

Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen
eingereicht von Prof. Dr. med. M. Nauck

**Über die Bedeutung der Zugabe von humanem Serum-Albumin zu
exogenen GLP-1-Infusionen am Beispiel der
Antagonisierbarkeit des GLP-1 [7-36-Amid]-Einflusses auf die
erste Phase der Insulin-Sekretion nach intravenöser
Glukosegabe durch den GLP-1-Rezeptor-Antagonisten
Exendin [9-39] bei gesunden Menschen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt
von Lars Dietrich Köthe
aus Marburg an der Lahn
Göttingen 2011

Diese Dissertation wurde angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. Nauck in der Zeit von 2006 bis 2011 im Diabeteszentrum Bad Lauterberg.

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter : Prof. Dr. med. M. Nauck

II. Berichterstatter / in : Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

III. Berichterstatter / in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2011

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGEN	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
1. EINLEITUNG	13
1.1 DER INKRETIN-EFFEKT	14
1.2 GLP-1	17
1.3 EXENDIN [9-39]	25
1.4 ADSORPTION VON PROTEINEN AN OBERFLÄCHEN	27
1.5 HUMANES SERUM-ALBUMIN	30
1.6 ZIEL DER ARBEIT	35
2. MATERIAL UND METHODEN	38
2.1 EINSCHLUSS- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN	38
2.2 PROBANDEN-CHARAKTERISTIKA	40
2.3 VERSUCHSPROTOKOLL	41
2.3.1 <i>Beschreibung der Experimente</i>	44
2.3.1.1 Voruntersuchung der Probanden	44
2.3.1.2 Beschreibung der Versuchstage	45
2.4 INFUSIONSLÖSUNGEN	48
2.5 BLUTENTNAHMEN	53
2.6 LABORPARAMETER	55
2.6.1 <i>Immunoassays</i>	55
2.6.2 <i>Plasmaglukose</i>	57
2.6.3 <i>Insulin</i>	57
2.6.4 <i>C-Peptid</i>	58
2.6.5 <i>Glucagon-like Peptide-1</i>	58
2.6.6 <i>Glukagon</i>	59
2.6.7 <i>Exendin [9-39]</i>	59
2.7 NEBENWIRKUNGEN	59
2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG / BERECHNUNGEN	61
2.8.1 <i>Berechnete Parameter</i>	61
2.8.1.1 <i>Insulin-Sekretionsrate</i>	61
2.8.1.2 <i>Integrierte Anstiege über Basalwerte ("Area under the Curve")-Berechnung</i>	61
2.8.2 <i>Statistische Parameter</i>	62
3. ERGEBNISSE	65
3.1 PROJEKT A	65

3.1.1 GLP-1 Total.....	65
3.1.2 GLP-1 Intakt.....	67
3.1.3 Exendin [9-39].....	68
3.1.4 Kapillare Plasmaglukose	69
3.1.5 Insulin.....	71
3.1.5.1 Insulin-Konzentrationen.....	71
3.1.5.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Konzentration	73
3.1.6 C-Peptid.....	74
3.1.7 Insulin-Sekretionsraten.....	76
3.1.7.1 Insulin-Sekretionsraten.....	76
3.1.7.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate	78
3.1.8 Glukagon.....	79
3.2 PROJEKT B.....	81
3.2.1 GLP-1 Total.....	81
3.2.2 GLP-1 Intakt.....	83
3.2.3 Exendin [9-39].....	85
3.2.4 Kapillare Plasmaglukose	87
3.2.5 Insulin.....	89
3.2.5.1 Insulin-Konzentrationen.....	89
3.2.5.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Konzentrationen	91
3.2.6 C-Peptid.....	92
3.2.7 Insulin-Sekretionsraten.....	94
3.2.7.1 Insulin-Sekretionsraten.....	94
3.2.7.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate	97
3.2.8 Glukagon.....	98
3.3 VERGLEICH PROJEKT A UND PROJEKT B.....	101
3.3.1 GLP-1 Total-Konzentrationen in Projekt A und Projekt B.....	101
3.3.1.1 GLP-1 Total-Konzentrationen unter isolierter GLP-1-Infusion	101
3.3.1.2 GLP-1 Total-Konzentrationen unter kombinierter GLP-1- und Exendin [9-39]-Infusion ..	103
3.3.2 Vergleich der integrierten Anstiege über Basalwerte der Insulin-Sekretionsraten bei den einzelnen Probanden in Projekt A und Projekt B.....	105
3.3.2.1 Integrierte Anstiege über Basalwerte der Insulin-Sekretionsraten bei den einzelnen Probanden in Projekt A.....	105
3.3.2.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte der Insulin-Sekretionsraten bei den einzelnen Probanden in Projekt B.....	106
3.3.3 Vergleich der individuellen prozentualen Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39].....	108
3.3.3.1 Individuelle prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1-Infusion und individuelle prozentuale Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] in Projekt A.....	108

3.3.3.2 Individuelle prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1-Infusion und individuelle prozentuale Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] in Projekt B.....	110
4. DISKUSSION	112
4.1 DISKUSSION DES VERGLEICHES PROJEKT A UND PROJEKT B.....	112
4.2 DISKUSSION DER GLP-1-VERMITTELTEN INSULINOTROPEN EFFEKTE UND DER WIRKUNG DES EXENDIN [9-39] (PROJEKT B).....	116
5. ZUSAMMENFASSUNG	129
6. ANHANG: TABELLEN 1A–3A, GLEICHUNGEN 1A–5A, ABBILDUNGEN 1A–5A	132
7. LITERATURVERZEICHNIS	142

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	“Area under the curve”
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholezystokinin
CRF	Case Report Form
dl	Deziliter
DPP - 4	Dipeptidyl-Peptidase - 4
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alii (lateinisch, m, “andere”)
fl	Femtoliter
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GCP	Good Clinical Practice
Ggf.	Gegebenenfalls
GIP	Glucose - Dependent Insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon - Like Peptide-1
GRPP	Glicentin - Related Pancreatic Peptide
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HDL	High Density Lipoprotein
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
m ²	Quadratmeter
MCH	Mean Corpuscular Haemoglobin
mg	Milligramm

min	Minute
mIU	Milli-IU ; Milli International Unit
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MPFG	Major Proglucagon Fragment
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mU	Milliunits
NaCl	Natrium-Chlorid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
No.	Numero (spanisch, Nummer)
n.s.	not significant
pl	Picoliter
pmol	Picomol
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
RM-ANOVA	“Repeated Measurement Analysis of Variance”
U/l	Units pro Liter
U/min	Umdrehung pro Minute
vs.	versus (lateinisch, gegenüber gestellt)
WHO	World Health Organization
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1	:	Enteroinsuläre Achse	S. 16
Abbildung 2	:	Gewebespezifische, posttranslationale Prozessierung des Proglukagons	S. 21
Abbildung 3	:	Sekretion und Wirkung von GLP-1	S. 25
Abbildung 4	:	Humanes Serum-Albumin (Tertiärstruktur)	S. 35
Abbildung 5	:	Infusionsplan für Versuchstage in Projekt A und Projekt B	S. 43
Abbildung 6	:	GLP-1 Total-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt A)	S. 67
Abbildung 7	:	Exendin [9-39]-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt A)	S. 69
Abbildung 8	:	Kapillare Plasmaglukose-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt A)	S. 71
Abbildung 9	:	Plasmainsulin-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt A)	S. 73
Abbildung 10	:	Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Konzentration 0 - 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe (erste Phase)(Projekt A)	S. 74
Abbildung 11:	:	Plasma-C-Peptid-Konzentrationen vor und nach Intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt A)	S. 76
Abbildung 12	:	Insulin-Sekretionsrate vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt A)	S. 78

Abbildung 13	:	Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate 0 - 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe (erste Phase)(Projekt A)	S. 79
Abbildung 14	:	Glukagon-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt A)	S. 81
Abbildung 15	:	GLP-1 Total-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt B)	S. 83
Abbildung 16	:	GLP-1 Intakt-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt B)	S. 85
Abbildung 17	:	Exendin [9-39]-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt B)	S. 87
Abbildung 18	:	Kapillare Plasmaglukose-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt B)	S. 89
Abbildung 19	:	Plasmainsulin-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt B)	S. 91
Abbildung 20	:	Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Konzentration 0 - 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe (erste Phase)(Projekt B)	S. 92
Abbildung 21	:	Plasma-C-Peptid-Konzentrationen vor und nach Intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt B)	S. 94
Abbildung 22	:	Insulin-Sekretionsrate vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt B)	S. 97
Abbildung 23	:	Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate 0 - 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe (erste Phase)(Projekt B)	S. 98

Abbildung 24	:	Glukagon-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe an den einzelnen Versuchstagen (Projekt B)	S. 100
Abbildung 25	:	GLP-1 Total-Konzentrationen unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion in Projekt A und Projekt B	S. 102
Abbildung 26	:	GLP-1 Total-Konzentrationen unter kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion in Projekt A und Projekt B	S. 104
Abbildung 27	:	Individuelle integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate an den einzelnen Versuchstagen in Projekt A	S. 106
Abbildung 28	:	Individuelle integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate an den einzelnen Versuchstagen in Projekt B	S. 107
Abbildung 29	:	Individuelle prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1[7-36-Amid]-Infusion (A) und die Individuelle prozentuale Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] (B) nach intravenöser Glukosestimulation bei den einzelnen Probanden in Projekt A	S. 109
Abbildung 30	:	Individuelle prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1[7-36-Amid]-Infusion (A) und die individuelle prozentuale Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] (B) nach intravenöser Glukosestimulation bei den einzelnen Probanden in Projekt B	S. 111

Tabellen:

Tabelle 1	:	Ein- und Ausschlusskriterien (Projekt A und Projekt B)	S. 39
Tabelle 2	:	Zeitpunkte der Blutentnahmen für die einzelnen Laborparameter nach Versuchsprotokoll (Projekt A und Projekt B)	S. 44

Gleichungen:

Gleichung 1	:	Berechnung der prozentualen Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion	S.62
Gleichung 2	:	Berechnung der prozentualen Hemmung der GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekte durch Exendin [9-39]	S. 62

Anhang:

Tabelle 1A	:	Probanden-Charakteristika	S. 132
Tabelle 2A	:	Mögliche Infusionsabfolgen in Abhängigkeit zur Randomisierung (Projekt A)	S. 134
Tabelle 3A	:	Mögliche Infusionsabfolgen in Abhängigkeit zur Randomisierung (Projekt B)	S. 135
Gleichung 1A	:	Formel zur Berechnung des Bedarfs an Basis GLP-1 [7-36-Amid] für die Infusionen mit GLP-1 an den Versuchstagen C und D (Projekt A)	S. 135
Gleichung 2A	:	Formel zur Berechnung des Bedarfes an Basis-Exendin [9-39]-Lösung zur Herstellung der Exendin [9-39]-Infusion am Versuchstag D und D' (Projekt A und Projekt B)	S. 135
Gleichung 3A	:	Berechnung der Flussrate (Y) für $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Exendin [9-39] am Versuchstag D und D' (Projekt A und Projekt B)	S. 135
Gleichung 4A	:	Berechnung der Flussrate (Y) für $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Exendin [9-39] am Versuchstag D und D' (Projekt A und Projekt B)	S. 136

Gleichung 5A	:	Formel zur Berechnung des Bedarfs an Basis GLP-1 [7-36-Amid] für die Infusionen mit GLP-1 an den Versuchstagen C' und D' (Projekt B)	S. 136
Abbildung 1A	:	Vergleichende Übersichtsdarstellung der Diagramme aus Projekt A und Projekt B für Blutglukose-, Insulin-, C-Peptid-Konzentrationen und Insulin-Sekretionsraten	S. 137
Abbildung 2A	:	Vergleichende Übersichtsdarstellung der Diagramme aus Projekt A und Projekt B für Glukagon-, GLP-1 Total-, Exendin [9-39]-Konzentrationen und GLP-1 Intakt (Projekt B)	S. 138
Abbildung 3A	:	Vergleichende Übersichtsdarstellung der Diagramme aus Projekt A und Projekt B für integrierte Anstiege über Basalwerte für Insulin-Konzentrationen und Insulin-Sekretionsraten	S. 139
Abbildung 4A	:	Vergleichende Übersichtsdarstellung der Diagramme aus Projekt A und Projekt B für die individuelle, prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion, die individuelle Hemmung der GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekte durch Exendin [9-39] und die individuellen Insulin-Sekretionsraten der einzelnen Probanden an den einzelnen Versuchstagen	S. 140
Abbildung 5A	:	Vergleichende Darstellung der GLP-1 Total-Konzentrationen unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion in Projekt A und Projekt B	S.141

1. Einleitung

Der Diabetes mellitus hat sich durch einen Anstieg der Erkrankungsfälle zu einem gesundheitspolitischen Problem entwickelt. Nach Schätzungen wird die Anzahl der Erkrankungen global von 1995 mit 135 Millionen Erkrankter auf 300 Millionen im Jahr 2025 anwachsen (King et al. 1998). Allein in Deutschland fand sich nach epidemiologischer Studienlage im Jahr 1990 eine Diabetesprävalenz von 4,5% der Gesamtbevölkerung. Die Prävalenz bei den über 60 Jahre alten Menschen lag sogar bei 20%, was in Anbetracht der Tatsache einer zunehmenden Lebenserwartung in unserer Gesellschaft von hoher Relevanz ist (Hauner 1998).

Da die Behandlung des Diabetes mellitus und dessen Folgeerkrankungen inzwischen 5 bis 10% aller Ausgaben der Gesundheitssysteme der industrialisierten Nationen ausmacht, ist eine umfassende Grundlagenforschung und Weiterentwicklung der medikamentösen Therapiemöglichkeiten von größter Bedeutung (Rubin et al. 1994).

Der überwiegende Teil der Erkrankungen ist dem Diabetes mellitus Typ-2 zuzuordnen. Dieser Typ ist insbesondere initial auch ohne Insulinsubstitution behandelbar. Daher bildeten sich gerade hier Forschungsschwerpunkte zur Entwicklung neuer medikamentöser Therapieansätze.

Eine neue Generation von Medikamenten zur Behandlung des Typ-2 - Diabetes mellitus steht seit jüngster Zeit zur Verfügung. Die Basis zur Entwicklung dieser Medikamentengruppe war die Entdeckung des Inkretin-Effektes. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden zwei Hormone identifiziert, die zur Schaffung neuer Substanzgruppen geeignet schienen: GIP (Glucose - Dependent Insulinotropic Polypeptide) und GLP-1 (Glucagon - Like Peptide - 1). Da GIP aber bei Patienten mit Typ-2 - Diabetes mellitus nur einen geringen insulinotropen Effekt aufweist (Nauck et al. 1993a), war das Interesse mehr auf das GLP-1 gerichtet. Zur Verbesserung der Insulinantwort auf orale Glukose-Belastungen durch Erhöhung der GLP-1-Spiegel oder Aktivierung von GLP-1-Rezeptoren gibt es mittlerweile verschiedene Ansatzmöglichkeiten. Die erste Möglichkeit stellt die Inhibition des Enzymes Dipeptidyl-Peptidase - 4 (DPP - 4) dar, welches für die rasche Inaktivierung des GLP-1 im menschlichen Organismus verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurden die DPP - 4-Inhibitoren produziert, von denen aktuell mit Sitagliptin, Vildagliptin und Saxagliptin drei Vertreter auf dem deutschen Markt sind. Des Weiteren existiert zur subkutanen Anwendung ein Peptid, welches in der Lage ist, die GLP-1-Rezeptoren zu stimulieren.

Dieses Peptid wurde eher zufällig in der Speicheldrüse der Echse *Heloderma suspectum* entdeckt und zeigte eine hohe Homologie zum nativen humanen GLP-1. Das Peptid wird Exendin-4 genannt. Aus ihm ging das Exenatide hervor, welches aktuell auf dem Markt zur Verfügung steht.

Ein weiterer Weg das Wissen um die Inkretinwirkung zur Therapie bei Typ-2-Diabetikern auszunutzen, ist die Veränderung der Affinität des applizierten GLP-1 zum abbauenden Enzym DPP - 4. Durch Veränderungen der Aminosäuresequenz oder Bindung des Peptids an Nebenketten können derartige Effekte erzielt werden. Ein Vertreter dieser GLP-1-Analoga ist das Liraglutide, das in aktuellen klinischen Studien erprobt wird und 2009 als neues Diabetesmedikament zugelassen wurde (Drucker und Nauck 2006).

1.1 Der Inkretin-Effekt

Der Inkretin-Effekt beschreibt das Phänomen, dass bei oraler Glukosegabe die Insulin-Sekretionsantwort deutlich höher ausfällt als bei intravenöser Gabe derselben Glukosemenge [Elrick et al. (1964), McIntyre et al. (1965), Perley und Kipnis (1967)].

Dass der Gastrointestinaltrakt einen wesentlichen Einfluss und eine wichtige Funktion für die endokrine und exokrine Rolle des Pankreas hat, wurde schon länger vermutet. Es konnte schon 1902 gezeigt werden, dass intestinale Mukosa eine Substanz enthalten musste, welche in der Lage war, die exokrine Pankreasfunktion über die Blutbahn zu beeinflussen. Die Autoren nannten die Substanz Sekretin und installierten den Begriff des Hormones in der medizinischen Fachwelt (Bayliss und Starling 1902). Die Arbeitsgruppe um Moore begann 1906 mit Versuchen, bei denen ein Duodenal-Mukosa-Extrakt *per os* in der Annahme gegeben wurde, es gäbe eine Substanz im Gastrointestinaltrakt, welche die Insulin-Sekretion steigere. Hier wurde bereits eine Substanz vermutet, die die endokrine Pankreasfunktion beeinflussen kann (Moore 1906). In der Folgezeit gab es viele Forschungsprojekte zu diesem Thema mit variablen Ergebnissen und Ansätzen. Ein Durchbruch waren die Arbeiten von La Barre und Still 1930. Es gelang ihnen, das bisherige Sekretin in zwei Fraktionen aufzuspalten, von denen die eine in der Lage war, die exokrine Pankreasfunktion zu stimulieren und die andere, den Blutzucker zu senken (La Barre und Still 1930). La Barre war es auch, der 1932 den Begriff "Incrétine" prägte, mit welchem er eine Substanz bezeichnete, die er aus der Mukosa des oberen Darmabschnittes gewann und welche den Blutzucker in

Tierversuchen bei intravenöser oder subkutaner Gabe senkte, ohne dabei die exokrine Pankreasfunktion zu stimulieren (La Barre 1932).

Die Verfeinerung der Untersuchungs- und Bestimmungsmethoden, insbesondere die Entwicklung der Radioimmunoassays durch Yalow und Berson (Yalow und Berson 1959), brachten die Forschungsarbeiten zunehmend voran. Die Untersuchungen, die die Grundlage für die Entdeckung des Inkretin-Effektes waren, brachten Ergebnisse, in denen gezeigt werden konnte, dass eine orale Glukosegabe zu einer deutlich höheren Insulin-Sekretionsantwort führte als die intravenöse Gabe von Glukose bei gleichen Plasmaglukose-Konzentrationen („Isoglykämie“). Daraus resultierte die Annahme, dass gastrointestinale Faktoren bei der Insulin-Sekretionsantwort eine essentielle Rolle spielen müssen [Elrick et al. (1964), McIntyre et al. (1965), Perley und Kipnis (1967)]. Nach Einschätzungen der Autoren mussten circa 50% der Insulin-Sekretionsantwort nach einer oralen Glukose-Belastung durch den Inkretin-Effekt bedingt sein (Nauck et al. 1986). Unger und Eisentraut prägten in diesem Zusammenhang auch den Begriff der „entero-insulären-Achse“ (Unger und Eisentraut 1969). Der Begriff sollte veranschaulichen, in welchem komplexen System der Gastrointestinaltrakt und der Inselapparat des Pankreas standen. Die Zellen des Pankreas werden nicht isoliert durch verschiedene Substrate (Kohlenhydrate, Fette, Aminosäuren) beeinflusst, sondern auch durch neuronale Einflüsse und endokrin über Inkretine und andere Hormone. Eine schematische Darstellung dieser Einflüsse findet sich in Abbildung1.

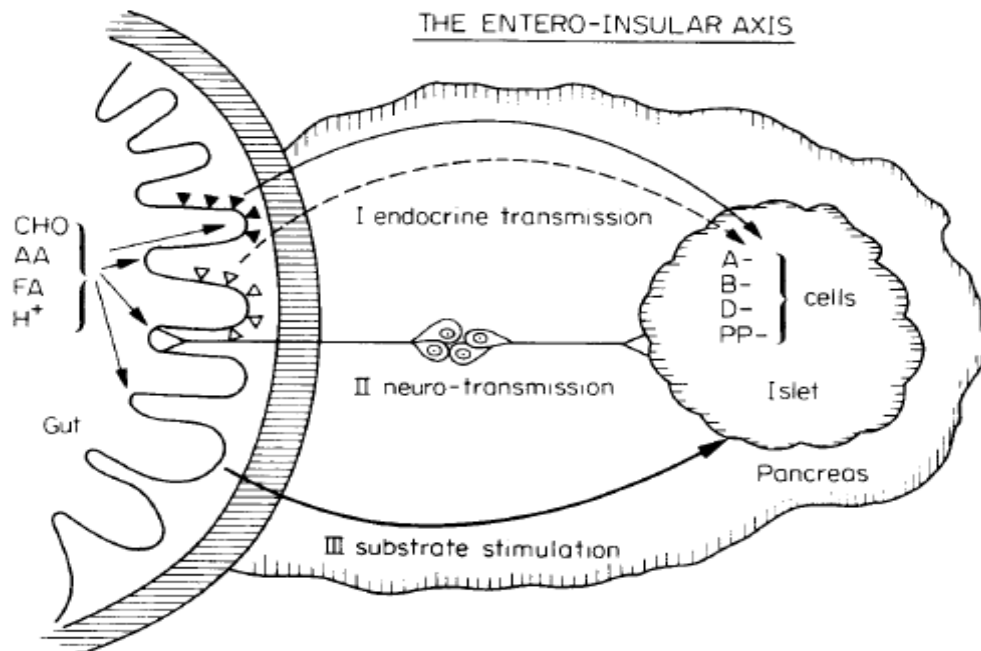


Abb.1: Entero-insuläre Achse: Nach Nahrungsaufnahme können hormonproduzierende Zellen der Pankreasinselzellen (A-Zellen, B-Zellen, D-Zellen, PP-Zellen) durch einen oder mehrere Modalitäten beeinflusst werden: I: endokrine Signale, II: neuronale Signale, III: direkter Substratkontakt. (aus Creutzfeldt 1979, S. 76).

1970 konnte ein Peptid aus der Darmschleimhaut isoliert werden, das anfänglich wegen seiner inhibitorischen Wirkung auf die Magensäureproduktion im Tierversuch "Gastric Inhibitory Polypeptide" (GIP) genannt wurde [Brown et al. (1970), Brown und Dryburgh (1971)]. Drei Jahre später entdeckte man die insulinotrope Wirkung des GIP (Dupre et al. 1973) und schlug deshalb später vor, es "Glucose - Dependent Insulinotropic Polypeptide" zu nennen. Da GIP formal die Kriterien für ein Inkretin erfüllt, gilt es als erstes nachgewiesenes Inkretin. Nachfolgende Untersuchungen zeigten aber rasch, dass noch weitere Inkretine existieren mussten, welche für den Insulin-Sekretionssteigernden Effekt nach oraler Glukose-Belastung mitverantwortlich waren und noch auf ihre Entdeckung warteten (Creutzfeldt 1979).

Später gelang es, ein weiteres Peptid zu generieren, das einen insulinotropen Effekt im Tierversuch hatte und ebenfalls die Kriterien für ein Inkretin erfüllte. Es handelte sich um Glucagon-Like peptide-1 (1-36) [GLP-1(1-36)]. Anschließend konnte

eine weitere insulinotrop wirkende Form, das Glucagon-Like Petide-1 [7-36-Amid] (GLP-1 [7-36-Amid]), generiert werden (Schmidt et al. 1985).

In einer Vielzahl von nachfolgenden Untersuchungen wurde der Nachweis erbracht, dass der Inkretin-Effekt sowohl durch GIP als GLP-1 getragen wurde. Beide Inkretine waren im gesunden Organismus in der Lage, die Insulin-Sekretionsantwort nach oraler Glukose-Belastung im Vergleich zur intravenösen Glukose-Belastung deutlich zu steigern (Nauck et al. 1986).

Die Erforschung der Störungen des Inkretin-Effektes bei Patienten mit einem Typ-2 - Diabetes mellitus sollten zum Grundstein einer neuen Generation von Medikamenten zur Behandlung des Typ-2 - Diabetes mellitus werden. Neben den schon bekannten pathophysiologischen Grundlagen eines Typ-2 - Diabetes mellitus zeigten sich auch Veränderungen auf dem Sektor der Inkretine. Es fanden sich eine leicht reduzierte Sekretion von GLP-1 [Toft-Nielsen et al. (2001), Vilsbøll et al. (2001)] und ein deutlicher Wirkverlust des GIP [Nauck et al. (1993a), Meier et al. (2001), Vilsbøll et al. (2002)] bei Patienten mit einem Typ-2 - Diabetes mellitus. Der insulinotrope Effekt des GLP-1 blieb bei Diabetes mellitus Typ-2 Patienten erhalten, wenn auch etwas vermindert im Vergleich zu gesunden Vergleichsgruppen [Nauck et al. (1993a), Kjems et al. (2003), Nauck et al. (2004)]. Die erhaltene Wirksamkeit des Inkretins GLP-1 bei an Typ-2 - Diabetes mellitus erkrankten Menschen war die Hauptbasis der Entwicklung einer neuen Generation von Medikamenten trotz der Tatsache, dass das GIP vermutlich das bedeutendere physiologische Inkretin im gesunden Organismus ist (Nauck et al. 1993b).

1.2 GLP-1

GLP-1 wird sowohl in den intestinalen L-Zellen des Jejunums, terminalen Ileums, Kolons und Rektums [Eissele et al. (1992), Ørskov (1994)] als auch in den A-Zellen des Pankreas gebildet [Ørskov et al. (1987), Eissele et al. (1992)]. Die höchste Dichte von L-Zellen findet sich im distalen Ileum. Darüber hinaus kommen L-Zellen im gesamten Dünndarm und in höherer Dichte im Dickdarm vor [Eissele et al. (1992), Damholt et al. (1999)]. Der luminale Abschnitt der pyramidenförmigen L-Zelle ist mit Mikrovilli besetzt und im Bereich ihrer Basis reich an Granula [Larsson et al. (1975); Eissele et al. (1992)]. Bei den L-Zellen handelt es sich um endokrine "open-type" Zellen. Ihr Sekretionsverhalten wird durch direkten Kontakt von Nahrungsbestandteilen im

intestinalen Lumen beeinflusst. Man konnte nachweisen, dass die orale Zufuhr von Fetten und Kohlenhydraten eine rasche GLP-1-Spiegel-Erhöhung im Plasma auslösen können. Auch Proteine und gemischte Aminosäuren können die GLP-1-Sekretion steigern [Elliott et al. (1993); Herrmann et al. (1995)].

Nach oraler Zufuhr von Glukose kommt es nach ca. 5-15 Minuten zu einem raschen Anstieg des GLP-1-Plasmaspiegels, gefolgt von einer glukosedosisabhängigen Plateauphase in der zweiten Stunde nach Nahrungsaufnahme und einer folgenden langsamen Annäherung an die basalen Ausgangskonzentrationen (Schirra et al. 1996). Aufgrund der Verteilung der L-Zellen im Gastrointestinaltrakt scheint es paradox, dass es nach Nahrungszufuhr zu einem so raschen Anstieg der GLP-1-Spiegel kommt, die höchste Dichte an L-Zellen aber erst in distalen Abschnitten des Dünndarmes nachgewiesen wird. Bei einem gesunden Probanden erscheint oral zugeführte flüssige Glukose nach ca. 6-8 Minuten im proximalen Duodenum, was zeitlich gut zu der ersten Phase des GLP-1-Anstieges passt (Balks et al. 1997). Nicht dazu passt die anatomische Verteilung der L-Zellen. Daher werden alternative Stimulationswege der L-Zellen unter folgender Vorstellung diskutiert: Die erste Phase des postprandialen GLP-1-Anstieges erfolgt durch alternative Stimulationswege der L-Zellen und die prolongierte Plateauphase wird durch direkten Kontakt von Nahrungsbestandteilen mit den L-Zellen getragen.

Es wurde vermutet, dass neuronale Einflüsse das Sekretionsverhalten der L-Zellen verändern. Es konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass Neurotransmitter wie Acetylcholin eine Freisetzung von GLP-1 auslösen können und diese Effekte sich durch die Gabe von Atropin verhindern lassen [Plaisancie et al. (1994), Dumoulin et al. (1995), Herrmann-Rinke et al. (1995)]. Beim Menschen jedoch ist dieses Phänomen nicht sicher nachvollziehbar. Gegen einen Einfluss des vegetativen Nervensystems spricht insbesondere die Tatsache, dass die vagal vermittelte präabsorptive Phase (cephalische Phase) keinen Einfluss auf die GLP-1-Konzentrationen hat und dass eine Atropingabe ebenfalls keine Veränderungen der GLP-Spiegel provoziert [Balks et al. (1997), Åhrén und Holst (2001)]. Darüber hinaus fanden sich auch nach Vagotomie keine wegweisenden Veränderungen [Miholic et al. (1991), Miholic et al. (1993), Gebhard et al. (2001)].

Eine andere Erklärung für die rasche GLP-1-Antwort nach Nahrungsaufnahme war die Annahme, dass gastrointestinale Hormone endokrinologisch im duodeno-ilealen Kreislauf auf die L-Zellen einwirken könnten. Das GIP wird auch aus K-Zellen im

Duodenum sezerniert und kommt daher frühzeitig mit Nahrungsbestandteilen in Kontakt. In Tierversuchen war GIP durchaus in der Lage, die GLP-1-Sekretion zu erhöhen [Greenberg et al. (1985), Roberge und Brubaker (1993), Dumoulin et al. (1995), Hermann-Rinke et al. (1995)]. Beim Menschen ließ sich dieser Mechanismus aber nicht sicher nachweisen, und es gilt daher als unwahrscheinlich, dass es einen endokrinologisch - regulierenden Kreislauf zwischen GIP und GLP-1 gibt [Nauck et al. (1993a), Herrmann et al. (1995), Schirra et al. (1996)]. Andere Hormone wie Cholezystokinin (CCK) oder Sekretin hatten schon in Tierversuchen mit Ratten keinen Einfluss auf die GLP-1-Sekretion [Plaisancie et al. (1994), Dumoulin et al. (1995), Herrman-Rinke et al. (1995)]. Beim Menschen fand sich in einer Studie eine Stimulation der GLP-1-Sekretion durch CCK (Fieseler et al. 1995). Dieser Effekt ließ sich in einer weiteren Studie aber nicht reproduzieren (Ahrén et al. 2000). In Kombination mit der Tatsache, dass CCK-Antagonisten keinen Einfluss auf die Insulin-Sekretion nach einem "mixed meal-Test" zeigten, gilt es als unwahrscheinlich, dass CCK einen Einfluss auf die Sekretion der Inkretin Hormone hat [Hildebrand et al. (1991), Schwarzendrube et al. (1991)].

Einen stärkeren Einfluss als endokrine Effekte scheinen parakrine Effekte durch Somatostatin auf das GLP-1-Sekretionsverhalten zu haben. Somatostatin wird unter anderem aus D-Zellen des Gastrointestinaltraktes sezerniert. Diese D-Zellen finden sich auch in unmittelbarer Nachbarschaft zu K- und L-Zellen (Damholt et al. 1999). Somatostatin-Infusionen konnten bei "in-vivo"-Studien zeigen, dass Somatostatin die Potenz hat, sowohl die GLP-1- als auch die GIP-Sekretion zu inhibieren [Salera et al. (1982), Ho et al. (1987), Martin PA und Faulkner (1996)]. Die GLP-1-Sekretion wird stärker durch das von den D-Zellen sezernierte Somatostatin-28 als durch das neuronal gebildete Somatostatin-14 inhibiert. Gemeinsam mit der Tatsache, dass sowohl GIP als auch GLP-1 in der Lage sind, die Somatostatin-Sekretion zu stimulieren, scheint hier ein parakriner Regelkreis zu existieren, der die Inkretin-Hormon-Sekretion limitiert [Jia et al. (1994), Hansen et al. (2000), Chisholm und Greenberg (2002)].

Insgesamt scheinen multiple Einflüsse durch direkte als auch indirekte Mechanismen die frühe GLP-1-Antwort zu steuern. Den Haupteinfluss hat aber trotz gegenläufiger Verteilung der L-Zellen im Gastrointestinaltrakt scheinbar der direkte Kontakt zwischen Nahrungsbestandteilen und L-Zellen im proximalen Verdauungstrakt. Grundlage für diese Annahme sind zum einen nachgewiesene duodenale L-Zellen (Theodorakis et al. 2006) und zum anderen die Sekretion einer GLP-1-Menge nach

Nahrungsaufnahme, die ca. 10% der in den jejunalen L-Zellen gespeicherten Gesamtmenge ausmacht (Nauck et al. 1997a). Darüber hinaus hatten Resektionen im Verlauf des Gastrointestinaltraktes, unabhängig ob Dünndarm oder Dickdarm, keinen Einfluss auf die GLP-1-Sekretion (Nauck et al. 1996). Insbesondere dieses Erkenntnis gibt Anlass zu der Annahme, dass die GLP-1-Sekretion primär vom Kontakt zwischen L-Zellen und Nahrungsbestandteilen abhängt, unabhängig davon, in welcher Region des Darmes der Kontakt stattfindet.

Der basale Plasmaspiegel von GLP-1 Total liegt bei 2 -15 pmol/L [Herrmann et al. (1995), Nauck (1998)]. Postprandial liegen die Konzentrationen zwischen 25 – 40 pmol/L in Abhängigkeit zur Größe der Mahlzeit und deren Zusammensetzung. Die Werte kehren nach ca. 180 Minuten wieder auf basale Konzentrationen zurück [Ørskov et al. (1994), Ahrén et al. (1997), Toft-Nielsen et al. (2001), Vilsbøll et al. (2001), Vollmer et al. (2008)]. Die Konzentrationen für GLP-1 Intakt (GLP-1[7-37] und GLP-1 [7-37-Amid]) liegen im Nüchternzustand bei < 1 pmol/L und nach oraler Nahrungsaufnahme bei 3 – 5 pmol/L [Vilsbøll et al. (2001), Dai et al. (2008)].

Für die Proteinbiosynthese des GLP-1 existiert keine eigene Gensequenz (Bell et al. 1983), sondern es wird aus dem Vorläuferhormon Proglukagon abgespalten. Bei diesem Prozess entstehen weitere stoffwechselaktive Hormone [Mojsov et al. (1986), Ørskov et al. (1987)]. Die posttranslationale Prozessierung des Moleküls unterscheidet sich gewebespezifisch (Conlon 1988). Im Pankreas entsteht aus dem Prohormon Glicentin-related Pankreatic Peptide (1-30) (GRPP), Proglukagon (33-61), Proglukagon (64-69) und das Major-Proglukagon-Fragment (72-158) (MPFG), welches die Sequenz für GLP-1 und GLP-2 enthält. Das MPFG wird im Pankreas nicht weiter gespalten [Thim und Moody (1982), Patzelt und Schiltz (1984), Yanaihara et al. (1985)]. Das Hauptprodukt der Prozessierung des Proglukagonmoleküls in den pankreatischen A-Zellen ist das Glukagon. GLP-1 wird nur in geringen Mengen freigesetzt (Holst 1997).

