

Diplomarbeit

**Vergleich von Nüchternglukagonwerten bei
Patienten und Patientinnen mit Diabetes Mellitus
Typ-1 und Typ-2, sowie gesunden Kontrollen**

eingereicht von

Maximilian Haberland

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Harald Sourij

&

MSc. Martina Brunner

Medellin, 10.01.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Medellin, am 10.01.2017

Maximilian Haberlander eh

Vorwort und Danksagungen

Da viele Fachausdrücke und medizinische Grundlagen nicht erklärt werden, erleichtert medizinisches Vorwissen das Verständnis dieser Arbeit. Als geschlechtergerechte Formulierung wird das Binnen-I bevorzugt, wenn dies nicht möglich ist wird auf die Paarform ausgewichen.

Mein Dank gilt Herrn Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Harald Sourij für die Bereitstellung des Themas und Frau Martina Brunner, MSc für die Anleitung und Unterstützung bei den Messungen. Beide haben mich bei der Ausführung der Diplomarbeit sehr unterstützt und beantworteten jede Frage ausführlich und verständlich. Auch für die Korrektur möchte ich mich bei beiden bedanken.

Zudem möchte ich meinen Eltern Albert und Adelheid danken, ohne deren Unterstützung ein Abschluss dieses Studiums nicht möglich gewesen wäre.

Aus der Studienzeit in Graz behalte ich viele schöne Erinnerungen, Freunde und Bekanntschaften, die mich hoffentlich noch lange begleiten werden.

Auch bei der Medizinischen Universität Graz möchte ich mich für die Ermöglichung des Studiums und die Anerkennung meiner Auslandsaufenthalte bedanken.

Nun wünsche ich viel Erkenntnisgewinn beim Lesen dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Einleitung: Glukagon ist ein, von den Alpha-Zellen des Pankreas produziertes, Hormon, das oftmals als Gegenspieler von Insulin bezeichnet wird, da es, im Gegensatz zu Insulin, den Blutzuckerspiegel erhöht und damit einer Hypoglykämie entgegenwirken kann. Da erst seit kurzem ein ausreichend spezifischer und sensibler Glukagon-ELISA vorhanden ist, werden mit diesem die Nüchternglukagonwerte von Patienten und Patientinnen mit Diabetes Mellitus Typ-1 und Typ-2, sowie gesunden Probanden und Probandinnen bestimmt und mit einem bisher üblichen RIA verglichen.

Methoden: Es wurden jeweils 20 Nüchternblutproben von gesunden Probanden und Probandinnen, sowie Patienten und Patientinnen mit Typ-1 und Typ-2 Diabetes gesammelt. Aus diesen wurden Glukagon, Glukose und HbA_{1c} bestimmt. Für die Glukagonbestimmung wurde ein ELISA der Firma Mercodia (10-1271-01) und ein RIA der Firma MP Biomedicals (07-152101) verwendet.

Ergebnisse: Gesunde hatten im Mittel eine Nüchternglukagonkonzentration von 7,6 pmol/l (\pm 2,5 pmol/l), Typ-1 DiabetikerInnen im Mittel eine von 9,8 pmol/l (\pm 8,3 pmol/l) und Typ-2 DiabetikerInnen im Mittel eine von 16,2 pmol/l (\pm 11,9 pmol/l). Die Typ-2 DiabetikerInnen zeigten signifikant ($p < 0,05$) höhere Glukagonwerte als die gesunden Kontrollen. Die Messwerte des RIAs waren im Mittel 77,7 pmol/l (\pm 30,3 pmol/l) höher als die des ELISAs.

Diskussion: Die Typ-2 DiabetikerInnen zeigten im Mittel eine Nüchternhyperglukagonämie, die Typ-1 DiabetikerInnen hingegen hatten normale Nüchternglukagonwerte die vergleichbar mit denen von nichtdiabetischen Personen sind. Als Ursachen für die beobachtete Hyperglukagonämie der Typ-2 DiabetikerInnen kommen eine Insulinresistenz von Alpha-Zellen, eine extrapankreatische Glukagonsekretion oder eine Störung der juxta- bzw. parakrinen Regulation in der Langerhans-Insel in Frage. Der verwendete RIA scheint für die Bestimmung von physiologischen Glukagonwerten inakkurat zu sein.

Abstract

Introduction: Glucagon, a hormone produced by the alpha-cells of the pancreas, is often called the antagonist of insulin because it elevates blood-sugar-levels and therefore can avoid hypoglycemia, in contrast to insulin. Because a sufficiently sensitive and specific glucagon-ELISA is available only recently, the fasting glucagon levels of type-1 diabetics, type-2 diabetics and healthy subjects were determined with it and compared with a RIA.

Methods: 20 blood samples of each group were collected under fasting conditions. Glucagon, glucose and HbA_{1c}-levels were determined. Glucagon was measured with an ELISA (10-1271-01) by the company Mercodia and a RIA by the company MP Biomedicals (07-152101).

Results: Healthy subjects had average fasting-glucagon-levels of 7.6 pmol/l (\pm 2.5 pmol/l), type-1 diabetics had levels of 9.8 pmol/l (\pm 8.3 pmol/l) and type-2 diabetics had levels of 16.2 pmol/l (\pm 11.9pmol/l). Type-2 diabetics showed significantly ($p < 0.05$) higher glucagon-levels than healthy subjects. Glucagon-levels measured by RIA were 77.7 pmol/l (\pm 30.3 pmol/l) higher on average than measured by ELISA.

Discussion: Type-2 diabetics showed hyperglucagonaemia, however type-1 diabetics presented with normal fasting-glucagon-levels. Reasons for the observed hyperglucagonaemia in type-2 diabetics could be alpha-cell insulin-resistance, an extrapancreatic source of glucagon, glucagon-producing beta cells or juxtakrine or paracrine dysregulation in the islet of Langerhans. The used RIA has proven to be inaccurate in the measurement of glucagon-levels in the physiological range.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort und Danksagungen	II
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Glukosehomöostase und Glukagon	2
1.2 Diabetes Mellitus und Glukagon	4
1.2.1 Aufbau der Langerhans-Insel	5
1.2.2 Regulation in der Langerhans-Insel	7
1.2.3 Glukagondysregulation bei Diabetes Mellitus	7
1.2.4 Glukagon in der Pathogenese des Diabetes Mellitus	11
1.3 Glukagon als therapeutisches Target	12
1.3.1 Biguanide	12
1.3.2 SGLT-2 Inhibitoren, die Gliflozine	13
1.3.3 GLP-1-Rezeptoragonisten und DPP-4 Inhibitoren	13
1.3.4 Glukagonrezeptor-Antagonisten und Antikörper	14
1.4 Probleme bei der Messung von Glukagon	14
1.4.1 Biosynthese des Glukagons	14
1.4.2 Immunoassays für die Glukagonbestimmung	16
2 Methoden	19
2.1 Rekrutierung der StudienteilnehmerInnen	19
2.2 Probengewinnung, -verarbeitung und -lagerung	20
2.3 Glukagonmessung	21
2.4 Glukosemessung und weitere erhobene Parameter	22
2.5 Statistische Auswertung	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Nüchternglukagonwerte bei Messung mit Mercodia-ELISA	24
3.2 Vergleich von Glukagon mit diabetesrelevanten Parametern	25
3.3 Vergleich von ELISA und RIA	27
4 Diskussion	30
4.1 Nüchternhyperglukagonämie bei Typ-2 Diabetes	30
4.2 Mögliche Gründe für die Hyperglukagonämie	31

4.3	Unzureichende Messgenauigkeit des verwendeten RIAs	32
5	Literaturverzeichnis.....	34

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa, ungefähr, schätzungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay
GLP-1	Glucagon-Like-Peptide-1
GLP-2	Glucagon-Like-Peptide-2
GR	Glukagon-Rezeptor
GRA	Glukagon-Rezeptor-Antikörper
NGT	Normale Glukosetoleranz
NTS	Nukleus Traktus Solitarii
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus (Typ-1 Diabetes)
IP2	Intervening Peptide 2
PC-2	Prohormon Konvertase-2
PC-1/3	Prohormon Konvertase-1/3
RIA	Radioimmunoassay
SGLT	Natrium (Sodium)-abhängiger Glukose-Transporter
T2DM	Typ-2 Diabetes Mellitus
ZNS	Zentrales Nervensystem
±	Standardabweichung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glukagonkonzentration in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration (14).	3
Abbildung 2: Klassisches Konzept der Langerhans-Insel, modifiziert nach (22).....	6
Abbildung 3: Mögliche Zytoarchitektur der Langerhans-Insel (24).....	6
Abbildung 4: Glukagon- und Insulinsekretion nach kohlenhydratreicher Nahrung bei Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen (T2DM) und Probanden mit normaler Glukosetoleranz (NGT), modifiziert nach (31,44).....	9
Abbildung 5: Glukagonsekretion nach gemischter Mahlzeit bei Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen (T2DM) und Probanden und Probandinnen mit normaler Glukosetoleranz (NGT), modifiziert nach (45).....	9
Abbildung 6: Glukosekonzentration (links) und hepatische Glukoseproduktion (rechts) bei normaler Insulinsekretion (A) und Typ-2-diabetischer Insulinsekretion (B), modifiziert nach (32).....	10
Abbildung 7: Posttranslationale Modifikation von Proglukagon (70).....	15
Abbildung 8: Strukturelle Ähnlichkeit von Glicentin, Oxyntomodulin und Glukagon, die Aminosäuresequenz von Glukagon wurde im Einbuchstabencode dargestellt (70,74).....	16
Abbildung 9: Mercodia-Antikörper für den Sandwich-ELISA, die Aminosäuresequenz von Glukagon wurde im Einbuchstabencode dargestellt (70,74,77).....	17
Abbildung 10: Boxplot mit den Nüchternglukagonkonzentrationen bei Messung mit Mercodia-ELISA.....	25
Abbildung 11: Gegenüberstellung von Nüchternglukagonkonzentration, bei Messung mit ELISA, und Nüchternglukosekonzentration.....	25
Abbildung 12: Gegenüberstellung von Nüchternglukagonkonzentration, bei Messung mit ELISA, und HbA1c.....	26
Abbildung 13: Gegenüberstellung von Nüchternglukagonkonzentration, bei Messung mit ELISA, und Diabetesdauer in Jahren.....	27
Abbildung 14: Vergleich der Nüchternglukagonkonzentrationen bei Messung mit ELISA und RIA.....	28
Abbildung 15: Bland-Altman-Diagramm zum Vergleich von ELISA und RIA.....	29

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien für manifesten Diabetes Mellitus und erhöhtes Diabetes-Risiko (16,18).....	5
Tabelle 2: Epidemiologische Daten der StudienteilnehmerInnen.	20
Tabelle 3: Messdaten zur Nüchternglukagonkonzentration bei Messung mit Mercodia-ELISA.	24
Tabelle 4: Vergleich der Messdaten zu den Nüchternglukagonkonzentrationen bei Messung mit Mercodia-ELISA und MP Biomedicals-RIA.	27

1 Einleitung

Glukagon ist ein, von den Alpha-Zellen des Pankreas produziertes Hormon, welches durch posttranslationale Modifikation aus der Peptidvorstufe Präproglukagon entsteht. Es wird oftmals als Gegenspieler von Insulin bezeichnet, da es, im Gegensatz zu Insulin, durch Aktivierung der hepatischen Glukoseproduktion den Blutzuckerspiegel erhöht, um so einer Hypoglykämie entgegenzuwirken (1). Dass Glukagon bei der Entstehung von Diabetes eine wichtige Rolle spielt, ist mittlerweile bekannt, weshalb Glukagon als wichtiges potentiell therapeutisches Target in Betracht gezogen wird (2-5).

Dies setzt jedoch voraus, dass physiologische und molekularbiologische Grundlagen beziehungsweise Abläufe bis in kleinste Detail verstanden werden. Aufgrund unspezifischer und nicht ausreichend empfindlicher Methoden war es lange Zeit nicht möglich, Glukagon entsprechend sensitiv und zuverlässig aus dem Plasma zu messen. Diese Problematik des Nichtvorhandenseins spezifischer Methoden konnte erst vor kurzem gelöst werden, weshalb bis zum jetzigen Zeitpunkt keine zuverlässigen und glaubwürdigen Daten zu Glukagon-Plasmawerten in Patienten und Patientinnen mit Typ-1 und Typ-2 Diabetes, sowie Stoffwechselgesunden vorliegen (6,7).

In dieser Arbeit werden daher mit Hilfe eines hoch-spezifischen und sensitiven Glukagon Sandwich-ELISAs die Nüchternglukagonkonzentrationen von Typ-1 und Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen, wie auch Gesunden bestimmt. Zusätzlich soll ermittelt werden, ob es einen möglichen Zusammenhang zwischen den ermittelten Glukagonwerten und weiteren diabetesrelevanten Parametern, wie Diabetesdauer, Glukose- und HbA_{1c}- Werten, gibt. Um zusätzlich die Auswirkung von unterschiedlichen Analysemethoden auf die Messergebnisse zu demonstrieren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Immunoassays für die Glukagonbestimmung miteinander verglichen.

1.1 Glukosehomöostase und Glukagon

Bei Gesunden beträgt der Glukosespiegel während eines Zeitraumes von 24 Stunden beträgt durchschnittlich 90 mg/dl (5 mmol/l) und bleibt stets über 55 mg/dl (3,0 mmol/l), nach beispielsweise Sport oder 60 Stunden ohne Nahrungsaufnahme. Nach Nahrungsaufnahme übersteigen die Glukosewerte normalerweise nicht 165 mg/dl (ca. 9,0 mmol/l) (1).

Glukose ist, neben Ketonkörpern bei längerer Zeit ohne Nahrungsaufnahme, die Hauptenergiequelle des Gehirns. 45 - 60 % der im Körper verbrauchten Glukose wird vom Gehirn aufgenommen. Der Rest wird von Skelettmuskulatur, Nieren, Blutzellen, Bauchorganen und Fettgewebe verbraucht (8). Das Gehirn kann keine Glukose produzieren oder lagern und begegnet deshalb einer Abnahme der Glukosekonzentration von 20 mg/dl (1 mmol/l) (von 70 mg/dl (4 mmol/l) auf 50 mg/dl (3 mmol/l)) mit einer Gegenregulation. Es veranlasst die Sekretion von Hormonen, die den Glukosespiegel erhöhen, wie Glukagon, Katecholamine, Kortisol und Wachstumshormone (1).

Ebenso wie eine Hypoglykämie dem Gehirn schadet hat auch eine chronische Hyperglykämie negative Auswirkungen auf unterschiedliche Organe. Deshalb ist es wichtig die Glukosekonzentration in einem engen Bereich zu halten. Insulin und Glukagon sind zwei wichtige Regulatoren der Glukosekonzentration (1).

Insulin stimuliert die Glykogensynthese und fördert die Glukoseaufnahme in insulinabhängige Zellen. Es wird bei hohen Glukosewerten vermehrt sezerniert und bei niedrigen Glukosewerten wird dessen Sekretion gehemmt (1).

