94.
184. Tschritter O, Hennige AM, Preissl H, Grichisch Y, Kirchhoff K, Kantartzis K, u. a. Insulin effects on beta and theta activity in the human brain are differentially affected by ageing. *Diabetologia.* Januar 2009;52(1):169–71.
185. Sartorius T, Peter A, Heni M, Maetzler W, Fritsche A, Häring H-U, u. a. The Brain Response to Peripheral Insulin Declines with Age: A Contribution of the Blood-Brain Barrier? *Diabetes Care.* 12. Mai 2015;38(5):e0126804.
186. Al-Massadi O, Fernø J, Diéguez C, Nogueiras R, Quiñones M. Glucagon Control on Food Intake and Energy Balance. *Int J Mol Sci.* 11. August 2019;20(16):3905.
187. Müller TD, Finan B, Clemmensen C, DiMarchi RD, Tschöp MH. The New Biology and Pharmacology of Glucagon. *Physiol Rev.* April 2017;97(2):721–66.
188. Davidson IWF, Salter JM, Best CH. Calorigenic Action of Glucagon. *Nature.* November 1957;180(4595):1124–1124.
189. Chan EK, Mackey MA, Snover DC, Schneider PD, Rucker RD, Eugene Allen C, u. a. Suppression of weight gain by glucagon in obese Zucker rats. *Exp Mol Pathol.* Juni 1984;40(3):320–7.
190. Habegger KM, Stemmer K, Cheng C, Muller TD, Heppner KM, Ottaway N, u. a. Fibroblast Growth Factor 21 Mediates Specific Glucagon Actions. *Diabetes.* 1. Mai 2013;62(5):1453–63.
191. Kim T, Nason S, Holleman C, Pepin M, Wilson L, Berryhill TF, u. a. Glucagon Receptor Signaling Regulates Energy Metabolism via Hepatic Farnesoid X Receptor and Fibroblast Growth Factor 21. *Diabetes.* September 2018;67(9):1773–82.

192. Nair KS. Hyperglucagonemia Increases Resting Metabolic Rate In Man During Insulin Deficiency*. *J Clin Endocrinol Metab.* Mai 1987;64(5):896–901.
193. Calles-Escandón J. Insulin dissociates hepatic glucose cycling and glucagon-induced thermogenesis in man. *Metabolism.* Juli 1994;43(8):1000–5.
194. Wynne K, Park AJ, Small CJ, Meeran K, Ghatgei MA, Frost GS, u. a. Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: a randomised controlled trial. *Int J Obes.* Dezember 2006;30(12):1729–36.
195. Sánchez-Garrido MA, Brandt SJ, Clemmensen C, Müller TD, DiMarchi RD, Tschöp MH. GLP-1/glucagon receptor co-agonism for treatment of obesity. *Diabetologia.* Oktober 2017;60(10):1851–61.

7 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Birkenfeld als Stellvertreter für die Medizinische Klinik IV sowie das Institut für Diabetes und Metabolismus Forschung des Helmholtz Zentrum München an der Universität Tübingen.

Ganz besonders dankbar bin ich meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Robert Wagner für die unermüdliche Unterstützung und hervorragende Betreuung von Beginn der Planung bis zum Abschluss der Studie. Er stand mir jederzeit sowohl bei der technischen Durchführung der Versuche, als auch bei der anschließenden statistischen Auswertung der Daten mit Rat und Tat zur Seite.

Maike Borutta, Ines Wagener, Andreas Vosseler, Dr. Louise Fritsche, Dr. Corinna Dannecker sowie Judith Leonie Nono danke ich für die intensive Unterstützung bei der Probandenbetreuung, der Durchführung der Versuche und der Arbeit im Labor zur Glukagonkonzentrationsbestimmung. Vor allem Maike Borutta und Ines Wagener möchte ich für die vielen gemeinsam verbrachten Tage im MRT-Schaltraum, ihre Geduld im Umgang mit den Probanden, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und anhaltende Hilfsbereitschaft danken.

Meinem Partner Julius möchte ich danken für seine Geduld, seinen Zuspruch und die vielen Gelegenheiten, in denen er mir mit technischen Ratschlägen zur Seite stand. Meinen Eltern und meiner Schwester für ihre scharfen Augen und meiner gesamten Familie für ihre Unterstützung auf dem Weg zu dieser Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt allen Studienteilnehmern, die mit ihrer Geduld und ihrem Interesse die Durchführung dieser Studie und unsere Ergebnisse erst möglich gemacht haben.

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik IV unter Betreuung von Prof. Robert Wagner durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Prof. Robert Wagner.

Die Vorbereitung der Probanden, die oralen Glukosetoleranztests mit Infusion von Glukagon- oder Placebolösung sowie fMRT-Messungen wurden von mir in Zusammenarbeit mit Prof. Robert Wagner, Maike Borutta und Ines Wagener durchgeführt. Die indirekte Kalorimetrie wurde abwechselnd durch wissenschaftliche Mitarbeiter des Instituts für Diabetes und Metabolismus Forschung des Helmholtz Zentrum München an der Universität Tübingen durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Prof. Robert Wagner eigenständig durch mich.

Ich versichere das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den