Die L-Zellen des Dünndarmes produzieren die Hauptmenge an GLP-1 (Eissele et al. 1992). Aus dem Proglukagon wird in den L-Zellen des Darmes Glicentin (Proglukagon 1-69), GLP-1 (Proglukagon 72-108), Intervening Peptide (Proglukagon 111-123) und GLP-2 (Proglukagon 126-158) gebildet [Thim und Moody (1981), Bataille et al. (1982), Ørskov et al. (1986)]. Aus dem Glicentin entstehen im weiteren Verlauf GRPP (Proglukagon 1-30) und Oxyntomodulin (Proglukagon 33-69), wobei bei beiden Produkten die physiologische Wirkung nicht bekannt ist.

Das GLP-1 liegt initial als biologisch inaktive Form GLP-1 [1-37-Amid] vor und wird im Verlauf nach Abspaltung von 6 N-terminalen Aminosäuren zum biologisch aktiven GLP-1 [7-37-Amid] als Glycin-extendierte Form, welches die prädominante Form im Darmgewebe darstellt (Ørskov et al. 1986).

Zum Teil wird von diesem Molekül noch die C-terminale Aminosäure abgespalten und das entstandene GLP-1 [7-36-Amid] wird C-terminal amidiert zur amidierten Form (Conlon 1988). Beide GLP-1-Isoformen haben identische biologische Effekte.

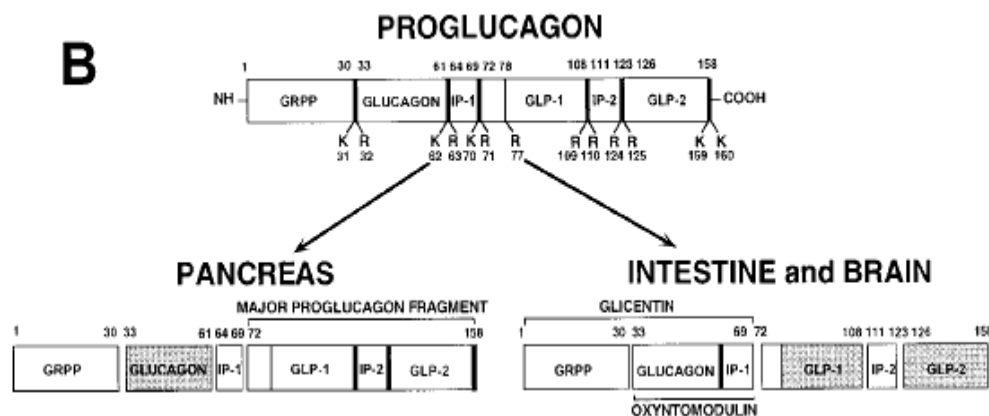


Abb.2: Gewebespezifische, posttranslationale Prozessierung des Proglucagon in Pankreas und Darm/Gehirn (aus Kieffer und Habener 1999, S. 885).

Die beiden aktiven GLP-1-Formen haben eine durchschnittliche Halbwertszeit in der Blutbahn von 1 – 2 Minuten [Ørskov et al. (1993), Vilsbøll et al. (2003a), Meier et al. (2004)]. Das hauptverantwortliche Enzym für die rasche Inaktivierung der aktiven GLP-1-Formen ist die Dipeptidyl-Peptidase – 4 (DPP – 4). Als Spaltprodukte entstehen inaktive GLP-1-Formen wie das GLP-1 (9-36-Amid) aus der amidierten GLP-1-Form und GLP-1 (9-37) aus der Glycin-extendierten Form [Deacon et al. (1995a), Hansen et al. (1999)]. Diese Einschätzung muß nach jüngsten Studien neu überdacht werden, da GLP-1 (9-36-Amid) und GLP-1 (9-37) doch schwache, insulinunabhängige antihyperglykämische Wirkungen haben sollen und eventuell Einfluss auf kardiovaskuläre Prozesse haben könnten [Nikolaidis et al. (2005a), Ban et al. (2008) Sonne et al. (2008)]. Das GLP-1 (9-37) ist der Hauptmetabolit des GLP-1-Abbauprozesses [Deacon et al. (1995a), Deacon et al. (1995b)].

Die physiologischen GLP-1-Effekte werden über spezifische GLP-1-Rezeptoren vermittelt. Es handelt sich dabei um ein aus 463 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 63 kDa. Der Rezeptor gehört zur Familie B der G-Proteingekoppelten Rezeptoren [Göke R. und Conlon (1988), Thorens (1992), Van Eyll et al. 1994]. Als Nachweis für die Existenz von GLP-1-Rezeptoren in den einzelnen Zielorganen wurde versucht, Rezeptor-mRNA nachzuweisen. Dies gelang in den Pankreasinseln (A-Zellen, B-Zellen und D-Zellen), dem Gehirn (Hypothalamus, Hirnstamm und Hypophyse), dem Magen, dem Darm, der Lunge, dem Herz und der Niere. In den für die Glukohomöostase so bedeutenden Organen wie Leber, Fettgewebe oder Skelettmuskulatur gelang dieser Nachweis nicht [Wheeler et al. (1993), Campos et al. (1994), Wei und Mojsov (1995), Bullock et al. (1996), Dunphy et al. (1998)].

Der nachgewiesene GLP-1-Rezeptor ist in allen Geweben strukturell identisch (Wei und Mojsov 1995). Die Existenz eines weiteren Rezeptors in Muskel-, Fett- und Lebergewebe wird noch kontrovers diskutiert und man vermutet die Existenz eines zweiten Rezeptors, der aber noch nicht identifiziert ist [Yang et al. (1998), Kieffer und Habener (1999)].

Seinen insulinotropen Effekt erzielt das GLP-1 an den β -Zellen der pankreatischen Inselzellen. Nach Bindung an den dortigen GLP-1-Rezeptor kommt es zu einer rezeptorvermittelten Stimulierung eines GTP-bindenden Proteins, welches die membrangebundene Adenylatzyklase aktiviert. Als Effekt kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP und einer Aktivierung der Proteinkinase A, welche Phosphorylierungsprozesse an weiteren Zielproteinen induziert. Nach Depolarisation der Zellmembran kommt es zu einem Anstieg der Konzentration an freiem zytosolischen Ca^{2+} durch Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Als Stimulus für die Freisetzung des Insulins aus den Vesikeln der β -Zellen wirkt der rasche Konzentrationsanstieg des freien Ca^{2+} im Zytosol. Dieser GLP-1-induzierte Ca^{2+} -Anstieg ist vom Glukose-Spiegel abhängig (Cullinan et al. 1994). Glukose und GLP-1 verursachen an den β -Zellen synergistisch einen raschen Ca^{2+} -Anstieg. Damit wird die Insulinfreisetzung induziert und somit auf erhöhte Blutzucker-Konzentrationen nach Nahrungsaufnahme reagiert (Mac Donald et al. 2002). Unterhalb einer Plasmaglukose-Konzentration von ca. 65 mg/dl ist der insulinotrope Effekt des GLP-1 so gut wie nicht vorhanden, hingegen aber besonders ausgeprägt bei hohen Plasmaglukose-Konzentrationen, z.B. postprandial. Somit ist die insulinfreisetzende Wirkung des GLP-1

abhängig von der Plasmaglukose-Konzentration [Göke R. et al. (1993a), Nauck et al. (2002)].

Einen weiteren Effekt an den β -Zellen des Pankreas hat das GLP-1 an zuvor glukoseresistenten β -Zellen. Hier wird die Glukosekompetenz dieser Zellen wieder hergestellt und ihnen ermöglicht, adäquat auf steigende Glukose-Konzentrationen zu reagieren (Holz et al. 1993). Zusätzlich reagieren auch glukosesensible β -Zellen nach GLP-1-Exposition deutlich stärker auf eine Stimulation durch Glukose (Göke B. et al. 2002). Darüber hinaus konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass GLP-1 oder GLP-1-Analoga die Potenz besitzen, die β -Zelle Masse zu erhöhen [Stoffers et al. (2000), Rolin et al. (2002)]. GLP-1 scheint noch weitere protektive Wirkungen auf die β -Zellen zu haben. Bei in vitro Experimenten ließ sich nachweisen, dass es unter dem Einfluss von GLP-1 durch "down"-Regulation von Kaspase-3 (spaltet strukturelle und funktionelle Proteine in der Ausführungsphase der Apoptose) und "up"-Regulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 zu einer verbesserten Überlebensfähigkeit von isolierten Inselzellen kam (Farilla et al. 2003). Der Verdacht einer anti-apoptotischen Wirkung des GLP-1 wurde weiter erhärtet durch Versuche, bei denen gezeigt werden konnte, dass GLP-1 das Zellüberleben der β -Zellen auch unter apoptoseinduzierenden Substanzen wie Streptozotocin, Zytokinen und Fettsäuren verbessert [Hui et al. (2003), Li et al. (2003), Buteau et al. (2004)].

Zur Verbesserung der Insulinantwort induziert GLP-1 eine verstärkte Transkription des Insulin Gens, eine Stabilisierung der mRNA und somit eine insgesamt erhöhte Insulin-Biosynthese [Drucker et al. (1987), Fehmann und Habener (1992)].

Regulierenden Einfluss auf die Plasmaglukose-Konzentrationen nimmt das GLP-1 auch, indem es die Glukagon-Sekretion inhibiert. Dieses geschieht einerseits durch direkte Einwirkung auf die α -Zellen über die dortigen GLP-1-Rezeptoren und andererseits durch eine GLP-1-induzierte Somatostatin-Freisetzung aus den δ -Zellen [D'Alessio et al. (1989), Komatsu et al. (1989)]. Unter GLP-1-Einfluss vermehrt freigesetztes Insulin wirkt auch hemmend auf die Glukagon-Sekretion (Samols et al. 1986).

Einen weiteren wichtigen Beitrag zur normalen Glukohomöostase übt GLP-1 im Magen-Darm-Trakt aus. Es verlangsamt die gastroduodenale Motilität, verzögert die Magenentleerung und verhindert so starke postprandiale Plasmaglukose-Anstiege, ohne dabei die Magenentleerung ganz zu verhindern oder gar Gastroparesen

auszulösen [Wettergren et al. (1993), Nauck et al. (1997b), Schirra et al. (1997), Schirra et al. (1998a)].

Über die GLP-1-Rezeptoren im zentralen Nervensystem, insbesondere in hypothalamischen Kerngebieten, wird vermutlich ein weiterer GLP-1-spezifischer Effekt ausgelöst. Es konnte nachgewiesen werden, dass die periphere Applikation von GLP-1 oder GLP-1-Analoga den Appetit und die Menge der aufgenommenen Nahrungsmittel senkte. Diesen Effekt konnte man sowohl an gesunden Probanden als auch Typ-2 - Diabetes mellitus Erkrankten finden [Flint et al. (1998), Gutzwiller et al. (1999a), Gutzwiller et al. (1999b), Toft-Nielsen et al. (1999), Edwards et al. (2001)]. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch Ergebnisse aus Tierversuchen. Bei einer intracerebroventrikulären Gabe von GLP-1 bei Nagetieren zeigt sich eine dosisabhängige Reduktion der Nahrungsaufnahme. Hingegen fand sich nach intracerebroventrikulärer Gabe des GLP-1-Rezeptor Antagonisten Exendin [9-39] eine deutlich erhöhte Nahrungsmittelaufnahme und ein Anstieg des Körpergewichtes bei den Tieren [Tang-Christensen et al. (1996), Turton et al. (1996), Meeran et al. (1999)].

Damit erweisen sich drei GLP-1-Wirkungen zur Vermeidung starker postprandialer Plasmaglukose-Anstiege als bedeutungsvoll: Verstärkung der Insulin-Sekretion, Hemmung der Glukagon-Sekretion und die Verlangsamung der Magenentleerung. Alle weiteren Effekte sind abschließend in Abbildung 3 zusammengefasst.

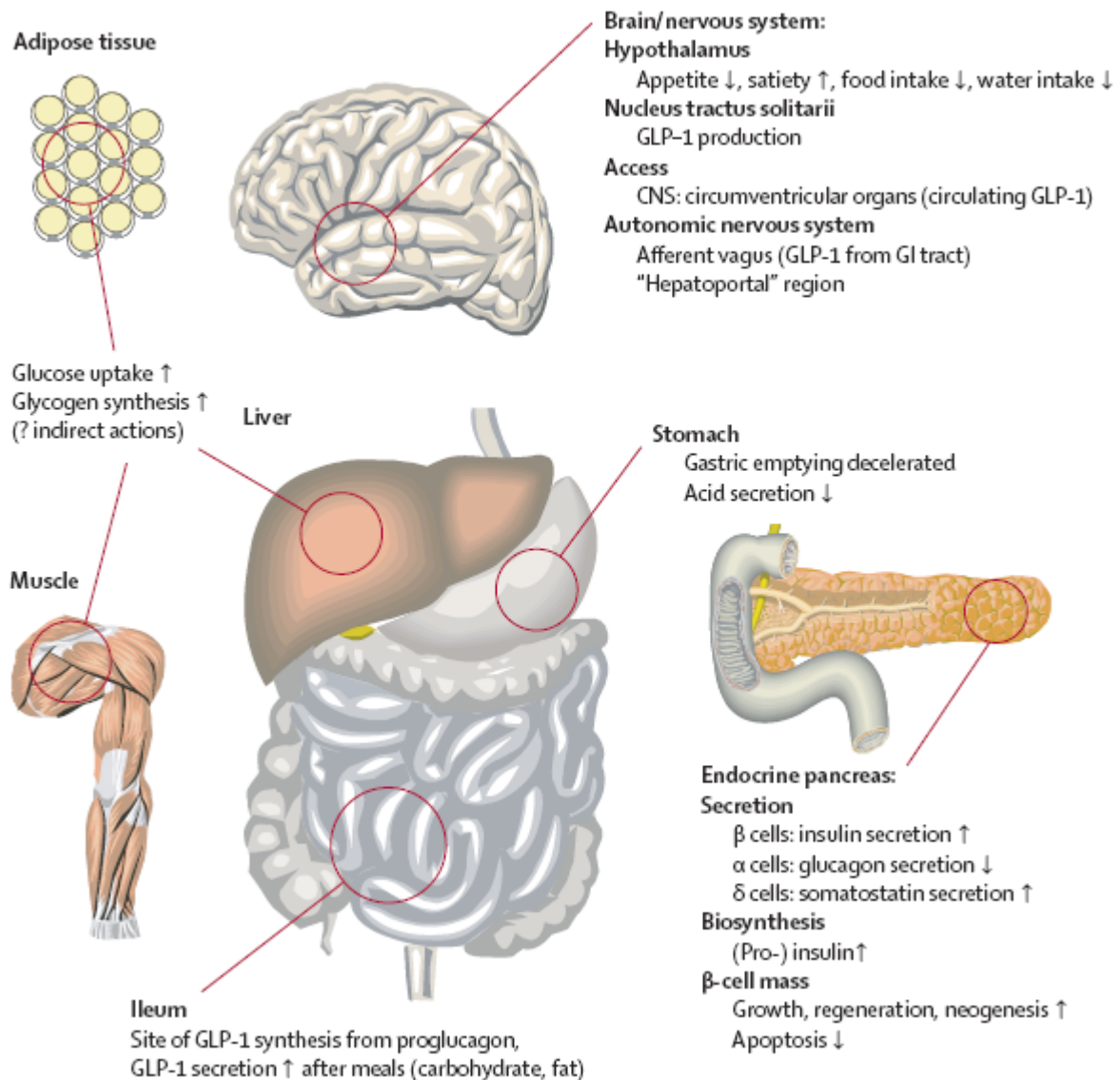


Abb 3: Sekretion und Wirkung von GLP-1 in unterschiedlichen Organen und Geweben (aus Drucker und Nauck 2006, S. 1696).

1.3 Exendin [9-39]

Aus dem Toxin der Unterkieferdrüsen der Gila-Krustenechse (*Heloderma suspectum*) konnte ein Protein namens Exendin-4 isoliert werden, und es zeigte sich, dass dieses Protein ein potenter Agonist an GLP-1-Rezeptoren sowohl der Ratte als auch des Menschen ist [Thorens (1992), Dillon et al. (1993), Thorens et al. (1993)]. Exendin-4 zeigt eine 53%ige Sequenzhomologie zu GLP-1 [7-36-Amid] (Raufmann et

al. 1992). Seine trunkierte Form Exendin [9-39] zeigt hingegen eine spezifische, antagonistische Wirkung am GLP-1-Rezeptor, ohne jegliche agonistische Wirkung. Dies ließ sich in *in vitro* und *in vivo* Versuchen am Tiermodell bestätigen [Göke R. et al. (1993b), Thorens et al. (1993), Kolligs et al. (1995), Wang Z. et al. (1995)].

Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass durch intravenöse Exendin [9-39]-Gabe die postprandiale Insulin-Sekretion um 50% reduziert wurde. Daraus resultierten Anstiege der postprandialen Plasmaglukose-Konzentration. Dies wird auf eine suffiziente Blockade der sonst GLP-1 augmentierten Insulin-Sekretion zurückgeführt. Auf andere insulinotrope Substrate hat Exendin [9-39] keinen hemmenden Einfluss gezeigt (Wang Z. et al. 1995). Auch eine intravenöse Bolusgabe von Exendin [9-39] vor intraduodener Glukosegabe konnte bei Ratten die Insulinantwort um 50% reduzieren (Kolligs et al. 1995). Bei Affen konnte durch die intravenöse Gabe von Exendin [9-39] vor intragastraler Gabe von Glukose im Vergleich zu einer Glukosegabe ohne Exendin [9-39] ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Plasmaglukose provoziert werden. Als ursächlich wird auch hier eine reduzierte Insulinausschüttung in der frühen postprandialen Phase angenommen, welche durch die Blockade der GLP-1-Rezeptoren durch Exendin [9-39] induziert wird (D'Alessio et al. 1996). Untersuchungen an Ratten zeigten, dass GLP-1 auch eine dominante Wirkung auf das Appetitgefühl und die Nahrungsaufnahme zu haben scheint. So fand sich nach intracerebroventrikulärer GLP-1-Gabe eine dosisabhängige Verminderung der Nahrungsaufnahme. Nach intracerebroventrikulärer Applikation von Exendin [9-39] zeigte sich hingegen eine erhöhte Nahrungsaufnahme und eine Gewichtszunahme als Ausdruck dafür, dass Exendin [9-39] scheinbar auch im zentralen Nervensystem GLP-1-Rezeptoren effizient hemmen kann [Tang-Christensen et al. (1996), Turton et al. (1996), Meeran et al. (1999)].

Beim Menschen konnte mit Applikationsdosen von $300 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Exendin [9-39] sowohl der insulinotrope Effekt von GLP-1 als auch die Hemmende Wirkung des GLP-1 auf die Glukagon-Sekretion aufgehoben werden (Schirra et al. 1998b). Diese Ergebnisse wurden in darauf folgenden Studien bestätigt und man fand heraus, dass unter Blockade der GLP-1-Rezeptoren durch Exendin [9-39] die postprandiale Insulin-Sekretion gehemmt und dadurch hyperglykämische Plasmaglukose-Spiegel provoziert werden konnten (Edwards et al. 1999). Allen Studien am Menschen war gemeinsam, dass die intravenöse Gabe von Exendin [9-39] gut toleriert wurde und keine wesentlichen Nebenwirkungen auftraten.

Auch die hemmende Wirkung von GLP-1 auf die Magenmotilität wird durch Gabe von Exendin [9-39] reduziert und es verkürzt die postprandiale antrale Inhibitionsphase [Schirra et al. (2001)].

1.4 Adsorption von Proteinen an Oberflächen

Da biotechnologisch gewonnene Proteine im Rahmen des Einsatzes als Therapeutikum bei oraler Applikation praktisch keine Bioverfügbarkeit zeigen, müssen diese parenteral verabreicht werden (Zimmer 2003). Hier liegt für die pharmazeutische Industrie seit langem ein Schwerpunkt ihrer Arbeit bezüglich Produktion, Lagerung und Applikation von Proteinen als Therapeutika. Dabei geht es um Interaktionen zwischen den Arzneimitteln und der Primärverpackung. Entscheidend sind dabei zwei Wechselwirkungsprinzipien zwischen Arzneimittel und Verpackung. Zum einen handelt es sich um das Phänomen der Adsorption der Proteine an den Oberflächen der Verpackung und zum anderen um das Phänomen der Migration (*Leaching*). Mit dem Begriff Migration wird die Möglichkeit beschrieben, dass sich aus der Verpackung Substanzen lösen und in das Arzneimittel diffundieren können (Haverkamp et al. 2007).

Bei dem Einsatz von Proteinen als parenterales Therapeutikum ist für die Anwendung vorrangig das Phänomen der Adsorption zu berücksichtigen. Proteine werden in Lösung durch verschiedene Reaktionen in ihrer Stabilität verändert und es kann aufgrund dessen zu molekularen Strukturänderungen kommen [Manning et al. (1989), Nakanishi et al. (2001)]. Im Gegensatz zu den meisten herkömmlichen chemischen Wirkstoffen zeigen Proteine als Makromoleküle in ihrem Peptidgerüst zahlreiche Stellen, die für Abbaureaktionen anfällig sind [Manning et al. (1989), Schumacher et al. (2003), Zimmer (2003)]. Die komplexen Strukturen von Proteinen bedingen die Tatsache, dass diese zu starken Wechselwirkungen zu den Verpackungssystemen wie z.B. Glas oder Kunststoff im Rahmen der Lagerung und Applikation neigen. Durch die starke Grenzflächenaktivität der Proteine kommt es zu Adsorptionsprozessen an den Oberflächen der Verpackungen. Die Bindung und ggf. anschließende Denaturierung verursachen Verluste der Wirkstoffkonzentration im Verpackungssystem (bzw. Infusionssystem), und so wird eine berechenbare, zuverlässige Dosierung unmöglich [Manning et al. (1989), Horbett (1992), Nakanishi et al. (2001)].

Proteine sind in ihrer Grundstruktur auf 4 Ebenen definiert. Der Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Die Primärstruktur beschreibt die Reihenfolge der Aminosäuren, die über Peptid-Säureamidbindungen miteinander verbunden sind und die Grundbausteine eines Proteins darstellen. Die 20 existenten Aminosäuren sind entweder basisch oder sauer und geben dadurch dem Protein je nach Zusammensetzung einen amphoteren (sowohl basisch als auch saure Anteile) und amphiphilen (sowohl hydrophile als auch lipophile Anteile) Charakter. Die Auffaltung der so gebildeten Ketten beschreibt man als Sekundärstruktur. Sie hängt von der Aminosäurezusammensetzung ab, also der Primärstruktur und der relativen Lage der jeweiligen Aminosäuren. Man unterscheidet die α – Helix, bei der die Bindungen innerhalb einer Kette vorliegen und das Gerüst der Polypeptidkette so in Form einer gestreckten Ziehharmonika vorliegt und das β – Faltblatt, bei dem die Bindungen zwischen zwei benachbarten Polypeptidketten auftreten. Beiden gemeinsam sind die maximale Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonyl- (CO) und Aminogruppen (NH), welche die Stabilität der Struktur bedingen [Pauling und Corey (1951), Pauling et al. (1951)]. Im Weiteren werden Proteine in Abhängigkeit der gesamten Proteinmorphologie als globuläre oder fibrilläre Proteine beschrieben. Die Mehrheit der Proteine, insbesondere Enzyme und Peptidhormone sind globuläre Proteine mit einer komplexen Struktur, da sie mehrere Sekundärstrukturtypen in einer Polypeptidkette enthalten. Einige Proteine enthalten auch ausschließlich α – Helices (z.B. Hämoglobin oder Myoglobin). Die meisten Proteine besitzen jedoch Anteile beider Sekundärstrukturformen [Stryer (1990), Strynadka und James (1996)].

Die Tertiärstruktur legt die dreidimensionale Lage aller Atome einschließlich der Seitenketten fest. Hierbei spielen insbesondere neben den Wasserstoffbrückenbindungen Disulfidbindungen eine wichtige Rolle. Zusätzlich treten ionische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Kohlenwasserstoffatomen im Inneren der Proteine auf. Die Quartärstruktur ist zu guter Letzt die Zusammenlagerung von mehreren Polypeptidketten in Tertiärstruktur zu einem funktionsfähigen Protein (Stryer 1990).

Auf allen Bindungs- und Strukturebenen kann es bei einem Protein zu Instabilitäten und Veränderungen im Kontakt mit anderen Substanzen oder bei Änderung der Verhältnisse kommen. Insbesondere in Lösungen zeigen Proteine einen Wechsel des Stabilitätszustandes. Die möglichen Instabilitätsreaktionen unterscheidet man in chemische (z.B. Deamidierung, Razematbildung, Hydrolyse, Oxidation, β -

Eliminierung, Umlagerung von Disulfidbrücken) und physikalisch (Adsorption, Denaturierung, Aggregation, Fällung) Reaktionen (Manning et al. [1989], Violand und Siegel [2000], Wang W. [2005]). Im Folgenden wird speziell die physikalische Instabilitätsreaktion der Adsorption betrachtet.

Proteine neigen wegen der beschriebenen Größe, Flexibilität und ihres häufig amphoteren Charakters zu starker Oberflächenaktivität an verschiedenen Oberflächen. Mit dem Prozess der Adsorption ist der Versuch eines Moleküls gemeint, die freie Oberflächenenergie des Feststoffes, an den es adsorbiert, zu reduzieren [Nakanashi et al. (2001), Martin AN (2002)].

Proteinhaltige Arzneistoffe sind bei der Verarbeitung, Lagerung und Applikation den unterschiedlichsten Oberflächen aus verschiedensten Materialien ausgesetzt. Darüber hinaus sind Proteine in dem Ausmaß ihrer individuellen Oberflächenaktivität variabel, da jede Primärstruktur unterschiedlich ist und so auch die dreidimensionale Struktur der Proteine Unterschiede aufweist. Darin liegt begründet, dass Arzneistoffe mit proteinartigen Wirkstoffen unterschiedliche Oberflächenaktivitäten aufzeigen und daher unterschiedlich mit Oberflächen interagieren. Somit ist das Ausmaß der gesamten Oberflächenphänomene abhängig von der Proteinstruktur, der Feststoffoberfläche und den Umgebungsbedingungen [Horbett (1992), Gray (2004)]. Bis heute sind die detaillierten Prozesse der Adsorption nicht endgradig geklärt, wobei insgesamt die Vorhersagbarkeit der auftretenden Konformitätsänderungen Probleme bereitet und daher für jedes einzelne proteinhaltige Präparat individuelle Untersuchungen durchgeführt werden müssen.

An dem Prozess der Adsorption sind multiple Prozesse beteiligt. Es wirken dabei neben entropiegesteuerten Prozessen, wie hydrophoben Wechselwirkungen und Konformitätsänderungen, auch elektrostatische Kräfte. Darüber hinaus werden intermolekulare Interaktionen wie Coulomb- und van-der-Waals-Kräfte aktiv, ebenso wie intramolekulare Interaktionen (Brash und Horbett 1995).

Bei der Adsorption handelt es sich um einen dynamischen Prozess, bei dem aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten der sich in Lösung befindlichen Moleküle eine Konkurrenzsituation für die Adsorption an der Oberfläche besteht. Der Prozess gliedert sich in einzelne Phasen, die chronologisch gegliedert sind. Initial erfolgt der Transport bzw. die Diffusion der Proteine in Richtung der Oberfläche bzw. Grenzfläche (z.B. Verpackungsmaterial, Infusionssystem), gefolgt von dem Prozess der Bindung an die Oberfläche. Dadurch kommt es zu strukturellen

Veränderungen des Proteins im adsorbierten Zustand und später zur Desorption von der Grenzfläche und ggf. zum Abtransport. Besonders in der Anfangsphase des Kontaktes zwischen proteinhaltiger Arzneilösung und der neuen Oberfläche (z.B. Befüllen des Infusionssystems) kommt es zu einer schnellen diffusionskontrollierten Phase, bei denen die Proteine sofort adsorbiert werden. In einer spätere Phase verlangsamt sich der Prozess, da Adsorptionsplätze zunehmend von Proteinen aus der ersten Phase bereits besetzt sind [Andrade (1985), Horbett (1992)]. Diese Tatsache kann man nutzen, seitdem bekannt ist, dass in Lösungen mit mehreren unterschiedlichen Proteinbestandteilen diejenigen die „freien“ Adsorptionplätze an der Oberfläche in der ersten Phase besetzen, die eine kleine Molekülgröße aufweisen und in hoher Konzentration vorliegen. In Multiprotein-Adsorptionsmodellen an Oberflächen zeigte sich, dass bei Mischlösungen mit Albumin, Fibrinogen und Immunglobulin G (IgG) die initialen Adsorptionprozesse an Polystyroloberflächen vom Albumin dominiert wurden, während die anderen Proteine weniger Oberflächenbindungen eingingen und daher in ihrer freien Konzentration höher lagen. Später kam es dann zu Austauschprozessen an den Oberflächen durch Fibrinogen und IgG. Man bezeichnet dieses Phänomen auch als Vroman-Effekt, der die „sequentielle Adsorption“ beschreibt [Vroman et al. (1977), Lu et al. (1994)]. Durch Zugabe von humanem Serum-Albumin kann man demnach die Kunststoffoberfläche in einem Infusionssystem absättigen und somit ein anderes proteinhaltiges Arzneimittel in höheren Konzentrationen in Lösung halten und Bindungsverluste so begrenzen. Genau dieses Phänomen wird am Beispiel einer GLP- 1 [7-36 Amid] Infusion im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielen.

1.5 Humanes Serum-Albumin

Humanes Serum-Albumin hat ein Molekulargewicht von 66,5 kDa und wird in der Leber synthetisiert (ca. 10 – 15 g/Tag). Es liegt in einer Konzentration zwischen 35 – 50 g/L vor und hat eine durchschnittliche Halbwertszeit von 19 Tagen (Peters 1985). Als regulierender Faktor für die Albuminsynthese wird der extravasale kolloidosmotische Druck in der Leber angesehen. So erklärt es sich auch, dass es bei iatrogener exogener Zufuhr kolloidonkotischer Substanzen, sowohl natürlicher als auch künstlicher Kolloide, im Rahmen längerer Anwendungen zu einer Hemmung der Albuminsynthese kommt (Oratz et. al. 1970). Das Albumin ist im menschlichen Organismus in zwei Kompartimenten verteilt. Zu 40% im intravasalen Flüssigkeitsraum und zu 60% im

extravasalen Flüssigkeitsraum. Der extravasale Flüssigkeitsraum ist in Abhängigkeit der Kapillarpermeabilität bezüglich der Organe für das Albumin in zwei Subkompartimente unterteilt. Die viszerale Organe bilden eines dieser Subkompartimente, da Sie eine hohe Kapillarpermeabilität für Albumin aufweisen und so ein schneller Austausch mit dem Intravasalraum stattfinden kann. Das zweite Subkompartiment bilden die Skelettmuskulatur und die Haut, da diese eine reduzierte Austauschgeschwindigkeit mit dem intravasalen Albuminpool darstellen [Oratz et. al. (1970), Rossing (1978), Margaron und Soni (1998), Standl (2001)]. Ungefähr 5% der intravasalen Albuminmenge werden pro Stunde mit dem Extravasalraum ausgetauscht („transcapillary escape rate“). Diese Austauschrate des Albumins ist erhöht bei Verbrennungen, Myxödem, Leberzirrhose und diabetischer Mikroangiopathie [Parving und Rossing (1973), Parving et. al. (1977)]. Über die Lymphbahnen wird das Albumin wieder dem Intravasalraum zugeführt. Bei physiologischer Kapillarpermeabilität beträgt die durchschnittliche intravasale Verweildauer des Albumins 4 Stunden (Standl 2001).

Die wichtigsten physiologischen Funktionen des Albumins bestehen in der Aufrechterhaltung des intravasalen Volumens, in einer Pufferfunktion als Bestandteil des Proteinpuffersystems und einer Transportfunktion.

Durch eine hohe Wasserbindungskapazität von ca. 18 ml/g kann Albumin Volumen im intravasalen Lumen binden. So hat Albumin eine ca. 2,5-fach höhere onkotische Wirkung bei vergleichbaren Konzentrationen als Globuline mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 170 kDa. Letztendlich bestimmt das Albumin zu 80% den intravasalen kolloidosmotischen Druck, obwohl es nur einen Anteil von 60% an den Gesamtproteinen im Plasma stellt [Ladegaard-Pedersen (1969), Standl (2001)].

Das Albumin kann als Bestandteil des Proteinpuffers des menschlichen Körpers, insbesondere durch reversible H^+ -Bindung oder Abgabe an der Carboxyl- bzw. Aminogruppe einen Anteil leisten, um das Säure-Basen-Gleichgewicht aufrecht zu erhalten (Scheid 1996).

Die Transportfunktion kann das Albumin durch seine besondere Struktur und Bindungsfähigkeit erfüllen. Die Primärstruktur des Albumins ist endgültig seit 1982 bekannt (Dugaiczky et. al. 1982). In späteren Arbeiten konnten die Sekundär- und nach Röntgenstrukturanalysen auch die Tertiärstruktur identifiziert werden. Aus den 585 Aminosäuren werden über 17 Disulfidbrücken drei homologe Domänen (I-III) gebildet, welche jeweils nochmals in zwei Subdomänen (A-B) gegliedert werden (siehe auch

Abb. 4) . Die dreidimensionale, herzförmige Struktur zeigt zu 67% eine α – helikale Struktur [Carter und Ho (1994), Peters (1996), Curry et. al. (1998)].

Albumin interagiert in vielfältiger Art und Weise mit seiner Umgebung, endogenen Substraten und Medikamenten. Typischerweise kommt es zu einer oder mehreren Bindungen in spezifischen Regionen des Moleküls. Wegweisende Arbeiten dazu stammen von Sudlow und seiner Arbeitsgruppe. Sie fanden zwei Bindungsstellen am Albuminmolekül und nannten diese Bindungsstelle I und Bindungsstelle II (Sudlow et. al. 1975). Bindungsstelle I liegt in der Subdomäne II A und Bindungsstelle II in der Subdomäne III A. Unter physiologischen Bedingungen binden z.B. körpereigene Substanzen wie Fettsäuren und Bilirubin an Albumin [Jacobsen (1969), Peters (1985), Curry et al. (1998)]. Aber auch viele Medikamente interagieren mit den Bindungsstellen des Albumins. Manche Medikamente bevorzugen bestimmte Bindungsstellen am Albuminmolekül. So binden z.B. Digitoxin, Ibuprofen und Tryptophan vorrangig an der Bindungsstelle III A und Warfarin vorrangig an II A [Sudlow et al. (1975), Sudlow et al. (1976), Sollenne und Means (1979), Xiao und Daniel (1992)]. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl die Bindungsstelle I als auch Bindungsstelle II in verschiedene Bindungsbereiche eingeteilt werden können, zu denen Liganden wie Warfarin oder Azapropazon (zu Bindungsstelle I) und Bilirubin und Diazepam (zu Bindungsstelle II) unterschiedliche Affinitäten besitzen [Fehske et al. (1982), Maruyama K. et al. (1985a), Yamasaki et al. (1996), Ghuman et al. (2005), Zhu et al. (2008)].