Im Gegensatz dazu steht Glukagon, dessen Hauptaufgabe es ist einer Hypoglykämie entgegenzuwirken, indem es den Abbau von Glykogen, die Glykogenolyse, und die Glukoneogenese in der Leber steigert und somit den Blutzuckerspiegel erhöht. Es wird daher oftmals als Gegenspieler von Insulin bezeichnet (9).

Nach Injektion von Glukagon beispielsweise reagiert die Leber mit einer raschen Stimulation der Glykogenolyse, die Glukoneogenese verändert sich nur unwesentlich. In einem Experiment an Hunden konnte gezeigt werden, dass die hepatische Glukoseproduktion nach erfolgter Glukagoninjektion mehr als 3-mal so hoch ist (10).

Glukagon ist für ca. 40 bis 50 % der hepatischen Glukoseproduktion verantwortlich und somit wichtig zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Glukosespiegels

(11). Dies konnte durch Studien gezeigt werden in denen durch die Infusion von Somatostatin die Glukagon- und Insulinsekretion gehemmt und Insulin ersetzt wurde. Daraufhin nahm nach kurzer Zeit die hepatische Glukoseproduktion und die Glukosekonzentration ab (12,13).

Glukagon reguliert nicht nur den Glukosespiegel im Blut, es wird von diesem auch im Sinne einer negativen Rückkopplung beeinflusst. Eine akute Hyperglykämie beispielsweise verursacht eine Hemmung und eine akute Hypoglykämie eine Erhöhung der Glukagonsekretion. Abbildung 1 veranschaulicht die Änderung des Glukagonspiegels in Abhängigkeit vom Glukosespiegel. Die hellblaue Kurve zeigt den Verlauf von Glukose und Glukagon bei einer Hyperglykämie, die blaue Kurve mit den Kreisen als Messpunkte zeigt den Verlauf bei einer Euglykämie, die dunkelblaue Kurve zeigt den Verlauf bei einer Hypoglykämie. Man erkennt den deutlichen Anstieg der Glukagonkonzentration nach Erzeugung einer Hypoglykämie und die Senkung der Glukagonkonzentration nach Erzeugung einer Hyperglykämie (14).

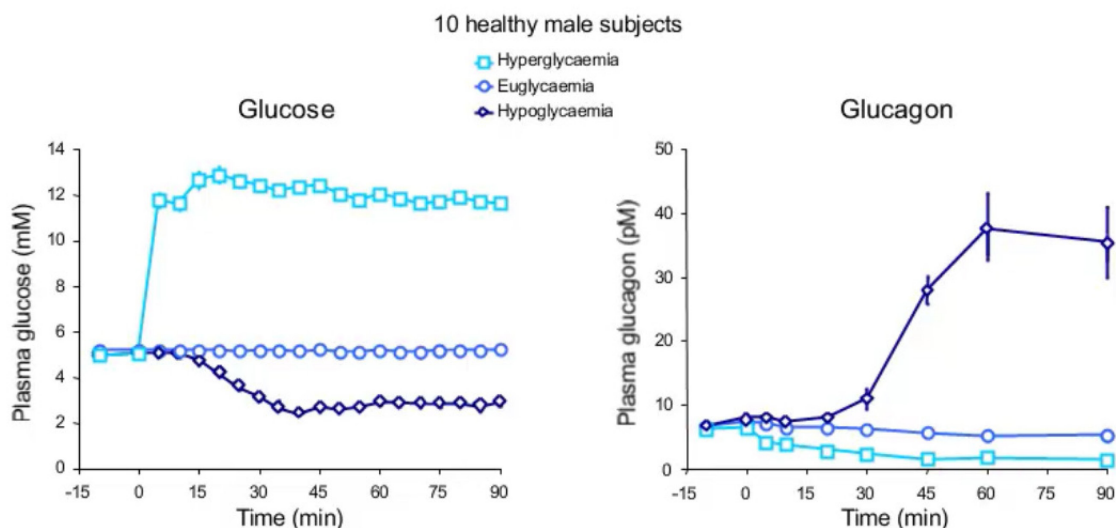


Abbildung 1: Glukagonkonzentration in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration (14).

Die Glukosehomöostase ist zum Beispiel bei Diabetes Mellitus gestört und auch eine Dysregulation der Glukagonsekretion scheint dabei eine Rolle zu spielen. Im folgenden Kapitel wird deshalb der Zusammenhang zwischen Diabetes und Glukagon erläutert.

1.2 Diabetes Mellitus und Glukagon

Schon 1975 postulierten Roger Unger und Lelio Orci ihre bihormonelle Hypothese, mit der sie die Pathogenese des Diabetes erklärten. Sie behaupteten, dass nicht nur der Insulinmangel im Blut, sondern auch eine relative Hyperglukagonämie zum Phänotyp des Diabetes beitragen (15).

Diabetes Mellitus kann nach seiner Ätiologie in unterschiedliche Formen unterteilt werden. Entsprechend der American Diabetes Association (ADA) sind diese Typ-1 Diabetes, Typ-2 Diabetes, andere spezifische Diabetes-Formen und Gestationsdiabetes. Die chronische Hyperglykämie ist ein gemeinsames Merkmal aller Diabetestypen. Sie wird assoziiert mit Langzeitschäden und Funktionseinschränkungen von verschiedenen Organen, hauptsächlich Augen, Nieren, Nerven, Herz und Blutgefäßen. Die klassischen Symptome der schweren Hyperglykämie sind Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust, Sehstörungen und Infektanfälligkeit bis hin zu Ketoazidose oder nicht-ketoazidotischem hyperosmolarem Syndrom (16).

Typ-1 und Typ-2 Diabetes sind die zwei in der Gesamtbevölkerung am häufigsten vorkommenden Formen und auch in dieser Arbeit im Probanden- und Probandinnenkollektiv enthalten. Der Grund für die chronische Hyperglykämie bei Typ-1 Diabetes ist die durch einen Autoimmunprozess bedingte Beta-Zellzerstörung und der damit verbundene absolute Insulinmangel. Bei Typ-2 Diabetes hingegen sind die Insulinresistenz der insulinabhängigen Zellen und der zumindest anfangs relative Insulinmangel, neben einer möglichen Glukagonsekretionsstörung, für die chronische Hyperglykämie verantwortlich (16,17).

Die Diagnose des Diabetes Mellitus wird mit Hilfe von HbA_{1c}-Wert, Nüchternglukosewert, 2-Stunden-Glukosewert nach 75g oralem Glukosetoleranztest (OGTT) oder Nicht-Nüchtern Glukosewert (Random-Glucose) gestellt. Auch ein erhöhtes Diabetes-Risiko kann durch die oben genannten Werte festgestellt werden. In Tabelle 1 werden die Diagnosekriterien für manifesten Diabetes Mellitus und erhöhtes Diabetes-Risiko dargestellt (16).

Tabelle 1: Diagnosekriterien für manifesten Diabetes Mellitus und erhöhtes Diabetes-Risiko (16,18).

	Manifester Diabetes Mellitus	Erhöhtes Diabetes-Risiko
Nicht-Nüchtern-Glukosewert (Random-Glucose)	≥ 200 mg/dl (11,2 mmol/l) + Klassische Symptome oder ≥ 200 mg/dl an 2 Tagen	
Nüchtern-Glukosewert	≥ 126 mg/dl (7 mmol/l) an 2 Tagen	≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/l), aber ≤ 125 mg/dl (6,9 mmol/l) (Abnorme Nüchtern glukose,
2-Stunden-Glukosewert nach 75 g OGTT	≥ 200 mg/dl (11,2 mmol/l) an 2 Tagen	Glukose ≥ 140 mg/dl (7,8 mmol/l), aber ≤ 199 mg/dl (11,0 mmol/l) (Gestörte Glukosetoleranz)
HbA _{1c} -Wert	≥ 6,5 % (48 mmol/mol) an 2 Tagen	≥ 5,7 % (39 mmol/mol), aber ≤ 6,4 % (46 mmol/mol)

Da Typ-1 und Typ-2 Diabetes mit einer Strukturveränderung in der Langerhans-Insel vergesellschaftet sind und diese bei Pathogenese des Diabetes eventuell von Bedeutung ist, wird im folgenden Abschnitt dessen Aufbau beschrieben.

1.2.1 Aufbau der Langerhans-Insel

Die Langerhans-Inseln befinden sich im endokrinen Teil des Pankreas (19). Sie beinhalten jeweils ca. 20-30% Alpha-Zellen, ca. 60% Beta-Zellen, 5-10% Delta-Zellen, PP- und Epsilon-Zellen in geringerer Anzahl (20,21). Es gibt mehrere Konzepte vom Aufbau der Langerhans-Inseln:

Es gibt das klassische Konzept, bei dem sich die Beta-Zellen im Kern und die Alpha- und Delta-Zellen in der Hülle der Langerhans-Insel befinden. Die Arteriolen treten in einer Region der Langerhans-Insel ein, in der sich nur Beta-Zellen befinden. Die Arteriolen teilen sich daraufhin in Kapillaren auf, welche den Blutstrom in die Hülle leiten, wo sich Alpha- und Delta-Zellen befinden. Das Blut fließt darauf folgend in Venolen ab. Somit können Sekretionsprodukte der Beta-Zellen die dem Blutstrom nachfolgenden Alpha- und Delta-Zellen beeinflussen (22). In Abbildung 3 wird dieses Konzept dargestellt. Das Gebiet der Beta-Zellen wurde in rot, das Gebiet der Alpha- und Delta-Zellen in grün dargestellt.

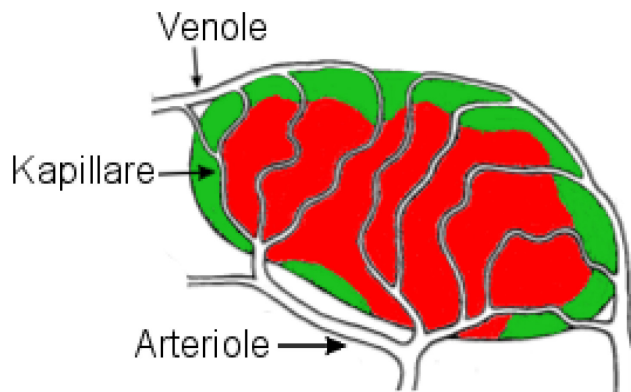


Abbildung 2: Klassisches Konzept der Langerhans-Insel, modifiziert nach (22).

Die Untersuchungen für dieses Konzept wurden an Nagetieren durchgeführt, die Zytoarchitektur der Langerhans-Insel von Menschen unterscheidet sich jedoch von der der Nagetiere (23).

Ein neueres Konzept beschreibt eine andere Durchblutungssituation. Es besagt, dass die Langerhans-Insel trilaminar aufgebaut ist, mit einer Schicht Alpha-Zellen (grün), einer Schicht Beta-Zellen (rot) und wieder einer Schicht Alpha-Zellen (grün), umgeben von Blutgefäßen, wie in Abbildung 3 verdeutlicht wird. In sich zusammengerollt ergibt sich die dreidimensionale Kugelstruktur der Langerhans-Insel (24).

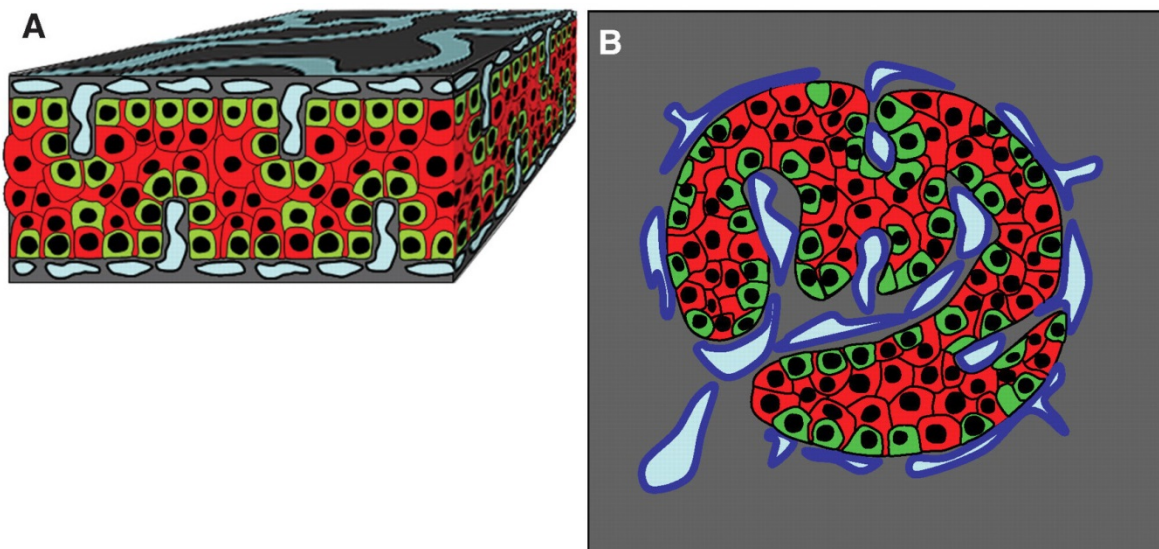


Abbildung 3: Mögliche Zytoarchitektur der Langerhans-Insel (24).

Somit erreicht der Blutstrom, und damit die Information der Konzentrationsänderung der Glukose im Blut zuerst die Alpha-Zellen und erst später die Beta-Zellen (14,24). In diesem Konzept sitzt jede Zelle der Langerhans-Insel an einem festgelegten bestimmten Ort. Dadurch wird gewährleistet, dass die gegenseitige Beeinflussung untereinander einwandfrei funktioniert. Die Alpha-Zellen beispielsweise

findet man immer an der Seite von Beta-Zellen vor, die diese meistens auch noch ummanteln, was auch für eine juxtakrine Regulation der Glukagonsekretion spricht (24).

1.2.2 Regulation in der Langerhans-Insel

Da man vermutet, dass eine Dysregulation der Glukagonsekretion einen Teil zur Hyperglykämie bei Diabetes beiträgt, ist es wichtig die parakrine Regulation der Glukagonsekretion in der Langerhans-Insel zu erläutern.

Insulin, ein Sekretionsprodukt der Beta-Zellen ist ein wichtiger Regulator der Sekretion von Glukagon, es hemmt dessen Ausschüttung und wird bei hohen Blutglukosewerten und kohlenhydratreicher Nahrung ausgeschüttet. Die Insulinsekretion ist bei Typ-1 Diabetes nicht vorhanden und bei Typ-2 Diabetes gestört (25). Der Insulineinfluss auf Alpha-Zellen wurde durch zahlreiche Studien belegt, welche beispielsweise Insulin in vitro durch Antikörper blockierten, wodurch in weiterer Folge ein Anstieg des Glukagonspiegels beobachtet werden konnte. Die Abnahme der Insulinproduktion durch Zerstörung von Beta-Zellen, hervorgerufen durch Substanzen, die toxisch auf Beta-Zellen wirken, bewirkt ebenfalls eine Zunahme der Glukagonsekretion im Tiermodell (26). Des Weiteren exprimieren Alpha-Zellen Insulinrezeptoren, weshalb durch die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor auf der Alphazelle, die Glukagonsekretion gehemmt werden kann. Dies erfolgt über eine Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Konzentration (27).