Die ganze Komplexität der Bindungsmöglichkeiten und des vielschichtigen Bindungsverhaltens des Albumin findet sich auch darin begründet, dass manche Liganden Affinitäten zu mehreren Bindungsstellen haben können und dass Strukturen innerhalb des Albuminmoleküls, die von den eigentlichen Bindungsstellen weit entfernt liegen, Einfluss auf das Bindungsverhalten haben können [Yamasaki et al. (1999), Bhattacharya et al. (2000), Dockal et al. (2000)]. Es ist also auch möglich, dass mehrere Liganden an einem Albuminmolekül gebunden sind, ohne sich dabei zu beeinflussen.

Die Bindungseigenschaften machen Albumin auch zu einem geeigneten Träger für Medikamente, welche gezielt an Albumin gekoppelt produziert und appliziert werden. Albumin ist nicht zuletzt dadurch für derartige Einsätze geeignet, da es sich sehr robust gegenüber Änderungen des pH-Wertes und der Temperatur zeigt. Darüber hinaus kann es lange gelagert werden. Als „drug carrier“ findet es insbesondere in der Onkologie und in der Rheumatologie Verwendung (Kratz 2008).

Die Anwendung von humanen Serum-Albumin als Therapeutikum im Bereich der Intensivmedizin wurde 1998 kritisch diskutiert, als im Rahmen einer Metaanalyse eine erhöhte Mortalität unter dem Einsatz von humanem Serum-Albumin bei den Indikationen Hypovolämie, Verbrennungen und Hypalbuminämie im Vergleich zum Einsatz von kristalloiden Lösungen postuliert wurde (Cochrane Injuries Group Albumin Reviewers 1998). Obwohl die Arbeit wohl methodische Mängel aufwies, wurde durch die Arbeit die Indikation zur Gabe von humanem Serum-Albumin kritischer als zuvor hinterfragt und deutlich, dass kaum Studien zu diesem Thema existierten. Insgesamt schienen kristalloide Lösungen und künstliche Kolloide eine gleichwertige therapeutische Alternative zu sein (Expertengruppe Humanalbumin 2000).

Spätere Arbeiten beschäftigten sich dann mit der Darstellung der Sicherheit und der guten Verträglichkeit von Albumin. In einer Übersichtsarbeit über alle gemeldeten schweren Nebenwirkungen nach Albumingabe in der Zeit von 1998 – 2000 wurde gezeigt, dass tödliche und nicht tödliche Nebenwirkungen sehr selten in Relation zur weltweit verabreichten Albumingesamtdosis auftraten und die Therapie mit humanem Serum-Albumin daher als sicher eingestuft werden kann (Vincent et al. 2003). Darüber hinaus wurde 2001 eine erneute Metaanalyse aufgelegt, in welcher der Einfluss der Gabe von humanem Serum-Albumin bei vergleichbaren Indikationen auf die Mortalität erneut beurteilt wurde. Dabei fand sich kein signifikanter Einfluss auf die Mortalität im Vergleich zu Kristalloiden (Wilkes und Navickis 2001).

Ein weiteres Risiko des Einsatzes von humanem Serum-Albumin besteht in der theoretisch denkbaren Übertragung von Infektionskrankheiten. Diese ist sowohl beim Einsatz von humanem Serum-Albumin als Therapeutikum, als „drug carrier“ oder auch als Zusatz zu intravenösen Infusionen zur Absättigung der Kunststoffoberflächen im Infusionssystem möglich.

Um das Risiko der Übertragung von Infektionserkrankungen zu vermeiden, werden strenge Richtlinien an die Gewinnung des humanen Serum-Albumins gestellt. Die Verkettung von Einzelschritten der Qualitätssicherung soll maximale Sicherheit gewährleisten. Im ersten Schritt soll durch gezielte Auswahl der in Frage kommenden Plasmaspender das Risiko minimiert werden. Aus dem humanen Poolplasma wird humanes Serum-Albumin mittels alkoholischer Fällungsverfahren gewonnen (Cohn et al. 1944). Jede Spende wird serologisch untersucht (auf HbsAG, anti HIV 1+2, anti-HCV) und zusätzlich kommen PCR-Testungen auf HCV, HBV, HIV 1, HAV und Parvovirus 19 zum Einsatz. Im Anschluss folgen weitere Virusinaktivierungsverfahren,

bei welchem aber die Pasteurisierung bei 60° über 10 Stunden den wichtigsten Inaktivierungsschritt darstellt. Darüber hinaus müssen Albuminchargen mit einem Barcode markiert sein, um eine Charge zurückverfolgen zu können. Die intravenöse Gabe von Albumin unterliegt dem Transfusionsgesetz, wenn es als Wirkstoff appliziert wird.

Bis heute ist keine direkte Übertragung einer Infektionserkrankung durch die intravenöse Gabe von humanem Serum-Albumin dokumentiert. Ein Problem stellte allerdings das Auftreten der neuen Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit dar. Von der klassischen Creutzfeld-Jakob-Krankheit wusste man, dass diese durch Blutprodukte nur sehr unwahrscheinlich zu übertragen sei, dies aber von der neuen Variante nicht definitiv sagen konnte. Problem dabei war, dass die veränderten Prion Proteine bei der klassischen Form ausschließlich im Gehirn nachzuweisen waren, bei der neuen Variante die Prion Proteine aber auch außerhalb des Gehirns bei Erkrankten nachzuweisen waren und somit theoretisch in Blutprodukten auftreten konnten. Bei der neuen Variante fanden sich Prion Proteine auch in Gaumenmandeln und Milz (Arbeitskreis Blut 1998).

Untersuchungen konnten aber zeigen, dass zumindest die konventionellen Aufreinigungsschritte (Alkohol-Fraktionierungsschritte) von Plasmaderivaten zu einer sukzessiven Entfernung der Erreger aus den Albumin und Immunoglobulin Fraktionen führten [Foster et al. (2000), Lee et al. (2000), Gregori et al. (2004)]. Dennoch wurden Sicherheitsmaßnahmen ergriffen, um Infektionen auf diesem Weg zu vermeiden.

Da trotz aller Sicherheitsmaßnahmen eine Infektion insbesondere mit neuartigen, bisher unbekanntem Erregern nicht vollends ausgeschlossen werden kann, ist die Indikationsstellung zur intravenösen Applikation von humanem Serum-Albumin stets streng zu stellen und jeweils eine gewissenhafte Risiko-Nutzen-Abwägung durchzuführen. Dies gilt insbesondere bei Gaben von humanem Serum-Albumin als Nichttherapeutikum, da in diesem Falle keine echte medizinische Indikation besteht. Als Beispiel für einen derartigen Einsatz wäre der Zusatz von humanem Serum-Albumin zu Infusionslösungen mit proteinhaltigen Substanzen zu sehen. Der Zusatz dient dazu, die Kunststoffoberflächen abzusättigen und so einen Verlust der Substanz durch Bindung an der Kunststoffoberfläche zu vermeiden. In diesem Fall stellt der Einsatz von humanem Serum-Albumin keine medizinische Indikation dar, sondern vielmehr eine technische Notwendigkeit, wie auch im Rahmen dieser Studie. Diese Tatsache wird auch von Ethik-Kommissionen kritisch gesehen und daher muss der Einsatz von

humanem Serum-Albumin insbesondere im Rahmen von klinischen Studien sorgfältig abgewogen werden und nur bei sonst unmöglicher technischer Umsetzung der Zielsetzung der Studie in Erwägung gezogen werden.

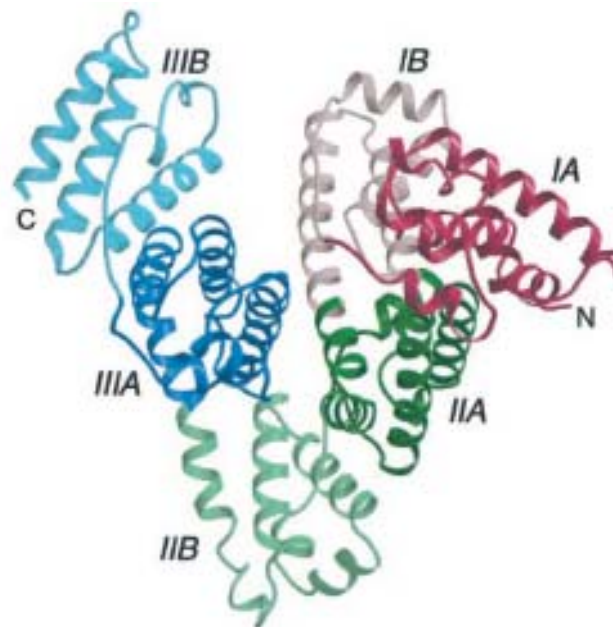


Abb 4: Humanes Serum-Albumin (Tertiärstruktur). I – III homologe Domänen. A – B = Subdomänen. (nach Bhattacharya et al. 2000, S. 38733).

1.6 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass die exogene Gabe von GLP-1 als intravenöse Infusion eine besondere Behandlung und Vorbereitung braucht, um zuverlässige, kalkulierbare und ausreichende GLP-1-Konzentration im Probanden zu erreichen. Es werden zwei Zubereitungsarten von GLP-1-Infusionen, unter der Berücksichtigung der durch die Infusionen zu erreichenden GLP-1-Konzentrationen, miteinander verglichen. In Hinblick auf die Planung von zukünftigen Studien mit exogener Gabe von GLP-1 ist eine zuverlässige Vorhersage der zu erreichenden GLP-1-Konzentrationen bedeutsam.

Es werden die GLP-1-Konzentrationen unter intravenösen GLP-1-Infusionen verglichen, die in einer Gruppe *ohne* den Zusatz von humanen Serum-Albumin erzielt

werden (Projekt A) und die in einer anderen Gruppe *mit* dem Zusatz von humanem Serum-Albumin erzielt werden (Projekt B). Es soll gezeigt werden, dass ohne den Zusatz von humanem Serum-Albumin in das Infusionssystem der GLP-1-Konzentrationsaufbau nicht sicher vorhergesagt werden kann, da es vermutlich zu Bindungsverlusten im Infusionssystem kommt. In einem weiteren Schritt soll der Nachweis erbracht werden, dass unter Zusatz von humanem Serum-Albumin zu der GLP-1-Infusion (Projekt B) eine rasche, supraphysiologische GLP-1-Konzentration erreicht werden kann, die suffizient die Insulin-Sekretionsantwort auf intravenöse Glukose-Belastung augmentiert und so die Wirksamkeit eines GLP-1-Antagonisten geprüft werden kann.

Die vorliegende Untersuchung soll fortführende Studien mit dem Inkretin GLP-1 erleichtern und darstellen, wie die multiplen GLP-1-Wirkungen unter besonderer Berücksichtigung der GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekte im menschlichen Organismus differenziert nachgewiesen und betrachtet werden können. Zu diesem Zweck ist die Wirksamkeit des GLP-1-Antagonisten Exendin [9-39] im Rahmen dieser Studie bei gesunden Probanden geprüft und untersucht worden. Existenz und nachgewiesene Wirksamkeit eines Antagonisten machen in der Endokrinologie eine detaillierte Betrachtung von substanzspezifischen Wirkungen im menschlichen Organismus möglich und können Wirkungsmechanismen und Wirkungen des antagonisierten Wirkstoffes besser verständlich machen.

In Projekt B soll die vollständige Aufhebung des insulinotropen Effektes des GLP-1 durch den GLP-1-Rezeptor-Antagonisten Exendin [9-39] nachgewiesen werden. Dazu wurden bei gesunden Probanden durch intravenöse GLP-1-Gabe supraphysiologische GLP-1-Spiegel aufgebaut und eine rasch ansteigende und hohe Plasmaglukose-Konzentration durch einen intravenösen Glukosebolus erreicht. So wurde unter Umgehung des Inkretin-Effektes ein starke GLP-1-vermittelte insulinotrope Wirkung provoziert. Unter der vorbestehenden GLP-1-Infusion war eine deutliche Steigerung der insulinsekretorischen Antwort auf die Glukosegabe zu erwarten. Als Vergleich sollte ein Versuchstag unter NaCl 0,9 %-Infusion dienen.

Die suffiziente Hemmung der GLP-1-Effekte durch einen GLP-1-Antagonisten wurde mit einer parallel zur GLP-1-Infusion verabreichten Infusion von Exendin [9-39] untersucht. Unter der kombinierten Infusion wurde dann ebenfalls eine intravenöse Glukosestimulation durchgeführt. Hier war die Vermutung, dass als Ausdruck der potenten Hemmung des GLP-1-Effektes durch das Exendin [9-39] eine deutlich

geringere insulinsekretorische Antwort nach Glukose-Belastung zu messen sein würde. Als erfolgreiche Antagonisierung wurde zuvor die Senkung der GLP-1-vermittelten Erhöhung der insulinsekretorischen Antwort um 75% durch das Exendin [9-39] definiert.

Ziel war es ein Regime zu etablieren, mit welchem der insulinotrope GLP-1-Effekt sicher gehemmt werden kann und somit ein Regime definiert werden kann, welches sehr wahrscheinlich auch weitere endogen sezernierte GLP-1-vermittelte physiologische Wirkungen hemmt. Gleichzeitig sollte die Notwendigkeit des Zusatzes von Albumin zu GLP-1-Infusionen dokumentiert werden, um einen berechenbaren und kalkulierbaren Versuchsaufbau mit ausreichenden GLP-1-Konzentrationen zu konzipieren.

2. Material und Methoden

Das Studienprotokoll und die erforderlichen Probandenaufklärungen wurden der Ethikkommission der Georg-August-Universität Göttingen vor Studienbeginn zur Prüfung auf rechtliche und ethische Bedenken vorgelegt. In einem Schreiben vom 22.12.2006 wurden keine ethischen oder rechtlichen Bedenken seitens der Ethikkommission erhoben. Die Durchführung und Planung der Studie entsprach den "Good Clinical Practise (GCP) Guidelines of the European Commission".

Alle Patienten erhielten vor der Teilnahme eine ausführliche Erklärung und Einweisung in den Studienablauf und unterschrieben vor Beginn der Studie eine Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie.

2.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Die Auswahl der Probanden erfolgte nach zuvor definierten Ein- und Ausschlusskriterien. Es wurden gesunde Probanden ohne bekannte Vorerkrankungen und ohne Voroperationen gesucht. Der Gesundheitszustand wurde anhand der klinischen Untersuchungsbefunde, des EKG-Befundes und der aktuellen Laborwerte beurteilt.

Eine Übersicht der definierten Kriterien findet sich in Tabelle 1.

Tab.1: Ein- und Ausschlusskriterien (Projekt A und Projekt B)

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
30 – 70 Jahre	< 30 Jahre oder > 70 Jahre
gesunde Probanden (Beurteilung abhängig von Anamnese, klinischer Untersuchung, EKG- Befund, Laborwerte)	Auftreten eines Typ-2 - Diabetes mellitus in Verwandtschaft 1. Grades
Frauen: Postmenopausal (FSH > 23 mIU/ml) oder chirurgisch sterilisiert	anamnestisch aufgetretener Gestationsdiabetes
Nichtraucher	Nikotinkonsum
Nüchtern glukose (kapillar) < 100 mg/dl	Schilddrüsen - Dysfunktion
normaler oraler Glukose-Toleranz-Test (120 min Blutzucker Wert < 140 mg/dl)	Schwangerschaft oder Stillzeit
Blutdruck maximal 140 / 90 mmHg, minimal 90 / 60 mmHg	Einnahme von Medikamenten (Ausnahme: Paracetamol und ASS)
Puls 50 – 90 / min	Blutverlust von 450 ml in den letzten 8 Wochen (einschließlich Blutspende)
Mindestkörpergewicht > 50 kg	signifikante Erkrankung in letzten 2 Wochen
BMI zwischen 20 – 35 kg/m ²	EKG – Anomalien, familienanamnestisch: Long-QT Syndrom
Männer: keine Fortpflanzung während und bis 3 Monate nach Studienende	anamnestisch bekannte Allergien
normale Nierenfunktion (Kreatinin im Normbereich und kein Nachweis einer Albuminurie)	arterieller Hypertonus
normale Leberfunktion (Transaminasen im Normbereich)	gastrointestinale, pulmonale, kardiale, neurologische, dermatologische, vaskuläre, psychiatrische Erkrankung
keine signifikante Anämie	Thrombozyten < 100.000/µl
	positive Hepatitis-B- oder -C-Serologie
	Alkohol- und Drogenabusus

2.2 Probanden-Charakteristika

Für Projekt A wurden 6 gesunde, nicht rauchende Probanden (4 Männer und 2 Frauen) im Alter von 31 bis 58 Jahren in die Studie eingeschlossen. Für Projekt B wurden 6 gesunde, nicht rauchende Probanden (5 Männer und 1 Frau) im Alter von 40 bis 61 Jahren eingeschlossen. Bei keinem der Probanden fanden sich im Rahmen der Voruntersuchungen (Nüchtern glukose und oGTT) Hinweise auf eine diabetische Stoffwechsellage oder Hinweise auf eine gestörte Glukose-Toleranz (Bestimmung der Blutzuckerwerte mit Beckmann Glucose Analyzer 2, Beckmann Instruments, München, Deutschland). Alle Patienten hatten vor dem oralen Glukose-Toleranz-Test eine 12-stündige Nahrungs- und Alkoholkarenz eingehalten.

Die Bestimmungen der HbA_{1c} – Werte (BioRad Diamant™, Mart und Hoerning GmbH, Deutschland) lagen im Normbereich. Die weiteren Laborparameter (Elektrolyte, Transaminasen, Lipidstatus, Bilirubin gesamt, Protein gesamt, alkalische Phosphatase, Phosphat, Harnsäure, Kreatinin, Harnstoff, Kreatininkinase, Lipase, LDH) zeigten keine Hinweise auf bestehende Lebererkrankungen, Nierenfunktionsstörungen oder andere aktuelle Erkrankungen (Analyse mit DimensionXpand, Dade Behring, Schwalbach, Deutschland). Im kleinen Blutbild (Analyse mit Beckmann Coulter ACT8, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) fanden sich keine signifikanten Anämien oder Hinweise auf akute Entzündungsreaktionen. Die Untersuchung des Morgenurins (Analyse mit Uryxxon 300, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) zeigte keine Hinweise auf Harnwegsinfekte oder Nierenläsionen.

Bei den weiblichen Probanden war zum Ausschluss einer möglichen Schwangerschaft während der Versuchsreihe im Protokoll gefordert, dass diese sich entweder in der Postmenopause befinden oder chirurgisch sterilisiert sein müssen. Die postmenopausale Situation wurde durch Bestimmung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) im Rahmen der Voruntersuchung bestätigt. Bei den weiblichen Probanden fanden sich FSH-Werte, die einen postmenopausalen Hormonstatus anzeigten (Normbereich für postmenopausal > 23 mIU/L). Zur weiteren Absicherung wurden im Rahmen der Voruntersuchung und während der Versuchsreihe mehrere Schwangerschaftstests im Urin durchgeführt (QuickVue, One-Step hCG Urin Test, Nachweisgrenze ab 25 mIU/ml hCG, Quidel Corporation, San Diego, USA). Eine Schwangerschaft trat während der Versuchsreihe nicht auf.

Anamnestisch fand sich bei keinem der Probanden ein Verwandter 1. Grades mit einem Typ-1 - oder Typ-2 - Diabetes mellitus. Auch in der Krankheitsanamnese fanden sich keine wesentlichen Vorerkrankungen oder Voroperationen.

Um einen parallelen Drogenabusus auszuschließen, wurden bei allen Patienten regelmäßige Drogentests im Urin durchgeführt (Kombi4/O2T, Mashan Diagnostika, Reinbeck, Deutschland für Amphetamine, Cocain, Opiate, Cannabis; Kombi/DOA2, Mashan Diagnostika, Reinbek, Deutschland für Barbiturate, Benzodiazepine). Zur Bestätigung der Nikotinkarenz wurde ein Urintest zum Nachweis von Cotinin verwendet (Cotinin Schnelltest, Mashan Diagnostika, Reinbek, Deutschland). Die geforderte Alkoholkarenz wurde über einen Alkoholtest im Urin regelmäßig kontrolliert (Q.E.D. A 150, Mashan Diagnostika, Reinbek Deutschland). Bei keinem der Probanden ließ sich ein Drogen-, Nikotin- oder Alkoholkonsum während der Studie nachweisen.

Die genauen Probandencharakteristika werden tabellarisch im Anhang, in Tabelle 1A, aufgeführt.

2.3 Versuchsprotokoll

Jeder Proband nahm an 4 (Projekt A) bzw. 3 (Projekt B) Versuchen teil. Wurde der Proband in die Studie eingeschlossen, traf er am Abend vor dem jeweiligen Versuch in der Klinik ein und wurde erneut exploriert und die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft. Noch am selben Abend wurden Drogen-, Nikotin- und Alkoholtests im Urin durchgeführt. Die Patienten bekamen ein Abendbrot und hielten ab 22:00 Uhr eine absolute Nahrungskarenz bis zum Versuchsbeginn ein. Während der Versuche blieben die Patienten nüchtern. Die Randomisierung erfolgte am Tag der ersten Aufnahme. Die Abfolge der einzelnen Infusionsregime war damit festgelegt. Die möglichen Reihenfolgen der Infusionen finden sich im Anhang in Tabelle 2A (Projekt A) bzw. 3A (Projekt B). Die Studie war nicht verblindet und zwischen den einzelnen Versuchstagen lagen jeweils mindestens 3 Tage als „wash-out-period“.

Die einzelnen Infusionslösungen wurden am Morgen des Versuchstages zubereitet. Versuchsbeginn war in der Regel um 07:30 Uhr. Die einzelnen Versuche unterschieden sich hinsichtlich der infundierten Substanzen. In Projekt A (ohne Zusatz von humanem Serum-Albumin) erfolgte am Versuchstag A eine Infusion mit NaCl 0,9 % über 360 Minuten, an Versuchtag C eine Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] über 270 Minuten und an Versuchstag D eine Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] über 270 Minuten

kombiniert mit einer Infusion mit Exendin [9-39] über 360 Minuten. Zur vergleichenden Auswertung mit Projekt B kamen die Daten, die bis zum Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe erfasst worden sind. In Projekt A gab es einen vierten Versuchstag B mit einer isolierten Exendin[9-39]-Infusion, welcher in dieser Arbeit keine Berücksichtigung fand.

In Projekt B (mit Zusatz von humanem Serum-Albumin) erfolgte am Versuchstag A' eine Infusion mit NaCl 0,9 % über 165 Minuten, an Versuchtag C' eine Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] über 165 Minuten und an Versuchtag D' eine Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] über 165 Minuten kombiniert mit einer Infusion mit Exendin [9-39] über 180 Minuten.

In beiden Projekten wurde an allen drei Versuchstagen eine intravenöse Glukosebolus - Injektion (0,3 g/kg Körpergewicht Glukose) zu einem definierten Zeitpunkt (0) durchgeführt. Der Infusionsplan zu den einzelnen Versuchstagen findet sich in Abbildung 5. Für Projekt A wurde lediglich der Zeitraum bis 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe graphisch dargestellt, da nur dieser Zeitraum zur vergleichenden Auswertung hinzugezogen wurde. Die Zeitpunkte für die Blutentnahmen der Parameter kapillare Glukose, Insulin, C-Peptid, GLP-1 Intakt, GLP-1 Total, Glukagon und Exendin [9-39] sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Abb.5: Infusionsplan für Versuchstage in Projekt A und Projekt B.

Projekt A

Glukose 0,3g·kg⁻¹·KG



Tag A

NaCl 0,9%

NaCl 0,9% 30ml·h⁻¹

Tag C

GLP-1 [7-36-Amid]

0,5 pmol·kg⁻¹·min⁻¹

Tag D

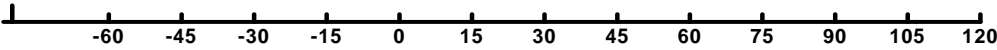
GLP-1 [7-36-Amid]

0,5 pmol·kg⁻¹·min⁻¹

+

Exendin (9-39)

500 pmol·kg ⁻¹ ·min ⁻¹	350 pmol·kg ⁻¹ ·min ⁻¹
--	--



Projekt B

Glukose 0,3g·kg⁻¹·KG



Tag A'

NaCl 0,9%

NaCl 0,9% 30ml·h⁻¹

Tag C'

GLP-1 [7-36-Amid]

1,0	0,5 pmol·kg ⁻¹ ·min ⁻¹
-----	--

Tag D'

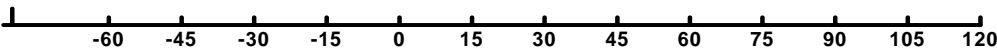
GLP-1 [7-36-Amid]

1,0	0,5 pmol·kg ⁻¹ ·min ⁻¹
-----	--

+

Exendin (9-39)

500 pmol·kg ⁻¹ ·min ⁻¹	350 pmol·kg ⁻¹ ·min ⁻¹
--	--



Tab. 2: Zeitpunkte der Blutentnahmen für die einzelnen Laborparameter nach Versuchsprotokoll (für Projekt A und B identisch).

X = Abnahme

Zeitpunkt (min)	Kapillare Glukose	Insulin	C-Peptid	GLP-1 Total	GLP-1 Intakt	Glukagon	Exendin [9-39] (Tag A' und C')	Exendin [9-39] (Tag D')
-80	X	X	X				X	
-70	X	X	X	X	X			
-60	X	X	X	X	X	X		X
-30	X	X	X					X
-15	X	X	X	X	X			
0	X	X	X	X	X	X		X
2	X	X	X					
4	X	X	X					
6	X	X	X					
8	X	X	X					
10	X	X	X					
12	X	X	X					
15	X	X	X	X	X	X		
20	X	X	X					
25	X	X	X					
30	X	X	X	X	X	X		X
40	X	X	X					
50	X	X	X					
60	X	X	X	X	X	X		X
90	X	X	X	X	X			X
120	X	X	X	X	X	X		X

2.3.1 Beschreibung der Experimente

2.3.1.1 Voruntersuchung der Probanden

Die Probanden kamen nach einer 12-stündigen Nahrungskarenz am Morgen der Voruntersuchung in die Klinik. Es wurde die exakte Eigenanamnese aufgenommen und die Familienanamnese exploriert. Die Ein- und Ausschlusskriterien wurden durch eine definierte Checkliste überprüft. Eine gegebenenfalls bestehende Begleitmedikation wurde erfasst. Die Vitalparameter (Blutdruck systolisch/diastolisch, Pulsfrequenz und Atemfrequenz), Körpergröße und Körpergewicht wurden gemessen. Eine Urinprobe wurde genommen und Blut aus einer Vene für weitere klinische Untersuchung

gewonnen. Ein EKG (CardioSmart, Hellige GmbH, Freiburg, Deutschland) wurde abgeleitet und ein „Skin prick Test“ (Duotip-Test II, Lincoln Diagnostics, Illinois, USA) mit Exendin [9-39] zum Ausschluss einer vorbestehenden allergischen Disposition gegen Exendin [9-39] durchgeführt. Mit einer körperlichen Untersuchung wurde die Voruntersuchung komplettiert.

Aus dem Ohrläppchen wurde nach Anstich mit einer Lanzette (Blood Lancets SUPRA, megro GmbH&CoKg, Wesel, Deutschland) 100 µl Kapillarblut gewonnen und zur Bestimmung der Nüchternplasmaglukose-Konzentrationen in einer Microvette gesammelt (Microvette CB 300, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Die Zentrifugation der Probe erfolgte unmittelbar (Eppendorf mini Spin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), um im Anschluss mit Hilfe eines Beckmann Glucose Analyzer 2 die Blutzuckerbestimmung durchzuführen. Bei normwertigen Plasmaglukose-Konzentrationen (< 100 mg/dl) wurde ein oraler Glukose-Toleranz-Test (ACCU-CHEK Dextro O.G-T., Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen) angeschlossen. Dazu tranken die Probanden 300 ml eines Mono/Oligosaccharid-Gemisches, welches nach enzymatischer Spaltung einer Menge von 75 g wasserfreier Glukose entspricht (WHO-Empfehlung). Ein normwertiges Ergebnis lag vor, wenn der Blutzucker nach 120 Minuten Werte < 140 mg/dl zeigte.

2.3.1.2 Beschreibung der Versuchstage

Die Patienten nahmen an 4 (Projekt A) bzw. 3 (Projekt B) Versuchstagen in randomisierter Reihenfolge teil. Nachdem die Probanden ab 22:00 Uhr des Vorabends eine Nahrungskarenz eingehalten hatten, wurden die Versuche gegen 07:30 Uhr ± 30 Minuten begonnen.

Zu Beginn des Versuches wurden die Vitalparameter (Blutdruck systolisch/diastolisch, Pulsfrequenz, Atemfrequenz) bestimmt. Das aktuelle Gewicht ist mit einer Waage (WB-100A Class III, Tanita, Tokyo, Japan) in Kilogramm ermittelt worden, um die Infusionsdosierung gewichtsbezogen individuell errechnen zu können. Anschließend wurden den Probanden jeweils zwei Venenverweilkanülen (Vasofix 20G oder 18G, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) intravenös platziert. Die Fixierung der Kanülen erfolgte mit Kanülenfixierpflaster (Curapor 8,8 x 6,5 cm, Lohmann Rauscher, Rengsdorf, Deutschland). Eine der Venenverweilkanüle wurde distal an der oberen Extremität zur Entnahme der Blutproben platziert, die andere am kontralateralen Arm im Bereich der Ellenbeuge. Über Letztere erfolgten sowohl die

Infusionen als auch die intravenöse Glukosegabe. Der sichere Transfer der infundierten Lösungen und der Glukose wurde durch den Einsatz eines Dreiwegehahns (Discofix , Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) ermöglicht.

Die Patienten wurden während der gesamten Versuchsdauer monitorisiert (Dash 2000, GE Marquette Medical Systems, Milwaukee, USA) und zu definierten Zeitpunkten wurden Blutdruckkontrollen durchgeführt. Die Position der Probanden war liegend und während der Versuche wurden Befindlichkeitsstörungen oder Missempfindungen als Ausdruck von Nebenwirkungen abgefragt und dokumentiert.

80 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe wurden die ersten "baseline" Blutproben abgenommen und der Versuchstag damit offiziell begonnen.

Bei Projekt A (ohne Zusatz von humanem Serum-Albumin) wurde am Versuchstag A 60 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe eine Infusion mit NaCl 0,9 % mit einer Flussrate von 30 ml/h begonnen. Diese Infusion lief mit dieser Flussrate durchgehend über einen Gesamtzeitraum von 360 Minuten und endete zum Zeitpunkt 300 Minuten nach intravenöser Glukosegabe.

Die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion am Versuchstag C wurde 30 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe mit einer Dosis von $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ gestartet und lief mit dieser Dosierung über weitere 270 Minuten bis zum Zeitpunkt 240 Minuten nach intravenöser Glukosegabe. Der Versuchstag endete offiziell am Zeitpunkt 300 Minuten nach intravenöser Glukosegabe.

Nach dem gleichen Schema wurde das GLP-1 [7-36-Amid] am Versuchstag D infundiert. Der Beginn der Infusion lag 30 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe mit einer Dosis von $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und wurde über 270 Minuten fortgesetzt. Zusätzlich zum GLP-1 [7-36-Amid] wurde am Versuchstag D bereits 60 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe eine Infusion mit Exendin [9-39] in einer Dosierung von $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ begonnen. Nach 60 Minuten ist die Dosierung der Exendin [9-39]-Infusion auf $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ reduziert worden und lief mit dieser Dosierung über weitere 300 Minuten bis zum Versuchsende. Zur vergleichenden Auswertung zwischen Projekt A und Projekt B wurden die Daten aus Projekt A berücksichtigt, die bis zum Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe erhoben worden sind.

Im Rahmen des Projektes B (mit Zusatz von humanem Serum-Albumin) wurde am Versuchstag A' 45 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe eine Infusion mit NaCl 0,9 % mit einer Flussrate von 30 ml/h begonnen. Diese Infusion lief mit dieser

Flussrate durchgehend über einen Gesamtzeitraum von 165 Minuten und endete zum Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe.

Die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion am Versuchstag C' wurde ebenfalls 45 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe gestartet mit einer Dosis von $1,0 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Nach 15 Minuten wurde die Dosis der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion auf $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ reduziert und lief mit dieser Dosierung bis zum Versuchsende über weitere 150 Minuten bis zum Ende des Versuchstages zum Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe.

Nach dem gleichen Schema wurde das GLP-1 [7-36-Amid] am Versuchstag D' infundiert. Der Beginn der Infusion lag 45 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe mit einer Dosis von $1,0 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und wurde nach 15 Minuten für weitere 150 Minuten mit einer Dosierung von $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ fortgesetzt. Zusätzlich zum GLP-1 [7-36-Amid] wurde am Versuchstag D' bereits 60 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe eine Infusion mit Exendin [9-39] in einer Dosierung von $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ begonnen. Nach 60 Minuten ist die Dosierung der Exendin [9-39]-Infusion auf $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ reduziert worden und lief mit dieser Dosierung über weitere 120 Minuten bis zum Versuchsende.

Die Infusionen wurden mit Perfusoren (Perfusor Compact, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gesteuert.

Zum Zeitpunkt 0 ist an allen Versuchstagen in beiden Projekten eine intravenöse Glukosegabe durchgeführt worden. Dazu wurden $0,3 \text{ g/kg}$ Körpergewicht Glukose (G-50/100ml, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) innerhalb von 20 Sekunden intravenös verabreicht.

Zu den festgelegten Zeitpunkten erfolgten die einzelnen Blutabnahmen und die Bestimmung der kapillaren Blutglukose. Die Bestimmung der Blutzuckerwerte erfolgte umgehend, um gegebenenfalls einer drohenden Hypoglykämie entgegenwirken zu können.

Nach Versuchsende wurden die Venenverweilkanülen entfernt, die Patienten erhielten umgehend eine Mahlzeit und wurden über weitere 4 Stunden nachbeobachtet. Im Anschluss erfolgte die Entlassung nach Hause.

2.4 Infusionslösungen

Projekt A:

Die Infusionslösung am Versuchstag A wurde als physiologische NaCl 0,9 %-Lösung (isotone Natriumchloridlösung 0,9 % Braun, 50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) vorbereitet. Das NaCl 0,9 % wurde in eine Perfusorspritze (Original Perfusor Spritze OPS 50 Luer Lock, 50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) überführt. Während des Versuches erfolgte die Zuleitung der Infusionslösung vom Perfusor zum Dreiwegehahn über eine Perfusorleitung (Original Perfusor Leitung Luer Lock, 200 cm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die Infusionsdauer am Versuchstag A betrug 360 Minuten (-60 bis 300) und die Flussrate konstant 30 ml/h. Daraus ergab sich ein Infusionsvolumen an diesem Tag von 180 ml. Für den Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe bei dem Vergleich beider Projekte ergibt sich für den Versuchstag A eine Infusionsdauer von 180 Minuten (-60 bis 120) und somit ein Gesamtvolumen von 90 ml.