Der zweite wichtige Regulator von Glukagon ist Somatostatin, welches in den Delta-Zellen der Langerhans-Insel produziert wird. Es hemmt durch Bindung an einen, an den Alpha-Zellen lokalisierten Rezeptor die Glukagonsekretion. Dies konnte durch die Applikation eines Somatostatin-Agonisten gezeigt werden (28). Somatostatin wird bei einer Erhöhung der Glukosekonzentration ausgeschüttet und ist zusammen mit Insulin ein wichtiger Inhibitor der Glukagonsekretion (27).

1.2.3 Glukagondysregulation bei Diabetes Mellitus

Die chronische Hyperglykämie bei Diabetes Mellitus wird verursacht durch eine Dysregulation von Insulin und möglicherweise Glukagon. Während der relative oder absolute Insulinmangel bei Typ-1 und Typ-2 Diabetes gut erforscht und verstanden ist, wirft der Einfluss von Glukagon noch einige Fragen auf. Es wurde vielfach eine Hyperglukagonämie bei Typ-1 Diabetes(29,30) und Typ-2(17,30-33)

Diabetes postuliert. Wobei andere Quellen diese nicht feststellen konnten (29,34). Diese Messungen wurden mit Messmethoden durchgeführt, die nicht spezifisch sind für Glukagon (6,7,35,36). Es wird hier jedoch davon ausgegangen, dass die Werte zumindest qualitativ richtig sind.

Normalerweise sollte eine Hyperglykämie mit einer Hemmung der Glukagonsekretion einhergehen, wie in Kapitel 1.1 erörtert wurde. Dies wurde allerdings anhand einer akuten Hyperglykämie gezeigt. Deshalb wäre eine Hyperglykämie mit einhergehender Hyperglukagonämie bei Diabetes als paradox zu bezeichnen. Doch ob eine chronische Hyperglykämie auch einen hemmenden Einfluss auf die Glukagonsekretion hat wurde noch nicht untersucht.

Welchen Einfluss eine akute Hyperglukagonämie auf Glukosewerte hat wurde ebenfalls in Kapitel 1.1 erklärt. Wenn man den Glukagonspiegel länger auf einem hohen Niveau hält, also im Sinne einer chronischen Hyperglukagonämie, dann scheint Glukagon immer noch in der Lage zu sein den Glukosespiegel zu erhöhen und verliert nicht seine Wirkung. Dies wurde an Mäusen gezeigt, denen 4 Wochen lang kontinuierlich Glukagon appliziert wurde (37).

Man sollte bei den Glukagonwerten auch noch Umstände berücksichtigen, die Einfluss auf die Glukagonsekretion haben, wie beispielsweise Nüchternheit oder Medikation. Bei Typ-1 und Typ-2 Diabetes beispielsweise scheint eine Insulintherapie in der Lage zu sein die Glukagonkonzentration im Blutplasma zu senken (30).

Für eine erhöhte Nüchternglukagonkonzentration bei Typ-2 Diabetes sprechen einige Quellen (11,38-40). Doch auch die Reaktion der Leber auf erhöhte Glukagonkonzentrationen ist möglicherweise verändert. Die hepatische Glukoseproduktion ist, bei gleicher Glukagonkonzentration, bei Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen höher als bei Gesunden, was auf eine höhere Sensibilität der Leberzellen für Glukagon zurückzuführen sein könnte (41).

Bei Typ-2 Diabetes tritt auch nach Mahlzeiten eine Hyperglukagonämie auf, vermutlich auf Grund der unzureichenden Sekretionshemmung durch Insulin (31,42). Bei stoffwechselgesunden sinkt die Glukagonkonzentration nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit (43). In Abbildung 4 wird die Glukagon- und Insulinsekretion von Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen und Probanden und Probandinnen mit normaler Glukosetoleranz nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit dargestellt.

Man kann die postprandial erhöhte Glukagonsekretion und die gestörte Insulinsekretion bei Typ-2 Diabetes erkennen.

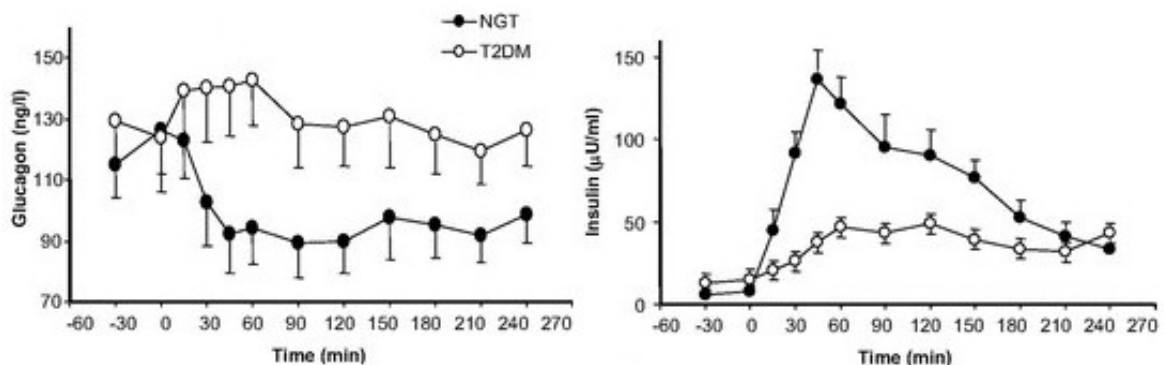


Abbildung 4: Glukagon- und Insulinsekretion nach kohlenhydratreicher Nahrung bei Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen (T2DM) und Probanden mit normaler Glukosetoleranz (NGT), modifiziert nach (31,44).

Nach einer gemischten Mahlzeit zeigen Typ-2 DiabetikerInnen typischerweise eine erhöhte Glukagonsekretion im Vergleich zu Probanden und Probandinnen mit normaler Glukosetoleranz, wie in Abbildung 5 verdeutlicht wird (45).

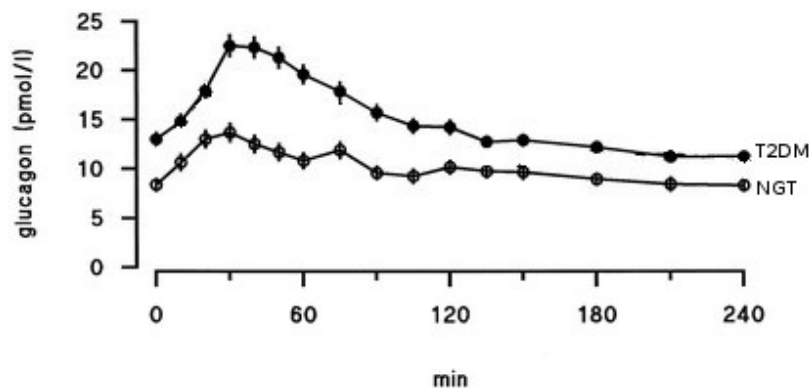


Abbildung 5: Glukagonsekretion nach gemischter Mahlzeit bei Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen (T2DM) und Probanden und Probandinnen mit normaler Glukosetoleranz (NGT), modifiziert nach (45).

Nicht nur postprandial, auch nach Glukosegabe, nach Aminosäureinjektion und nach einer proteinreichen Mahlzeit konnten höhere Glukagon- und Glukosewerte bei Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen als bei Stoffwechselgesunden nachgewiesen werden (46).

Inwieweit sich ein postprandiale Hyperglukagonämie auf die postprandiale Glukosekonzentration auswirkt, konnte an Probanden und Probandinnen gezeigt werden. Bei Ihnen wurden mittels Injektion Typ-2-diabetische und gesunde Glukagon- und Insulinwerte simuliert. Beiden Gruppen wurde zuvor Somatostatin verabreicht

um die körpereigene Glukagon und Insulinsekretion zu hemmen. Es wurde gezeigt, dass die postprandiale Hyperglukagonämie nicht allein für die postprandial höheren Glukosewerte bei Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen verantwortlich ist, sondern auch die gestörte Insulinsekretion eine Rolle spielt. Bei normaler Insulinsekretion kann die hepatische Glukoseproduktion, trotz erhöhter Glukagonsekretion, gehemmt werden. Bei gestörter Typ-2-diabetischer Insulinsekretion überwiegt jedoch die Aktivierung der hepatischen Glukoseproduktion, hervorgerufen durch die höhere Glukagonsekretion, wie in Abbildung 6 illustriert wird (32).

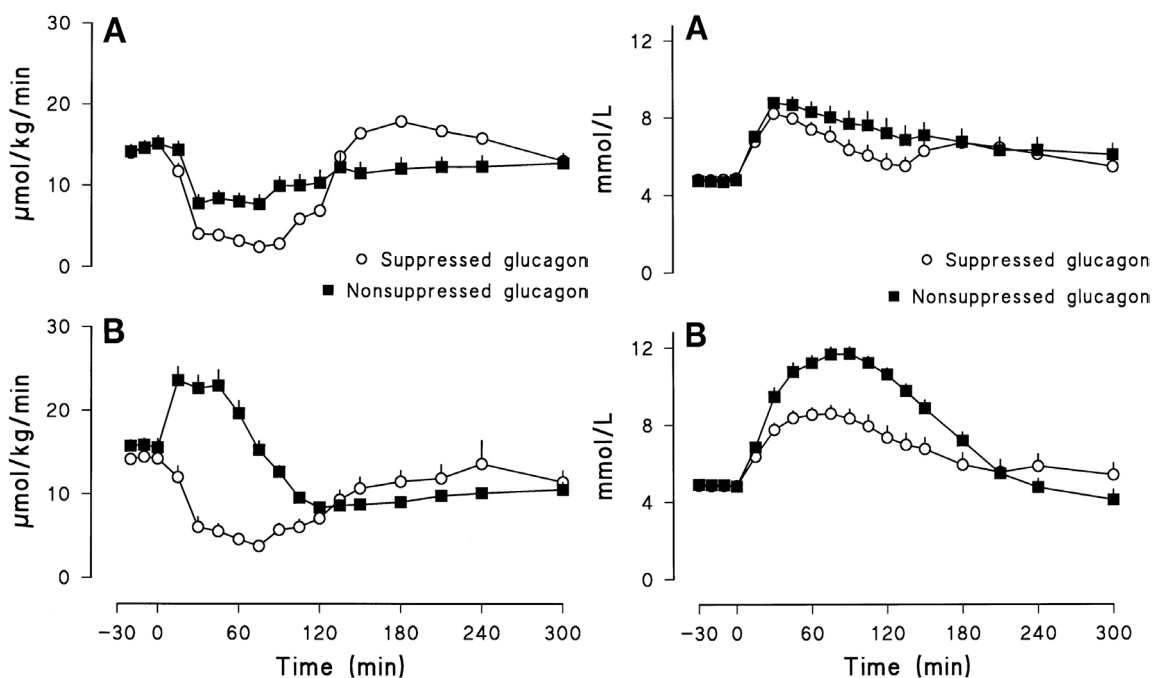


Abbildung 6: Glukosekonzentration (links) und hepatische Glukoseproduktion (rechts) bei normaler Insulinsekretion (A) und Typ-2-diabetischer Insulinsekretion (B), modifiziert nach (32).

Somit ist anzunehmen, dass nicht nur die gestörte insulinvermittelte Aufnahme der Glukose in die Zellen verantwortlich für eine postprandiale Hyperglykämie bei Typ-2 Diabetes ist, sondern auch eine Hyperglukagonämie einen Beitrag zu leisten vermag.

Ein weiteres Zeichen der Glukagon-Dysregulation ist die fehlende Reaktion von Glukagon auf eine Hypoglykämie bei Diabetes Mellitus (47,48). Normalerweise nimmt bei einer Hypoglykämie die Insulinsekretion ab und die Glukagonsekretion zu. Diese Gegenregulation beginnt ab Glukosewerten zwischen 67 – 81 mg/dl (3,7 – 4,5 mmol/l). Bei Typ-1 Diabetes und Typ-2 Diabetes im fortgeschrittenen Stadium, wenn die Insulinsekretion reduziert ist, funktioniert dieser Mechanismus nur

eingeschränkt. Die Insulinkonzentration sinkt nicht, da keine endogene Insulinproduktion vorhanden ist und die Glukagonsekretion erhöht sich nur unwesentlich. Dadurch bleibt die Erhöhung der hepatischen Glukoseproduktion aus und eine Hypoglykämie kann nicht ausgeglichen werden (47). Möglicherweise wird diese Glukagonsekretionsstörung hervorgerufen durch den Wegfall der Senkung der Insulinsekretion in der Langerhans-Zelle (49).

Die Hypoglykämie stellt eine bedeutende Limitation der Blutzuckereinstellung bei Typ-1 Diabetes und auch Typ-2 Diabetes dar (50,51). Eine Glukagon-Dysregulation scheint dabei eine bedeutende Rolle zu spielen.

1.2.4 Glukagon in der Pathogenese des Diabetes Mellitus

Dass die erhöhte Glukagonkonzentration schon früh einen Beitrag zur Pathogenese des Typ-2 Diabetes zu leisten vermag, sieht man daran, dass auch bei Probanden und Probandinnen mit nur gestörter Glukosetoleranz, die Glukagonspiegel postprandial erhöht sind. In einer Studie stellte sich heraus, dass bei Probanden und Probandinnen mit einer gestörten Glukosetoleranz oder einem abnormen Nüchternglukosewert die Glukagonsekretion höher ist als bei der gesunden Vergleichsgruppe (52).

Auch nur eine geringe Störung der Glukosetoleranz verändert die Glukagonsekretion. Dies wurde an gesunden Probanden und Probandinnen beobachtet, bei denen durch eine Glukokortikoidgabe die Glukosetoleranz herabgesetzt wurde und sich darauffolgend auch die postprandiale Glukagonsekretion erhöhte (53). Ebenso konnten bei postmenopausalen Frauen mit gestörter Glukosetoleranz erhöhte Glukagonwerte nach oralem Glukosetoleranztest festgestellt werden (54). Bei postmenopausalen Frauen wurde auch gezeigt, dass, schon vor dem Eintreten einer gestörten Glukosetoleranz, die Glukagonsekretion der Alpha-Zellen erhöht ist. Dies wurde in einer 12 Jahre dauernden Studie untersucht bei der ein Glukose-abhängiger Arginin-Stimulationstest am Beginn, nach 3, 8 und 12 Jahren durchgeführt wurde (55).