Die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionslösungen für die Versuchstage C und D wurden nach identischer Vorgehensweise hergestellt. Da diese Infusionen mit konstanter Flussraten von 6 ml/h während der Versuche liefen, musste die gewichtsadaptierte Dosierung durch variable Konzentrationen in den Perfusorsystemen erreicht werden. Das benutzte GLP-1 [7-36-Amid] (Clinalfa, Bachem Distribution Service GmbH, Weil am Rhein, Deutschland) lag als tiefgefrorene Trockensubstanz vor, welche bei $< -18^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde. Bei der letzten chemischen Analyse zeigte sich ein verbliebener Wirkstoffgehalt von 78 μg pro Glasgefäß. Dieser Wert wurde bei den Kalkulationen zur Herstellung der GLP-1 [7-36-Amid]-Lösungen zur Infusion berücksichtigt. Die Trockensubstanz wurde am Morgen des jeweiligen Versuchstages aufgetaut und durch ein definiertes Volumen (3,12 ml) NaCl 0,9 %-Lösung in Lösung gebracht. Die so produzierte Basis GLP-1 [7-36-Amid]-Lösung hatte eine konstante Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GLP-1 [7-36-Amid] und wurde zur weiteren Zubereitung der Infusionslösung verwendet. Am Morgen des jeweiligen Versuchstages wurde das aktuelle Körpergewicht (kg) des Patienten gemessen, um die gewichtsadaptierte Dosierung ($\text{pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ermitteln und die erforderliche Konzentration herstellen zu können. Berechnungsgrundlagen waren dazu ein gewünschtes Gesamtvolumen von 50 ml Infusionslösung, eine konstante Flussrate von 6 ml/h, eine vorhandene Basis GLP-1 [7-36-Amid]-Lösung mit einer Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GLP-1 [7-36-Amid], eine geforderte Dosierung von 0,5 $\text{pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, das Molekulargewicht des GLP-1 [7-36-

Amid] und ein Variable (B), welche das Körpergewicht der Probanden in Kilogramm wiedergibt (siehe auch Gleichung 1A im Anhang). Durch diese Kalkulation wurde eine Konstante berechnet, die durch Multiplikation mit dem aktuellen Körpergewicht (B) eine Berechnung des erforderlichen Volumen Y (in ml) von Basis GLP-1 [7-36-Amid]-Lösung ermöglichte. Dieses Volumen musste in das Gesamtvolumen von 50 ml NaCl 0,9 % transferiert werden, um die zuvor genannten Bedingungen zu erfüllen.

Diese Konstante lag bei 0,032977 ml/kg.

Das kalkulierte Volumen Y (ml) wurde einer 50 ml NaCl 0,9 %-Lösung entnommen und danach durch das identische Volumen Y (ml) der Basis GLP-1 [7-36-Amid]-Lösung ersetzt, so dass am Ende ein Gesamtvolumen von 50 ml vorlag und dieses in eine Perfusorspritze gegeben werden konnte. Die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion lief mit einer Flussrate von 6 ml/h über 270 Minuten (-30 bis 240) und somit in einer Dosierung von $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Nach diesem Infusions-Regime wurde sowohl an Versuchstag C als auch D verfahren. Das Gesamtvolumen der infundierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion belief sich an Versuchstag C und D auf jeweils 27 ml. Bis zum Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe zum Vergleich mit Projekt B wurden somit an Versuchstag C und D 15 ml GLP-1 [7-36-Amid] infundiert (-30 bis 120).

Am Versuchstag D wurde eine Exendin [9-39]-Infusionslösung zusätzlich zur GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionslösung zubereitet. Das Exendin [9-39] (Exendin [9-39] 10 mg Lyophilisat in vial, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hannover, USA) lag als tiefgefrorenes Lyophilisat (gefriergetrocknet) in 10 mg pro Glasgefäß vor. Es wurde bei $<-18^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am Morgen des Versuches wurde das Exendin [9-39] aufgetaut und mit 2,0 ml NaCl 0,9 %-Lösung mit Hilfe einer 5 ml Spritze (B. Braun Injekt 5 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in Lösung gebracht. Auf diesem Weg wurde eine Basis-Exendin [9-39]-Lösung mit einer Konzentration von 5mg/ml hergestellt.

Im Gegensatz zur Applikation der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion wurde bei der Exendin [9-39]-Infusion die gewichtsabhängige Dosierung ($\text{pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) durch individuelle Flussraten über das Perfusorsystem erreicht. Die hergestellten Infusionen mussten also eine identische Konzentration aufweisen. Diese Zielkonzentration im Infusionssystem des Exendin [9-39] lag bei 1,18 mg/ml. Die erforderliche Menge an Basis-Exendin [9-39]-Lösung (5 mg/ml) in ml, welche in ein Gesamtvolumen von 50ml NaCl 0,9 %-Lösung transferiert werden musste, wurde durch eine Berechnung definiert (siehe auch Gleichung 2A im Anhang).

Demnach wurde aus der zuvor vorbereiteten 50 ml NaCl 0,9 %-Lösung 12,0 ml mit Hilfe einer Spritze (B.Braun Injekt 10 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) (Anmerkung 10 ml Spritze ist bis 12 ml skaliert) entfernt und im Anschluss 12,0 ml der Basis-Exendin [9-39]-Lösung hinzugefügt, um am Ende ein Gesamtvolumen von 50 ml mit einer Exendin [9-39]-Konzentration von 1,18 mg/ml zu erhalten. Diese wurde in eine 50 ml Perfusorspritze transferiert.

Um die gewichtsabhängige Dosierung von initial $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und später $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ zu erreichen, wurde am Morgen des Versuchstages eine Kalkulation unter Berücksichtigung des Körpergewichtes des Probanden durchgeführt und die entsprechenden Flussraten definiert. Grundlage der Kalkulation ist ein Musterpatient mit einem Körpergewicht von 70 kg, einer Flussrate von 0,1 ml/min, einer Konzentration von 1,18 mg/ml und dem Exendin [9-39] Molekulargewicht von 3368,8 g/mol. Die Formeln, die an den Versuchstagen zum Einsatz kamen geben diese Berechnung in vereinfachter Form wieder und dienen der raschen Berechnung der Flussraten an den Versuchstagen (siehe auch Gleichung 3A und 4A im Anhang).

Die Probanden erhielten am Versuchstag D 60 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe eine Exendin [9-39]-Infusion mit einer Dosierung von $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Dazu wurde die Exendin [9-39]-Infusion mit einer Flussrate von Y (ml/min) appliziert (siehe auch Gleichung 3A im Anhang). Nach 60 Minuten wurde die Exendin [9-39]-Dosierung reduziert und mit einer Flussrate von Z (ml/min) (siehe auch Gleichung 4A im Anhang) und somit mit $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ fortgeföhren. Insgesamt erhielten die Probanden die Exendin [9-39]-Infusion über einen Zeitraum von 360 Minuten (-60 bis 300). Das infundierte Gesamtvolumen differierte dabei körperrgewichtabhängig zwischen 24,3 ml und 37,1 ml. Bis zum Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe zum Vergleich mit Projekt B erhielten die Probanden zwischen 13,0 ml und 19,9 ml (-60 bis 120).

An allen Versuchstagen erhielten die Probanden eine intravenöse Glukosegabe zum Zeitpunkt 0. Dabei wurde über die proximal gelegene Venenverweilkanüle 0,3 g Glukose pro Kilogramm Körpergewicht mit 20ml Spritzen (B.Braun inject 20 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) injiziert. Dabei wurden gewichtsabhängige Volumina zwischen 37,3 ml bis 58,2 ml Glukose 50 % (G-50/100 ml, Braun Melsungen, Melsungen AG, Deutschland) notwendig.

Projekt B:

Die Infusionslösung am Versuchstag A' wurde als physiologische NaCl 0,9 %-Lösung (isotone Natriumchloridlösung 0,9 % Braun, 50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit 1% humanem Serum-Albumin (Human Serum-Albumin 20% Behring, CSL Behring, salzarm, CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland) vorbereitet. Zu diesem Zweck wurden nach alkoholischer Desinfektion der Oberflächen der Gefäße aus dem 50 ml NaCl 0,9 % Gefäß 2,5 ml mit einer 2,0 ml Spritze (B. Braun Injekt 2 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) (Anmerkung: 2,0 ml Spritze ist bis 3,0 ml skaliert) mit Hilfe einer Kanüle (Neolus 20G, BSN medical GmbH&Co KG, Hamburg, Deutschland) entfernt und verworfen. Im Anschluss wurden 2,5 ml humanes Serum-Albumin 20 % in das NaCl 0,9 % - Gefäß gegeben und somit das Gesamtvolumen auf erneut 50 ml ergänzt. So wurde eine Albumin-Konzentration von 1% erreicht. Diese Lösung wurde in eine Perfusorspritze (Original Perfusor Spritze OPS 50 Luer Lock, 50ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) überführt. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt, um letztlich über 100 ml Infusionslösung zu verfügen. Während des Versuches erfolgte die Zuleitung der Infusionslösung vom Perfusor zum Dreiwegehahn über eine Perfusorleitung (Original Perfusor Leitung Luer Lock, 200 cm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die Infusionsdauer am Versuchstag A' betrug 165 Minuten (- 45 bis 120) und die Flussrate konstant 30 ml/h. Daraus ergab sich an diesem Tag ein Infusionsvolumen von 82,5 ml.

Die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionslösungen für die Versuchstage C' und D' wurden ebenfalls als 1%-ige Humanalbumin-Lösung hergestellt. Da diese Infusionen mit konstanten Flussraten von 10 ml/h bzw. 20 ml/h während der Versuche liefen, musste die gewichtsadaptierte Dosierung durch variable Konzentrationen in den Perfusorsystemen erreicht werden. Die Trockensubstanz, welche identisch war mit der aus Projekt A, wurde am Morgen des jeweiligen Versuchstages aufgetaut und durch ein definiertes Volumen (3,12 ml) der beschriebenen 1%-igen Humanalbumin-NaCl 0,9 %-Lösung in Lösung gebracht. Die so produzierte Basis GLP-1 [7-36-Amid]-Lösung hatte eine konstante Konzentration von 25 µg/ml GLP-1 [7-36-Amid] und wurde zur weiteren Zubereitung der Infusionslösung verwendet. Am Morgen des jeweiligen Versuchstages wurde das aktuelle Körpergewicht (kg) des Patienten gemessen, um die gewichtsadaptierte Dosierung ($\text{pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ermitteln und die erforderliche Konzentration herzustellen zu können. Berechnungsgrundlagen waren dazu ein gewünschtes Gesamtvolumen von 50 ml Infusionslösung, eine konstante Flussrate von

10 ml/h, eine vorhandene Basis GLP-1 [7-36-Amid]-Lösung mit einer Konzentration von 25 µg/ml GLP-1 [7-36-Amid], eine geforderte Dosierung von $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, das Molekulargewicht des GLP-1 [7-36-Amid] und ein Variable (B), welche das Körpergewicht der Probanden in Kilogramm wiedergibt (siehe auch Gleichung 5A im Anhang). Durch diese Kalkulation wurde eine Konstante berechnet, die durch Multiplikation mit dem aktuellen Körpergewicht (B) eine Berechnung des Volumen Y (in ml) von Basis GLP-1 [7-36-Amid]-Lösung ermöglichte. Dieses Volumen musste in das Gesamtvolumen von 50 ml NaCl 0,9 % (1% humanes Serum-Albumin) transferiert werden, um die zuvor genannten Bedingungen zu erfüllen.

Diese Konstante lag bei 0,0197862 ml/kg.

Das kalkulierte Volumen Y (ml) wurde den vorbereiteten 50 ml 1%-igen Humanalbumin-NaCl 0,9 %-Lösung entnommen und danach durch das identische Volumen Y (ml) der Basis GLP-1 [7-36-Amid]-Lösung ersetzt, so dass am Ende ein Gesamtvolumen von 50 ml vorlag und dieses in eine Perfusorspritze gegeben werden konnte. Die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion lief initial mit einer Flussrate von 20 ml/h über 15 Minuten (-45 bis -30) in einer Dosierung von $1,0 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Nach 15 Minuten wurde die Flussrate auf 10 ml/h reduziert und damit eine Dosis von $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ appliziert. In dieser Dosierung lief die Infusion über weitere 150 Minuten (-30 bis 120). Nach diesem Infusions-Regime wurde sowohl an Versuchstag C' als auch D' verfahren. Das Gesamtvolumen der infundierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion belief sich an Versuchstag C' und D' auf jeweils 30 ml.

Am Versuchstag D' wurde eine Exendin [9-39]-Infusionslösung zusätzlich zur GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionslösung zubereitet. Das Exendin [9-39] (Exendin [9-39] 10 mg Lyophilisat in vial, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hannover, USA) lag als tiefgefrorenes Lyophilisat (gefriergetrocknet) in 10 mg pro Glasgefäß vor. Es wurde bei $<-18^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am Morgen des Versuches wurde das Exendin [9-39] aufgetaut und mit 2,0 ml 1%-igen Humanalbumin-NaCl 0,9 %-Lösung mit Hilfe einer 5 ml Spritze (B. Braun Injekt 5 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in Lösung gebracht. Auf diesem Weg wurde eine Basis-Exendin [9-39]-Lösung mit einer Konzentration von 5mg/ml hergestellt.

Das weitere Vorgehen entsprach im wesentlichen dem Vorgehen in Projekt A. Insbesondere kamen dieselben Formeln zur Anwendung (siehe auch Gleichung 2A, 3A und 4A im Anhang). Ein wesentlicher Unterschied bestand darin, dass die 50 ml NaCl

0,9 % in der Perfusorspritze auch als 1%-iges Humanalbumin-NaCl 0,9 % vorbereitet worden waren.

Die Probanden erhielten am Versuchstag D' 60 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe eine Exendin [9-39]-Infusion mit einer Dosierung von $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Dazu wurde die Exendin [9-39]-Infusion mit einer Flussrate von Y (ml/min) appliziert (siehe auch Gleichung 3A im Anhang). Nach 60 Minuten wurde die Exendin [9-39]-Dosierung reduziert und mit einer Flussrate von Z (ml/min) (siehe auch Gleichung 4A im Anhang) und somit mit $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ fortgeföhren. Insgesamt erhielten die Probanden die Exendin [9-39]-Infusion über einen Zeitraum von 180 Minuten. Das infundierte Gesamtvolumen differierte dabei körperrgewichtsabhängig zwischen 11,5 ml und 20,5 ml.

An allen Versuchstagen erhielten die Probanden eine intravenöse Glukosegabe zum Zeitpunkt 0. Dabei wurde über die proximal gelegene Venenverweilkanüle 0,3 g Glukose pro Kilogramm Körpergewicht mit 20 ml Spritzen (B. Braun inject 20 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) injiziert. Dabei wurden gewichtsabhängige Volumina zwischen 36,7 ml bis 59,5 ml (Projekt B) Glukose 50 % (G-50/100 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) notwendig.

2.5 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen während der Versuchstage erfolgten ausschließlich aus der distal gelegenen Venenverweilkanüle. Zu den Abnahmezeitpunkten wurden variable Volumina in Abhängigkeit von den zu bestimmenden Parametern abgenommen. Die Abnahme zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Insulin, C-Peptid, GLP-1 Total, GLP-1 Intakt, Glukagon und Exendin [9-39] erfolgte mit Plasma Monovetten (EDTA, 2,7 ml K3E, 9 ml K2E, 4 ml K3E, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland).

Die Monovetten zur Abnahme der GLP-1 Total-, GLP-1 Intakt- und Glukagon-Proben wurden am Morgen des jeweiligen Versuchstages mit Diprotin A (Diprotin A, Bachem AG, Bubendorf, Schweiz) versetzt, um in einer Gesamtkonzentration von 0,1 mmol/l eine ausreichende DPP – 4-Inhibition zur Vermeidung der Degradation der Peptide sicherzustellen [Deacon et al. (1995a), Deacon et al. (1995b)]. Im Anschluss wurden die Monovetten bis zur Blutentnahme im Kühlschrank gelagert.

Nach der jeweiligen Blutentnahme wurden die Proben umgehend auf Eis gelagert, bis sie in einer Kühlzentrifuge (Rotina 35R, Hettich Zentrifugen, Lauenau,

Deutschland) zentrifugiert wurden. Die Proben für die Bestimmungen der Insulin und C-Peptid-Konzentrationen sind über 15 Minuten bei 17° Celsius mit einer Geschwindigkeit von 3000 U/min zentrifugiert worden. Im Anschluss sind je 200 µl Plasma in ein PS-Röhrchen überführt und bei < - 27°C gelagert worden.

Die Proben zur Bestimmung von GLP-1 Total, GLP-1 Intakt, Glukagon und Exendin [9-39] sind über 15 Minuten bei 4° Celsius mit einer Geschwindigkeit von 3000 U/min zentrifugiert worden. Maximal lagen zwischen Abnahme und Zentrifugation 10 Minuten. Im Anschluss wurde der Plasmaüberstand vom Blutkuchen abpipetiert und entsprechend den Anforderungen der zu bestimmenden Parametern in vorbereitete Aufbewahrungsgefäße gegeben. Für GLP-1 (Total und Intakt) sind 900 µl Plasma, für Glukagon 700 µl Plasma und für Exendin [9-39] 100 µl in ein PP-Röhrchen überführt und bei < - 27°C gelagert worden.

Die zur Bestimmung von Insulin und C-Peptid geplanten Proben wurden in 3,5 ml Polystyrol-Röhrchen (PS-Röhrchen 3,5 ml, transparent, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und die Proben zur Bestimmung von GLP-1 Total, GLP-1 Intakt, Glukagon und Exendin [9-39] in Polypropylen-Röhrchen (PP-Röhrchen 3,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgefüllt. Bis zur Verschickung zur weiteren Analyse (GLP-1 Total, GLP-1 Intakt, Glukagon, Exendin [9-39]) oder Bestimmungen im hauseigenen Labor (Insulin , C-Peptid) wurden die Proben bei < -27°C eingefroren.

Zur Bestimmung der kapillaren Plasma Glukose wurde den Patienten aus dem Ohrläppchen 100 µl Blut entnommen (Microvette CB 300, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und umgehend für 30 Sekunden bei 13000 U/min zentrifugiert (Eppendorf mini Spin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die Glukose-Konzentrationsmessung mit einem Glucose Analyzer 2 (Beckmann Instruments, München, Deutschland) nach der Glukose-Oxidase-Methode erfolgte sofort am Untersuchungsplatz. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und die Ergebnisse dokumentiert. Zwischen Abnahme und Bestimmung der Glukose-Konzentration lagen maximal 4 Minuten.

Mehrfach aufgetaute Proben fanden bei der Analyse keine Berücksichtigung. Die auswärtig analysierten Proben (GLP-1 Total, GLP-1 Intakt, Glukagon, Exendin [9-39]) wurden nach Beendigung der Versuchsreihe bei < -27°C transportiert. Eine konstante Kühlung wurde durch ein durchgängig messendes Thermometer in der Transportkiste kontrolliert und dokumentiert.

2.6 Laborparameter

Die Analysen der Laborparameter für die klinische Chemie und die Hämatologie wurden im klinischen Laboratorium des Diabeteszentrums Bad Lauterberg durchgeführt. In diesem Labor erfolgte ebenfalls die Bestimmung der Insulin und der C-Peptid-Konzentrationen.

Die für das Screening erforderlichen Hepatitis B-, Hepatitis C- und HIV-Serologien wurden durch das Labor Bioscientia GmbH in Jena durchgeführt. Dort wurde auch die Bestimmung der alpha - Amylase und des Albumin durchgeführt.

Die Bestimmungen der Konzentrationen von GLP-1 Total, GLP-1 Intakt, Glukagon und Exendin [9-39] erfolgten in Zusammenarbeit mit der Abteilung medizinische Physiologie des Panum Institute der Universität Kopenhagen.

2.6.1 Immunoassays

Yalow und Berson gelang es erstmalig durch Markierung von Enzymen mit radioaktiven Isotopen einen Radioimmunoassay für die Bestimmung von Inulin Konzentrationen herzustellen (Yalow und Berson 1959). Um den Umgang mit radioaktiven Substanzen zu vermeiden, verwendeten Nakane und Pierce später Enzyme zur Markierung in der Immunhistochemie (Nakane und Pierce 1967).

Allen Immunoassay gemeinsam ist das Grundprinzip der Erkennung und somit der Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Phase durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper. Sowohl Antigen als auch Antikörper können je nach Konfiguration des Assays nachzuweisender Analyt sein.

Man unterscheidet grob zwei Konfigurationen von Immunoassays: Den kompetitiven und den nicht - kompetitiven Assay.

Bei den kompetitiven Assays ist ein für das Antigen spezifischer Antikörper in einer festen Phase gebunden. Diesem wird nun die Probenlösung mit der unbekanntem Konzentration des Analyten mit dem passenden Antigen und eine Lösung mit einer bekannten Konzentration an markiertem, passenden Antigen zugefügt. Beide Antigene konkurrieren um die Bindungsstellen an den Antikörpern der festen Phase. Je höher die Konzentration des Antigens in der zu bestimmenden Probe ist, desto weniger markiertes Antigen kann an der festen Phase binden. Nach Auswaschung kann je nach Markierung die Konzentration des Analyten bestimmt werden. Diese Variante eignet

sich bei Antigenen für die es nur einen Antikörper gibt oder für Haptene, da diese nicht ausreichend Bindungsstellen zur Bindung von zwei Antikörpern haben.

Bei den nicht-kompetitiven Assays kommen zwei Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen oder Antigen und Antikörper zum Einsatz, welche an unterschiedlichen Bindungsstellen ansetzen. Man unterscheidet zwei Formen. Zum einen den „antibody capture assay“ und den „two antibody assay“ („Sandwich Assay“). Der „antibody capture assay“ kommt primär zur Bestimmung des aktuellen Immunstatus durch Bestimmung von Antikörper - Titer zum Einsatz. Dabei ist das Antigen, gegen das der zu bestimmende Antikörper gerichtet ist, an eine feste Phase gekoppelt und der zu bestimmende Antikörper wird in unbekannter Konzentration hinzugegeben. Dieser bindet an die Antigene in der festen Phase. In einem zweiten Schritt wird nach einem Waschschrift ein enzymmarkierter Sekundärantikörper hinzugegeben, welcher an den konstanten Teil des Primärantikörpers bindet. Anschließend wird das Enzymsubstrat hinzugegeben (bei enzymmarkierten Antikörpern) und die Antikörperkonzentration durch Bestimmung der Enzymaktivität gemessen.

Bei dem „two antibody assay“ („Sandwich assay“) ist hingegen ein Antikörper in der festen Phase gebunden, der sich gegen eine Bindungsstelle des in der Probe zu bestimmenden Antigens richtet. Diesen Antikörper nennt man Primärantikörper bzw. „Fänger“ („catching antibody“). Nach Zugabe der Probe mit der unbekannt Konzentration des zu bestimmenden Antigens bindet dieses an die in der festen Phase fixierten Antikörper. In einem Waschschrift werden alle anderen Substrate, die nicht antikörpergebunden sind, ausgewaschen. Daraufhin wird ein zweiter, markierter Antikörper gegen eine andere Bindungsstelle des zu bestimmenden Antigens hinzugegeben und der Überschuss anschließend ausgewaschen. Diesen Antikörper nennt man Sekundärantikörper bzw. Detektor („detecting antibody“). Danach erfolgt die Zugabe des Enzymsubstrates (bei enzymmarkierten Antikörpern) und anhand der Enzymaktivität wird die Konzentration bestimmt.

Je nach verwendeter Markierungssubstanz unterscheidet man „Radioimmunoassays“ (RIA) und „Enzym-linked Immunosorbent Assays“ (ELISA). Bei dem RIA werden schwach radioaktive Substanzen verwendet und die Konzentration durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Bei den ELISA sind die zugeführten Antikörper mit Enzymen markiert, welche in den zugegebenen Enzymsubstraten spezifische Reaktionen katalysieren. Die Konzentrationen können dann anhand der Enzymaktivität bestimmt werden. Dabei kann zum Beispiel auch eine chemische

Reaktion katalysiert werden, bei der durch Chemilumineszenz Licht abgegeben wird, welches gemessen und in Relation zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens gesetzt werden kann.

Die Hormonbestimmung durch immunologische Bestimmungsverfahren zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und eine leichte Durchführbarkeit aus. Zu beachten sind aber Kreuzreaktivitäten, die Folge einer Bindung der eingesetzten Antikörper an Bindungsstellen von Hormonvorstufen, Abbauprodukten oder strukturell ähnlichen Proteinen sind und so bei Nichtbeachtung zu falschen Konzentrationsbestimmungen führen können (Wild 2005).

2.6.2 Plasmaglukose

Die kapillare Plasmaglukose-Konzentration wurde mit einem Glucose Analyzer 2 (Beckmann Instruments, München, Deutschland) nach der Glukose-Oxidase-Methode bestimmt. Zu diesem Zweck entnahm man dem Probanden mit einer Microvette (Microvette CB 300, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mittels Kapillarwirkung zu den definierten Zeitpunkten 100 µl Kapillarblut aus dem Ohrläppchen und zentrifugierte es umgehend für 30 Sekunden bei 13000 U/min (Eppendorf mini Spin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Es erfolgten jeweils Doppelbestimmungen, welche schriftlich fixiert wurden.

Vor den Bestimmungen der Plasmaglukose erfolgte die Eichung der Messgeräte mit Hilfe einer Eichlösung auf 150 ± 1 mg/dl (Beckmann Instruments, München, Deutschland). Es folgten im Verlauf weitere Eichungen und Vergleichsmessungen mit einer Standardlösung 150 ± 5 mg/dl (Beckmann Instruments, München, Deutschland).

2.6.3 Insulin

Die Plasmainsulin-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) -Verfahrens bestimmt. Dabei kommen ein biotinylierter monoklonaler Insulin-spezifischer Antikörper und ein mit Rutheniumkomplex markierter monoklonaler Insulin-spezifischer Antikörper zum Einsatz, die einen Sandwich-Komplex bilden. Nach Zugabe von Streptavidin wird der Komplex über Biotin–Streptavidin-Wechselwirkung an der Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt und durch Anlegen einer Spannung

die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Bestimmung erfolgte mit dem COBAS "ECLIA" auf einem Roche Elecsys 2010 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die kleinste nachweisbare Insulin-Konzentration lag bei diesem Verfahren bei 0,2 mU/l (1,4 pmol/l). Kreuzreaktivitäten bestehen zu Rinderinsulin (25%), Schweineinsulin (19,2%), humanem Proinsulin (0,05%) und Insulin-like growth factor I (0,04%). Es fanden sich keine Kreuzreaktivitäten zu C-Peptid, Glukagon und Somatostatin. Der inter-assay-Variationskoeffizient lag bei < 3%.

2.6.4 C-Peptid

Die Plasma-C-Peptid-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines Elektrochemilumineszenz-Immunoassay Verfahrens (ECLIA) bestimmt. Dabei kommt ein biotinylierter, monoklonaler C-Peptid-spezifischer Antikörper und ein mit Rutheniumkomplex markierter, monoklonaler C-Peptid-spezifischer Antikörper zum Einsatz, die einen Sandwich Komplex bilden. Nach Zugabe von Streptavidin wird der Komplex über Biotin – Streptavidin Wechselwirkung an der Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt und durch Anlegen einer Spannung die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Bestimmung erfolgte mit dem COBAS "ECLIA" auf einem Roche Elecsys 2010 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die kleinste nachweisbare C-Peptid-Konzentration lag bei diesem Verfahren bei 0,003 nmol/l (0,01 ng/ml). Kreuzreaktivitäten bestehen zu humanem Proinsulin (32,5%) und humanem Insulin (0,005%). Die Kreuzreaktivität für Proinsulin hat keine klinische Relevanz, da Konzentrationen bei Gesunden 100 fach geringer sind als C-Peptid-Konzentrationen. Keine Kreuzreaktivitäten fanden sich mit Insulin (Schwein und Rind), Insulin-like growth factor I, humanem Wachstumshormon und Glukagon. Der inter-assay-Variationskoeffizient lag bei < 5%.

2.6.5 Glucagon-like Peptide-1

Die GLP-1 Total-Konzentrationen sind mit einem Radio-Immunoassay Verfahren bestimmt worden. Das hierbei verwendete Antiserum (No. 89390) bindet spezifisch an den amidierten C-Terminus des GLP-1 [7-36-Amid]. Eine Kreuzreaktivität des

Antiserums mit anderen Hormonen ergibt sich bei denen, die die Sequenz Proglukagon 78-107-Amid besitzen. So wird GLP-1(9-36) durch das Antiserum gebunden. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1 pM. Der Inter-assay Variationskoeffizient lag bei < 6% (Ørskov et al., 1994).

Die GLP-1 Intakt-Konzentrationen sind ebenfalls mit einem Radio-Immunoassay Verfahren bestimmt worden. Hierbei wird ein "two-site Sandwich" Immunoassay unter Verwendung zweier monoklonaler Antikörper genutzt. Als "catching antibody" wird GLP1F5 verwendet, der nahe C-Terminal bindet. Mab 26.1 als "detecting antibody", welcher konsequent N-terminal bindet. Der Test zeigt eine Kreuzreaktivität von < 0,1% mit GLP-1 (1-37), GLP-1 (8-37) oder GLP-1 (9-37). Die unterste Nachweisgrenze lag bei 1 pM. Der inter-assay-Variationskoeffizient lag bei < 5% (Vilsbøll et al. 2003b).

2.6.6 Glukagon

Die Glukagon-Konzentration wurde mit einem Radio-Immunoassay Verfahren bestimmt. Der verwendete Antikörper (antibody code No. 4305) bindet direkt an den C-Terminus des Glukagon-Moleküls. Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Exendin [9-39] von < 0,01%. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 pM und der inter-assay-Variationskoeffizient liegt bei < 6% [Holst (1980), Holst (1982), Deacon (2010)].

2.6.7 Exendin [9-39]

Die Exendin [9-39]-Konzentration wurde mit einem Immunoassay Verfahren bestimmt. Der verwendete polyklonale Antikörper (antibody code No. 3145) bindet direkt an den C-Terminus des Exendin [9-39]-Moleküls. Der Antikörper wird durch Immunisierung von Kaninchen mit synthetischem Exendin-4 gewonnen. Der Antikörper reagiert mit Exendin [9-39] und Exendin-4. Er zeigt keine Kreuzreaktivität mit GLP-1, Glukagon oder GIP. Die unterste Nachweisgrenze liegt bei 1 pmol/l und der inter-assay-Variationskoeffizient liegt bei < 5%.

2.7 Nebenwirkungen

Die Probanden wurden vor, während und nach den Versuchstagen nach möglichen Nebenwirkungen befragt. Im Falle von Nebenwirkungen wurden diese

schriftlich fixiert und als "Adverse Events" nach GCP-Richtlinien in den CRF dokumentiert. Im Allgemeinen wurden die einzelnen Infusionen von den Probanden gut vertragen und es kam zu keinen signifikant gehäuften Nebenwirkungen, die sich einer der infundierten Substanzen zuordnen ließe.

In Projekt A entwickelte ein Patient 4 - 5 Stunden nach der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (Versuchstag C) Kopfschmerzen, die keine zusätzliche Komedikation erforderlich machten und über einen Zeitraum von 2 Stunden anhielten. Ein Proband gab unter laufender GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (Versuchstag C) allgemeines Unwohlsein an und begann zu schwitzen. Der Blutzucker lag zu diesem Zeitpunkt im Normbereich, Blutdruck und Puls zeigten sich ebenso unauffällig wie das abgeleitete EKG. Dieser Zustand hielt über 5 Minuten an und trat danach nicht noch einmal auf. Zwei Patienten entwickelten im Bereich der Braunüleneinstich – Stellen eine Thrombophlebitis superficialis. Dies geschah einmal nach einer Exendin [9-39]-Infusion (Versuchstag D) und einmal nach einer GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (Versuchstag C). Nach Behandlung mit einer lokal wirksamen, topischen, gerinnungshemmenden Salbe und passagerer Ruhigstellung durch einen Verband zeigten sich die Symptome rückläufig und nach drei Tagen ließ sich keine lokale Restsymptomatik mehr nachweisen. Ein Proband entwickelte an seinem ersten Versuchstag nach Infusion von Exendin [9-39] (Versuchstag D) eine lokale allergische Effloreszenz im Bereich der Ellenbeuge als Reaktion auf die verwendeten Braunülen Fixierungspflaster. An den folgenden Versuchstagen wurden bei diesem Patienten andere Pflaster zur Fixierung der Braunüle verwendet und es kam zu keinen weiteren lokalen Reaktionen. Die Allergische Reaktion war zuvor folgenlos abgeheilt.

In Projekt B zeigten sich in zwei Fällen im Bereich der zum Versuch plazierten Braunüle in der Ellenbeuge ein Hämatom, welche im Verlauf aber ohne Folgeerscheinungen abheilten. In einem Fall kam es unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (Versuchstag C') zu einer vom Patienten nicht wahrgenommenen Hypoglykämie mit einem gemessenen Wert von 49 mg/dl. Der Blutzucker stabilisierte sich aber ohne weitere Maßnahmen innerhalb von 2 Minuten auf 53 mg/dl und begann von diesem Zeitpunkt an wieder in normale Bereiche anzusteigen. Zwei Patienten klagten nach der Placebo-Infusion (NaCl 0,9 %) über passageren Schwindel (maximal über 60 Minuten). Ein Patient beklagt an den Versuchstagen C' (isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion) und D' (GLP-1 [7-36-Amid]- + Exendin [9-39]-Infusion) über Kopfschmerzen in den Abendstunden über einen maximalen Zeitraum von 2 Stunden.

Schwerwiegende Nebenwirkungen traten nicht auf und keine der beklagten Beschwerden war nach Beendigung der Studie weiterhin nachzuweisen.

2.8 Statistische Auswertung / Berechnungen

2.8.1 Berechnete Parameter

2.8.1.1 Insulin-Sekretionsrate

Die Insulin-Sekretionsrate wurde über die Dekonvolution aus Plasma-C-Peptid-Konzentrationen und unter Verwendung populationsbasierter Übergangskonstanten berechnet [Eaton et al. (1980); Polonsky et al. (1986), Van Couter et al. (1992)]. Diese Kalkulationen wurden mit Hilfe der Software ISEC Version 3.4a durchgeführt (Hovorka und Jones 1994). Die berechneten Werte werden in $\text{pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ausgedrückt. Es ist die Insulin-Sekretionsrate für die erste Phase der Insulin-Sekretion berechnet worden. Die erste Phase ist definiert als Zeitraum zwischen der intravenösen Glukosegabe (Zeitpunkt 0) und 10 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe (Zeitpunkt 10).

2.8.1.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte ("Area under the Curve")– Berechnung

Die Fläche unterhalb der Graphen der Insulin-Konzentration und der Insulin-Sekretionsrate wurde mit einem dafür installierten Makro (Excel 4.0-Makro AUC1_21) unter dem Rechen- und Tabellenkalkulationsprogramm (Excel 2003, Microsoft Cooperation, USA) berechnet. Es berechnet ein positives Integral (Anstiege über Basalwerte), ein negatives Integral (Abfälle unter Basalwerte), ein Netto – Integral (Anstiege über Basalwerte minus Abfälle unter Basalwerte) und das Gesamtintegral (oberhalb des Wertes $0 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Das Netto-Integral ist für die weitere Bearbeitung berücksichtigt worden. Die Kalkulationen beziehen sich auf die erste Phase (0 – 10 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe) der Insulinantwort auf den Glukosebolus. Die erste Phase ist definiert als Zeitraum zwischen der intravenösen Glukosegabe (Zeitpunkt 0) und 10 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe (Zeitpunkt 10).

Das Ausmaß der Stimulation der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid] und das Ausmaß der Hemmung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] wurde mit Hilfe der integrierten Anstiege über Basalwerte für die Insulin-Sekretionsrate bestimmt.

Zuvor definiertes Ziel war eine Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort auf Glukosegabe durch Exendin [9-39] um 75%. Berechnet wurden die Stimulation und der prozentuale Wert der Hemmung durch folgende Formeln, wobei AUC_x dem jeweils integrierten Anstieg über Basalwerten der Insulin-Sekretionsrate in der ersten Phase an dem jeweiligen Versuchstag entspricht.