Auch die Feststellung, dass bei Glukagonrezeptor, GR-Knockout-Mäusen mit Typ-2 Diabetes keine Hyperglykämie ausgelöst werden kann und bei GR-Knockout-Mäusen ohne Diabetes sich dieser gar nicht erst entwickeln kann, suggeriert, dass Glukagon ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese des

Diabetes Mellitus ist (56). Denn, auch bei Typ-1-diabetischen Mäusen ohne Glukagonrezeptoren kann man weder eine gestörte Glukosetoleranz, noch eine Hyperglykämie feststellen. Wenn man diesen GR-Knockout-Mäusen mit Typ-1 und Typ-2 Diabetes nun kurzzeitig die DNA für den GR in Leberzellen einschleust, exprimieren diese die GR-RNA und somit den Rezeptor. In dieser Zeit zeigen die Mäuse die Krankheitssymptome ihrer jeweiligen Diabetesentität (57). Darüber hinaus normalisiert die Gabe von GR-Antagonisten metabolische Veränderungen in diabetischen Mäusen.(58)

Dass Glukagon einen Teil zu den metabolischen Veränderungen bei Typ-2 Diabetes beitragen könnte, wurde auch an Mäusen gezeigt, denen 4 Wochen lang kontinuierlich Glukagon mit Hilfe einer Pumpe appliziert wurde, um eine Hyperglukagonämie zu erzeugen. Sie zeigten darauffolgend eine Blutdruckerhöhung, eine gestörte Glukosetoleranz und Zeichen von Nierenschädigung (37).

Generell kann man sagen, dass die Wirkung von Glukagon viel zu den metabolischen Veränderungen bei Diabetes Mellitus beiträgt und die Glukagonsekretion scheint schon früh in der Pathogenese des Diabetes verändert zu sein (37,53-55,57-59).

1.3 Glukagon als therapeutisches Target

Da Glukagon die Glukosekonzentration im Blut beeinflussen kann, ist dessen medikamentöse Beeinflussung in der Therapie des Diabetes Mellitus interessant. In den folgenden Absätzen werden einige Wirkstoffe beschrieben, die die Wirkung oder die Sekretion von Glukagon verändern. Das eigentliche Target oder das Ziel ist teilweise nicht Glukagon, da die Hauptwirkung von manchen Substanzen eine andere ist.

1.3.1 Biguanide

Das Biguanid Metformin ist das Mittel der Wahl als orales Antidiabetikum bei übergewichtigen Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen. Metformin senkt die Glukosekonzentration im Blut nicht-insulinotrop und verursacht keine Hypoglykämien (25). Die Biguanide senken die hepatische Glukoseproduktion, also die Glukoneogenese und Glykogenolyse und hemmen die Wirkung von Glukagon auf die Leber (60,61).

Bei Gabe von Metformin an Typ-1 DiabetikerInnen konnten diese ihre benötigte Insulindosis senken, jedoch konnten keine signifikanten Veränderungen bei HbA_{1c}, Gewicht oder Gesamtcholesterin festgestellt werden (62).

1.3.2 SGLT-2 Inhibitoren, die Gliflozine

In der Therapie des Typ-2 Diabetes werden Natrium (Sodium)-abhängige Glukose-Transporter-2 Inhibitoren, SGLT-2 Inhibitoren (Gliflozine), als nicht-insulinotrope orale Antidiabetika verwendet. Der SGLT-2 kommt in den Alpha-Zellen des Pankreas sowie in der Niere vor (63). Dort verringern SGLT-2 Hemmer die Reabsorption von Glukose und verursachen dadurch eine Glukosurie mit resultierender Senkung der Glukosekonzentration im Blut (64). Diese Senkung ist jedoch vergesellschaftet mit einer Erhöhung der hepatischen Glukoseproduktion (65). Für diesen Effekt scheint die gesteigerte Sekretion von Glukagon bei der Gabe von beispielsweise Dapagliflozin verantwortlich zu sein, welche jedoch nur bei physiologischen Glukosewerten vorhanden ist. Bei höheren Glukosekonzentrationen scheinen unspezifischere Glukosetransporter für den Glukosetransport in die Alpha-Zelle auszureichen (63). Ein weiterer Grund für die Erhöhung der hepatischen Glukoseproduktion nach Dapagliflozingabe könnte die gleichzeitige Senkung der Insulinkonzentration sein. Somit sinkt durch die Steigerung der Glukagonsekretion die Insulin-Glukagon-Ratio nach Gabe von SGLT-2 Hemmern. Die glukosesenkende Wirkung ist jedoch immer noch ausreichend gegeben (65).

1.3.3 GLP-1-Rezeptoragonisten und DPP-4 Inhibitoren

GLP-1-Rezeptoragonisten, welche nicht so schnell durch die Dipeptidylpeptidase-4, DPP-4, abgebaut werden können, als auch DPP-4 Inhibitoren, die Gliptine, werden als Therapeutika bei Typ-2 Diabetes verwendet (25).

GLP-1 ist ein sogenanntes Inkretin, das von den L-Zellen der Darmmukosa produziert wird und welches bei Nahrungsaufnahme freigesetzt wird. Es ist in der Lage über eine vermehrte Insulinausschüttung den Blutzucker zu senken (25). GLP-1 hemmt die Glukagonsekretion aus den Alpha-Zellen indirekt über die Stimulation der Somatostatin- und Insulinsekretion, aber auch direkt über, in geringer Anzahl vorhandener, GLP-1-Rezeptoren auf den Alpha-Zellen. Diese insulinunabhängige Wirkung von GLP-1 wird in einer Studie mit Typ-1 Diabetikern und Diabetikerinnen angedeutet, welche C-Peptid negativ waren, also keine endogene Insulinsekretion

mehr vorwiesen und bei denen GLP-1 trotzdem die Glukagonsekretion hemmen konnte (4).

1.3.4 Glukagonrezeptor-Antagonisten und Antikörper

Ein pharmakologischer Weg die Wirkung von Glukagon auszuschalten ist die Hemmung seines Rezeptors, durch Antagonisten oder Antikörper. Dieser Weg wird zurzeit intensiv erforscht. Glukagonrezeptor-Antikörper, GRA, beispielsweise sind in der Lage Euglykämie und normale HbA_{1c}-Werte bei Typ-1 Diabetikern und Diabetikerinnen wiederherzustellen. Sie konnten somit, ohne die Wirkung von Insulin, den Phänotyp des Typ-1 Diabetes im Mausmodell aufheben (58).

Auch bei Typ-2 Diabetes senken GRA die Glukosewerte im Blut und verursachen eine Hyperglukagonämie, ohne Hypoglykämien hervorzurufen. Dies wurde im Affen- und Mausmodell festgestellt (66).

Ebenso in der Lage die Nüchternblutzuckerwerte und die HbA_{1c}-Werte zu senken sind die Glukagonrezeptor-Antagonisten, sie erhöhen ebenfalls die Glukagonkonzentration im Blut. Auch eine Erhöhung von LDL Cholesterin wurde festgestellt, was auf eine vermehrte Resorption aus dem Darm, durch Steigerung der Gallensäurenproduktion, zurückzuführen ist (67). Die Wirkung von GR-Antagonisten wurde auch in mehreren pharmakologischen Studien am Menschen gezeigt (2,3).

Durch die Blockade des GR steigt die Glukagonkonzentration dosisabhängig teilweise um das 4,5-fache an, vermutlich durch einen negativen Feedback-Mechanismus. Auch ein Anstieg der Aminotransferasen wurde festgestellt (2).

Möglicherweise stellt die Beeinflussung der Glukagonwirkung an seinem Rezeptor einen zukünftigen Weg der Diabetestherapie dar.

1.4 Probleme bei der Messung von Glukagon

1.4.1 Biosynthese des Glukagons

Um näher zu bringen, warum es lange Zeit nicht möglich war spezifisch Glukagon aus Plasma zu messen, sollte man zunächst die Biosynthese des Glukagons beschreiben, da diese die strukturellen Besonderheiten des Glukagonmoleküls verdeutlicht.

Die Biosynthese von Glukagon, einem 29 Aminosäuren langen Peptid, erfolgt in den Alpha-Zellen des Pankreas, aus dem Glukagon-Präkursor Proglukagon (68).

Das dazugehörige Gen, das Präproglukagon Gen, wird jedoch nicht nur ausschließlich in den Alpha-Zellen exprimiert, sondern ebenso in den enteroendokrinen L-Zellen der Darmmukosa und den Zellen des Nucleus Tractus Solitarii (NTS) (69). Durch gewebsspezifische, posttranslationale Modifikation werden aus dem Glukagon-Präkursor Proglukagon unterschiedliche glukagonähnliche Produkte prozessiert. Verantwortlich für diese gewebsspezifische Prozessierung sind unterschiedliche Formen des Enzyms Prohormon-Konvertase. In den Alpha-Zellen des Pankreas wird überwiegend Prohormon Konvertase-2 (PC-2) exprimiert, welche, neben anderen biologisch inaktiven Peptiden, Glukagon als einziges bioaktives Peptid produziert. In den Zellen des Nucleus Tractus Solitarii und den enteroendokrinen L-Zellen produziert die Prohormon Konvertase-1/3 (PC-1/3) überwiegend Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1), Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2) und Oxyntomodulin als physiologisch aktive Produkte. Des Weiteren stellt die PC-1/3 Glicentin und das Intervening Peptide 2 (IP2) her (70). Somit ist der Pankreas die Hauptquelle der Glukagonproduktion, jedoch auch die enteroendokrinen L-Zellen und die Zellen des Nucleus Tractus Solitarii wären in der Lage Glukagon zu produzieren, falls diese eine andere Prohormon-Konvertase exprimieren würden. In Abbildung 7 wird die posttranslationale Modifikation des Proglukagons noch einmal schematisch dargestellt.

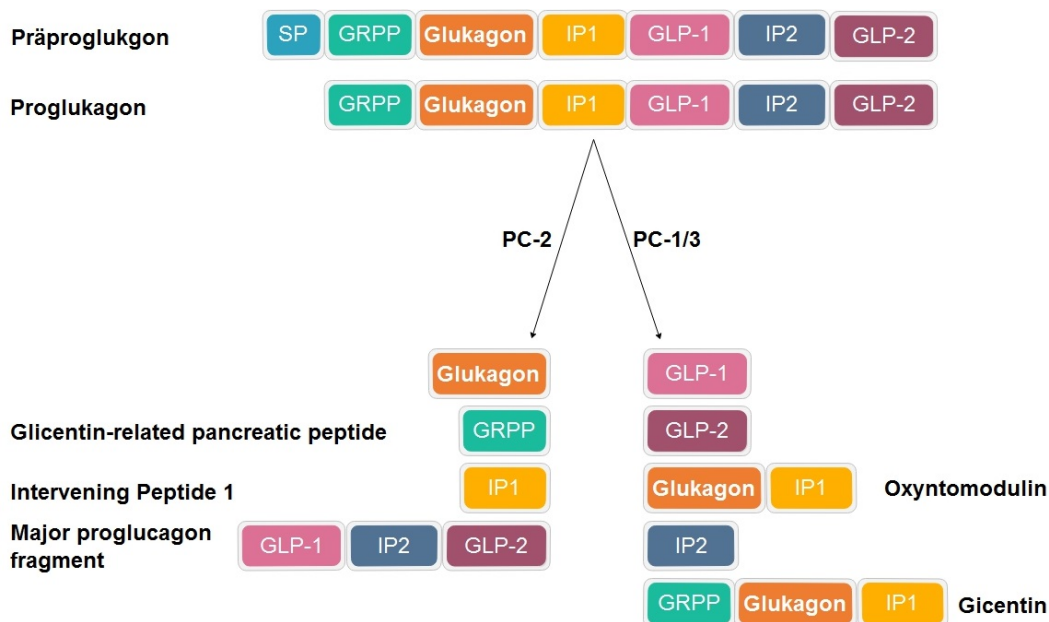


Abbildung 7: Posttranslationale Modifikation von Proglukagon (70).

Glukagon enthält die Aminosäuresequenz (33-61) des Proglukagons. Diese Sequenz ist in den Peptiden Glicentin, mit Aminosäuresequenz (1-69) von Proglukagon, und Oxyntomodulin, mit Aminosäuresequenz (33-69) von Proglukagon, enthalten. Diese strukturellen Ähnlichkeiten und die Tatsache, dass physiologisch aktives Glukagon eine sehr geringe Halbwertszeit (zwischen 5 und 6 Minuten) aufweist, führen dazu, dass die Messung von Glukagon Probleme bereitet (6,71).

1.4.2 Immunoassays für die Glukagonbestimmung

Die erste Messung von Glukagon wurde 1959 von Roger Unger und dessen Team mittels eines Radioimmunoassays, RIA, durchgeführt (72). Es war die zweite radioimmunologische Messung eines Peptids nach Insulin. Für die Durchführung dieser ersten Messung erhielt Rosalyn Yalow 1977 den Nobelpreis.(73)

Die verwendeten Antikörper sind ein wichtiger Bestandteil eines jeden Immunoassays, sei es RIA oder Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay, ELISA. In RIAs für Glukagon werden oftmals Antikörper verwendet, die gegen das C-terminale Ende von Glukagon binden, somit auch in Anwesenheit von Oxyntomodulin und Glicentin, die die Aminosäuresequenz von Glukagon beinhalten, nur mit Glukagon reagieren. Ein Antikörper, der gegen eine Struktur in der Mitte von Glukagon gerichtet ist, würde unspezifisch auch mit Glicentin und Oxyntomodulin reagieren (7). Abbildung 8 verdeutlicht die Ähnlichkeiten.

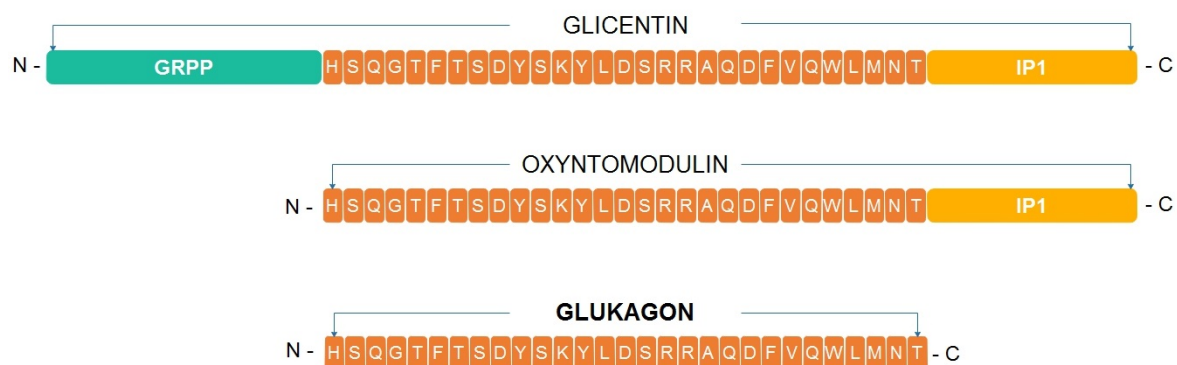


Abbildung 8: Strukturelle Ähnlichkeit von Glicentin, Oxyntomodulin und Glukagon, die Aminosäuresequenz von Glukagon wurde im Einbuchstabencode dargestellt (70,74).

Ein N-terminal verlängertes oder verkürztes Glukagonmolekül würde auch von einem C-terminalen Antikörper gebunden werden. Diese verlängerten oder verkürzten Formen von Glukagon kommen beispielsweise bei terminaler Niereninsuffizienz vor (7). Auch das Hauptabbauprodukt, Glukagon (3-29) und andere Metaboliten von Glukagon würden mit einem C-terminalen Antikörper reagieren.

Eine spezifische Messung von ausschließlich intaktem Glukagon ist somit nicht sicher möglich (75).

Am besten geeignet für die Messung von Glukagon sind Assays die Antikörper verwenden, die gegen das N-terminale und C-terminale Ende von Glukagon gerichtet sind, da dadurch eine Kreuzreaktivität theoretisch weitestgehend ausgeschlossen werden kann (7). Deshalb empfiehlt sich die Verwendung eines Sandwich-ELISAs, dieser misst verkürzte oder verlängerte Formen nicht, wenn er gegen zwei unterschiedliche Stellen, sogenannte Epitope, des Glukagonmoleküls reagiert, die nur im Glukagon (1-29) enthalten sind. Das zu messende Molekül muss bei einem Sandwich-ELISA mit beiden Antikörpern reagieren (76). Der in dieser Diplomarbeit verwendete Sandwich-ELISA der Firma Mercodia, verwendet sowohl einen spezifischen N- als auch einen spezifischen C-terminalen Antikörper, wie in Abbildung 9 illustriert wird (77).

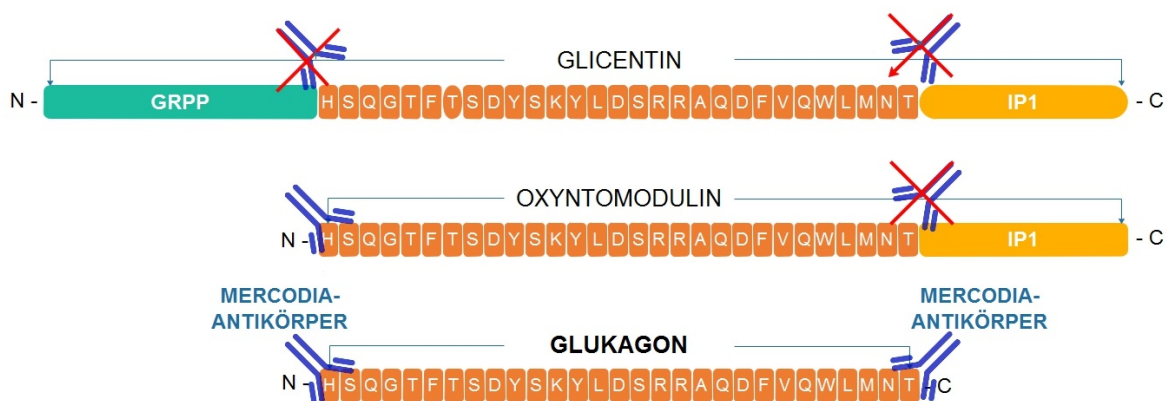


Abbildung 9: Mercodia-Antikörper für den Sandwich-ELISA, die Aminosäuresequenz von Glukagon wurde im Einbuchstabencode dargestellt (70,74,77).

Darüber hinaus ist es empfehlenswert die Stabilität von Glukagon in Proben, durch den Zusatz eines DPP-IV Inhibitors und anderen Proteaseinhibitoren zum K₂EDTA-Blutabnahmeröhrchen, zu erhöhen, dies entspricht dem BD™ P800-Röhrchen. Dadurch kann der Abbau von Glukagon durch diverse Proteasen verhindert und somit eine in-vitro Halbwertszeit von Glukagon bei Raumtemperatur von bis zu 48 Stunden erreicht werden (78). Die Firma Mercodia empfiehlt bei der Verwendung von K₂EDTA-Röhrchen ohne Zusatz und BD™ P800-Röhrchen eine Lagerung bei Raumtemperatur von einer Stunde bzw. von 6 Stunden nicht zu überschreiten (79).

Um die Nüchternglukagonwerte bei gesunden Probanden und Probandinnen, Typ-1 und Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen zu erhalten, wird in dieser Arbeit

der zurzeit spezifischste und sensitivste Glukagon-ELISA verwendet (6,80). Darüber hinaus wird ein RIA der Firma MP Biomedicals, LLC mit dem oben erwähnten ELISA der Firma Mercodia verglichen.

2 Methoden

2.1 Rekrutierung der StudienteilnehmerInnen

Das Projekt wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt und nach den Vorgaben der Helsinki Deklaration durchgeführt. Patienten und Patientinnen mit Typ-1-Diabetes oder Typ-2-Diabetes wurden im Rahmen eines Routinebesuchs an der Diabetesambulanz der Klinischen Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie (LKH-Universitätsklinikum Graz) zur Teilnahme an der Studie eingeladen. Gesunde freiwillige StudienteilnehmerInnen wurden aus der Probanden- und Probandinnendatenbank der CF-Clinical Research Center (Medizinische Universität Graz) rekrutiert.

Alle Patienten, Patientinnen, Probanden und Probandinnen der Studie wurden ausführlich über die Risiken und den Nutzen des Projektes aufgeklärt und unterzeichneten eine Einverständniserklärung.

Entsprechend Allford FP et al., ist mit einer maximalen Differenz im Glukagonspiegel zwischen den untersuchten Gruppen von im Mittel 11 pg/ml zu rechnen (33). Bei einer Power von 80%, einem Alpha von 0,05 und einer Standardabweichung von 12 pg/ml ist bei 3 Gruppen von einer Gruppengröße von zumindest 19 TeilnehmerInnen pro Gruppe auszugehen (Analysis of Variance). Daher wurden insgesamt 60 TeilnehmerInnen, jeweils 20 Typ-1 DiabetikerInnen (15 männlich, 5 weiblich), 20 Typ-2 DiabetikerInnen (12 männlich, 8 weiblich) und 20 Gesunde (7 männlich, 13 weiblich) eingeschlossen.

Folgende relevante Einschlusskriterien für Typ-1- und Typ-2-DiabetikerInnen wurden im Vorfeld definiert:

- Männliche oder weibliche Patienten und Patientinnen im Alter von 18 – 90 Jahren.
- Nüchterer Zustand (mehr als 8 Stunden ohne Kalorienaufnahme) (16).
- Diagnostizierter Typ-1- oder Typ-2-Diabetes, nach Leitlinien der Österreichischen Diabetes Gesellschaft (18).

Folgende relevante Einschlusskriterien für gesunde Probanden und Probandinnen wurden im Vorfeld definiert:

- Männliche oder weibliche Probanden und Probandinnen im Alter von 18 – 90 Jahren.

- Nüchterner Zustand (mehr als 8 Stunden ohne Kalorienaufnahme) (16).
- Keine Diabeteserkrankung oder bekannte Eigenschaften, die die Glukagonkonzentration im Blutplasma verändern, wie Roux-en-Y-Magenbypass, Vagotomie oder Niereninsuffizienz (7).

Tabelle 2: Epidemiologische Daten der StudienteilnehmerInnen.

Probanden- und Probandinnenkategorie		Alter in Jahren	Nüchtern-glukose in [mg/dl]	HbA1c in [mmol/mol]	Diabetes-dauer in Jahren	BMI in [kg/m ²]
Gesund	Mittelwert	29,5	86,8			
	Standardabweichung	± 6,5	± 5,1			
Typ-1 Diabetes	Mittelwert	35,5	160,7	71	18,2	25,5
	Standardabweichung	± 15,6	± 59,0	± 17	± 11,9	± 4,0
Typ-2 Diabetes	Mittelwert	63,6	168,4	64	19,3	28,3
	Standardabweichung	± 8,9	± 56,8	± 14	± 10,2	± 3,0
Gesamtsumme	Mittelwert	42,9	138,6	67	18,7	26,8
	Standardabweichung	± 18,5	± 59,5	± 16	± 10,9	± 3,8

2.2 Probengewinnung, -verarbeitung und -lagerung

Die Probengewinnung zur Bestimmung der Plasma-Glukagonwerte von Typ-1 und Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen erfolgte im Rahmen einer routinemäßigen Blutabnahme in der Diabetesambulanz der Klinischen Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie. Gesunde StudienteilnehmerInnen wurden zur Blutabnahme in die CF-Clinical Research Center, am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (Medizinische Universität Graz) eingeladen. In beiden Fällen erfolgte eine venöse Blutabnahme aus der Armbeuge.

Die Blutabnahmen der DiabetikerInnen erfolgten im Zeitraum von Dezember 2015 bis April 2016, die der gesunden Probanden und Probandinnen erfolgten im April 2016.

Für die Blutabnahme wurden BDTM P800 Blutabnahmeröhrchen (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet. Die Blutabnahmeröhrchen wurden entsprechend der Herstellervorgaben bei 2 - 8°C und vor Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert (81). Die Proben wurden direkt nach der Abnahme 15 Minuten lang bei +4°C und 1200 g zentrifugiert und das Plasma anschließend in entsprechende Cryovials transferiert. Die Probenlagerung erfolgte bis zum Zeitpunkt der Analytik bei ≤ -70°C.

2.3 Glukagonmessung

Zur Messung der Plasma-Glukagonwerte wurden folgende Immunoassays verwendet:

1. Merckodia (AB, Uppsala, Schweden), Glukagon Sandwich-ELISA 10-271-01 (Chargennummer: 23398, Ablaufdatum: 31.10.2016). Der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) beruht auf der direkten Sandwichtechnik, bei der zwei monoklonale Antikörper mit zwei getrennten Bindungsstellen am Glukagonmolekül reagieren. Der N-terminale Glukagon-Antikörper M5F9S ist an eine Mikrotiterplatte gebunden, welche 96 Vertiefungen, sogenannte Wells, aufweist. Der M5F9S Antikörper ist der sogenannte Capture-Antikörper, der das Glukagon-Molekül auf der Mikrotiterplatte zurückhält. Dem Pipettierschema folgend wurden jeweils 25 µl der Kalibratoren, der Kontrollen und der gewonnenen Proben in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Daraufhin wurde der C-terminale Glukagon-Antikörper E6A11K zugegeben und für 19,5 Stunden bei 4-8°C inkubiert, um die Bindung von Glukagon mit den zugegebenen Antikörpern zu ermöglichen. Der E611K Antikörper ist der sogenannte Detection-Antikörper, an dem das Enzym Peroxidase konjugiert wurde und mit dessen Hilfe sich die Glukagonkonzentration messen lässt. Der, nach der Inkubation durchgeführte, Waschschriff entfernt die nichtgebundenen Detection-Antikörper. Danach wurde Tetramethylbenzidin hinzugefügt, welches mit der konjugierten Peroxidase des E611K Antikörpers reagiert. Durch die Zugabe von Säure nach der Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion gestoppt und es entstand ein kolorimetrischer Endpunkt. Dieser wurde mittels Biotech Synergy HT Plate Reader, 450 nm, (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA) mit einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (82,83).
2. MP Biomedicals (LLC, Solon, Ohio, Vereinigte Staaten von Amerika) Glukagon Doppel-Antikörper RIA 07-152101 (Chargennummer: RGLUK1606, Ablaufdatum: 22.06.2016). Bei diesem Radioimmunassay reagiert eine begrenzte Anzahl an Glukagon-Antikörpern mit einem Glukagon-Molekül, welches mit einem Radioisotop konjugiert wurde. Nach Zugabe der gewonnenen Plasmaproben und somit des Glukagons, konkurrierten das radioaktiv

markierte und das zu messende unmarkierte Glukagon um die Bindungsstellen des Antikörpers. Je mehr unmarkiertes Glukagon vorhanden ist, desto weniger radioaktiv markiertes Glukagon wird vom Antikörper gebunden. Nach Extraktion des ungebundenen radioaktiv markierten Glukagons durch verschiedene Reaktionsschritte wird die Radioaktivität des verbliebenen Materials bestimmt. Mit Hilfe einer Standardkurve, welche durch Messung von Standardproben mit bekannter Glukagonkonzentration erstellt wird, kann auf die Glukagonkonzentrationen in den Proben rückgeschlossen werden (84). Es wurden 6 Proben von Typ-1 DiabetikerInnen, 5 Proben von Typ-2 DiabetikerInnen und 5 Proben von gesunden Probanden und Probandinnen für die Vergleichsmessungen herangezogen.

2.4 Glukosemessung und weitere erhobene Parameter

Zur Messung der Glukosekonzentration wurde ein Super GL 2 (Firma Dr. Müller Gerätebau, Freital, Deutschland) verwendet. Die Glukosekonzentration wurde aus einem Plasmaaliquot bestimmt, welches mit dem BD™ P800 Blutabnehmeröhrchen gewonnen wurde. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert beider Messungen herangezogen.

Folgende weitere Parameter wurden von allen Studienteilnehmern und Studienteilnehmerinnen erfragt:

- Geburtsdatum bzw. Alter in Jahren
- Diabetes-Typ (falls zutreffend)
- Diabetesdauer in Jahren (falls zutreffend)
- Geschlecht

Folgende Parameter wurden aus den Patienten- und Patientinnenakten der DiabetikerInnen erhoben:

- Die HbA_{1c}- Werte, welche im Rahmen der routinemäßigen Blutabnahme bestimmt wurden. Sie erfolgte zum selben Zeitpunkt wie die Abnahme zur Glukagonbestimmung.
- BMI, welcher wie folgt errechnet wurde:
$$\text{BMI} = \frac{\text{Gewicht (in kg)}}{(\text{Größe (in m)} \times \text{Größe (in m)})}$$

2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS, Version 22 und 23 von IBM verwendet. Sämtliche Tabellen, Abbildungen und Berechnungen im Kapitel Ergebnisse wurden ebenfalls damit erstellt.

Bei der Gegenüberstellung von Glukagon mit den diabetesrelevanten Parametern wurde eine Pearson-Korrelation durchgeführt und die Effektstärke nach Cohen angegeben. Zur Überprüfung von statistischer Signifikanz wurde ein t-Test bei unabhängigen Stichproben verwendet. Ein p-Wert von kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant eingestuft.

Die Abbildungen 8,9 und 10 wurden mit dem Programm Edraw Max Ger 8.4 erstellt.

Je nach Methode können Laborwerte in verschiedenen Einheiten angegeben werden. Dies trifft auch auf die beiden Messmethoden zur Glukagonbestimmung zu. Um die Glukagonwerte der unterschiedlichen Assays miteinander vergleichen zu können, wurde für die Umrechnung von pg/ml auf mmol/l der Umrechnungsfaktor 0,287 verwendet (85).

3 Ergebnisse

3.1 Nüchternglukagonwerte bei Messung mit Mercodia-ELISA

Die Messung der Nüchternglukagonkonzentration im Blutplasma ergab bei den gesunden Probanden und Probandinnen im Mittel 7,6 pmol/l, bei den Typ-1 Diabetikern und Diabetikerinnen im Mittel 9,8 pmol/l und bei den Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen im Mittel 16,2 pmol/l.