Gleichung 1: Berechnung der prozentualen Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid] (Projekt A A/C und Projekt B A'/C'):

$$[(AUC_{C/C'} - AUC_{A/A'}) / AUC_{A/A'}] * 100 = \text{Stimulation durch isolierte GLP-1 [7-36-Amid]} \\ \text{Infusion in \%}$$

Gleichung 2: Berechnung der prozentualen Hemmung der GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekte durch Exendin [9-39] (Projekt A $A/C/D$ und Projekt B $A'/C'/D'$):

$$[(AUC_{C/C'} - AUC_{D/D'}) / (AUC_{C/C'} - AUC_{A/A'})] * 100 = \text{Hemmung durch Exendin [9-39] in \%}$$

2.8.2 Statistische Parameter

Die Angaben der Probanden-Charakteristika sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die experimentellen Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes. Die Berechnungen erfolgten mit einem Rechen- und Tabellenkalkulationsprogramm (Excel '2003, Microsoft Cooperation, USA). Die statistische Auswertung wurde mit einer Varianzanalyse für Messwiederholungen ("Repeated Measures Analysis of Variance – RM-ANOVA) durchgeführt. Die Varianzanalyse für Messwiederholungen ist geeignet zur Analyse von Messwerten, bei denen ein Parameter wiederholt im Zeitverlauf bestimmt wird und verschiedene experimentelle Konditionen untereinander verglichen werden sollen. Es ergeben sich Aussagen zur Signifikanz von Unterschieden:

(a) Zwischen den experimentellen Bedingungen (z.B. Infusion NaCl vs. Infusion GLP-1) (p-Wert A).

(b) zum Zeitverlauf (p-Werte B).

(c) für die Interaktion zwischen experimentellen Bedingungen und Zeitverlauf (p-Werte AB).

Im Falle von signifikanten Unterschieden bei A, B bzw. AB kann im Anschluss eine einfache Varianzanalyse darüber Aufschluss geben, ob signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Bedingungen nachweisbar sind bei mehr als zwei experimentellen Bedingungen, gefolgt von einem post – hoc - Test (Duncan's Test) zur genauen Zuordnung der signifikanten Unterschiede. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

Die statistische Analyse ist mit Hilfe des Programms Statistica, Version 5.1 (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) durchgeführt worden.

In der statistischen Analyse der GLP-1 Total-Konzentrationen gilt es eine Besonderheit zu berücksichtigen. Bei den laborchemischen Analysen wurden bei zwei Probanden im Projekt B zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten während unterschiedlicher Versuchstag GLP-1 Total-Konzentrationen von > 320 pmol/l gemessen. Da diese Werte zum einen in ihrer absoluten Größe nicht zu definieren sind und zum anderen die Werte nicht in einem plausiblen Zusammenhang mit den anderen Werten der Probanden zu diesem Zeitpunkt zu bringen waren, wurden diese beiden Werte bei der statistischen Analyse als Messfehler betrachtet und von der Analyse ausgeschlossen. In die Berechnung der Mittelwerte und der Standardfehler zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Werte nicht mit einbezogen und somit mit einer Werteanzahl zu diesem Zeitpunkt mit 5 berechnet ($n = 5$). In Rücksprache mit der Abteilung "Medizinische Statistik" der Universität Göttingen (Kurzberatungstermin am 07.04.2008) wurde für die statistische Analyse über die RM-Anova folgendes Vorgehen besprochen: Die "missing data" zu den beiden Zeitpunkten wurden über das "best case, worst case"-Verfahren ersetzt. Dabei werden die fehlenden Werte in der ersten Analyse mit dem niedrigsten gemessenen Wert (bezogen auf "baseline"-Werte) zu diesem Zeitpunkt ersetzt ("worst case") und in einer zweiten Analyse mit dem höchsten gemessenen Wert zu diesem Zeitpunkt ("best case") ersetzt. Kommt es in beiden Analysen zu einer Signifikanz ($p < 0,05$), gilt dieses Ergebnis als Ausdruck einer angenommenen Signifikanz und kann als solche definiert werden. Die weiteren Subanalysen (Einzelwert-ANOVA, Post-hoc-Duncan) werden dann mit den niedrigsten

Werten ("worst case") durchgeführt. In unserem Fall handelt es sich um einen Probanden am Versuchstag C' zum Zeitpunkt – 30 und einen weiteren Probanden am Versuchstag D' zum Zeitpunkt 60.

3. Ergebnisse

3.1 Projekt A

3.1.1 GLP-1 Total

Die basalen GLP-1-Konzentrationen unterschieden sich am Beginn der Versuchstage nicht signifikant. Am Versuchstag A wurden Konzentrationen von $8,7 \pm 1,2$ pmol/l, am Versuchstag C $6,3 \pm 1,7$ pmol/l und am Versuchstag D $5,0 \pm 1,1$ pmol/l gemessen. Trotz der Tatsache, dass 30 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe die isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion gestartet wurde, fanden sich zum Zeitpunkt 0 keine höheren GLP-1 Total-Konzentrationen als unter der NaCl 0,9 %-Infusion. Lediglich unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] zeigte sich ein signifikanter GLP-1 Total-Anstieg im Vergleich zur NaCl 0,9 %-Infusion. Im direkten Vergleich zur isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion zeigte sich zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Differenz. Zum Zeitpunkt 0 konnten am Versuchstag A $4,5 \pm 1,2$ pmol/l, am Versuchstag C $6,2 \pm 0,7$ pmol/l und am Versuchstag D $8,6 \pm 1,4$ pmol/l ($p = 0,01$ vs NaCl 0,9 %) gemessen werden. Unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion fand sich über 60 Minuten kein Anstieg der GLP-1 Total-Konzentrationen und die gemessenen Konzentrationen lagen auf dem Niveau der gemessenen Konzentrationen unter der NaCl 0,9 %-Infusion. Das bedeutet, dass trotz der Tatsache, dass die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion seit 60 Minuten intravenös appliziert wurde, kein suffizienter GLP-1 Total-Spiegel aufgebaut werden konnte und somit auch zum Zeitpunkt der Glukosegabe keine zusätzliche GLP-1-vermittelte Stimulation der Insulin-Sekretion erfolgen konnte. Erst zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Glukosegabe fand sich ein nennenswerter GLP-1 Total-Anstieg unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion, welcher aber noch immer nicht statistisch signifikant im Vergleich zur NaCl 0,9 %-Infusion war. Erst zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Glukosegabe ließen sich unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion signifikant höhere GLP-1 Total-Konzentrationen messen als unter NaCl 0,9 %-Infusion. Das heißt, dass erst nach 120 Minuten intravenöser GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion ein höherer GLP-1 Total-Spiegel erreicht werden konnte als unter Placebo. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich unter NaCl 0,9 %-Infusion Konzentrationen von $7,3 \pm 1,3$ pmol/l, unter GLP-1 [7-36-

Amid]-Infusion von $33,7 \pm 8,2$ pmol/l ($p = 0,02$ vs. NaCl 0,9 %) und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] von $44,0 \pm 9,2$ pmol/l ($p = 0,003$ vs. NaCl 0,9 %). Die Konzentrationen an Versuchstag C und D unterschieden sich zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant.

Im Gegensatz zu der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion fanden sich unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] deutlich früherer Anstiege der GLP-1 Total-Konzentrationen. Bereits zum Zeitpunkt 0 fand sich wie bereits erwähnt im Vergleich zur Infusion mit NaCl 0,9 % ein signifikanter Anstieg. Dieser wurde im Verlauf der kombinierten Infusion fortgesetzt, stabilisierte sich auf hohem Niveau und war zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Glukosegabe dauerhaft signifikant höher als unter NaCl 0,9 %-Infusion. Da bei der kombinierten Infusion schon 60 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe die Exendin [9-39]-Infusion begonnen und erst im Anschluss 30 Minuten vor Glukosegabe die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion begonnen wurde, kann eine vor der GLP-1-Infusion stattgefundenen „Absättigung“ an den Kunststoffoberflächen des Infusionssystems einen schnelleren Konzentrationsaufbau ermöglicht haben.

Am Ende der Versuchstage lagen die GLP-1 Total-Konzentrationen unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion und unter kombinierter Infusion signifikant höher als unter NaCl 0,9 %-Infusion. Am Versuchstag A wurde jetzt eine GLP-1 Total-Konzentration von $4,5 \pm 1,5$ pmol/l, am Versuchstag C von $38,0 \pm 5,4$ pmol/l ($p = 0,005$ vs. NaCl 0,9 %) und am Versuchstag D von $48,5 \pm 11,3$ pmol/l ($p = 0,0009$ vs. NaCl 0,9 %) gemessen.

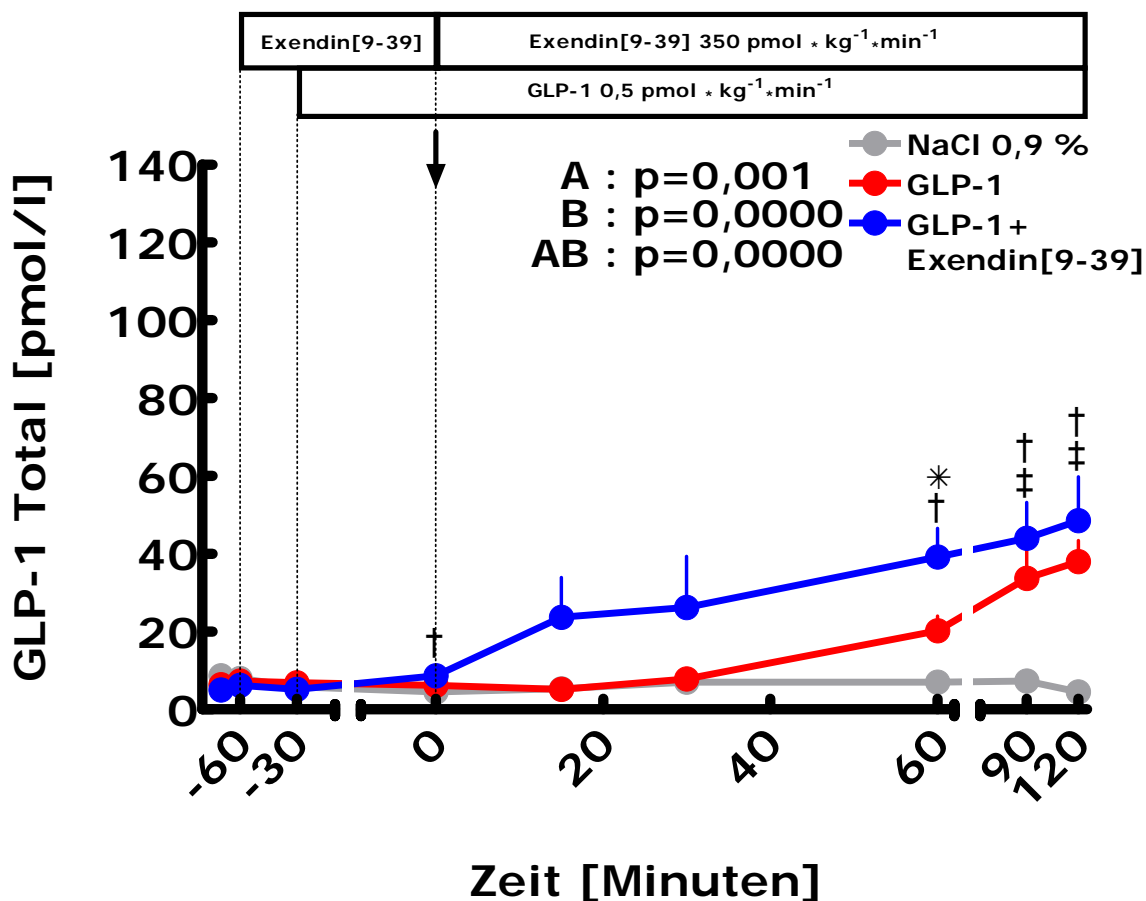


Abb. 6: GLP-1 Total-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.1.2 GLP-1 Intakt

Die GLP-1 Intakt-Konzentrationen sind im Projekt A nicht bestimmt worden.

3.1.3 Exendin [9-39]

Signifikanzen zwischen den einzelnen Versuchstagen ließen sich für die Exendin [9-39]-Konzentrationen nicht statistisch berechnen, da an den Versuchstagen A und C lediglich Proben zur Bestimmung der Exendin [9-39]-Konzentrationen 80 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe genommen wurden und im Anschluss keine weiteren Bestimmungen an diesen Versuchstagen erfolgten. An den beiden Tagen ließen sich keine Exendin [9-39]-Konzentrationen nachweisen. Ebenso lagen die Exendin [9-39]-Konzentrationen am Versuchstag D vor Beginn der Exendin [9-39]-Infusion bei $0,0 \pm 0,0$ nmol/l.

Unter der kombinierten Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] konnte ein rascher Konzentrationsanstieg beobachtet werden. Nachdem die Exendin [9-39]-Infusion zum Zeitpunkt 60 Minuten vor intravenöser Glukosegabe mit einer Dosierung von $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ gestartet wurde, konnte nach 30 Minuten eine Konzentration von $57,8 \pm 13,6$ nmol/l gemessen werden. Bis zum Zeitpunkt 0 kommt es zu einer weiteren Steigerung auf eine maximale Konzentration von $173,8 \pm 48,3$ nmol/l. Im Anschluss wurde die Dosierung nach Infusionsprotokoll auf $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ abgesenkt. Folgerichtig sank die Exendin [9-39]-Konzentration auf $111,4 \pm 15,3$ nmol/l und stabilisierte sich dann im weiteren Verlauf auf ein steady state. Am Ende des Versuchstages konnten Konzentrationen von $147,3 \pm 25,9$ nmol/l bestimmt werden.

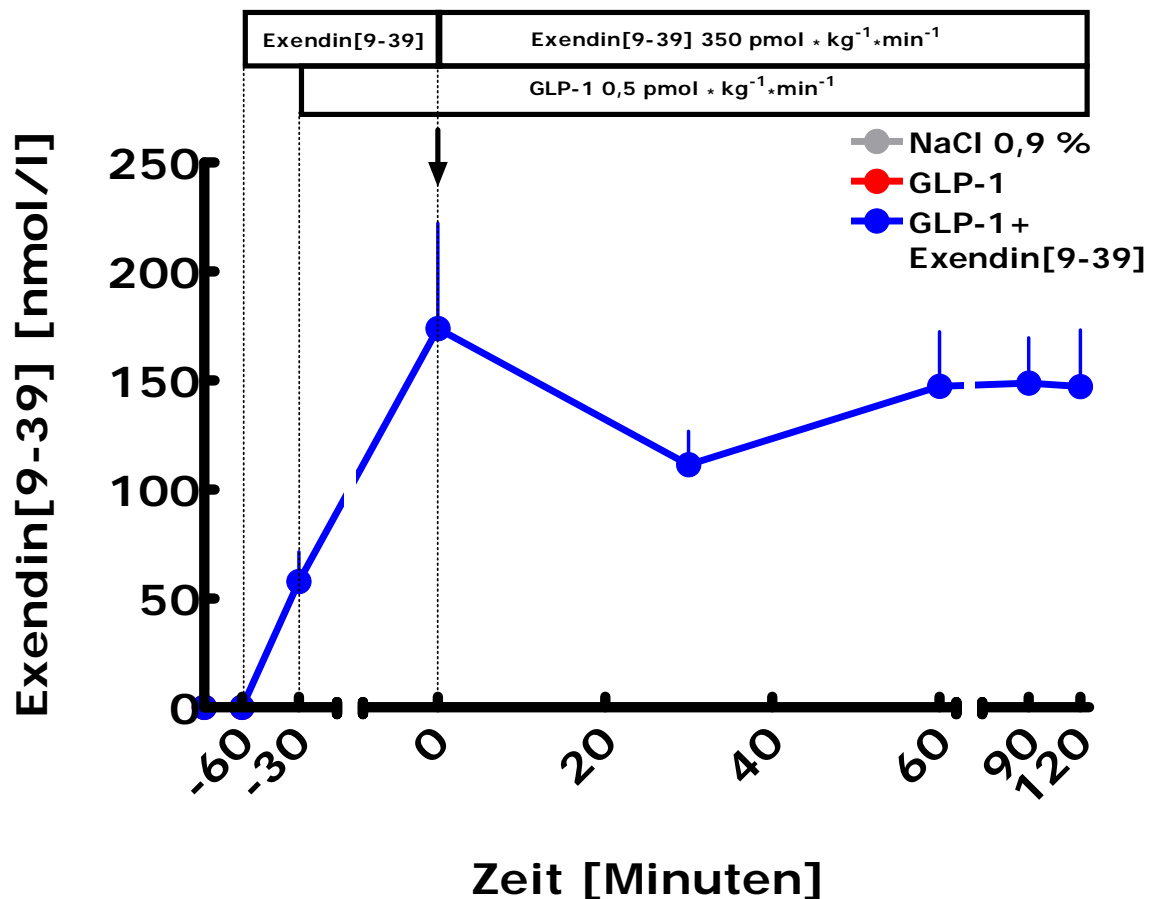


Abb. 7: Exendin [9-39]-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.1.4 Kapillare Plasmaglukose

An allen Versuchstagen fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der initialen Nüchterglukose-Werte. Am Versuchstag A konnten Konzentration von 95 ± 2 mg/dl, am Versuchstag C 96 ± 3 mg/dl und am Versuchstag D 94 ± 3 mg/dl gemessen werden. Der Beginn der Infusionen zeigte vorerst keine signifikanten Veränderungen der Plasmaglukose-Konzentrationen. Insbesondere hatten die 30 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe begonnenen isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen keinen Einfluss auf den Plasmaglukose-Wert.

Nach der intravenösen Glukosegabe fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der maximalen Konzentrationen und des Plasmaglukose-Verlaufs über die ersten 60 Minuten danach. 2 Minuten nach Glukosegabe lag die Plasmaglukose-Konzentration unter NaCl 0,9 %-Infusion bei 267 ± 38 mg/dl, unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei 295 ± 35 mg/dl und unter kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion bei 279 ± 40 mg/dl. Insgesamt schien der Abbau der künstlich aufgebauten hyperglykämischen Plasmaglukose-Konzentrationen unter der kombinierten Infusion etwas verzögert, wobei sich aber während der ersten sechzig Minuten nach Glukosegabe keine signifikanten Unterschiede nachweisen ließen.

90 Minuten nach intravenöser Glukosegabe lag die Glukose-Konzentration unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit 81 ± 8 mg/dl signifikant niedriger als unter kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion mit 106 ± 4 mg/dl ($p = 0,02$ vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Zu diesem Zeitpunkt fand sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Versuchstag A und Versuchstag C.

Am Versuchsende zum Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe zeigten sich dann signifikant niedrigere Plasmaglukose-Konzentrationen unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit 72 ± 3 mg/dl. Im Vergleich dazu konnten unter NaCl 0,9 %-Infusion 88 ± 4 mg/dl ($p = 0,02$ vs. GLP-1 [7-36-Amid]) und unter kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion 90 ± 5 mg/dl gemessen werden.

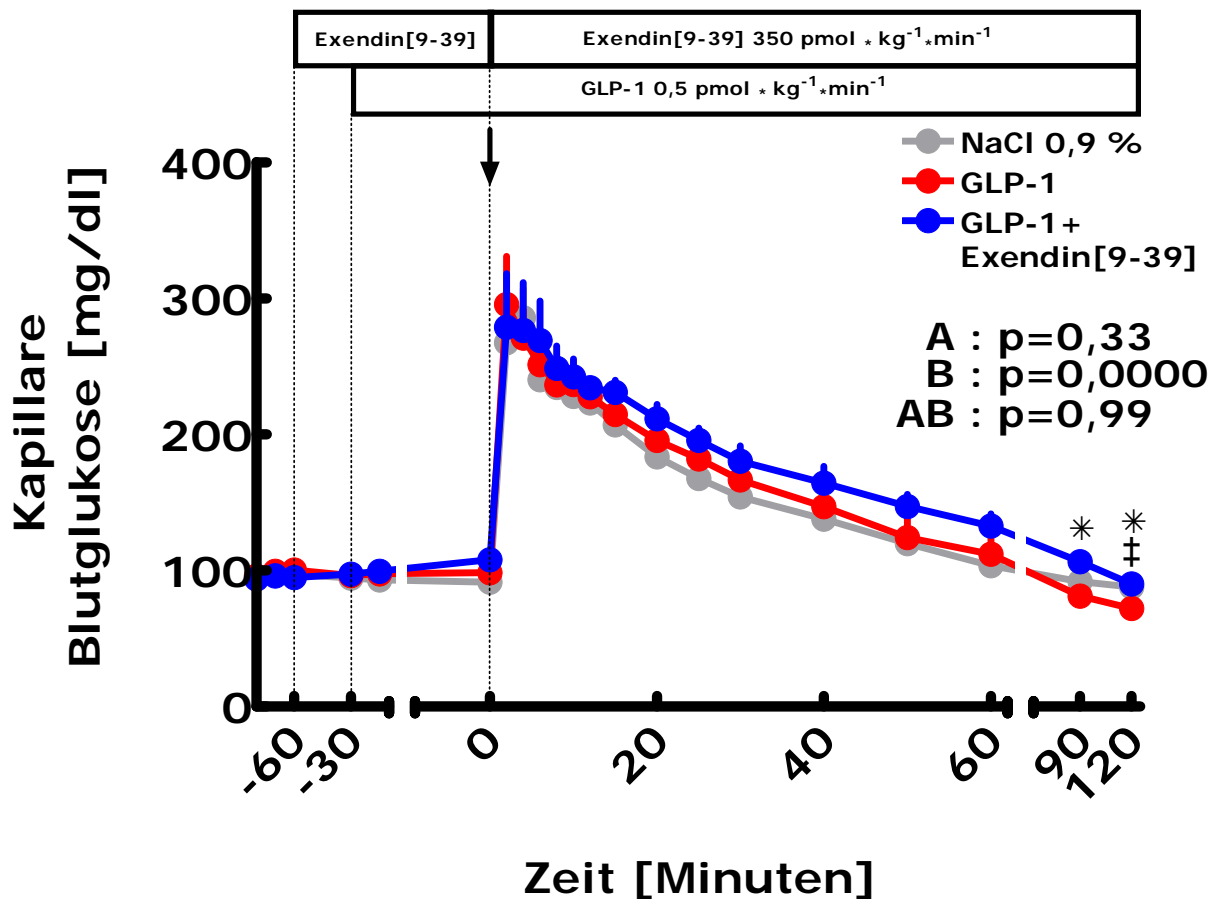


Abb. 8: Kapillare Plasmaglukose-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (\downarrow) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.1.5 Insulin

3.1.5.1 Insulin-Konzentrationen

An allen Versuchstagen lagen die basalen Insulin-Konzentrationen auf einem vergleichbaren Niveau ohne signifikante Unterschiede. Vor Versuchstag A wurden $5,5 \pm 1,2$ mU/l, vor Versuchstag C $6,2 \pm 0,9$ mU/l und vor Versuchstag D $4,8 \pm 0,9$ mU/l gemessen.

Im gesamten weiteren Versuchsverlauf zeigten sich unter den zu vergleichenden Infusionen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Insulin-Konzentrationen. Dabei sind unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion höhere Insulin-Konzentrationen zu finden, ohne sich dabei aber in Regionen einer statistischen Signifikanz zu befinden. Als Reaktion auf die Glukose-Belastung fand sich ein steiler Anstieg der Insulin-Konzentrationen. Zu keinem Zeitpunkt der ersten Phase der Insulin-Sekretion lagen signifikante Unterschiede vor. Die maximalen Insulin-Konzentrationen fanden sich 4 Minuten nach Glukosegabe unter der NaCl 0,9 %-Infusion mit $51,6 \pm 11,9$ mU/l und unter der kombinierten Infusion mit $41,9 \pm 10,5$ mU/l.

Unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion lagen die maximalen Insulin-Konzentrationen mit $65,2 \pm 15,9$ mU/l 6 Minuten nach Glukosegabe. Zum Zeitpunkt 60 Minuten nach intravenöser Glukosegabe ist die Insulin-Konzentration unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion nach anfänglichem Abfall im Vergleich zu den anderen Versuchstage wieder auf einen Wert von $30,2 \pm 11,8$ mU/l angestiegen. Unter der NaCl 0,9 %-Infusion fanden sich zu diesem Zeitpunkt Konzentrationen von $12,5 \pm 3,9$ mU/l und unter kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion Konzentrationen von $19,7 \pm 6,1$ mU/l. Statistisch lagen diese Differenzen aber außerhalb der Signifikanz ($p = 0,08$). Der Anstieg der Insulin-Konzentration ist vermutlich Ausdruck der unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion zu diesem Zeitpunkt stark angestiegenen GLP-1-Konzentration. Nachdem bis zu diesem Zeitpunkt keine relevanten GLP-1-Konzentrationen aufgebaut werden konnten. Dieser erneute Anstieg der Insulin-Konzentration ist auch Erklärung für die signifikant niedrigeren Plasmaglukose-Konzentrationen unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. Am Ende der Versuchstage lagen die Insulin-Konzentrationen auf dem Ausgangsniveau ohne sich untereinander signifikant zu unterscheiden. Am Versuchstag A lag die Konzentration zum Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe bei $4,9 \pm 0,9$ mU/l, am Versuchstag C bei $6,2 \pm 1,4$ mU/l und am Versuchstag D bei $6,1 \pm 1,6$ mU/l.

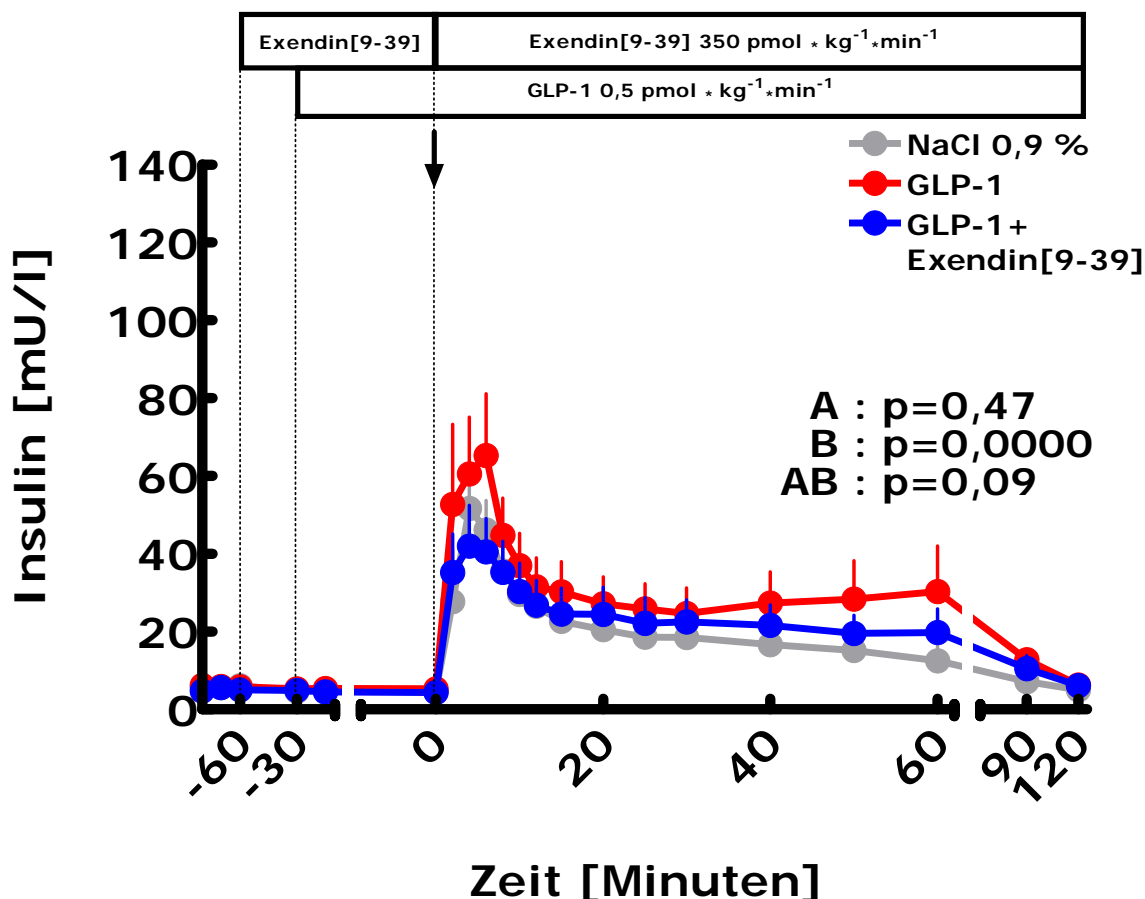


Abb. 9: Plasmainsulin-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : p < 0,05 NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : p < 0,05 isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : p < 0,05 NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.1.5.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Konzentration

Die Flächen unter den Konzentrationskurven für die erste Phase (Zeitpunkt 0 bis 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe) zeigten keine signifikanten Unterschiede an den einzelnen Versuchstagen. Ein Maximum präsentierte sich unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit $431,1 \pm 119,8 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Im Vergleich dazu fanden sich unter der NaCl 0,9 %-Infusion Werte von $302,6 \pm 72,5 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin

[9-39]-Werte von $291,8 \pm 74,5 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($p = 0,27$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,93$ vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Insgesamt lässt sich hier keine suffiziente Stimulation der Insulin-Sekretion durch die isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion erkennen. Dies lässt sich bei Betrachtung der GLP-1-Konzentrationen zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe durch einen unzureichenden Aufbau einer effektiven GLP-1-Konzentration erklären.

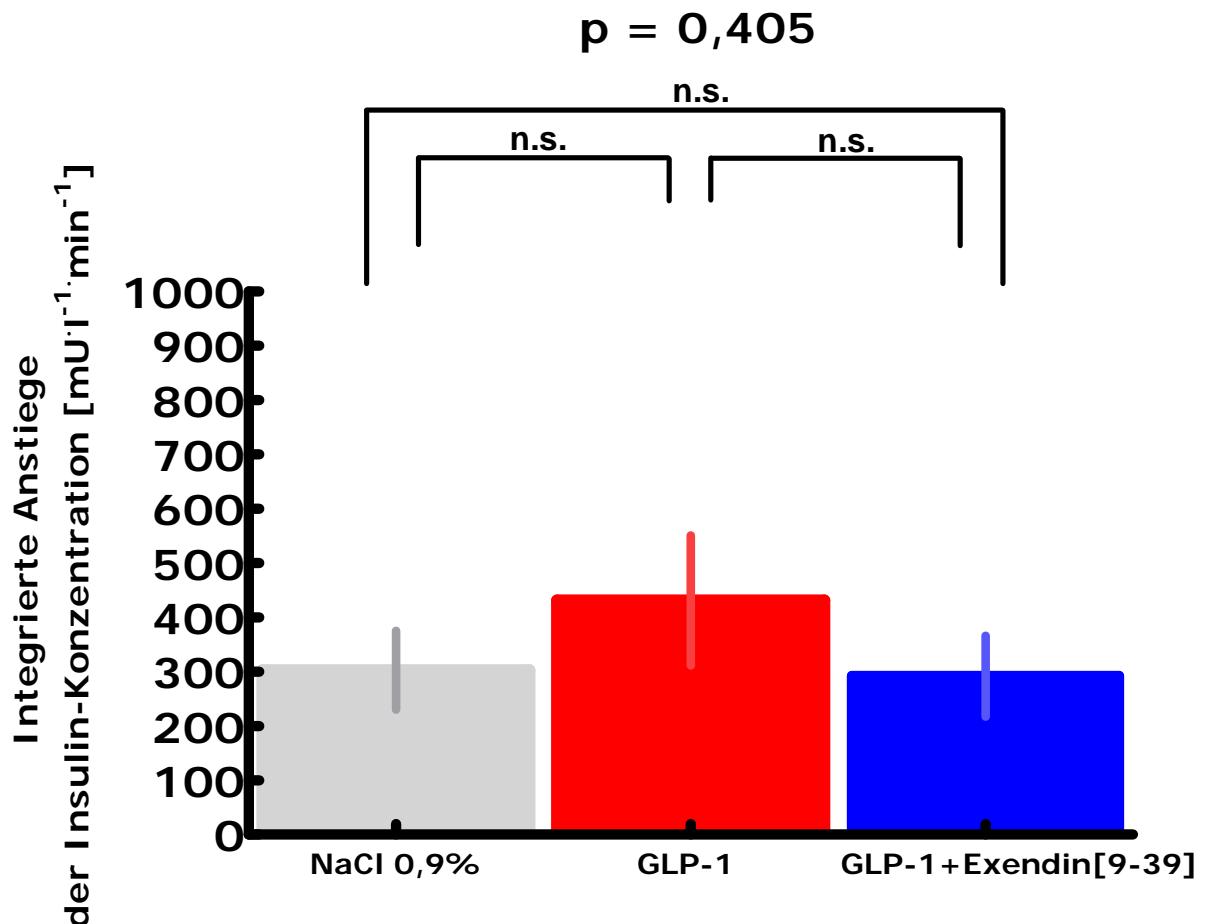


Abb. 10: Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Konzentration 0 - 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe (erste Phase) unter NaCl 0,9 %-, isolierter GLP-1 [7-36-Amid]- oder kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- + Exendin [9-39]-Infusion. n.s: nicht signifikant.

3.1.6 C-Peptid

Die basalen C-Peptid-Konzentrationen lagen an allen Versuchstagen auf einem vergleichbaren Niveau. Am Versuchstag A fanden sich Konzentrationen von $0,6 \pm 0,1$

nmol/l, am Versuchstag C $0,7 \pm 0,1$ nmol/l und am Versuchstag D $0,6 \pm 0,1$ nmol/l. Während des gesamten Versuchsverlaufes fanden sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. Es ließen sich insgesamt höhere C-Peptid-Konzentrationen unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion finden, ohne Signifikanzniveau zu erreichen. Konform mit den Insulin-Konzentrationen findet sich ein starker Anstieg der C-Peptid-Konzentrationen nach der intravenösen Glukosegabe zum Zeitpunkt 0 an allen Versuchstagen. Die maximalen Konzentrationen in der ersten Phase der Insulin-Sekretion fanden sich 6 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe. Unter der NaCl 0,9 %-Infusion lag die Konzentration zu diesem Zeitpunkt bei $1,6 \pm 0,1$ nmol/l, unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei $1,9 \pm 0,3$ nmol/l und unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] bei $1,5 \pm 0,2$ nmol/l.

Danach sanken die Konzentrationen, um dann unter kombinierter Infusion und unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion nach einer Plateauphase 30 Minuten nach Glukosegabe wieder leicht anzusteigen bzw. unter NaCl 0,9 %-Infusion das Niveau zu halten. 60 Minuten nach Glukosegabe fand sich unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion ein zweites Maximum mit einer Konzentration von $2,0 \pm 0,4$ nmol/l. Unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] fanden sich Konzentrationen von $1,6 \pm 0,3$ nmol/l und unter der NaCl 0,9 %-Infusion Werte von $1,3 \pm 0,2$ nmol/l. Ein Signifikanzniveau fand sich statistisch nicht. Am Ende der Versuchstage lagen die Konzentrationen auf einem vergleichbaren niedrigen Niveau. Am Versuchstag A wurden $0,8 \pm 0,1$ nmol/l, am Versuchstag C $1,1 \pm 0,2$ nmol/l und am Versuchstag D $0,9 \pm 0,2$ nmol/l gemessen.

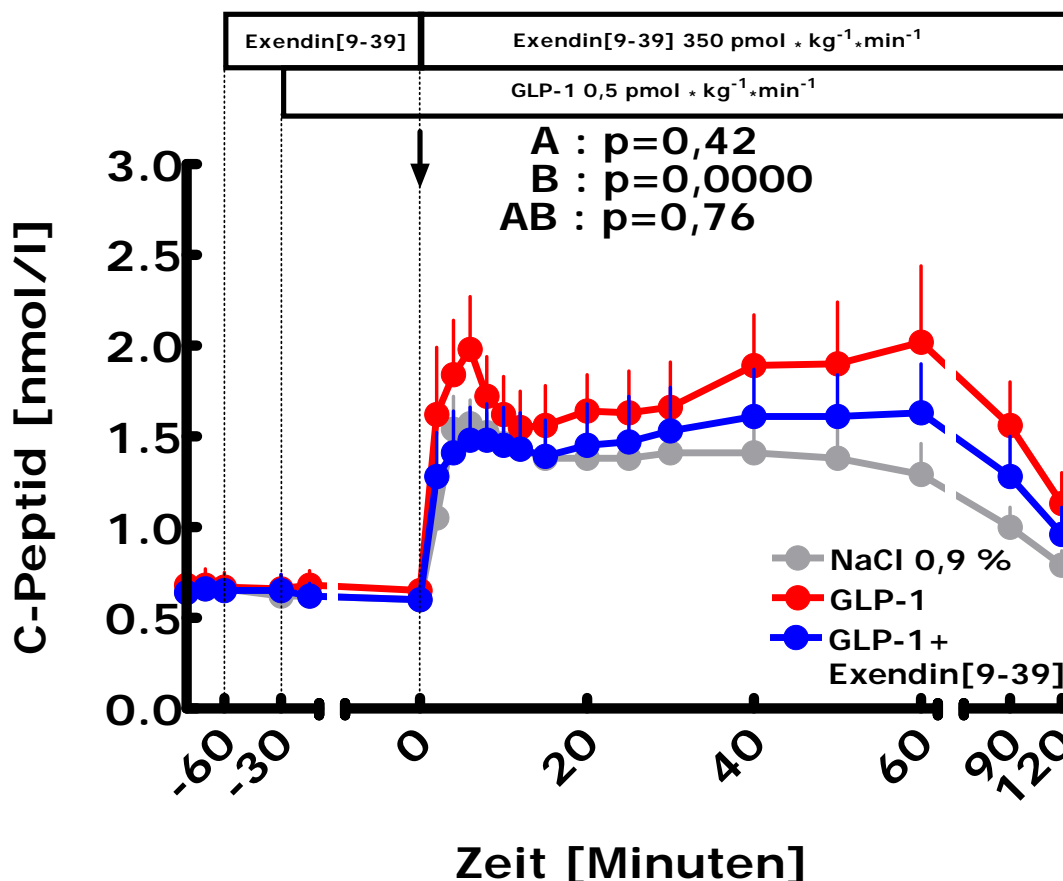


Abb. 11: Plasma-C-Peptid-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. *: $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.1.7 Insulin-Sekretionsraten

3.1.7.1 Insulin-Sekretionsraten

Zu Beginn der Versuchstage unterschieden sich die basalen Insulin-Sekretionsraten nicht. Am Versuchstag A konnten Werte von $1,9 \pm 0,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, am Versuchstag C $2,0 \pm 0,1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und am Versuchstag D $1,9 \pm 0,1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bestimmt werden. Auch nach Beginn der Infusionen zeigten sich keine nennenswerten Veränderungen der Insulin-Sekretionsraten. Insbesondere hatte der

Beginn der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion 30 Minuten vor intravenöser Glukosegabe keinen Einfluss auf die Insulin-Sekretionsrate. Zum Zeitpunkt 0 vor Glukosegabe wurden unter NaCl 0,9 %-Infusion $2,0 \pm 0,3 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion $1,9 \pm 0,3 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] $2,0 \pm 0,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ berechnet.

Nach intravenöser Glukosegabe kommt es zu einem raschen Anstieg der Insulin-Sekretionsrate. Unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] finden sich die maximalen Insulin-Sekretionsraten bereits 2 Minuten nach intravenöser Glukosegabe. Unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion konnte die Insulin-Sekretionsrate mit $21,3 \pm 16,9 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] mit $14,1 \pm 4,1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ berechnet werden. Unter NaCl 0,9 %-Infusion zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine Rate von $11,2 \pm 3,6 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich somit nicht.

Innerhalb der ersten 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe kam es zu einem raschen absinken der Insulin-Sekretionsraten. Nach 10 Minuten lagen die Sekretionsraten am Versuchstag A bei $5,1 \pm 1,1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, am Versuchstag C $3,9 \pm 0,8 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und am Versuchstag D bei $5,7 \pm 1,3 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Unter NaCl 0,9 %-Infusion und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] lagen die Sekretionsraten im weiteren Verlauf auf vergleichbarem Niveau bis 50 Minuten nach intravenöser Glukosegabe, um dann weiter abzufallen und am Ende der Versuchstage auf den Ausgangswerten zu enden. Am Ende des Versuchstages A lagen Sekretionsraten von $1,8 \pm 0,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und am Ende des Versuchstages D von $2,1 \pm 0,4 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ vor. Ebenso verliefen die Insulin-Sekretionsraten unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion, wobei sich hier noch zwei kleinere pulsatile Sekretionserhöhungen zum Zeitpunkt 40 und 60 Minuten nach intravenöser Glukosegabe fanden. Beide erreichten aber kein Signifikanzniveau. Am Ende des Versuchstage C lag eine Sekretionsrate von $2,4 \pm 0,6 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ vor. Insgesamt fanden sich zu keinen Zeitpunkt signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Infusionen.

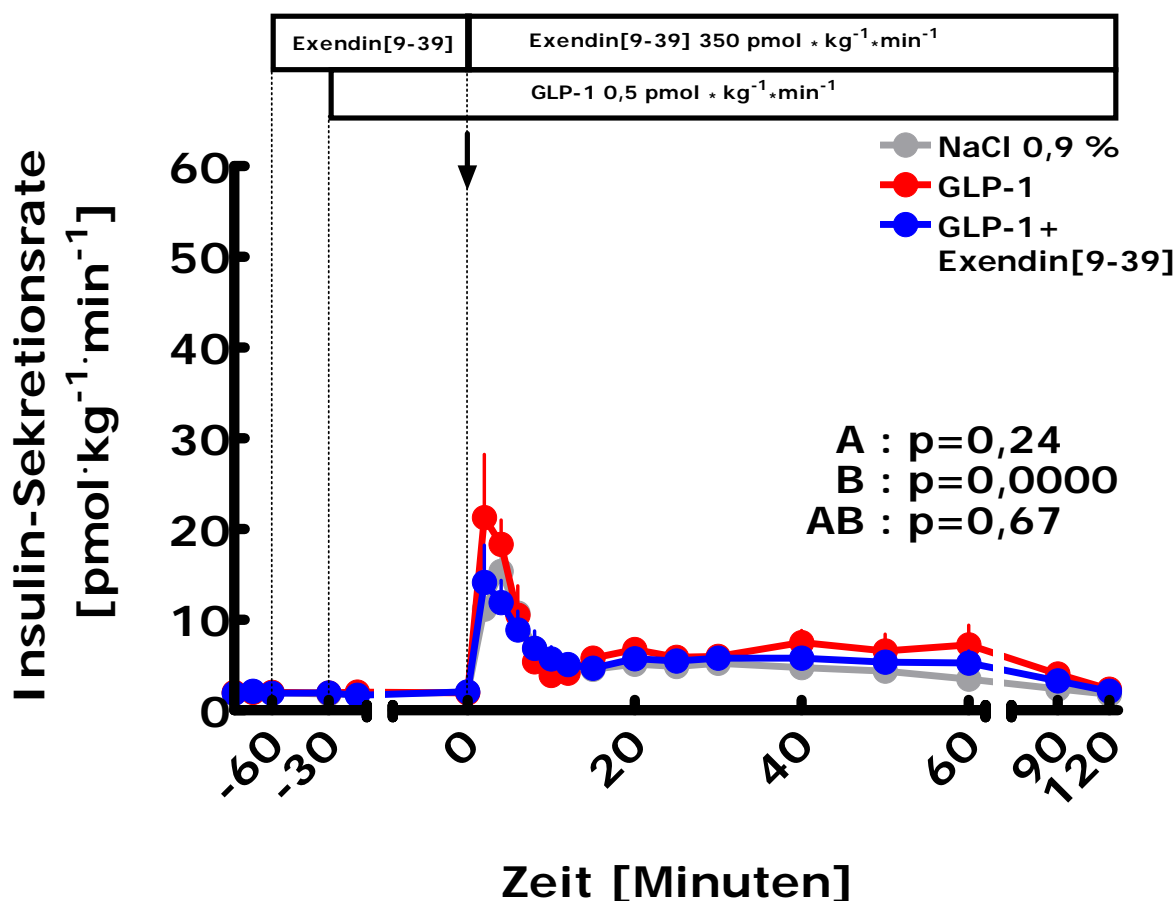


Abb. 12: Insulin-Sekretionsrate vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.1.7.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate

In der ersten Phase der Insulin-Sekretion (0 – 10 Minuten) nach der intravenösen Glukosegabe zeigte sich unter der Kurve des Verlaufgraphen am Tag der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion kein signifikant höherer Wert als an den anderen beiden Versuchstagen. Der Wert am Versuchstag C wurde auf $96,9 \pm 27,9 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ berechnet, am Versuchstag A auf $75,9 \pm 16,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und am Versuchstag D auf $71,8 \pm 20,9 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($p = 0,21$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,17$ vs. kombinierter Infusion GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Eine Signifikanz zwischen

Versuchstag A und D fand sich ebenfalls nicht. Insgesamt lässt sich hier keine suffiziente Stimulation der Insulin-Sekretion durch die isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion erkennen und somit auch keine suffiziente Hemmung der Stimulation durch Exendin [9-39] demonstrieren. Dies lässt sich, wie bereits erwähnt, bei der Betrachtung der GLP-1-Konzentrationen zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe durch einen unzureichenden Aufbau einer wirksamen GLP-1-Konzentration erklären.

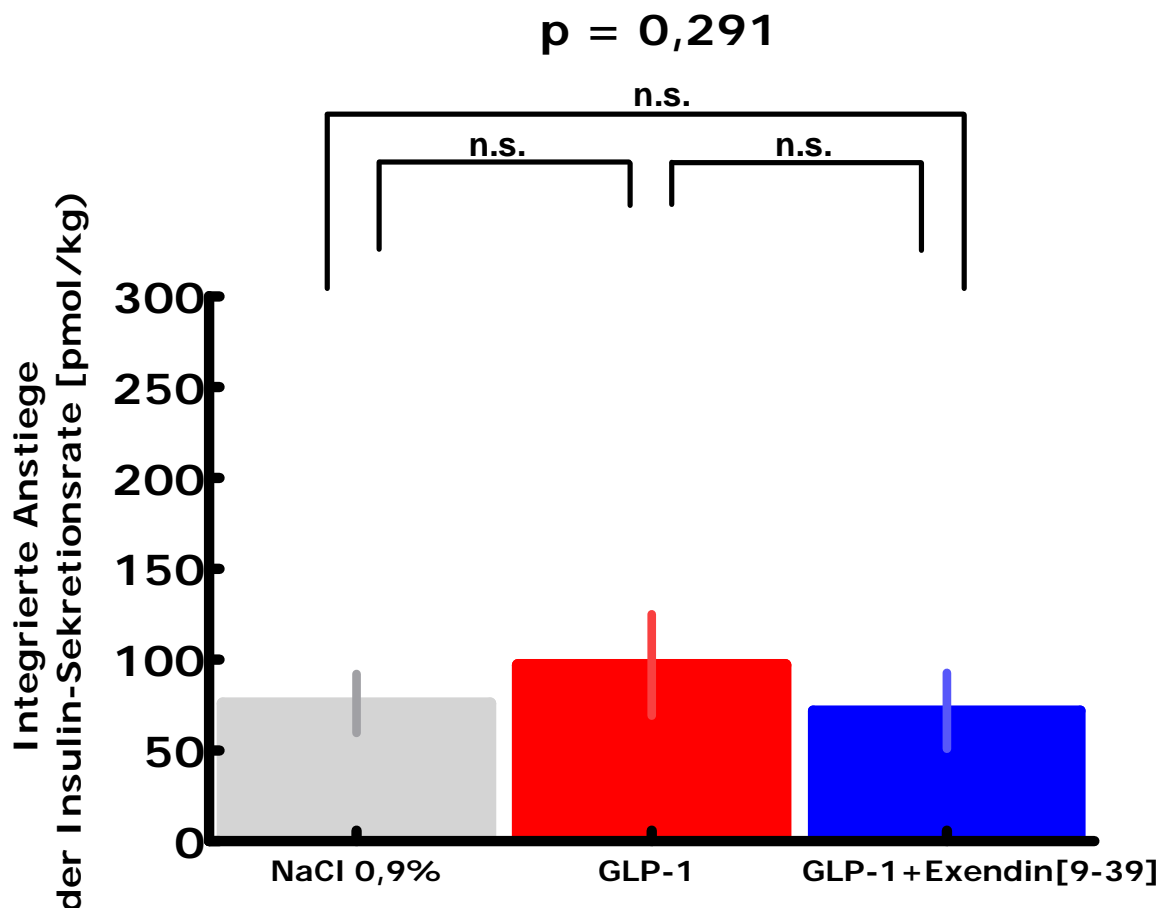


Abb. 13: Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate 0 - 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe (erste Phase) unter NaCl 0,9 %-, isolierter GLP-1 [7-36-Amid]- oder kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- + Exendin [9-39]-Infusion. n.s: nicht signifikant.

3.1.8 Glukagon

Die basalen Glukagon-Konzentrationen wiesen vor Versuchsbeginn keine signifikanten Differenzen auf. Am Versuchstag A sind Konzentrationen von $11,8 \pm 3,5$ pmol/l, am Versuchstag C von $9,5 \pm 3,5$ pmol/l und am Versuchstag D von $9,7 \pm 3,2$

pmol/l. Unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-amid] und Exendin [9-39], bei welcher 60 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe begonnen wurde Exendin [9-39] zu infundieren, fand sich bereits zum Zeitpunkt 0 ein deutlicher Anstieg der Glukagon-Spiegel und im Vergleich zur isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion ein statistisch signifikanter Unterschied. Zum Zeitpunkt 0 lag unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-39-amid] und Exendin [9-39] eine Glukagon-Konzentration von $19,3 \pm 3,9$ pmol/l vor. Unter NaCl 0,9 %-Infusion lag diese bei $9,8 \pm 2,9$ pmol/l ($p = 0,5$ vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]) und unter GLP-1 [7-36-Amid] bei $7,0 \pm 2,7$ pmol/l ($p = 0,02$ vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]).

Nach intravenöser Glukosegabe sanken die Glukagon-Spiegel am Versuchstag A und C als Reaktion auf die erhöhten Insulin-Konzentrationen und Plasamaglukose-Konzentrationen deutlich ab und 15 Minuten nach Glukosegabe fanden sich Glukagon-Konzentrationen unter NaCl 0,9 %-Infusion von $5,0 \pm 1,7$ pmol/l und unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion von $4,0 \pm 1,8$ pmol/l. Die Glukagon-Konzentrationen blieben fortan unter diesen beiden Infusionsregimen vergleichsweise stabil, wobei sich am Ende des Versuchstages C noch ein nichtsignifikanter Anstieg verzeichnen ließ, welcher ggf. als beginnende Gegenregulation zu deuten ist, da zu diesem Zeitpunkt am Versuchstag C auch die niedrigsten Plasmaglukose-Konzentrationen gemessen wurden.

Dauerhaft signifikant höhere Glukagon-Konzentrationen wurden unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-amid] und Exendin [9-39] gemessen. Dies ist vermutlich Ausdruck der suffizienten Inhibition der Glukagon supprimierenden Wirkung des körpereigenen GLP-1. Wobei in diesem Fall für die Interpretation der Daten die Kreuzreaktivität des verwendeten Glukagon-Assays mit Exendin [9-39] berücksichtigt werden muß.

Am Ende der Versuchstage sind am Versuchstag A Glukagon-Konzentrationen von $5,5 \pm 2,4$ pmol/l ($p = 0,01$ vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]), am Versuchstag C von $8,2 \pm 12,6$ pmol/l ($p = 0,02$ vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]) und am Versuchstag D von $22,5 \pm 4,1$ pmol/l gemessen worden.

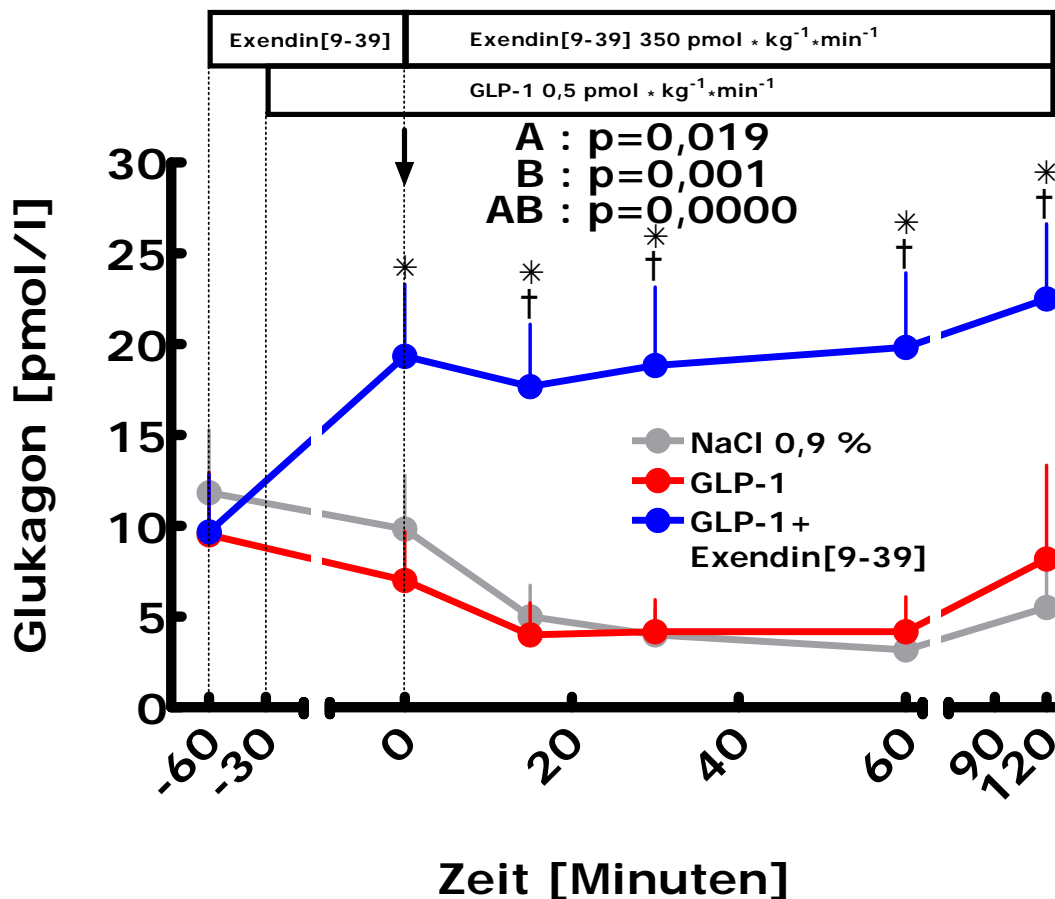


Abb. 14: Glukagon-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 % Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : p < 0,05 NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : p < 0,05 isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : p < 0,05 NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.2 Projekt B

3.2.1 GLP-1 Total

Die Basalwertmessungen der GLP-1 Total-Konzentrationen wiesen an den einzelnen Versuchstagen keine Unterschiede auf. Vor der NaCl 0,9 %-Infusion fanden sich Werte von $9,8 \pm 1,5$ pmol/l, vor der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion Werte von $10,0 \pm 0,7$ pmol/l und vor der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]-

Werte von $9,3 \pm 1,8$ pmol/l. Am Versuchstag A' zeigten sich, wie zu erwarten war, im gesamten Versuchsverlauf keine signifikanten Veränderungen der GLP-1 Total-Spiegel. An den Versuchstagen C' und D' zeigte sich dagegen kurz nach Beginn der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit $1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ein rascher Anstieg der GLP-1 Total-Konzentrationen. Die ersten weiteren Messungen erfolgten 15 Minuten nach GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionsbeginn und somit 30 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe. Unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion fanden sich Konzentrationen von $83,0 \pm 29,4$ pmol/l ($p = 0,02$ vs. NaCl 0,9 %) und unter der kombinierten Infusion $137,5 \pm 25,2$ pmol/l ($p = 0,01$ vs. NaCl 0,9 %). Diese Konzentrationen lagen signifikant höher als unter der NaCl 0,9 %-Infusion, bei der sich zu diesem Zeitpunkt ein Wert von $8,0 \pm 1,3$ pmol/l nachweisen ließ. Interessanterweise zeigte sich auch eine deutliche Differenz bezüglich der GLP-1 Total-Konzentration an Versuchstag D' gegenüber C' zu diesem Zeitpunkt. Am Versuchstag D' war die Konzentration mit $137,5 \pm 25,2$ pmol/l deutlich, aber nicht signifikant höher als an Tag C' ($p = 0,7$ vs. GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion).

Nach Reduktion der infundierten GLP-1 [7-36-Amid]-Dosen auf $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ sanken die GLP-1 Total-Spiegel zum Zeitpunkt 0 (intravenöse Glukosegabe) an Versuchstag C' auf $52,7 \pm 13,7$ pmol/l und an Versuchstag D' auf $60,7 \pm 4,9$ pmol/l. Signifikante Differenzen zwischen Tag C' und D' fanden sich im weiteren Verlauf des Versuches nicht mehr. Unter der Dosierung von $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ blieben die GLP-1 Total-Konzentrationen auf einem stabilen Niveau. Tendenziell zeigten sich unter der kombinierten Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] höhere GLP-1 Total-Konzentrationen, welche aber kein Signifikanzniveau erreichten. Über den gesamten Verlauf lagen die GLP-1 Total-Spiegel ab dem Zeitpunkt 30 Minuten vor intravenöser Glukosegabe an Versuchstagen C' und D' signifikant höher als an Versuchstag A'.

Am Ende der Versuchstage wurden GLP-1 Total-Konzentrationen unter NaCl 0,9 %-Infusion von $7,5 \pm 1,6$ pmol/l, unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion von $54,3 \pm 12,7$ pmol/l und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] von $67,2 \pm 13,1$ pmol/l nachgewiesen. Somit waren am Ende des Versuches die Spiegel an Tag C' ($p = 0,007$ vs. NaCl 0,9 %) und D' ($p = 0,002$ vs. NaCl 0,9 %) weiterhin signifikant höher als an Versuchstag A'.

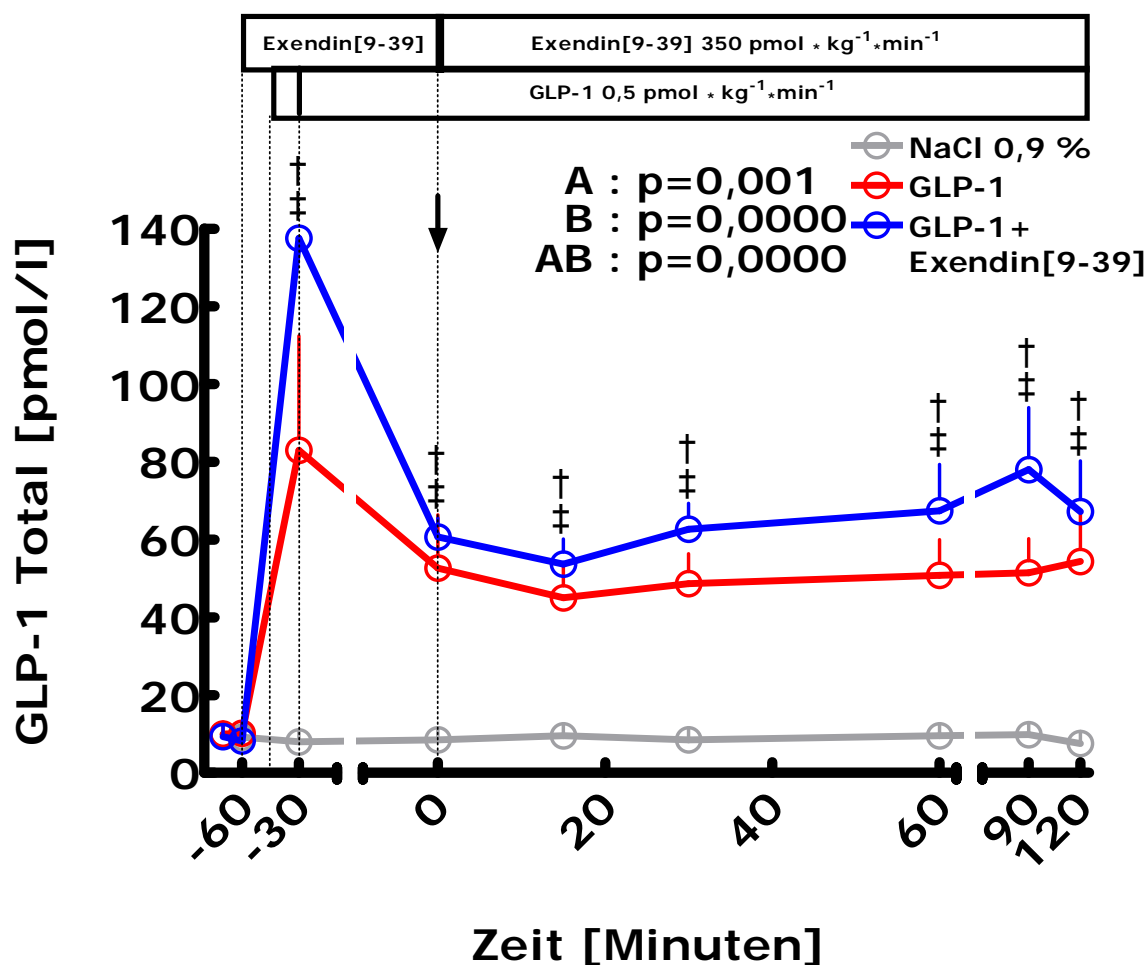


Abb. 15: GLP-1 Total-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. † : $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.2.2 GLP-1 Intakt

Zu Beginn des Versuchstages A' lagen die gemessenen Werte im Mittel bei $0,0 \pm 0,0$ pmol/l, an Tag C' bei $0,5 \pm 0,5$ pmol/l und an Tag D' bei $1,3 \pm 1,2$ pmol/l. Statistisch fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei den "baseline"- Messungen. Zum Zeitpunkt 30 Minuten vor intravenöser Glukosegabe und somit 15 Minuten nach dem Beginn der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit einer Dosierung von $1,0 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ließen sich im Vergleich zum Versuchstag A' an den Versuchstagen C' und D'

signifikant höhere GLP-1 Intakt-Konzentrationen nachweisen. Unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion wurden $12,4 \pm 2,7$ pmol/l ($p = 0,0005$ vs. NaCl 0,9 %) und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] $14,1 \pm 1,9$ pmol/l ($p = 0,0002$ vs. NaCl 0,9 %) gemessen. Zeitgleich lag die Konzentration von GLP-1 Intakt unter der NaCl 0,9 %-Infusion weiter bei $0,0 \pm 0,0$ pmol/l. Nach Reduzierung der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion zum Zeitpunkt 30 Minuten vor intravenöser Glukosegabe auf $0,5$ pmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹ an den Versuchstagen C' und D' sanken die GLP-1 Intakt-Spiegel. Zum Zeitpunkt 0 (intravenöse Glukosegabe) fanden sich unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion Werte von $5,8 \pm 0,9$ pmol/l und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Werte von $6,9 \pm 1,3$ pmol/l. Unter der NaCl 0,9 %-Infusion konnten zu diesem Zeitpunkt Konzentrationen von $0,0 \pm 0,0$ pmol/l nachgewiesen werden. Somit lagen die Werte an Versuchstag C' ($p = 0,0006$ vs. NaCl 0,9 %) und Versuchstag D' ($p = 0,0002$ vs. NaCl 0,9 %) weiterhin signifikant höher. Über den gesamten weiteren Versuchsverlauf blieben die GLP-1 Intakt-Spiegel an den Versuchstage C' und D' signifikant höher als an Versuchstag A' bis zum Zeitpunkt 60 Minuten nach intravenöser Glukosegabe. Ab diesem Zeitpunkt waren lediglich die Spiegel an Versuchstag C' signifikant höher als am Versuchstag A'. Die GLP-1 Intakt-Konzentrationen unter der kombinierten GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] lagen zwar auch deutlich höher als am Versuchstag A', jedoch ließen sich statistisch keine Signifikanzen nachweisen. Am Ende des Versuchstages wurden unter der NaCl 0,9 %-Infusion Werte von $0,0 \pm 0,0$ pmol/l, unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion Werte von $8,1 \pm 2,7$ pmol/l und unter kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion Werte von $4,5 \pm 1,4$ pmol/l gemessen.

Zwischen den Versuchstagen C' und D' fanden sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Differenzen in Hinsicht auf die GLP-1 Intakt-Konzentrationen.

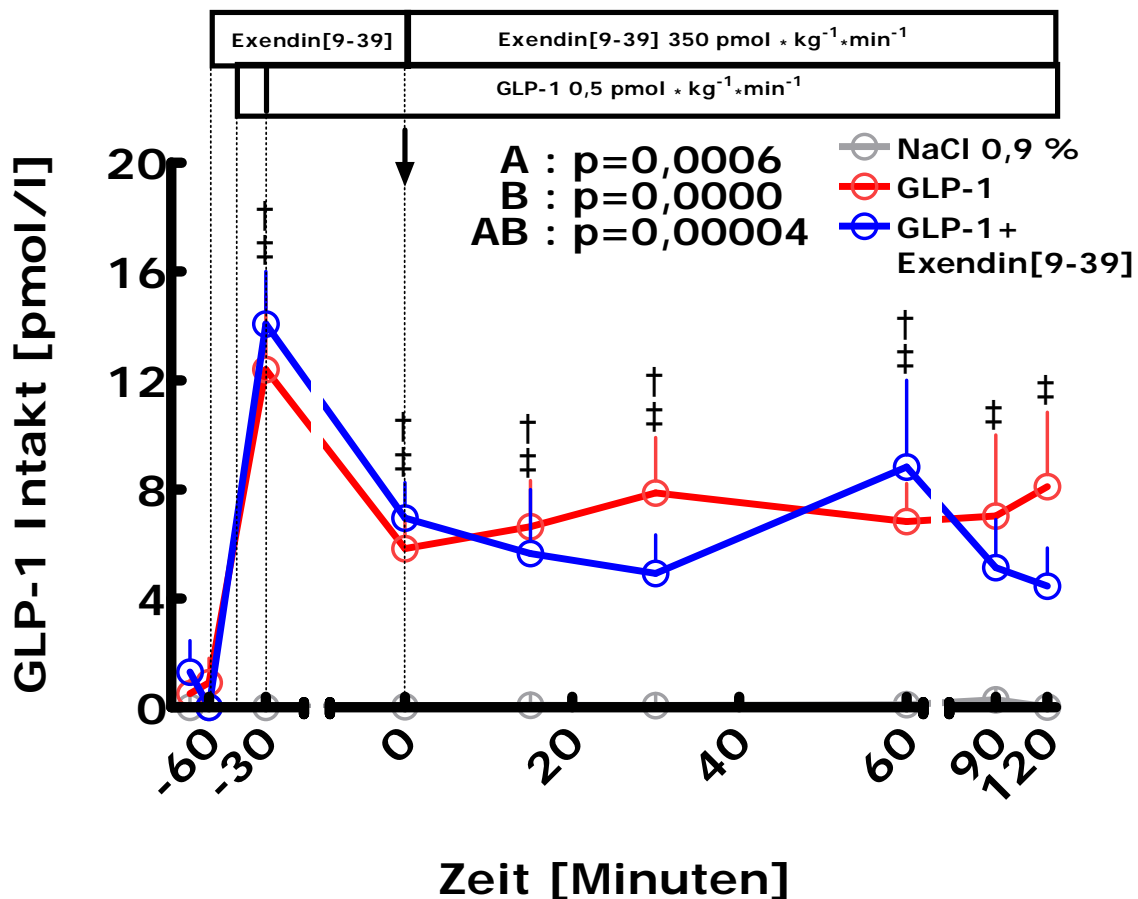


Abb. 16: GLP-1 Intakt-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.2.3 Exendin [9-39]

Signifikanzen zwischen den einzelnen Versuchstagen ließen sich für die Exendin [9-39]-Konzentrationen nicht statistisch berechnen, da an den Versuchstagen A' und C' lediglich Proben zur Bestimmung der Exendin [9-39]-Konzentrationen 80 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe genommen wurden und im Anschluss keine weiteren Bestimmungen an diesen Versuchstagen erfolgten. An den beiden Tagen ließen sich keine Exendin [9-39]-Konzentrationen nachweisen. Am Versuchstag D' unter der kombinierten GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion wurden über den

gesamten Versuchszeitraum mehrere Proben zur Exendin [9-39]-Konzentrationsbestimmung abgenommen. Begonnen wurden die Abnahmen 60 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe. Es zeigte sich jeweils ein rascher Anstieg der Exendin [9-39]-Konzentration 30 Minuten nach Beginn der Infusion mit einer Dosierung von $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Exendin [9-39]-Konzentration lag vor Beginn der Infusion bei $0,1 \pm 0,1 \text{ nmol/l}$. Diese Messungen dürfen nach Aussage des Labors, das die Exendin [9-39]-Konzentrationen bestimmt hat, als "nicht nachweisbar" gewertet werden. 30 Minuten nach Beginn der Exendin [9-39]-Infusion konnten Werte von $101,7 \pm 13,9 \text{ nmol/l}$ gemessen werden. Nach weiteren 30 Minuten zum Zeitpunkt 0 (intravenöse Glukosegabe) lag die Konzentration des Exendin [9-39] bei $148,3 \pm 19,1 \text{ nmol/l}$. Anschließend wurde die Dosierung auf $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ reduziert. Dennoch stieg die Exendin [9-39]-Konzentration kumulativ weiter an, jedoch mit einer deutlich langsameren Progression. Nach 60 Minuten mit einer Dosis von $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ wurden Konzentrationen von $176,3 \pm 17,4 \text{ nmol/l}$ gemessen. Danach sanken die Spiegel wieder leicht und vor Beendigung des Versuches nach 120 Minuten mit einer Dosierung von $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ konnten Werte von $166,8 \pm 12,7 \text{ nmol/l}$ gefunden werden.