Tabelle 3: Messdaten zur Nüchternglukagonkonzentration bei Messung mit Mercodia-ELISA.

Probanden- und Probandinnen-kategorie	Mittelwert (in pmol/l)	Standard-abweichung (in pmol/l)	Median (in pmol/l)	Minimum (in pmol/l)	Maximum (in pmol/l)	Anzahl
Gesund	7,6	± 2,5	7,0	4,3	13,4	20
Typ-1 Diabetes	9,8	± 8,3	9,2	2,6	41,1	20
Typ-2 Diabetes	16,2	± 11,9	11,8	2,5	46,6	20
Gesamtsumme	11,2	± 9,1	8,5	2,5	46,6	60

Die Werte der Gesunden reichen von 4,3 pmol/l bis 13,4 pmol/l und sind mit einer Standardabweichung von ± 2,5 pmol/l nicht sehr weit gestreut.

Im Gegensatz zu den Typ-1 Diabetikern und Diabetikerinnen, bei Ihnen liegt eine deutliche Streuung mit Werten von 2,6 bis 41,1 pmol/l und einer Standardabweichung von ± 8,3 pmol/l vor. Im Mittel sind die Nüchternglukagonkonzentrationen um 2,2 pmol/l höher als die der Gesunden (nicht signifikant $p > 0,05$) und um 6,4 pmol/l niedriger als die der Typ-2 DiabetikerInnen (nicht signifikant $p > 0,05$). Die Typ-2 DiabetikerInnen hatten signifikant ($p < 0,05$) höhere Werte als die Gesunden, sie hatten im Mittel mehr als doppelt so hohe Werte. Die Standardabweichung von ± 11,9 pmol/l und die hohe Differenz zwischen Minimum und Maximum verdeutlicht, dass es auch in dieser Gruppe eine große Streuung bei den Nüchternglukagonwerten gibt.

Die folgende Darstellung zeigt, dass es in jeder Probandenkategorie Ausreißer nach oben gibt, die weit höhere Werte haben als in ihrer Vergleichskategorie.

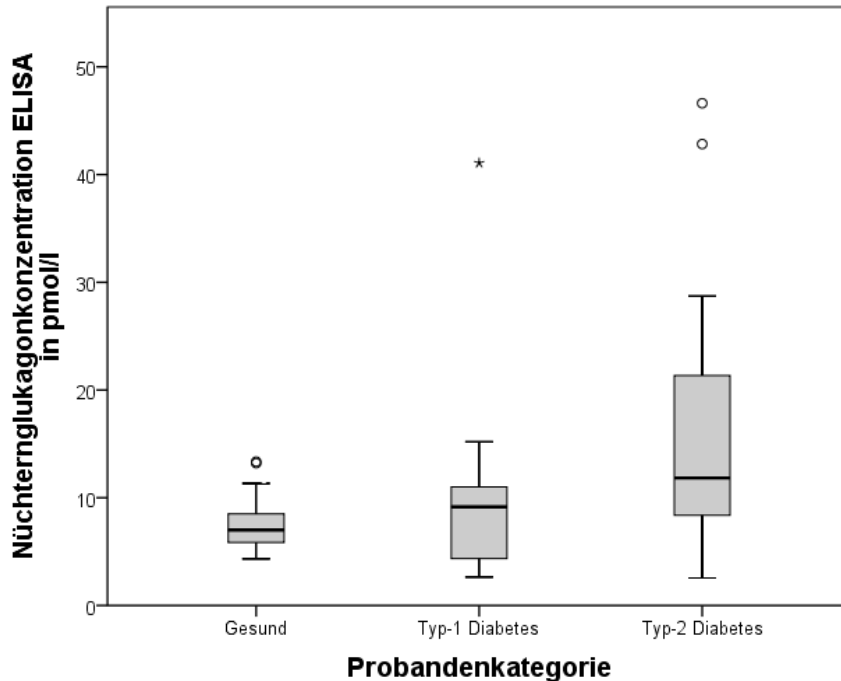


Abbildung 10: Boxplot mit den Nüchternglukagonkonzentrationen bei Messung mit Mercodia-ELISA.

3.2 Vergleich von Glukagon mit diabetesrelevanten Parametern

Die Nüchternglukagon- und Nüchternglukosekonzentrationen der Probanden und Probandinnen korrelieren miteinander, jedoch nur schwach ($p < 0,01$). Das Streudiagramm in Abbildung 11 veranschaulicht die Korrelation.

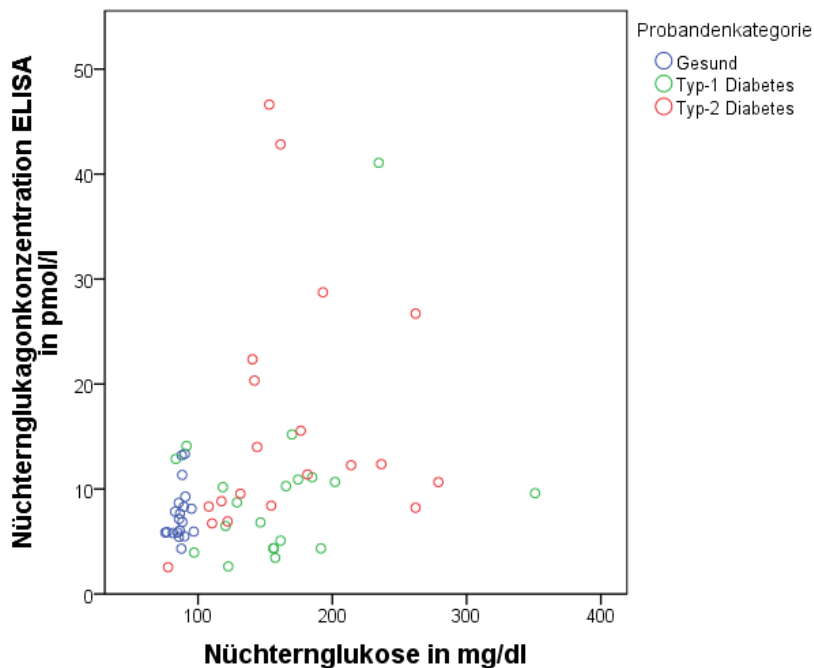


Abbildung 11: Gegenüberstellung von Nüchternglukagonkonzentration, bei Messung mit ELISA, und Nüchternglukosekonzentration.

Im Vergleich von den HbA_{1c}- Werten gibt es eine mittelstarke Korrelation mit den Nüchternglukagonwerten ($p < 0,01$). Festzustellen ist, dass diejenigen mit sehr hohen HbA_{1c}- Werten (> 70 mmol/mol) keine hohen Glukagonwerte hatten. Abbildung 12 verdeutlicht diese Feststellung.

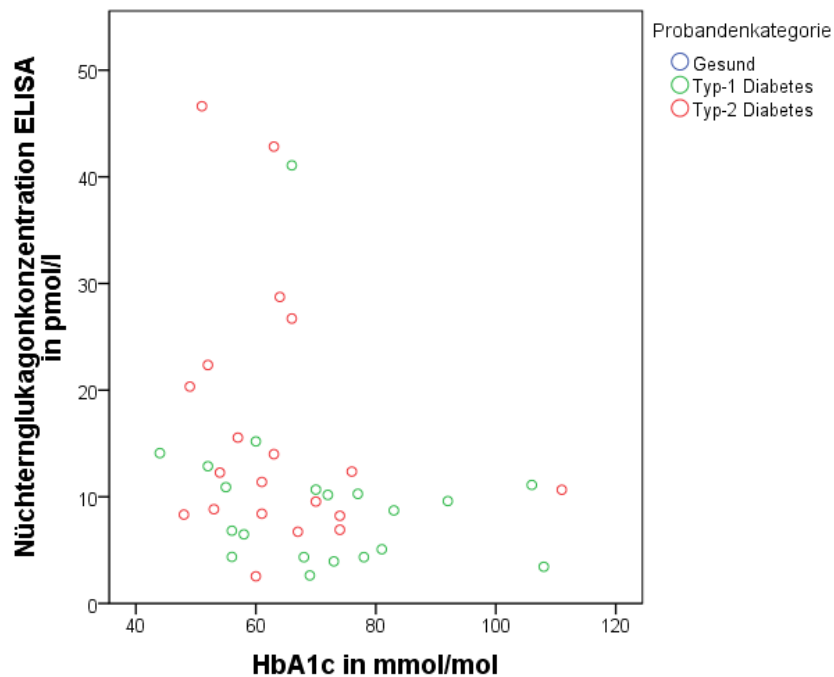


Abbildung 12: Gegenüberstellung von Nüchternglukagonkonzentration, bei Messung mit ELISA, und HbA_{1c}.

Ebenfalls untersucht wurde, ob die Diabetesdauer sich auf die Nüchternglukagonwerte der Patienten und Patientinnen auswirkt. Abbildung 13 veranschaulicht, dass es in dieser Studie keine Korrelation zwischen den beiden oben genannten Werten gibt.

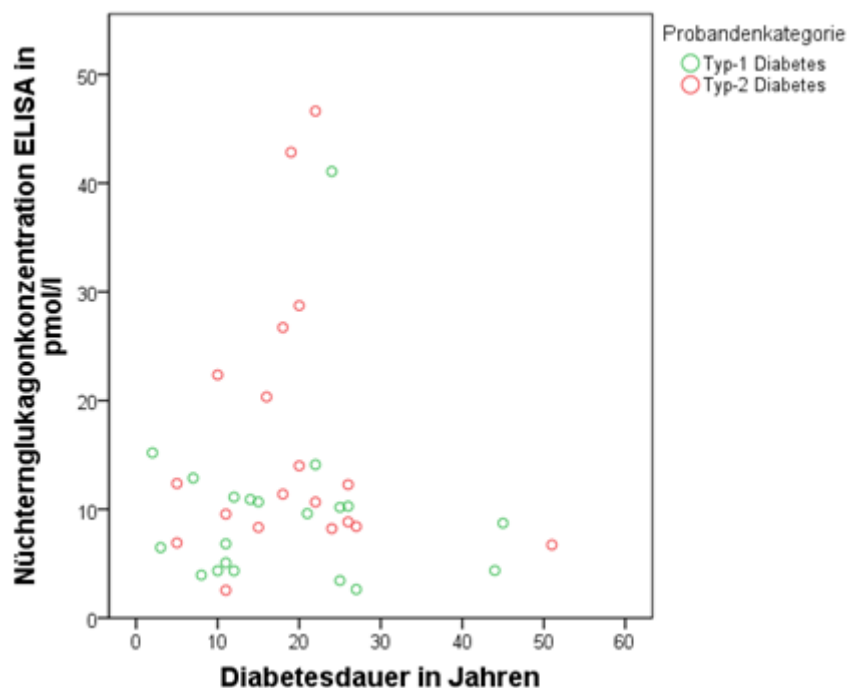


Abbildung 13: Gegenüberstellung von Nüchternglukagonkonzentration, bei Messung mit ELISA, und Diabetesdauer in Jahren.

3.3 Vergleich von ELISA und RIA

Tabelle 4: Vergleich der Messdaten zu den Nüchternglukagonkonzentrationen bei Messung mit Mercodia-ELISA und MP Biomedicals-RIA.

Probanden- und Probandinnenkategorie		Nüchternglukagonkonzentration RIA in pmol/l	Nüchternglukagonkonzentration ELISA in pmol/l	Differenz RIA-ELISA in pmol/l
Gesund	Mittelwert	73,8	8,2	65,7
	Anzahl	5	5	5
	Standardabweichung	± 20,9	± 3,1	± 21,7
	Minimum	49,4	5,4	43,9
	Maximum	101,9	13,2	96,1
Typ-1 Diabetes	Mittelwert	81,3	6,7	74,6
	Anzahl	6	6	6
	Standardabweichung	± 27,5	± 3,0	± 25,6
	Minimum	51,0	3,4	45,9
	Maximum	131,7	10,3	121,5
Typ-2 Diabetes	Mittelwert	116,7	23,3	93,4
	Anzahl	5	5	5
	Standardabweichung	± 37,3	± 15,0	± 40,7
	Minimum	76,5	8,4	59,1
	Maximum	166,5	46,6	144,1
Gesamtsumme	Mittelwert	90,0	12,3	77,7
	Anzahl	16	16	16
	Standardabweichung	± 33,1	± 11,1	± 30,3
	Minimum	49,4	3,4	43,9
	Maximum	166,5	46,6	144,1

Bei der Messung von Glukagon zeigten sich im Vergleich von ELISA mit dem RIA deutliche Unterschiede. Die Werte bei der Messung mit dem RIA waren im Mittel 77,7 pmol/l ($\pm 30,3$ pmol/l) höher als die bei der Messung mit dem ELISA. Somit wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den beiden Messverfahren festgestellt. Diese Abweichung bedeutet, dass die Messung mit dem RIA durchgehend höhere Werte ergab als die Messung mit dem ELISA. Auch der RIA deutet höhere Nüchternglukagonwerte in der Gruppe der Typ-2 DiabetikerInnen an ($p > 0,05$). Der Hersteller gibt Werte von 7,2 pmol/l bis 71,7 pmol/l als normal an, nach dieser Definition wären alle erhobenen Werte im Mittel nicht normal (84). Abbildung 14 verdeutlicht noch einmal die Diskrepanz beider Messergebnisse.

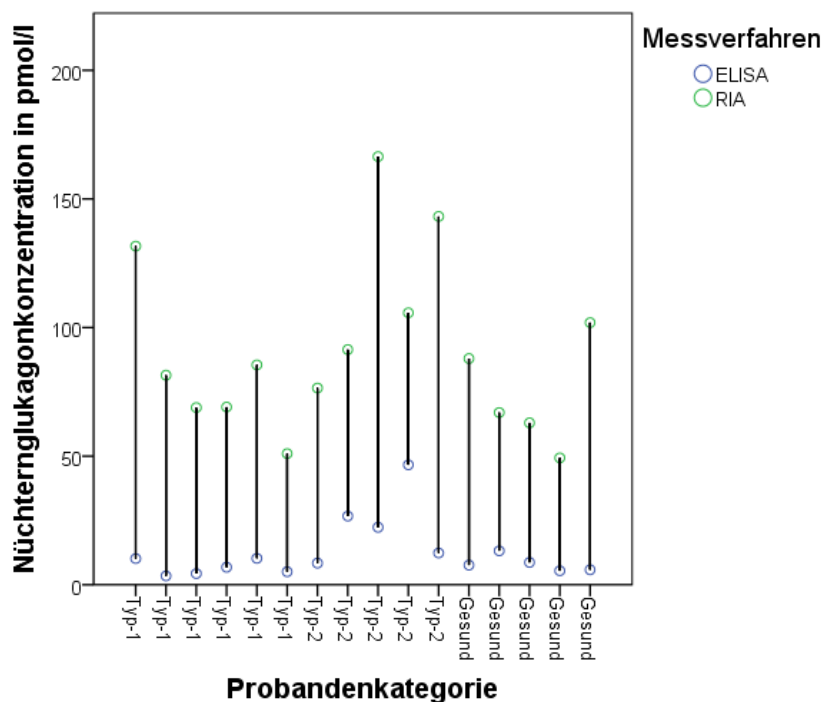


Abbildung 14: Vergleich der Nüchternglukagonkonzentrationen bei Messung mit ELISA und RIA.

Da alle Messergebnisse des RIAs durchgehend zu hoch waren, sollte man feststellen ob es beim Vergleich der beiden Messverfahren eine systematische Messabweichung gibt. Dafür wurde ein Bland-Altman-Diagramm angefertigt.

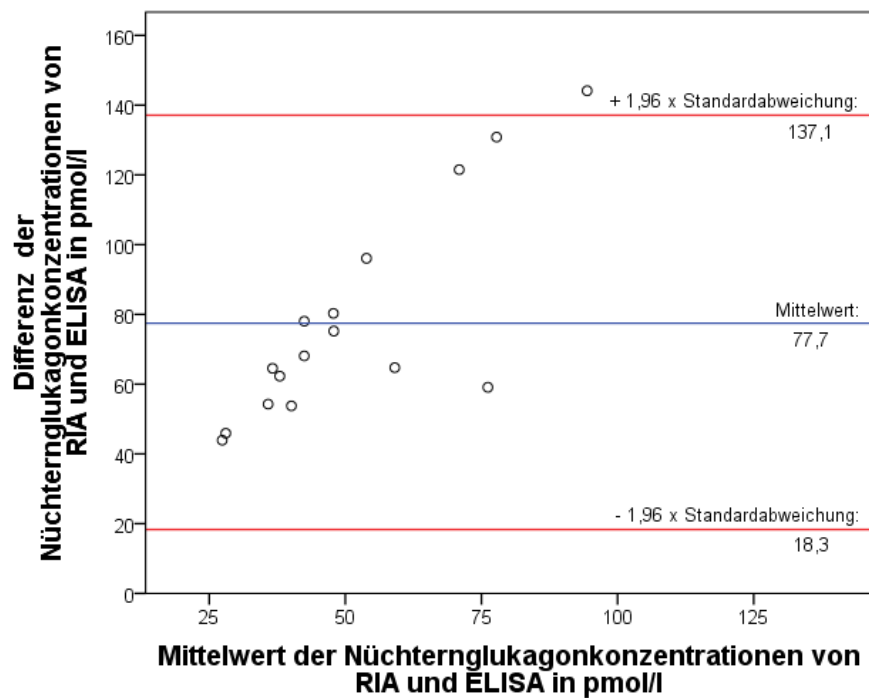


Abbildung 15: Bland-Altman-Diagramm zum Vergleich von ELISA und RIA.

Aus dem Bland-Altman-Diagramm in Abbildung 15 geht hervor, dass es keine systematische Abweichung für die Messergebnisse des RIAs und des ELISAs gibt. Die Differenzen der beiden Glukagonwerte neigen dazu bei zunehmenden Glukagonmittelwerten auch zuzunehmen.

4 Diskussion

4.1 Nüchternhyperglukagonämie bei Typ-2 Diabetes

Der Mittelwert von 7,6 pmol/l bei den Nüchternglukagonkonzentrationen der Gesunden deckt sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie, die mit demselben Mercodia Glukagon-ELISA durchgeführt wurde. In dieser werden Werte von 10 pmol/l und weniger angegeben (6). Wichtig zu erwähnen ist, dass der ELISA von Mercodia nur bei Werten ab 5 pmol/l ausreichend sensitiv ist und somit, in Situationen in denen die Glukagonsekretion gehemmt ist, möglicherweise nicht ausreichend sensitiv ist (7).

Die Nüchternglukagonwerte der Typ-1 DiabetikerInnen sind mit im Mittel bei 9,8 pmol/l und Großen und Ganzen übereinstimmend mit denen der Gesunden. Wenn man den einen Ausreißer mit einem Wert von 41 pmol/l rausrechnet, ergibt sich ein Mittelwert von 8,2 pmol/l, welcher damit nur geringfügig erhöht, im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ist. Ein Grund für diesen Ausreißer könnte eine vergessene Insulininjektion sein, da sich der Proband oder die Probandin mit einem Nüchternglukosewert von 235 mg/dl präsentierte. Der Wegfall der Glukagonsekretionshemmung durch Insulin könnte diesen erhöhten Wert erzeugt haben. Auch ein Messfehler könnte für diesen hohen Wert verantwortlich sein. Somit wird in dieser Arbeit nahegelegt, dass sich bei der Gruppe der Typ-1 DiabetikerInnen keine Hyperglukagonämie im nüchternen Zustand nachweisen lässt.

Bei den Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen ist der Mittelwert der Nüchternglukagonkonzentrationen mit 16,2 pmol/l mehr als doppelt so hoch wie bei den gesunden Kontrollen. Somit deuten die Ergebnisse dieser Arbeit eine Nüchternhyperglukagonämie bei den Typ-2 Diabetikern und Diabetikerinnen an.

Jedoch ist die Glukagonkonzentration der Typ-2 DiabetikerInnen nur im Mittel höher als die der gesunden Kontrollen, nicht jeder Typ-2 DiabetikerIn hatte höhere Glukagonwerte als die gesunden Kontrollen. Gleichzeitig hatte nicht jeder Typ-1 DiabetikerIn normale Werte. Die unterschiedliche Medikation der DiabetikerInnen könnte ein Grund dafür sein, da einige Medikamente die Glukagonsekretion beeinflussen, wie in Kapitel 1.3 beschrieben wurde. Auch die Messung und Vergleich des C-Peptid-Wertes könnte aufschlussreich sein, um den möglichen Einfluss einer Insulinhemmung nachzuvollziehen.

Um genauere Aussagen zu treffen im Hinblick auf die Definition und die Konsequenzen einer Hyperglukagonämie, wird eine höhere Fallzahl benötigt. Interessant wäre es zu überprüfen wie hoch die postprandialen Glukagonwerte in den jeweiligen Probanden- und Probandinnenkategorien sind. Insbesondere der postprandiale Wert von denjenigen, die nüchtern schon erhöhte Werte vorwiesen. Möglicherweise hat eine postprandiale Hyperglukagonämie auch mehr Auswirkungen auf den Glukosespiegel.

4.2 Mögliche Gründe für die Hyperglukagonämie

Warum ist bei Typ-1 Diabetes der Nüchternglukagonspiegel annähernd normal und bei Typ-2 Diabetes erhöht? Wenn man nun die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Diabetesentitäten betrachtet, dann kommt man zum Schluss, dass bei beiden die Insulinsekretion fehlt bzw. gestört ist. Beide Gruppen haben keine bzw. weniger Beta-Zellen, was sie jedoch unterscheidet ist die Insulinresistenz der insulinabhängigen Zellen (25). Möglicherweise ist auch die Alpha-Zelle resistent gegenüber Insulin. Dass die Glukagonsekretion schon früh in der Pathogenese des Typ-2 Diabetes erhöht ist, wurde in Kapitel 1.2.4 schon beschrieben (53-55,86). Noch vor einer Glukosetoleranzstörung sezerniert die Alpha-Zelle eventuell schon vermehrt Glukagon, da ihre Insulinsensitivität schon abgenommen hat. Diese vermehrte Glukagonsekretion könnte eine höhere Insulinsekretion der Beta-Zellen bewirken, was wiederum die Insulinresistenz von Zellen erhöhen könnte (56,87). Somit ist die Insulinresistenz der Alpha-Zellen eine mögliche Erklärung für die Hyperglukagonämie im nüchternen Zustand bei Typ-2 Diabetes.

Da Typ-2 Diabetes oftmals assoziiert ist mit einer Adipositas und damit einhergehender Fehlernährung, könnte auch ein anderes Proglukagon exprimierendes Gewebe für die erhöhte Glukagonsekretion verantwortlich sein, nämlich die L-Zellen in der Darmmukosa. Hinweise dafür gibt es einige, wie etwa, dass bei Typ-2 Diabetes bei oraler Glukosegabe die Glukagonsekretionshemmung niedriger ist als bei einer intravenösen Glukosegabe (40,88). Möglicherweise ist nicht die Glukagonsekretionshemmung niedriger, sondern die Glukose im Darm bewirkt eine Glukagonsekretion der L-Zellen. Ein weiterer Hinweis ist, dass Patienten und Patientinnen, denen das Pankreas komplett entfernt wurde, Nüchternglukagonwerte von 5 pmol/l hatten. Werte um 5 pmol/l könnte man nach den Ergebnissen

dieser Arbeit durchaus als normal einstufen. Nach OGTT erreichten sie sogar Werte von durchschnittlich 18,8 pmol/l, sie reagierten also mit einer Glukagonsekretionssteigerung. Bei der gesunden Kontrollgruppe bewirkte der OGTT eine Glukagonsekretionshemmung. Bei beiden Gruppen führte eine intravenöse Glukosegabe zu einer Sekretionshemmung von Glukagon. Auch die, für die Glukagonsynthese notwendige, PC-2 konnte in L-Zellen nachgewiesen werden (89). Folglich könnte eine extrapankreatische Glukagonsekretionsquelle für die Hyperglukagonämie verantwortlich sein.

Eine weitere Erklärung für die Hyperglukagonämie ist die mögliche Umwandlung von Beta-Zellen in Alpha-Zellen bzw. eine Zunahme der Anzahl von Alpha-Zellen bei Typ-2 Diabetes (90). Beta-Zellen der Maus sind in der Lage bei Typ-2 Diabetes Glukagon zu bilden. Somit kann man eine Unterscheidung zwischen Alpha- und Beta-Zellen nicht durch Betrachtung deren Hormoninhaltes treffen (91). Womöglich sind Glukagon-produzierende Beta-Zellen oder vermehrte Alpha-Zellen für die Hyperglukagonämie verantwortlich.

Von Bedeutung könnte auch die Veränderung im Aufbau oder der Wegfall der para- bzw. juxtakrinen Regulation in der Langerhans-Insel sein. Veränderungen treten jedoch bei beiden Entitäten, Typ-1 und bei Typ-2 Diabetes, auf, jedoch präsentiert sich nur der Typ-2 Diabetes mit einer Hyperglukagonämie. Möglicherweise fällt beim Typ-2 Diabetes ein weiteres parakrines, die Glukagonsekretion-hemmendes Hormon weg - das Somatostatin der Delta-Zelle (92). Dies wäre eine weitere Erklärung für die erhobenen Ergebnisse.

4.3 Unzureichende Messgenauigkeit des verwendeten RIAs

Der verwendete ELISA der Firma Mercodia wurde bereits auf Spezifität und Sensitivität getestet und sollte durch die Verwendung von C- und N-terminalen Antikörpern nur mit intaktem Glukagon reagieren (6). Die Werte des RIAs der Firma MP Biomedicals waren deutlich höher als die des ELISAs, weshalb man annehmen kann, dass der RIA nicht nur intaktes Glukagon misst.

Die Firma MP Biomedicals macht keine genauen Angaben darüber, ob es sich bei dem verwendeten Antikörper um einen Antikörper der spezifisch gegen das C- und/oder N-terminale Ende von Glukagon gerichtet ist, handelt (84). Falls dieser

nicht spezifisch für das N-terminale Ende von Glukagon ist, dann kann er theoretisch auch mit allen Molekülen reagieren, die die Sequenz von Glukagon enthalten. Nur ein C-terminaler Antikörper würde ausschließlich mit Glukagon reagieren, wie in Kapitel 1.4.2 schon erläutert wurde. Somit wäre der RIA von MP Biomedicals auf Grund seines verwendeten Glukagon-Antikörpers nicht in der Lage ausschließlich Glukagon zu messen, führt dadurch zu falsch hohen Werten und ist deshalb nicht geeignet für die Messung von Glukagon.

Auch unspezifische Bindungen und Matrixeffekte sind möglicherweise ein Grund für die falsch hohen Werte des RIAs (93).

Zum Schluss ist zu erwähnen, dass bei jeglicher Beschreibung von Glukagonwerten auf die Methode der Glukagonbestimmung zu achten ist, da nicht alle Messmethoden spezifisch für intaktes Glukagon sind. Somit sollten viele in der Einleitung erläuterte Zusammenhänge mit Glukagon, nochmals mit besseren Messmethoden überprüft werden. Ergebnisse die bisher mit nicht ausreichend spezifischen Messmethoden erzielt wurden, sind mit Vorsicht zu interpretieren.

5 Literaturverzeichnis

(1) Shrayyef MZ, Gerich JE. Physiology of Glucose Metabolism - Normal Glucose Homeostasis. In: Poretsky L, editor. Principles of Diabetes Mellitus. 2nd ed. New York Dordrecht Heidelberg London: Springer; 2010. p. 19.

(2) Kazda CM, Garhyan P, Kelly RP, Shi C, Lim CN, Fu H, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Study of the Glucagon Receptor Antagonist LY2409021 in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2015 Dec 17.

(3) Kazierad DJ, Bergman A, Tan B, Erion DM, Somayaji V, Lee DS, et al. Effects of multiple ascending doses of the glucagon receptor antagonist, PF-06291874, in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2016 Apr 5.

(4) Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care* 1996 Jun;19(6):580-586.

(5) Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, Holst JJ, Nauck MS, Ritzel R, et al. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Mar;87(3):1239-1246.

(6) Bak MJ, Albrechtsen NW, Pedersen J, Hartmann B, Christensen M, Vilsboll T, et al. Specificity and sensitivity of commercially available assays for glucagon and oxyntomodulin measurement in humans. *Eur J Endocrinol* 2014 Mar 8;170(4):529-538.

(7) Wewer Albrechtsen NJ, Hartmann B, Veedfald S, Windelov JA, Plamboeck A, Bojsen-Moller KN, et al. Hyperglucagonaemia analysed by glucagon sandwich ELISA: nonspecific interference or truly elevated levels? *Diabetologia* 2014 Sep;57(9):1919-1926.

(8) Gerich JE. Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab* 2000 Dec;2(6):345-350.

(9) Paschke R, Voigt K. *Endokrines System. Physiologie*. 6th ed. Stuttgart: Klinker R.; Pape H. C.; Kurtz A.; Silbernagl S.; 2010. p. 516.

(10) Cherrington AD. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 1999 May;48(5):1198-1214.

(11) 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* 1987;36(3):274-283.