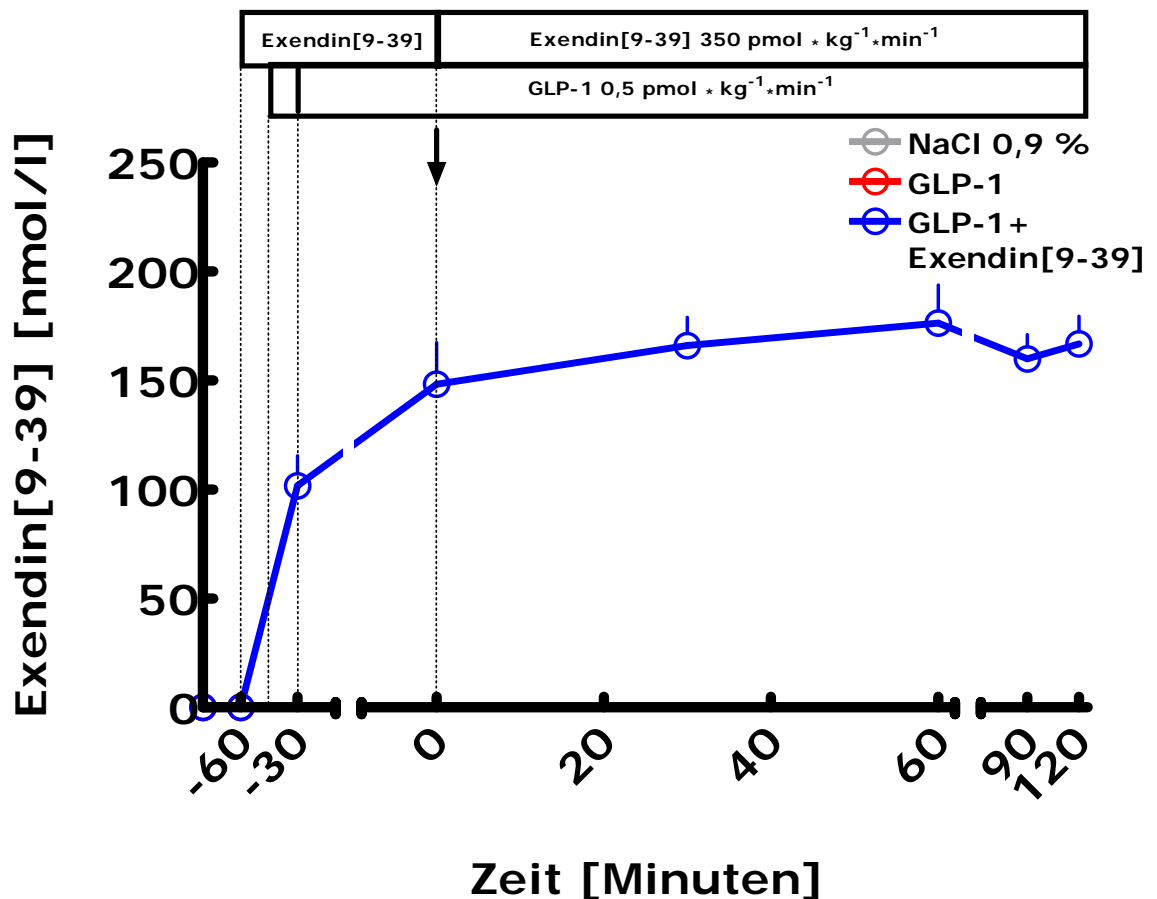


Abb. 17: Exendin [9-39]-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise).

3.2.4 Kapillare Plasmaglukose

Die initialen Nüchternglukose-Werte zeigten bei allen Probanden an allen drei Versuchstagen keine signifikanten Unterschiede. Am Versuchstag A' fanden sich Werte von 100 ± 2 mg/dl, am Versuchstag C' 97 ± 2 mg/dl und am Versuchstag D' 95 ± 2 mg/dl. Im nüchternen Zustand zeigte die 45 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe beginnenden isolierten Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] bereits eine signifikante Reduzierung der Glukose-Konzentration. Nach 15 Minuten Infusionsdauer mit einer Dosierung von $1,0 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ senkte sich der Glukose-Spiegel auf 89 ± 2 mg/dl ab ($p = 0,005$ vs. NaCl 0,9 %). Im weiteren Verlauf sank der Blutzucker unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion auch nach Reduktion der Dosis auf $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ weiter ab und erreichte zum Zeitpunkt 0 vor der intravenösen Glukosegabe einen Wert von 80 ± 3

mg/dl und war damit signifikant niedriger als an den anderen beiden Versuchstagen ($p = 0,0001$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,0003$ vs. GLP-1 [7-36-Amid] + Exendin [9-39]). Zum Zeitpunkt 0 wurden unter der NaCl 0,9 %-Infusion 100 ± 2 mg/dl und unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] 98 ± 2 mg/dl gemessen.

Die durch die intravenöse Glukosegabe provozierte Hyperglykämie lag bei allen Probanden an allen Versuchstagen initial auf einem vergleichbaren Niveau ohne signifikante Unterschiede. Die Maximalwerte fanden sich bei der ersten Messung nach der intravenösen Glukosegabe. Unter der NaCl 0,9 %-Infusion zeigten sich 2 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe Plasmaglukose-Konzentrationen von 331 ± 14 mg/dl, unter GLP-1 [7-36-Amid] Werte von 327 ± 23 mg/dl und unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]-Werte von 316 ± 15 mg/dl.

Der Glukoseabbau präsentierte sich in den ersten 15 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe als unabhängig von der Infusionsart. Es zeigten sich in diesem Zeitraum keine signifikanten Unterschiede. 15 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe lag die Plasmaglukose-Konzentration unter NaCl 0,9 %-Infusion bei 230 ± 8 mg/dl, unter GLP-1 [7-36-Amid] bei 201 ± 19 mg/dl und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] bei 226 ± 7 mg/dl. Tendenziell lag der kapillare Glukose-Wert zum Zeitpunkt 15 Minuten nach intravenöser Glukosegabe unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion zwar niedriger, erreichte aber kein Signifikanzniveau. Die Plasmaglukose-Konzentration unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion sank 20 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe signifikant. Zu diesem Zeitpunkt fand sich eine Konzentration von 163 ± 18 mg/dl im Vergleich zu 207 ± 9 mg/dl unter NaCl 0,9 %-Infusion und 205 ± 9 mg/dl unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion ($p = 0,03$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,03$ vs. GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Über weitere 30 Minuten zeigte sich unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion eine signifikant erniedrigte Konzentration bis zum Zeitpunkt 50 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe. Zu diesem Zeitpunkt lag die Plasmaglukose-Konzentration unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei 70 ± 8 mg/dl, unter NaCl 0,9 %-Infusion bei 131 ± 11 mg/dl und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] bei 114 ± 14 mg/dl ($p = 0,002$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,015$ vs. GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Im weiteren Versuchsverlauf kam es zu einer zunehmenden Annäherung der Plasmaglukose-Konzentrationen an den

unterschiedlichen Versuchstagen und bei Beendigung der Versuche lagen keine signifikanten Unterschiede mehr vor.

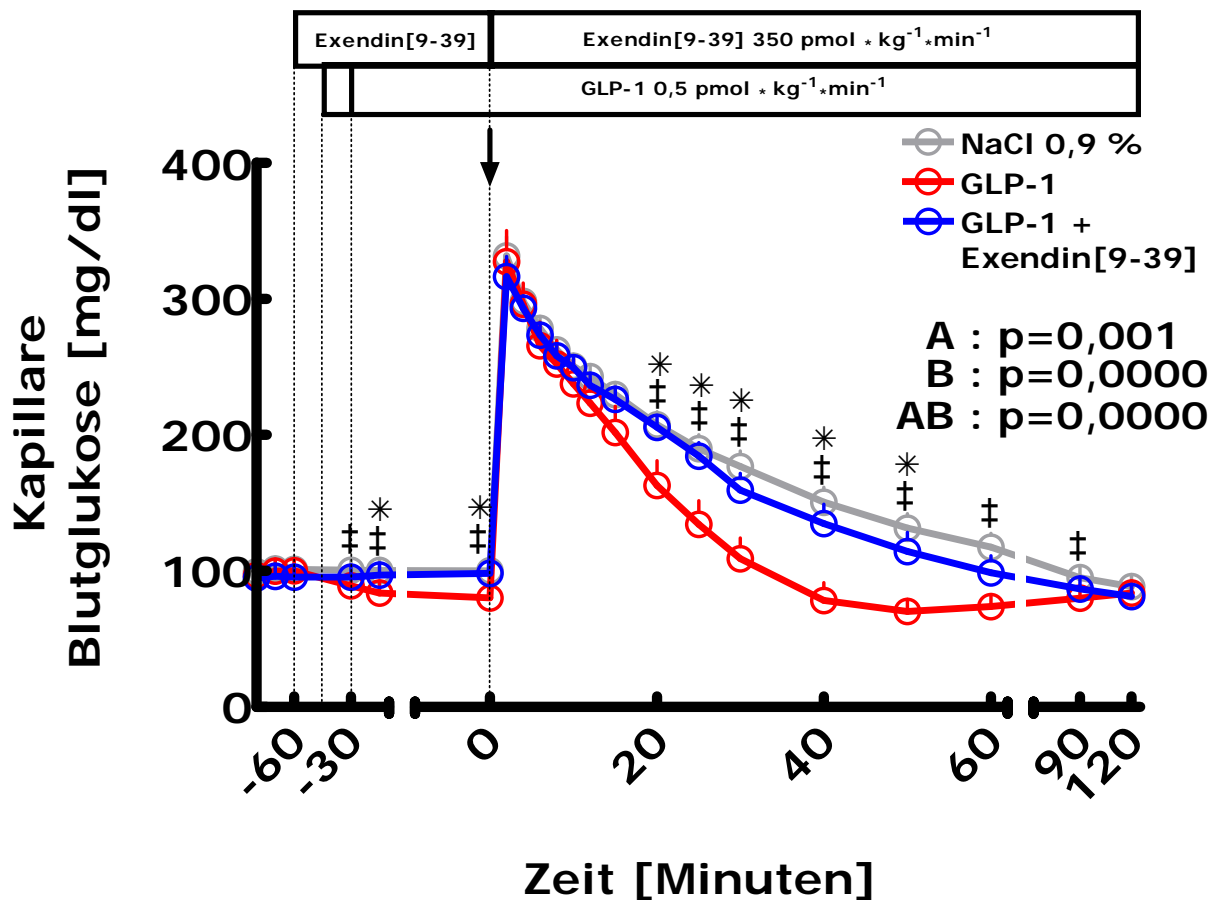


Abb. 18: Kapillare Plasmaglukose-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : p < 0,05 NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. *: p < 0,05 isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : p < 0,05 NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.2.5 Insulin

3.2.5.1 Insulin-Konzentrationen

Die Plasmainsulin-Spiegel wiesen an allen Versuchstagen vor Infusionsbeginn keine signifikanten Unterschiede auf. Am Versuchstag A' wurden Insulin-Spiegel von $8,0 \pm 1,6$ mU/l, am Versuchstag C' $7,1 \pm 2,0$ mU/l und am Versuchstag D' $6,0 \pm 1,3$ mU/l als "baseline-Werte" gemessen. Einen ersten stimulierenden Effekt zeigt die isolierte

GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion zum Zeitpunkt 30 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe. Es kam zu einem signifikantem Anstieg der Insulin-Konzentration 15 Minuten nach Beginn der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit einer Dosierung von $1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Zu diesem Zeitpunkt lag die Insulin-Konzentration unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei $15,7 \pm 2,1 \text{ mU/l}$. Sie lag somit höher als unter NaCl 0,9 %-Infusion, bei welcher sich zu diesem Zeitpunkt ein Insulin-Spiegel von $5,8 \pm 1,3 \text{ mU/l}$ nachweisen ließ und höher als unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] mit $7,9 \pm 1,1 \text{ mU/l}$ ($p = 0,0006$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,03$ vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Dieser Effekt war passager und zum Zeitpunkt 15 Minuten vor intravenöser Glukosegabe und zum Zeitpunkt 0 nicht mehr nachweisbar.

Nach der intravenösen Glukosegabe zeigte sich eine deutliche Steigerung der Insulin-Konzentrationen unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. Es konnten signifikant höhere Insulin-Spiegel über einen Zeitraum von 20 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe nachgewiesen werden. Das Maximum fand sich 4 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe. Hier lag unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion ein Wert von $132,6 \pm 21,5 \text{ mU/l}$. Zum selben Zeitpunkt wurden unter NaCl 0,9 % $66,1 \pm 13,0 \text{ mU/l}$ und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] $64,2 \pm 12,6 \text{ mU/l}$ gemessen ($p = 0,01$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,01$ vs. kombinierter Infusion GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Nach 30 Minuten wurde das Signifikanzniveau unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion verlassen und die Insulin-Konzentrationen näherten sich einander an. 40 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe sank die Insulin-Konzentration bei der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion unter die mittleren Konzentrationen der anderen Versuchstage, ohne dass sich dabei eine Signifikanz nachweisen ließ. 60 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe lag der Insulin-Spiegel unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei $5,4 \pm 0,9 \text{ mU/l}$, unter NaCl 0,9 % bei $13,2 \pm 2,3 \text{ mU/l}$ und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] bei $15,2 \pm 5,7 \text{ mU/l}$.

Am Versuchsende lagen die Insulin-Konzentrationen an allen Versuchstagen auf einem vergleichbaren Niveau ohne signifikante Differenzen.

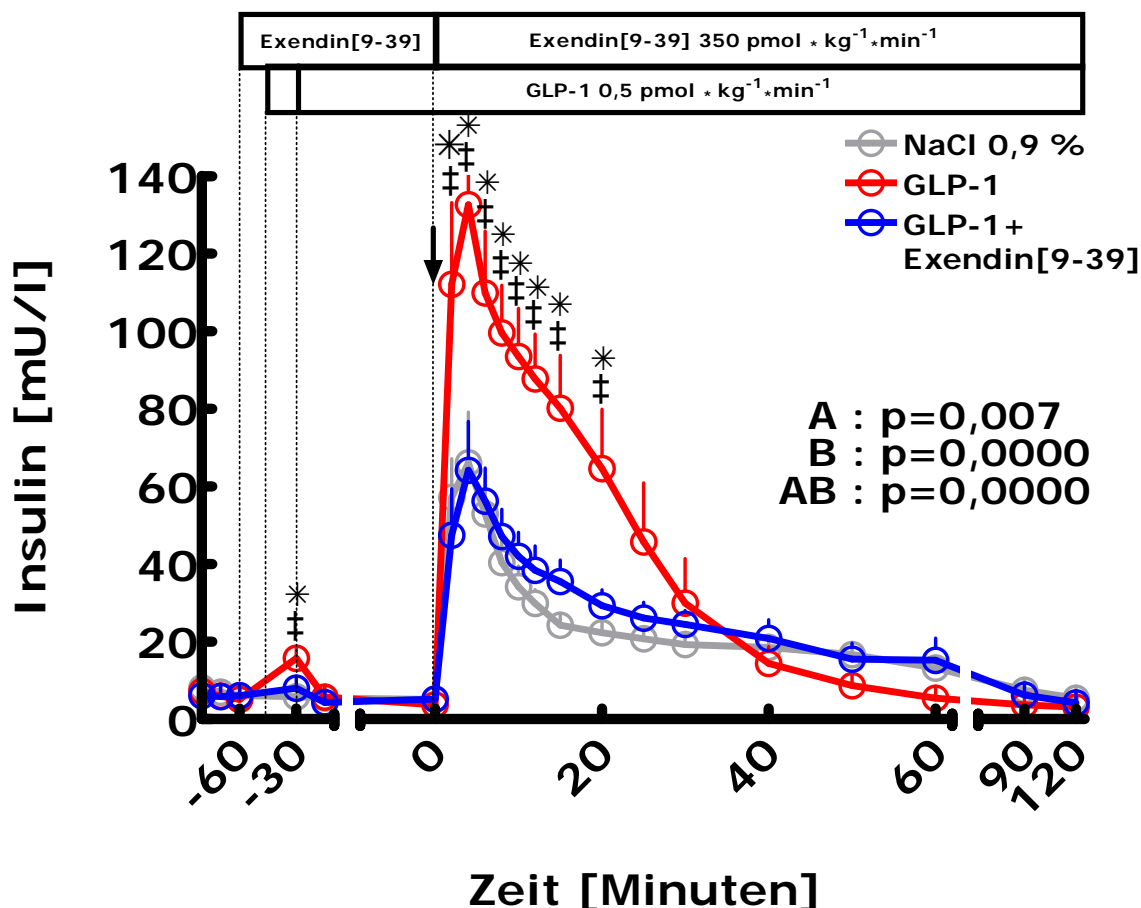


Abb. 19: Plasmainsulin-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.2.5.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Konzentrationen

Die Flächen unter den Konzentrationskurven für die erste Phase (Zeitpunkt 0 bis 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe) zeigten signifikante Unterschiede an den einzelnen Versuchstagen. Ein Maximum präsentierte sich unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit $952,8 \pm 132,7 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Im Vergleich dazu fanden sich unter der NaCl 0,9 %-Infusion Werte von $408,4 \pm 68,6 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]-Werte von $419,9 \pm 82,3 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($p = 0,02$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,02$ vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Zwischen den berechneten Werten für die Insulin-Konzentrationen an

den Versuchstagen A' und D' ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Dies kann als Ausdruck einer suffizienten Hemmung der insulinotropen Wirkung des GLP-1 [7-36-Amid] durch das Exendin [9-39] gewertet werden.

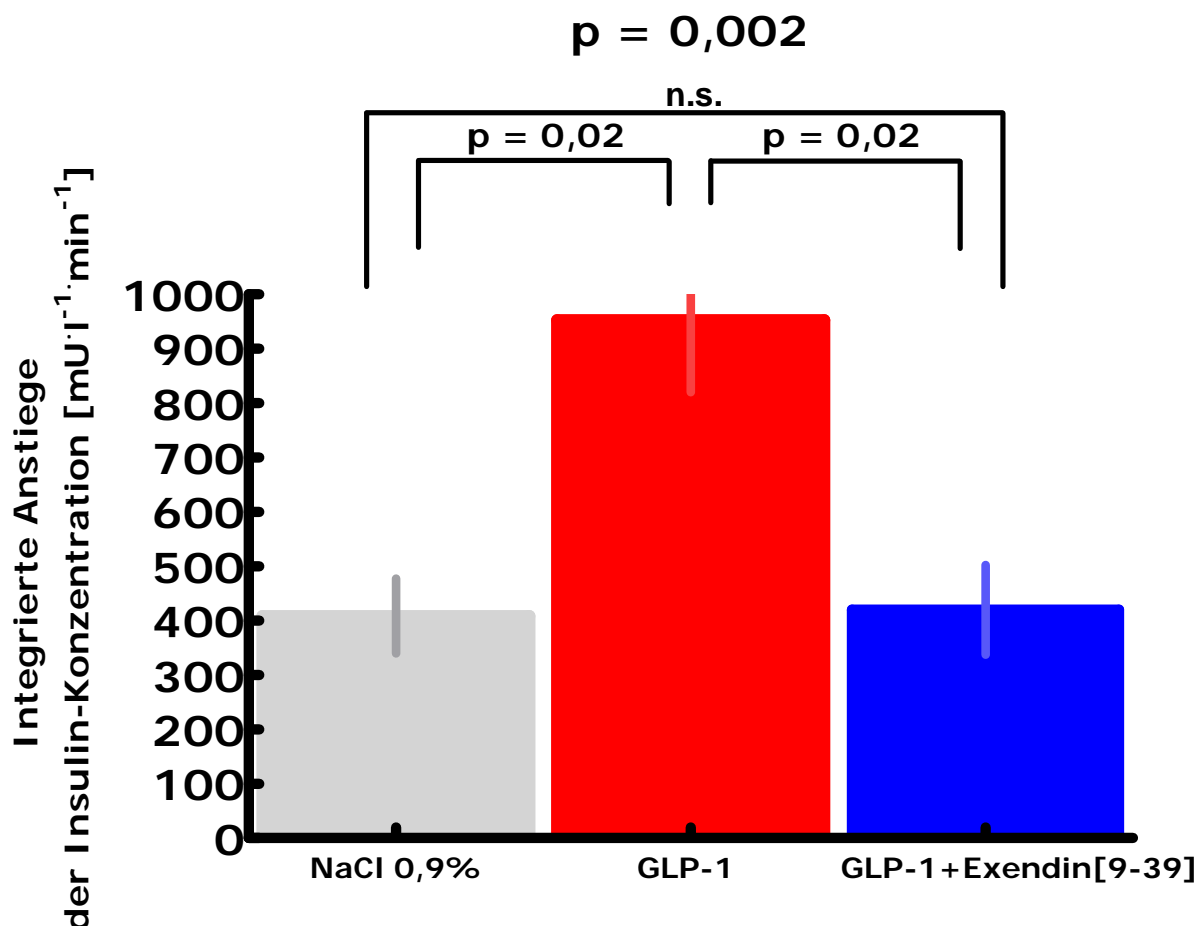


Abb. 20: Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Konzentration 0 - 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe (erste Phase) unter NaCl 0,9 %-, isolierter GLP-1 [7-36-Amid]- oder kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- + Exendin [9-39]-Infusion. n.s: nicht signifikant.

3.2.6 C-Peptid

Die Ausgangskonzentrationen an den einzelnen Versuchstagen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Vor Beginn der NaCl 0,9 %-Infusion lagen die Konzentrationen bei $0,7 \pm 0,1$ nmol/l, vor Beginn der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei $0,7 \pm 0,1$ nmol/l und vor der kombinierten Infusion bei $0,6 \pm 0,1$ nmol/l. Ein erster Effekt konnte 15 Minuten nach Beginn der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion am Versuchstag C' nachgewiesen werden. Hier wurde in Anlehnung an die Befunde bei der Insulin-

Konzentration ein signifikanter Anstieg des C-Peptides unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion nachgewiesen. Die C-Peptid-Konzentrationen lagen zu diesem Zeitpunkt unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei $1,0 \pm 0,1$ nmol/l, unter NaCl 0,9 %-Infusion bei $0,6 \pm 0,1$ nmol/l und unter kombinierter Infusion bei $0,7 \pm 0,1$ nmol/l ($p = 0,007$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,019$ vs. kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Auch hierbei handelt es sich um einen passageren Effekt, welcher zum Zeitpunkt 0 nicht mehr nachweisbar war. Vor der intravenösen Glukosegabe lagen die C-Peptid-Konzentrationen wieder auf vergleichbarem Niveau mit $0,6 \pm 0,1$ nmol/l unter NaCl 0,9 %-Infusion und mit $0,6 \pm 0,1$ nmol/l unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion und mit $0,6 \pm 0,1$ nmol/l unter kombinierter Infusion.

Nach der intravenösen Glukosegabe fanden sich signifikant erhöhte C-Peptid-Konzentrationen am Versuchstag mit der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. Dieses Phänomen ließ sich bis 25 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe nachweisen. Den Maximalwert erreichte die C-Peptid-Konzentration am Tag C' 6 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe. Hier fanden sich Konzentrationen von $3,0 \pm 0,4$ nmol/l. Wohingegen an Versuchtag A' mit $1,7 \pm 0,2$ nmol/l und an Versuchtag D' mit $1,7 \pm 0,1$ nmol/l niedrigere Werte gemessen wurden ($p = 0,004$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,003$ vs. kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Zwischen den C-Peptid-Konzentrationen an den Versuchstagen mit NaCl 0,9 %-Infusion und mit kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] fanden sich über den gesamten Zeitraum keine signifikanten Differenzen.

Zum Zeitpunkt 40 Minuten nach intravenöser Glukosegabe hatten sich die C-Peptid-Konzentrationen an allen Versuchstagen wieder angenähert und lagen mit $1,4 \pm 0,1$ nmol/l unter NaCl 0,9 %, $1,6 \pm 0,3$ nmol/l unter GLP-1 [7-36-Amid] und $1,6 \pm 0,2$ nmol/l unter Infusion mit kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] auf einem vergleichbaren Niveau.

Im Anschluss fiel die C-Peptid-Konzentration unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion unter die mittlere Konzentration der entsprechenden Zeitpunkte an den anderen Versuchstagen, ohne dabei ein statistisches Signifikanzniveau zu erreichen.

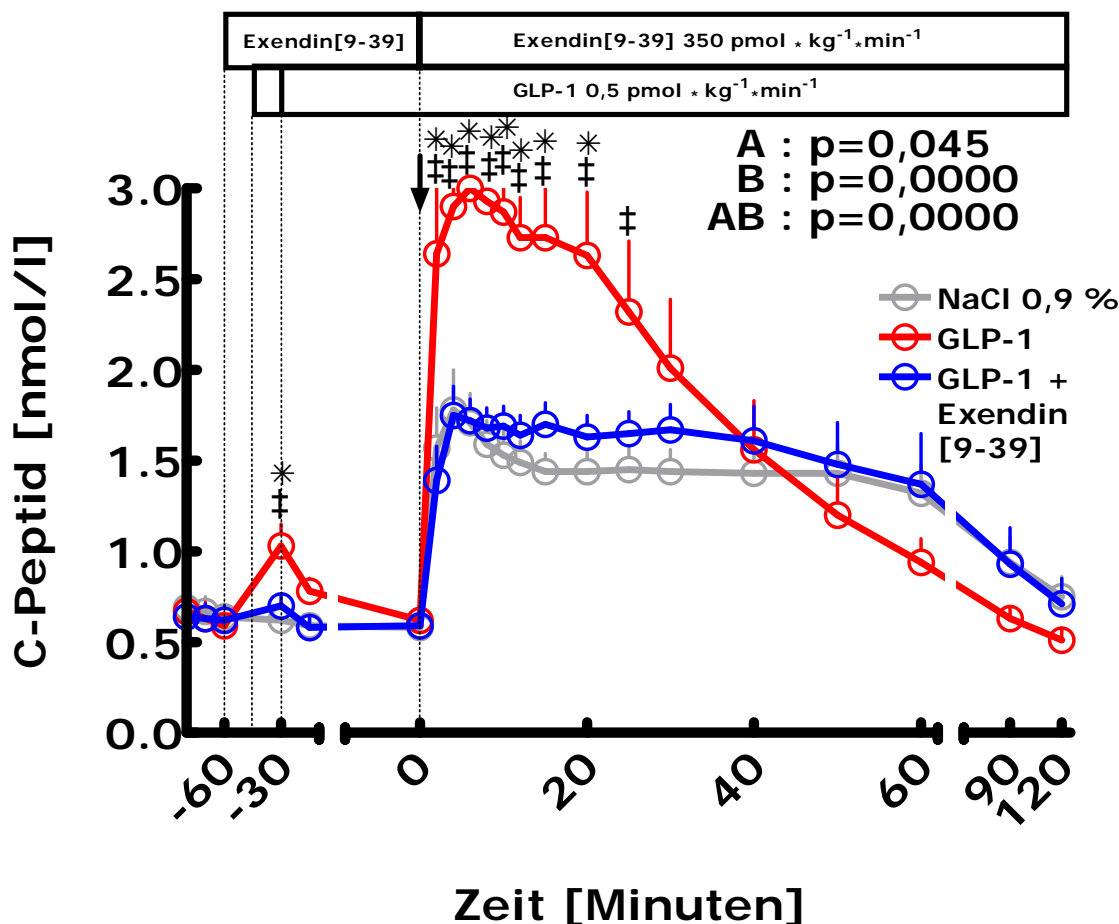


Abb. 21: Plasma-C-Peptid-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : p < 0,05 NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : p < 0,05 isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : p < 0,05 NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.2.7 Insulin-Sekretionsraten

3.2.7.1 Insulin-Sekretionsraten

Zu Beginn der Versuche wiesen die Insulin-Sekretionsraten an allen Versuchstagen keine signifikanten Unterschiede auf. Am Versuchstag A' zeigten sich Werte von $2,2 \pm 0,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, an Versuchstag C' $2,1 \pm 0,3 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und an Versuchstag D' $2,0 \pm 0,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei den Basalwertmessungen vor Infusionsbeginn. Nach 15-minütiger Infusion des GLP-1 [7-36-Amid] am Versuchstag C'

konnte eine signifikante Steigerung der Insulin-Sekretionsrate nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt 30 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe fand sich unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion eine Insulin-Sekretionsrate von $4,1 \pm 0,4 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und somit eine signifikant höhere Rate als unter NaCl 0,9 %-Infusion mit $1,9 \pm 0,2$ und unter kombinierter GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]-Infusion mit $2,4 \pm 0,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($p = 0,0001$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,0005$ vs. kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Auch hier zeigte sich ein nur passagerer Effekt auf die Insulin-Sekretionsrate nach Beginn der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion, welcher sich nach Reduktion der Dosierung auf $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ nicht mehr nachweisen ließ. Zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe (Zeitpunkt 0) fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstagen. Nach der intravenösen Glukosegabe zeigte sich besonders am Anfang der ersten Phase der Insulin-Sekretion über 4 Minuten eine deutlich höhere Rate unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion als an den anderen beiden Versuchstagen. Am Versuchstag C' lag das Maximum bei $51,1 \pm 6,1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 2 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe. Zu diesem Zeitpunkt lag die Insulin-Sekretionsrate an Tag A' bei $25,1 \pm 3,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und an Tag D' bei $21,9 \pm 3,6 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($p = 0,001$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,0005$ vs. kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Auch über die verbleibenden 8 Minuten der ersten Phase der Insulin-Sekretion lagen die Messungen unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion deutlich über denen der anderen beiden Versuchstagen. Es ließ sich hier aber bis auf den Zeitpunkt 4 Minuten nach Glukosegabe, keine statistische Signifikanz nachweisen.

In der Anfangsphase des weiteren Verlaufes der Insulin-Sekretion zeigte sich eine Annäherung der Werte an Versuchstag C' und D', wohingegen die Sekretionsrate an Versuchstag A' 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe eine signifikante Reduzierung aufwies. Unter NaCl 0,9 %-Infusion lag die Sekretionsrate bei $4,7 \pm 0,6$ unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei $10,3 \pm 1,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und unter kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] bei $7,7 \pm 0,6 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($p = 0,016$ vs. GLP-1 [7-36-Amid] und $p = 0,049$ vs. kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). 15 Minuten nach der Glukosegabe ließ sich eine erneute kurze pulsatile Erhöhung der Sekretionsrate unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion nachweisen, welche das Signifikanzniveau überschritt. Der Wert lag bei $11,3 \pm 2,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, wohingegen unter NaCl 0,9 % $4,7 \pm 0,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] $6,8 \pm 0,6 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

min⁻¹ gemessen wurden ($p = 0,004$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,03$ vs. kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]).

Im Anschluss näherten sich die Insulin-Sekretionsraten wieder an und wiesen bis zum Zeitpunkt 40 Minuten nach intravenöser Glukosegabe keine weiteren Signifikanzen auf. Erst ab dem Zeitpunkt 40 Minuten nach intravenöser Glukosegabe sank die Insulin-Sekretionsrate unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion signifikant unter die der anderen beiden Versuchstage. Diese Tatsache ist konform zu dem kapillaren Blutzuckerlauf, welcher um diesen Zeitpunkt und in den folgenden 30 Minuten ein Minimalwert unter der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion zeigte. Die verminderte Insulin-Sekretionsrate scheint somit eine Reaktion auf den erniedrigten kapillaren Plasmaglukose-Spiegel zu sein. Die Rate lag zum Zeitpunkt 40 Minuten nach intravenöser Glukosegabe am Versuchstag C' bei $1,9 \pm 0,5$ pmol · kg⁻¹ · min⁻¹, am Versuchstag A' bei $5,0 \pm 0,4$ pmol · kg⁻¹ · min⁻¹ und am Versuchstag D' bei $5,4 \pm 1,1$ pmol · kg⁻¹ · min⁻¹ ($p = 0,009$ vs. NaCl 0,9 %-Infusion und $p = 0,005$ vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Dieses Phänomen ließ sich über weitere 50 Minuten bis zum Zeitpunkt 90 Minuten nach intravenöser Glukosegabe auf Signifikanzniveau nachweisen. 120 Minuten nach Glukosegabe hatte sich die Sekretionsraten an allen Versuchstagen auf niedrigem Niveau eingependelt. Sie wiesen jedoch eine statistische Signifikanz zwischen Versuchstag A' und Versuchstag C' auf. Am Ende des Versuches lag die Rate am Versuchstag A' bei $1,8 \pm 0,3$ pmol · kg⁻¹ · min⁻¹ und am Versuchstag C' bei $0,9 \pm 0,2$ ($p = 0,03$ vs. GLP-1 [7-36-Amid]).

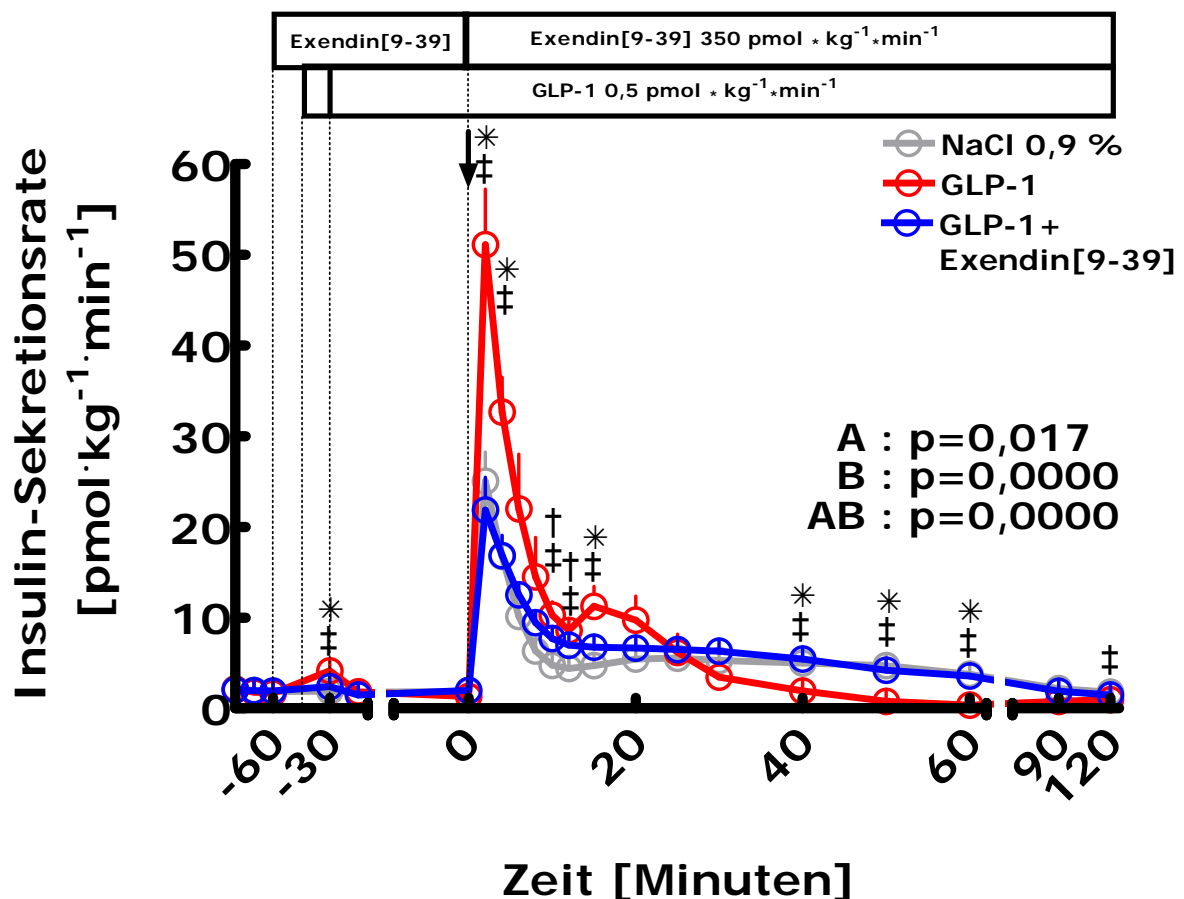


Abb. 22: Insulin-Sekretionsrate vor und nach intravenöser Glukosegabe (↓) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. *: $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.2.7.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate

In der ersten Phase der Insulin-Sekretion (0 – 10 Minuten) nach der intravenösen Glukosegabe zeigte sich unter der Kurve des Verlaufgraphen am Tag der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion ein signifikant höherer Wert als an den anderen beiden Versuchstagen. Der Wert am Versuchstag C' wurde auf $234,2 \pm 40,6 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ berechnet, am Versuchstag A' auf $103,2 \pm 13,1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und am Versuchstag D' auf $111,4 \pm 14,0 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($p = 0,001$ vs. NaCl 0,9 % und $p = 0,001$ vs. kombinierter Infusion GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39]). Eine Signifikanz zwischen

Versuchstag A' und D' fand sich nicht. Insgesamt kann diese Berechnung als Ausdruck einer suffizienten Hemmung des insulinotropischen Effektes des GLP-1 [7-36-Amid] durch das Exendin [9-39] gewertet werden.