- (12) Liljenquist JE, Mueller GL, Cherrington AD, Keller U, Chiasson J-, Perry JM, et al. Evidence for an important role of glucagon in the regulation of hepatic glucose production in normal man. *J Clin Invest* 1977 Feb;59(2):369-374.
- (13) Breckenridge SM, Raju B, Arbelaez AM, Patterson BW, Cooperberg BA, Cryer PE. Basal insulin, glucagon, and growth hormone replacement. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 Nov;293(5):E1303-10.
- (14) Holst JJ. Mercodia Webinar: Glucagon Assay . 2014; Available at: <https://www.mercodia.com/assets/upload/files/Webinars/Glucagon%20assay.mp4>. Accessed 07/12, 2016.
- (15) Unger RH, Orci L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* 1975 Jan 4;1(7897):14-16.
- (16) American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014 Jan;37 Suppl 1:S81-90.
- (17) Reaven GM, Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Jaspan JB. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1987 Jan;64(1):106-110.
- (18) Roden M. Diabetes mellitus: definition, classification and diagnosis. *Wien Klin Wochenschr* 2016 Apr;128 Suppl 2:S37-40.
- (19) Pschyrembel R. *Klinisches Wörterbuch* . 2013; Available at: https://www-1pschyrembel-1de-1pschyrembel.han.medunigraz.at/#q=parakrin&d=kw_4399291&f=&v=doc. Accessed 05/04, 2016.
- (20) Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 2002 Jul 15;107(1-3):63-69.
- (21) Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Feb 14;103(7):2334-2339.
- (22) Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 1982 Oct;31(10):883-889.
- (23) Arrojo e Drigo R, Ali Y, Diez J, Srinivasan DK, Berggren PO, Boehm BO. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia* 2015 Oct;58(10):2218-2228.
- (24) Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, et al. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 2010 May;59(5):1202-1210.

- (25) Herold G. Innere Medizin. Köln: Herold, Gerd; 2016.
- (26) Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 2007 Feb;28(1):84-116.
- (27) Elliott AD, Ustione A, Piston DW. Somatostatin and insulin mediate glucose-inhibited glucagon secretion in the pancreatic alpha-cell by lowering cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015 Jan 15;308(2):E130-43.
- (28) Strowski MZ, Cashen DE, Birzin ET, Yang L, Singh V, Jacks TM, et al. Antidiabetic activity of a highly potent and selective nonpeptide somatostatin receptor subtype-2 agonist. *Endocrinology* 2006 Oct;147(10):4664-4673.
- (29) Cooperberg BA, Cryer PE. Beta-cell-mediated signaling predominates over direct alpha-cell signaling in the regulation of glucagon secretion in humans. *Diabetes Care* 2009 Dec;32(12):2275-2280.
- (30) Raskin P, Unger RH. Effect of insulin therapy on the profiles of plasma immunoreactive glucagon in juvenile-type and adult-type diabetics. *Diabetes* 1978 Apr;27(4):411-419.
- (31) Muller WA, Faloon GR, Aguilar-Parada E, Unger RH. Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion. *N Engl J Med* 1970 Jul 16;283(3):109-115.
- (32) Shah P, Basu A, Basu R, Rizza R. Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans. *Am J Physiol* 1999 Aug;277(2 Pt 1):E283-90.
- (33) Alford FP, Blood SR, Nabarro JD. Glucagon levels in normal and diabetic subjects: use of a specific immunoabsorbent for glucagon radioimmunoassay. *Diabetologia* 1977 Jan;13(1):1-6.
- (34) Unger RH, Aguilar-Parada E, Muller WA, Eisentraut AM. Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1970 Apr;49(4):837-848.
- (35) Ahren B. Glucagon--Early breakthroughs and recent discoveries. *Peptides* 2015 May;67:74-81.
- (36) Edgerton DS, Cherrington AD. Glucagon's yin and yang effects on hepatic glucose production. *Nat Med* 2013 Jun;19(6):674-675.
- (37) Li XC, Liao TD, Zhuo JL. Long-term hyperglucagonaemia induces early metabolic and renal phenotypes of Type 2 diabetes in mice. *Clin Sci (Lond)* 2008 May;114(9):591-601.
- (38) Avogaro A, Crepaldi C, Miola M, Maran A, Pengo V, Tiengo A, et al. High blood ketone body concentration in type 2 non-insulin dependent diabetic patients. *J Endocrinol Invest* 1996 Feb;19(2):99-105.

- (39) Knop FK, Aaboe K, Vilsboll T, Volund A, Holst JJ, Krarup T, et al. Impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia characterizing type 2 diabetic subjects are early signs of dysmetabolism in obesity. *Diabetes Obes Metab* 2012 Jun;14(6):500-510.
- (40) Knop FK, Vilsboll T, Madsbad S, Holst JJ, Krarup T. Inappropriate suppression of glucagon during OGTT but not during isoglycaemic i.v. glucose infusion contributes to the reduced incretin effect in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2007 Apr;50(4):797-805.
- (41) Matsuda M, DeFronzo RA, Glass L, Consoli A, Giordano M, Bressler P, et al. Glucagon dose-response curve for hepatic glucose production and glucose disposal in type 2 diabetic patients and normal individuals. *Metabolism* 2002 Sep;51(9):1111-1119.
- (42) Mitrakou A, Kelley D, Veneman T, Jenssen T, Pangburn T, Reilly J, et al. Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes* 1990 Nov;39(11):1381-1390.
- (43) Felig P, Wahren J, Sherwin R, Hendler R. Insulin, glucagon, and somatostatin in normal physiology and diabetes mellitus. *Diabetes* 1976 Dec;25(12):1091-1099.
- (44) Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2007 May;28(3):253-283.
- (45) Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, et al. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Aug;86(8):3717-3723.
- (46) Del Prato S, Marchetti P. Beta- and alpha-cell dysfunction in type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 2004 Nov-Dec;36(11-12):775-781.
- (47) Cryer PE. Hypoglycaemia: the limiting factor in the glycaemic management of Type I and Type II diabetes. *Diabetologia* 2002 Jul;45(7):937-948.
- (48) Dagogo-Jack S, Rattarasarn C, Cryer PE. Reversal of hypoglycemia unawareness, but not defective glucose counterregulation, in IDDM. *Diabetes* 1994 Dec;43(12):1426-1434.
- (49) Raju B, Cryer PE. Loss of the decrement in intraislet insulin plausibly explains loss of the glucagon response to hypoglycemia in insulin-deficient diabetes: documentation of the intraislet insulin hypothesis in humans. *Diabetes* 2005 Mar;54(3):757-764.
- (50) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998 Sep 12;352(9131):837-853.

(51) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993 Sep 30;329(14):977-986.

(52) Faerch K, Vaag A, Holst JJ, Glumer C, Pedersen O, Borch-Johnsen K. Impaired fasting glycaemia vs impaired glucose tolerance: similar impairment of pancreatic alpha and beta cell function but differential roles of incretin hormones and insulin action. *Diabetologia* 2008 May;51(5):853-861.

(53) Hansen KB, Vilsboll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. Increased postprandial GIP and glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone, relative physical inactivity, and high-calorie diet in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Feb;96(2):447-453.

(54) Larsson H, Ahren B. Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2000 May;23(5):650-657.

(55) Ahren B. Beta- and alpha-cell dysfunction in subjects developing impaired glucose tolerance: outcome of a 12-year prospective study in postmenopausal Caucasian women. *Diabetes* 2009 Mar;58(3):726-731.

(56) Lee Y, Berglund ED, Yu X, Wang MY, Evans MR, Scherer PE, et al. Hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Sep 9;111(36):13217-13222.

(57) Lee Y, Wang MY, Du XQ, Charron MJ, Unger RH. Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice. *Diabetes* 2011 Feb;60(2):391-397.

(58) Wang MY, Yan H, Shi Z, Evans MR, Yu X, Lee Y, et al. Glucagon receptor antibody completely suppresses type 1 diabetes phenotype without insulin by disrupting a novel diabetogenic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015 Feb 24;112(8):2503-2508.

(59) Lee Y, Berglund ED, Yu X, Wang MY, Evans MR, Scherer PE, et al. Hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Sep 9;111(36):13217-13222.

(60) Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 2013 Feb 14;494(7436):256-260.

(61) Unger RH, Berglund ED, Habener JF, Cherrington AD. Dissecting the actions of widely used diabetes drugs. *Nat Med* 2013 Mar;19(3):272-273.

(62) Vella S, Buetow L, Royle P, Livingstone S, Colhoun HM, Petrie JR. The use of metformin in type 1 diabetes: a systematic review of efficacy. *Diabetologia* 2010 May;53(5):809-820.

- (63) Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Queniat G, Moerman E, Thevenet J, et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med* 2015 May;21(5):512-517.
- (64) DeFronzo RA, Davidson JA, Del Prato S. The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia. *Diabetes Obes Metab* 2012 Jan;14(1):5-14.
- (65) Merovci A, Solis-Herrera C, Daniele G, Eldor R, Fiorentino TV, Tripathy D, et al. Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J Clin Invest* 2014 Feb;124(2):509-514.
- (66) Yan H, Gu W, Yang J, Bi V, Shen Y, Lee E, et al. Fully human monoclonal antibodies antagonizing the glucagon receptor improve glucose homeostasis in mice and monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 2009 Apr;329(1):102-111.
- (67) Guan HP, Yang X, Lu K, Wang SP, Castro-Perez JM, Previs S, et al. Glucagon receptor antagonism induces increased cholesterol absorption. *J Lipid Res* 2015 Nov;56(11):2183-2195.
- (68) BAUM J, SIMONS BE, Jr, UNGER RH, MADISON LL. Localization of glucagon in the alpha cells in the pancreatic islet by immunofluorescent technics. *Diabetes* 1962 Sep-Oct;11:371-374.
- (69) Schroeder WT, Lopez LC, Harper ME, Saunders GF. Localization of the human glucagon gene (GCG) to chromosome segment 2q36----37. *Cytogenet Cell Genet* 1984;38(1):76-79.
- (70) Sandoval DA, D'Alessio DA. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev* 2015 Apr;95(2):513-548.
- (71) Hinke SA, Pospisilik JA, Demuth HU, Mannhart S, Kuhn-Wache K, Hoffmann T, et al. Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) degradation of glucagon. Characterization of glucagon degradation products and DPIV-resistant analogs. *J Biol Chem* 2000 Feb 11;275(6):3827-3834.
- (72) UNGER RH, EISENTRAUT AM, McCALL MS, MADISON LL. Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon. *J Clin Invest* 1961 Jul;40:1280-1289.
- (73) Lefebvre PJ. Early milestones in glucagon research. *Diabetes Obes Metab* 2011 Oct;13 Suppl 1:1-4.
- (74) Thomsen J, Kristiansen K, Brunfeldt K, Sundby F. The amino acid sequence of human glucagon. *FEBS Lett* 1972 Apr 1;21(3):315-319.
- (75) Howard JW, Kay RG, Tan T, Minnion J, Creaser CS. Identification of plasma protease derived metabolites of glucagon and their formation under typical laboratory sample handling conditions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2015 Jan 30;29(2):171-181.

(76) Sloan JH, Siegel RW, Ivanova-Cox YT, Watson DE, Deeg MA, Konrad RJ. A novel high-sensitivity electrochemiluminescence (ECL) sandwich immunoassay for the specific quantitative measurement of plasma glucagon. Clin Biochem 2012 Dec;45(18):1640-1644.

(77) Corinth AA. Glucagon Measurement, Addressing Long-Standing Analytical Challenges. 2015; Available at: <https://mercodia.com/assets/upload/files/%2032-4235%20Glucagon%20Measurement%20White%20paper%2020.pdf>. Accessed 05/23, 2016.

(78) Yi J, Warunek D, Craft D. Degradation and Stabilization of Peptide Hormones in Human Blood Specimens. PLoS One 2015 Jul 29;10(7):e0134427.

(79) Merckodia Company. Technical Report 34-0146 - Sample Collection for the Merckodia Glucagon ELISAs. Available at: <https://mercodia.com/assets/upload/files/Technotes/TN34-0146%20Sample%20collection%20for%20Merckodia%20Glucagon%20v2.pdf>. Accessed 11/18, 2016.

(80) Wewer Albrechtsen NJ, Veedfald S, Plamboeck A, Deacon CF, Hartmann B, Knop FK, et al. Inability of Some Commercial Assays to Measure Suppression of Glucagon Secretion. J Diabetes Res 2016;2016:8352957.

(81) Becton DaC. BD P800 - Blood Collection System for Plasma Metabolic Biomarker Preservation. 2015; Available at: <http://www.bdbiosciences.com/ds/ab/others/366420.pdf>. Accessed 10/26, 2016.

(82) Gäreskog M, Carlsson A, Schwanbeck M, Karamihos E, Gäredal C, Grufman L, et al. Development and validation of a high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay for specific measurement of glucagon. Available at: <https://www.mercodia.com/assets/upload/files/Posters/Glucagon%20for%20IDF.pdf>. Accessed 10/18, 2016.

(83) Merckodia AB. Merckodia Glucagon ELISA - Directions for Use. 2014; Available at: https://www.mercodia.se/assets/upload/files/DfU/Glucagon/vers.%203.0/Glucagon%20v%203_0.pdf. Accessed 10/18, 2016.

(84) MP Biomedicals. Glucagon Kit, Procedure for the Radioimmunoassay of Human Plasma Glucagon. Available at: [http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/03d5991c3a7e7f0d8525792e00243e31/72c7d3e68c125aad8525694a006a55f8/\\$FILE/07-152101.pdf](http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/03d5991c3a7e7f0d8525792e00243e31/72c7d3e68c125aad8525694a006a55f8/$FILE/07-152101.pdf). Accessed 07/11, 2016.

(85) Umrechnungstabelle. Available at: <http://www.medunigraz.at/labordiagnostik/Umrechnung.htm>. Accessed 11/18, 2016.

(86) Faerch K, Borch-Johnsen K, Holst JJ, Vaag A. Pathophysiology and aetiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance: does it matter for

prevention and treatment of type 2 diabetes? *Diabetologia* 2009 Sep;52(9):1714-1723.

(87) Kawai K, Yokota C, Ohashi S, Watanabe Y, Yamashita K. Evidence that glucagon stimulates insulin secretion through its own receptor in rats. *Diabetologia* 1995 Mar;38(3):274-276.

(88) Meier JJ, Deacon CF, Schmidt WE, Holst JJ, Nauck MA. Suppression of glucagon secretion is lower after oral glucose administration than during intravenous glucose administration in human subjects. *Diabetologia* 2007 Apr;50(4):806-813.

(89) Lund A, Bagger JI, Wewer Albrechtsen NJ, Christensen M, Grondahl M, Hartmann B, et al. Evidence of Extrapancreatic Glucagon Secretion in Man. *Diabetes* 2016 Mar;65(3):585-597.

(90) Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J Histochem Cytochem* 2015 Aug;63(8):575-591.

(91) Brereton MF, Iberl M, Shimomura K, Zhang Q, Adriaenssens AE, Proks P, et al. Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nat Commun* 2014 Aug 22;5:4639.

(92) Guardado Mendoza R, Perego C, Finzi G, La Rosa S, Capella C, Jimenez-Ceja LM, et al. Delta cell death in the islet of Langerhans and the progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in non-human primates (baboon, *Papio hamadryas*). *Diabetologia* 2015 Aug;58(8):1814-1826.

(93) Rauch P, Zellmer A, Dankbar N, Specht C, Sperling D. Assayoptimierung: Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden. *Laborwelt* 2005;6(4).