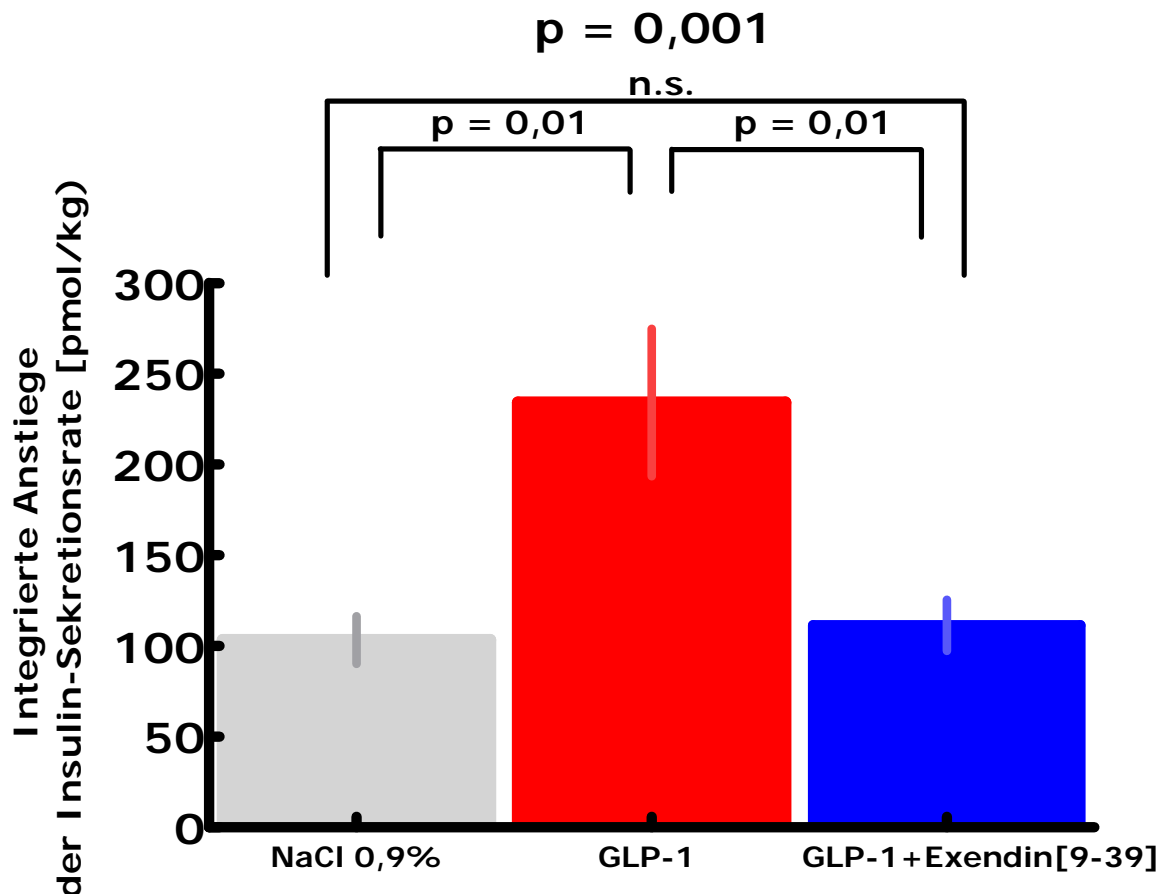


Abb. 23: Integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsrate 0 - 10 Minuten nach intravenöser Glukosegabe (erste Phase) unter NaCl 0,9 %-, isolierter GLP-1 [7-36-Amid]- oder kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- + Exendin [9-39]-Infusion. n.s: nicht signifikant.

3.2.8 Glukagon

Die Ausgangssituation bezüglich der Glukagon-Konzentrationen zeigte zu Beginn der Versuche keine signifikanten Differenzen an den einzelnen Versuchstagen. Die Glukagon-Spiegel lagen vor der NaCl 0,9 %-Infusion bei $8,3 \pm 2,8$ pmol/l, vor der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei $8,4 \pm 2,4$ pmol/l und vor der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] bei $7,5 \pm 2,0$ pmol/l.

Einen deutlichen Effekt im Sinne einer Erhöhung der Glukagon-Konzentration fand sich unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] zum Zeitpunkt 0 (intravenöse Glukosegabe). Zu diesem Zeitpunkt lief die Exendin [9-39]-Infusion seit 60 Minuten und die zeitgleich kombiniert infundierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion seit 45 Minuten. An diesem Versuchstag zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine Glukagon-Konzentration von $18,3 \pm 1,3$ pmol/l ($p = 0,0004$ vs. GLP-1 [7-36-Amid] und $p = 0,0004$ vs. NaCl 0,9 %). Messungen an den Versuchstagen A' ergaben hier Werte von $6,3 \pm 2,3$ pmol/l und an Versuchstag C' $6,0 \pm 1,8$ pmol/l. Über den gesamten weiteren Versuchszeitraum blieben die Glukagon-Konzentrationen unter der kombinierten GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion signifikant höher als an den anderen beiden Versuchstagen. Ursächlich hierfür ist am ehesten die suffiziente Hemmung der inhibitorischen Wirkung des GLP-1 auf die Glukagon-Sekretion durch das Exendin [9-39]. Wobei auch in diesem Versuchsaufbau für die Interpretation der Daten die Kreuzreaktivität des verwendeten Glukagon-Assays mit Exendin [9-39] berücksichtigt werden muß.

Nach der intravenösen Glukosegabe zeigte sich an den Versuchstagen A' und C' eine Absenkung der Glukagon-Konzentrationen am ehesten als Reaktion auf die hohen Plasmaglukose-Spiegel. 15 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe sanken die Werte unter der NaCl 0,9 %-Infusion auf $2,8 \pm 0,9$ pmol/l und unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion auf $3,0 \pm 1,0$ pmol/l. Die Konzentrationen unter der kombinierten GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion blieben signifikant höher ($p = 0,0001$ vs. GLP-1 [7-36-Amid] und $0,00008$ vs. NaCl 0,9 %) mit Werten von $16,7 \pm 1,3$ pmol/l.

60 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe fand sich eine einmalig signifikante Erhöhung der Glukagon-Konzentration unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion gegenüber der NaCl 0,9 %-Infusion. 60 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe wurden am Versuchstag C' Glukagon-Konzentrationen von $6,0 \pm 1,4$ pmol/l gemessen ($p = 0,04$ vs. NaCl 0,9 %), wohingegen zu diesem Zeitpunkt die Glukagon-Konzentration am Versuchstag A' bei $1,8 \pm 0,5$ pmol/l lag. Am ehesten ist diese Glukagon-Erhöhung unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit einer Gegenregulation des Organismus gegen eine drohende Hypoglykämie zu werten. Denn zwischen den Zeitpunkten 40 bis 60 Minuten nach intravenöser Glukosegabe fanden sich bei den Messungen der kapillaren Plasmaglukose unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion die niedrigsten Werte.

Vor Beendigung des Versuches zum Zeitpunkt 120 Minuten nach intravenöser Glukosegabe konnten an Versuchstag A' Glukagon-Konzentrationen von $4,3 \pm 1,0$ pmol/l, an Versuchstag C' von $6,4 \pm 2,3$ pmol/l und an Versuchstag D' von $19,3 \pm 1,8$ pmol/l gemessen werden. Einen signifikanten Unterschied zwischen Tag A' und Tag C' fand sich nicht mehr. Die Konzentration am Ende des Versuchstages D' blieb aber signifikant erhöht ($p = 0,0002$ vs. GLP-1 [7-36-Amid] und $p = 0,0001$ vs. NaCl 0,9 %).

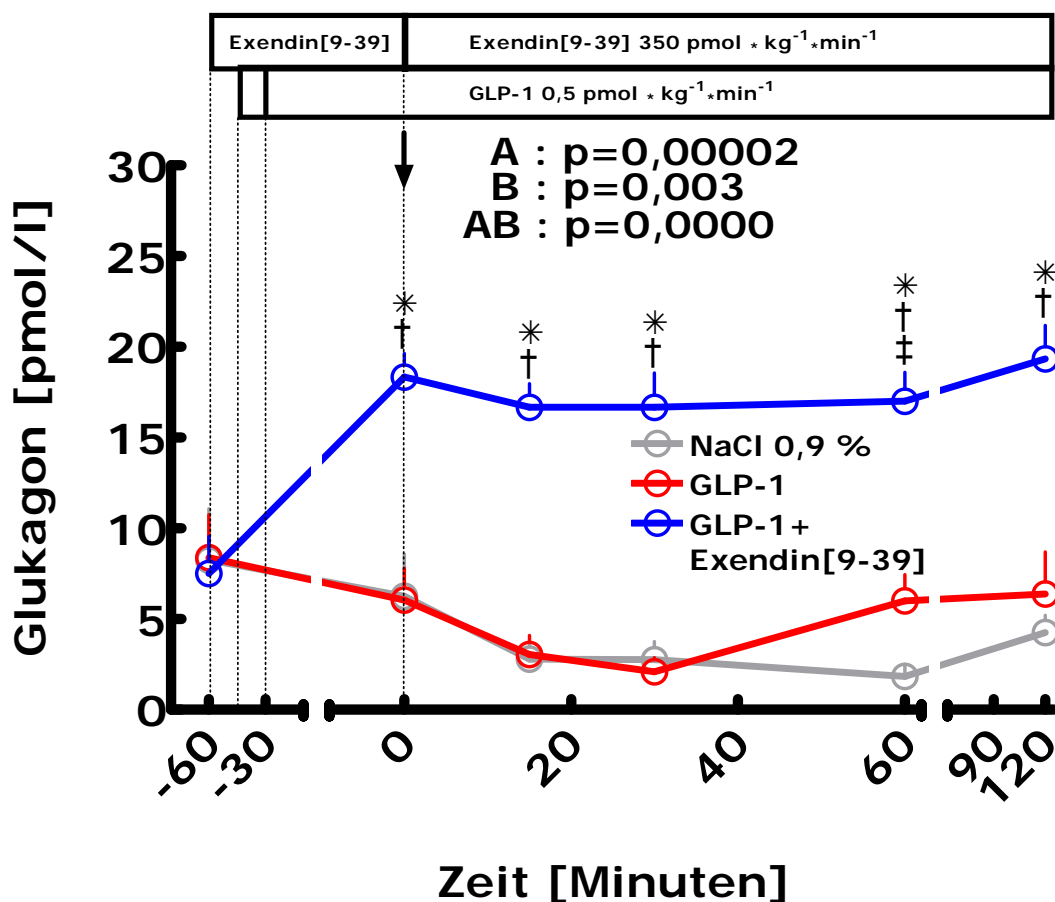


Abb. 24: Glukagon-Konzentrationen vor und nach intravenöser Glukosegabe (\downarrow) unter NaCl 0,9 %-Infusion (graue Kreise), isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion (rote Kreise) und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]-Infusion (blaue Kreise). ‡ : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. * : $p < 0,05$ isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39]. † : $p < 0,05$ NaCl 0,9 %-Infusion vs. kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion + Exendin [9-39].

3.3 Vergleich Projekt A und Projekt B

Ein Vergleich zwischen den GLP-1 Intakt Konzentrationen erfolgt nicht, da dieser Parameter ausschließlich in Projekt B gemessen wurde.

3.3.1 GLP-1 Total-Konzentrationen in Projekt A und Projekt B

3.3.1.1 GLP-1 Total-Konzentrationen unter isolierter GLP-1-Infusion

An den Versuchstagen, an denen die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion isoliert gegeben wurde, zeigen sich deutliche Unterschiede bezüglich des zeitlichen Verlaufes im Aufbau von ausreichenden GLP-1-Plasmakonzentrationen. Im Projekt A zeigte sich zum Zeitpunkt 0 (Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe) eine geringere GLP-1-Konzentration als im Vergleich zu den basalen Konzentrationen vor Beginn der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion, obwohl die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bereits seit 30 Minuten intravenös verabreicht wurde. Fanden sich zu Beginn dieses Versuchstages (Versuchstag C) noch GLP-1-Konzentrationen von $6,3 \pm 1,7$ pmol/l lagen die Konzentrationen zum Zeitpunkt 0 bei $6,2 \pm 0,7$ pmol/l. Auch nach 60 minütiger GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion zeigte sich kein Konzentrationsanstieg. Es befanden sich die GLP-1-Konzentrationen auf dem Niveau des Versuchstages an dem NaCl 0,9 % infundiert wurde. Aufgrund des nicht existierenden supraphysiologischen GLP-1-Spiegels, lässt sich auch die fehlende Stimulation der Insulin-Sekretionsantwort auf die intravenöse Glukosegabe erklären. Als einzig plausible Erklärung für den fehlenden Anstieg erscheint ein Verlust des Peptids durch Bindungsprozesse an den Kunststoffoberflächen der Infusionssysteme.

Im Gegensatz dazu ließen sich im Projekt B unter Zugabe von Albumin zu der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bereits nach 15 Minuten Infusionsdauer starke GLP-1-Konzentrationsanstiege bestimmen. An den Versuchstagen C' wurde 45 Minuten vor intravenöser Glukosegabe die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion begonnen. Schon nach 15 Minuten lag die GLP-1 Total-Konzentration bei $83,0 \pm 29,3$ pmol/l. Auch wenn die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion im Projekt B mit höherer Dosierung ($1,0 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) begonnen wurde, scheint das nicht ausreichend als plausible Erklärung für den eklatanten Unterschied zwischen den GLP-1 Total-Konzentrationen unter den isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen. Vielmehr scheinen durch die Zugabe von Albumin zur Infusionslösung im Projekt B die Kunststoffoberflächen des Infusionssystems

abgesättigt zu sein, so dass weniger GLP-1 im Infusionssystem verloren geht. Daher können durch GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen mit Zugabe von Albumin schneller, zuverlässiger und berechenbarer GLP-1-Konzentrationsanstiege erzielt werden.

Nach 15 Minuten wurde im Projekt B die Dosierung der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion auf des Niveau von Projekt A ($0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) reduziert. Daraus resultierend sank die GLP-1 Total-Konzentration zu Zeitpunkt 0 auf $52,7 \pm 13,7 \text{ pmol/l}$ und hielt sich in diesem Bereich stabil bis zum Ende des Versuchstages. Somit lag im Projekt B eine ausreichende supraphysiologische GLP-1 Total-Konzentration zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe vor und es konnte so eine suffiziente Stimulation der Insulin-Sekretion provoziert werde.

Im Projekt A zeigten sich erst nach 90-minütiger GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion langsam beginnende GLP-1 Total-Konzentrationsanstiege, welche dann auch im Versuchsablauf konsequent weiter anstiegen.

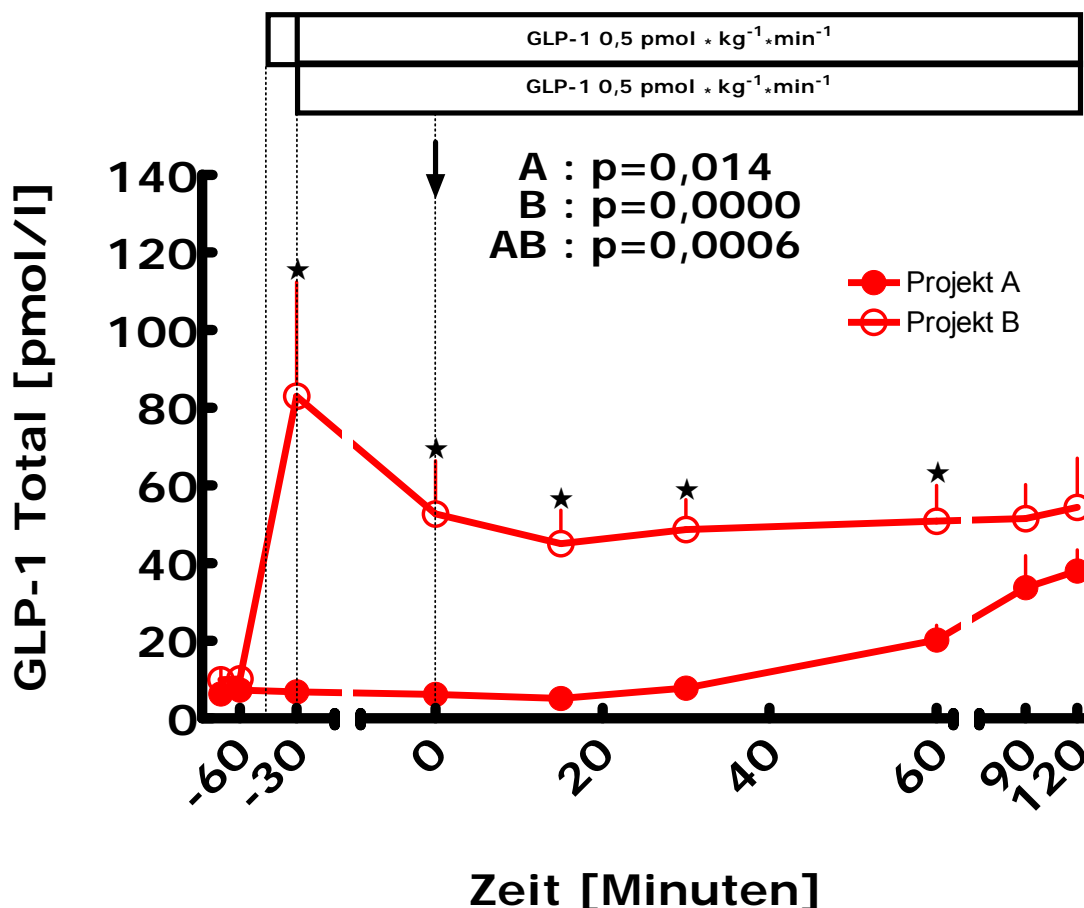


Abb. 25: GLP-1 Total-Konzentrationen unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion in Projekt A (ohne Zusatz von Albumin)[geschlossene, rote Kreise] und Projekt B (mit Zusatz von Albumin)[offene, rote Kreise]. \star : $p < 0,05$ Projekt A vs. Projekt B. Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe (\downarrow).

3.3.1.2 GLP-1 Total-Konzentrationen unter kombinierter GLP-1- und Exendin [9-39]-Infusion

Auch an den Versuchstagen der kombinierten Infusionen von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] fanden sich offensichtliche Differenzen bezüglich des zeitlichen Ablaufes der Konzentrationsanstiege von GLP-1 Total.

In Projekt A fanden sich nach 30-minütiger GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion zum Zeitpunkt 0 ein unzureichender Anstieg der GLP-1 Total-Konzentrationen. Zu diesem Zeitpunkt lagen die Konzentrationsspiegel bei $8,6 \pm 1,3$ pmol/l und somit unterhalb eines Konzentrationsbereiches, der wirkungsvoll eine Stimulation der Insulin-Sekretionsantwort bedingen könnte. Im Gegensatz zur isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion fand sich am Versuchstag D unter kombinierter Infusionstherapie mit Exendin [9-39] im Projekt A jedoch ein deutlich früherer Beginn des GLP-1-Konzentrationsanstiegs. Es fanden sich nach 45-minütiger kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] eine GLP-1 Total-Konzentration von $23,7 \pm 10,3$ pmol/l. Unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion fanden sich Anstiege erst nach 90-minütiger Infusion. Im weiteren Verlauf stiegen die GLP-1-Spiegel kontinuierlich weiter an, um am Ende in vergleichbaren Regionen wie in Projekt B zu verweilen. Es scheint somit durch Kombination zweier Peptidinfusionen zu einem geringeren GLP-1-Verlust im Infusionssystem zu kommen, da das zweite Peptid ebenfalls zur Absättigung der Kunststoffoberflächen beiträgt. Jedoch kam es auch unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] in Projekt A zu einem unkontrollierten nicht berechenbaren GLP-1 Total-Konzentrationsaufbau. Insbesondere gelang es in Projekt A auch unter kombinierter Infusion nicht zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe einen supraphysiologischen GLP-1 Total-Spiegel aufzubauen, um die erste Phase der Insulin-Sekretionsantwort zu stimulieren. Aus diesem Grund ließ sich in Projekt A die Wirksamkeit des GLP-1-Antagonisten Exendin [9-39] nicht dokumentieren und zeigen.

Im Projekt B hingegen fanden sich unter Zugabe von Albumin sowohl zu der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion als auch zu der Exendin [9-39]-Infusion und unter etwas höherer GLP-1 [7-36-Amid]-Dosierung über 15 Minuten schon nach 15-minütiger GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion deutlich supraphysiologische GLP-1 Total-Konzentrationen mit $137,5 \pm 25,2$ pmol/l. Nach Dosisreduktion fanden sich zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe suffiziente Konzentrationen von $60,7 \pm 4,9$ pmol/l. Somit fanden sich im Projekt B Konzentrationen, die die erste Phase der Insulin-Sekretionsantwort nach

Glukosegabe stimuliert haben, sodass ein Nachweis der Wirksamkeit des GLP-1-Antagonisten möglich war. Unter der kombinierten Infusion fanden sich in Projekt B tendentiell höhere GLP-1 Total-Konzentrationen, was ggf. Ausdruck einer zusätzlich stabilisierenden Funktion des zweiten Peptids im Infusionssystem sein könnte.

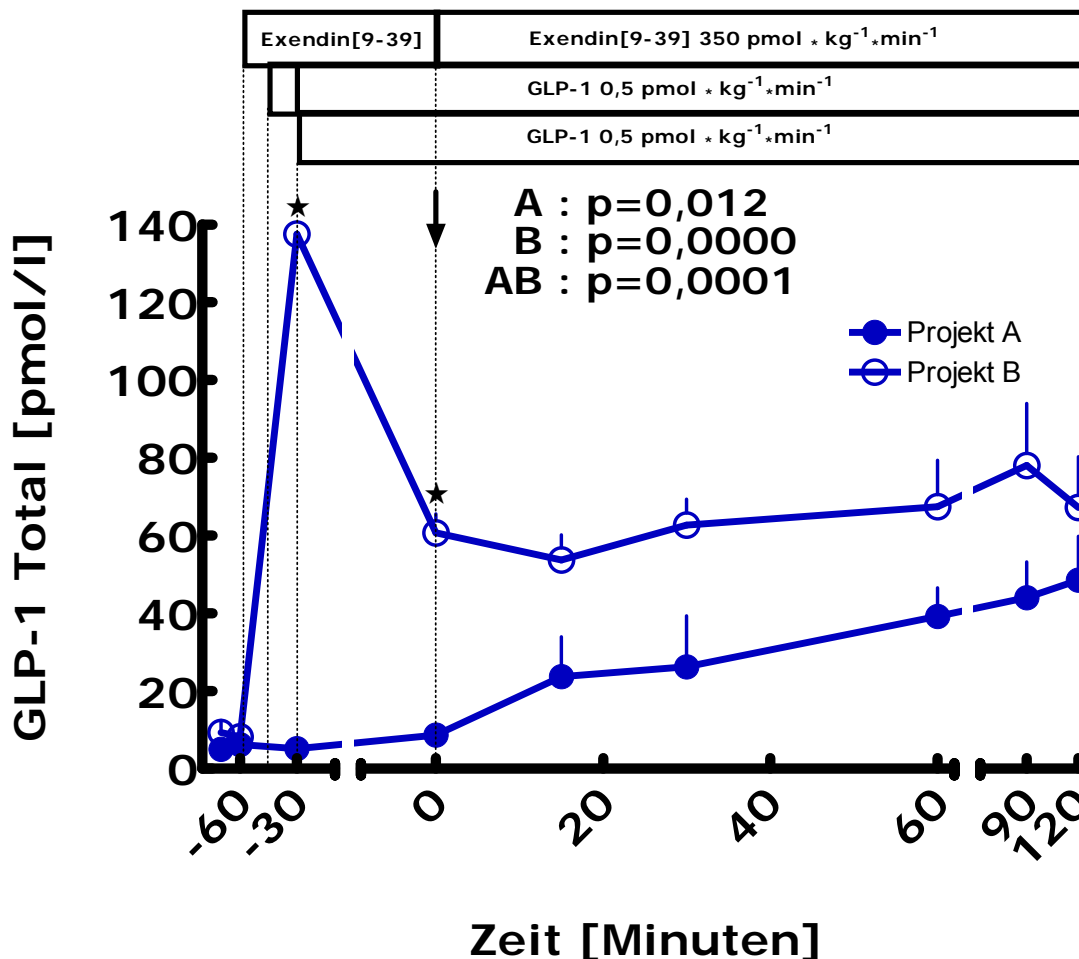


Abb. 26: GLP-1 Total-Konzentrationen unter kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion in Projekt A (ohne Zusatz von Albumin) [geschlossene, blaue Kreise] und Projekt B (mit Zusatz von Albumin) [offene, blaue Kreise]. ★ : p < 0,05 Projekt A vs. Projekt B. Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe (↓).

3.3.2 Vergleich der integrierten Anstiege über Basalwerte der Insulin-Sekretionsraten bei den einzelnen Probanden in Projekt A und Projekt B

3.3.2.1 Integrierte Anstiege über Basalwerte der Insulin-Sekretionsraten bei den einzelnen Probanden in Projekt A

In Projekt A fand sich bei allen Probanden unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion eine unzureichende Erhöhung der Insulin-Sekretionsrate. Ursächlich dafür waren die zuvor beschriebenen unzureichenden Konzentrationen von GLP-1 zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe. Das Ziel des gesamten Versuchsaufbaues konnte somit nicht erreicht werden. Die dennoch bestehenden, nicht signifikanten Variationen der integrierten Anstiege über Basalwerte der Insulin-Sekretionsrate unterlagen in Projekt A vorrangig den physiologischen Schwankungen. Als Reaktion darauf erschienen die Ausmaße der Hemmung durch den GLP-1-Antagonisten Exendin [9-39] teils überproportional groß mit bis zu > 500%. Im Gegensatz dazu imponierten auch Probanden, bei denen gar keine Hemmung gelang bzw. nur sehr geringgradige Hemmung möglich war. Insgesamt lässt sich aber festhalten, dass diese Ergebnisse letztendlich, aufgrund der fehlenden bzw. unzureichenden Stimulation durch die nicht existenten GLP-1-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Glukosegabe nicht auswertbar waren. Vermutlich war ein zu hoher Verlust von GLP-1 im Infusionssystem verantwortlich für das Scheitern des Versuchsaufbaus.

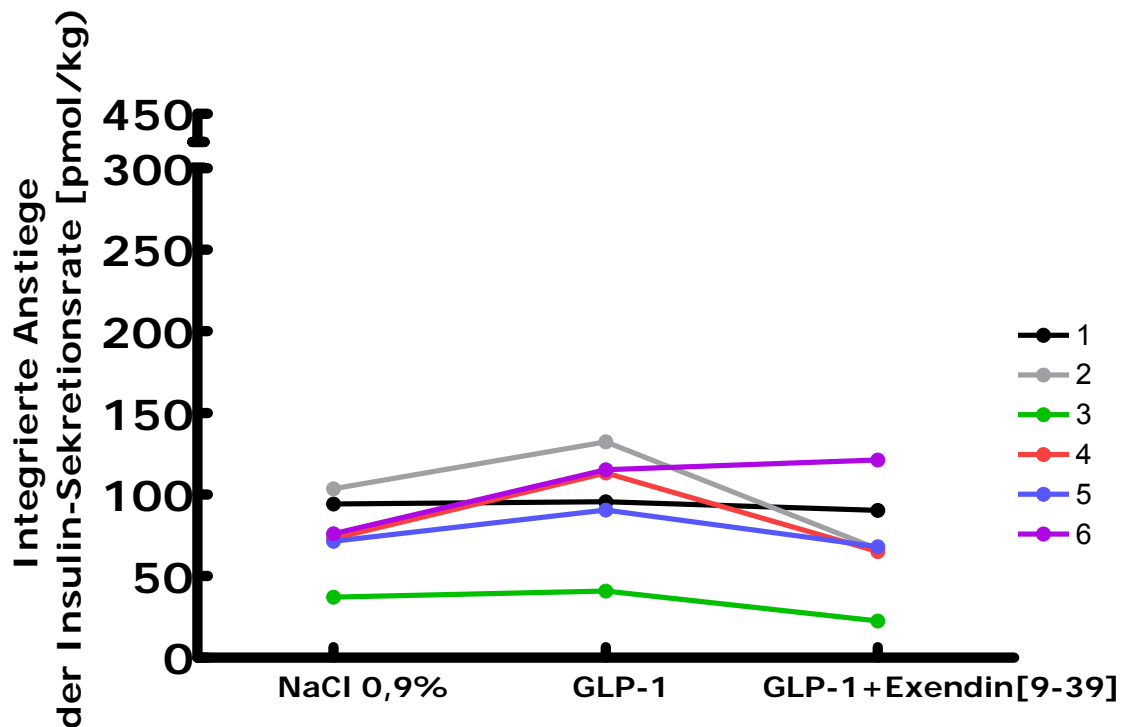


Abb. 27: Individuelle integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsraten der einzelnen Probanden (1 bis 6) in Projekt A (ohne Zusatz von Albumin) an den einzelnen Versuchstagen.

3.3.2.2 Integrierte Anstiege über Basalwerte der Insulin-Sekretionsraten bei den einzelnen Probanden in Projekt B

In Projekt B fanden sich unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion deutlich höhere integrierte Anstiege über Basalwerte der Insulin-Sekretionsrate als unter alleiniger NaCl 0,9 %-Infusion. Ursächlich dafür waren die suffizienten GLP-1-Konzentrationen zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe durch die stabile und zuverlässige Zufuhr des exogenen GLP-1 unter Zugabe von Albumin ins Infusionssystem. Als Folge daraus konnte im weiteren Versuchsaufbau auch die Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] dokumentiert und nachgewiesen werden. Lediglich bei einem der Probanden (Proband 10) ließ sich zwar eine regelrechte Stimulation der insulinsekretorischen Antwort unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion erzielen, aber unter kombinierter Infusion eine nur unzureichende Hemmung durch Exendin [9-39] erzielen. Eine ineffektive Exendin [9-39]-Konzentration scheidet als Ursache aus, da bei dem Probanden die gemessenen Exendin [9-39]-Konzentrationen tendenziell sogar

höher lagen als im Mittelwert der gesamten Probanden in Projekt B. Hier bleiben die ermittelten Parameter und Werte eine Erklärung schuldig. Vielleicht gibt es Individuen, bei denen der hemmende Effekt von Exendin [9-39] auf GLP-1-vermittelte Effekte niedriger ausfällt als bei anderen. Bei dem zuvor beschriebenen Probanden war jedoch der hemmende Effekt des Exendin [9-39] auf den inhibitorischen Effekt des GLP-1 auf die Glukagon-Sekretion ebenfalls nachzuweisen, da auch dieser Proband unter Exendin [9-39] Einfluss einen Glukagon-Konzentrationsanstieg zeigte.

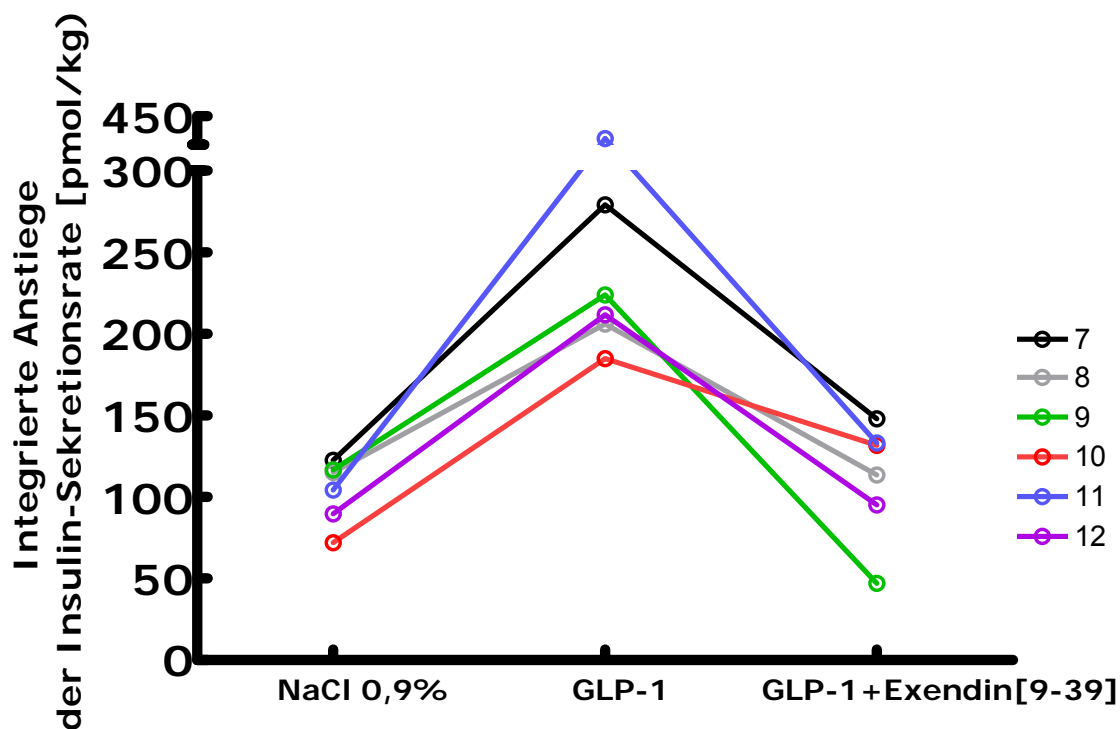


Abb. 28: Individuelle integrierte Anstiege über Basalwerte („AUC“) der Insulin-Sekretionsraten der einzelnen Probanden (7 bis 12) in Projekt B (mit Zusatz von Albumin) an den einzelnen Versuchstagen.

3.3.3 Vergleich der individuellen prozentualen Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39]

3.3.3.1 Individuelle prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulinsekretion unter isolierter GLP-1-Infusion und individuelle prozentuale Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] in Projekt A

In Projekt A konnte dieser Parameter nur ohne konkrete Aussagekraft berechnet werden, da aufgrund der vorbeschriebenen Probleme eine nur unzureichende oder gar vollkommen ausbleibende Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion erzielt werden konnte. Somit war es auch nicht möglich, eine suffiziente Hemmung durch Exendin [9-39] zu dokumentieren. Stattdessen kommt es aufgrund dieser Tatsache und normalen physiologischen Schwankungen zu völlig verfälschten, nicht zu verwendenden Werten. Diese sollen der Vollständigkeit halber angeführt und gezeigt werden. Die berechneten Stimulationswerte lagen minimal bei 1,5% und maximal bei 54,9%. Der Mittelwert betrug 28%. Es wurden prozentuale Hemmungen durch Exendin [9-39] zwischen 507% und -15% berechnet. Im Mittel 218%.

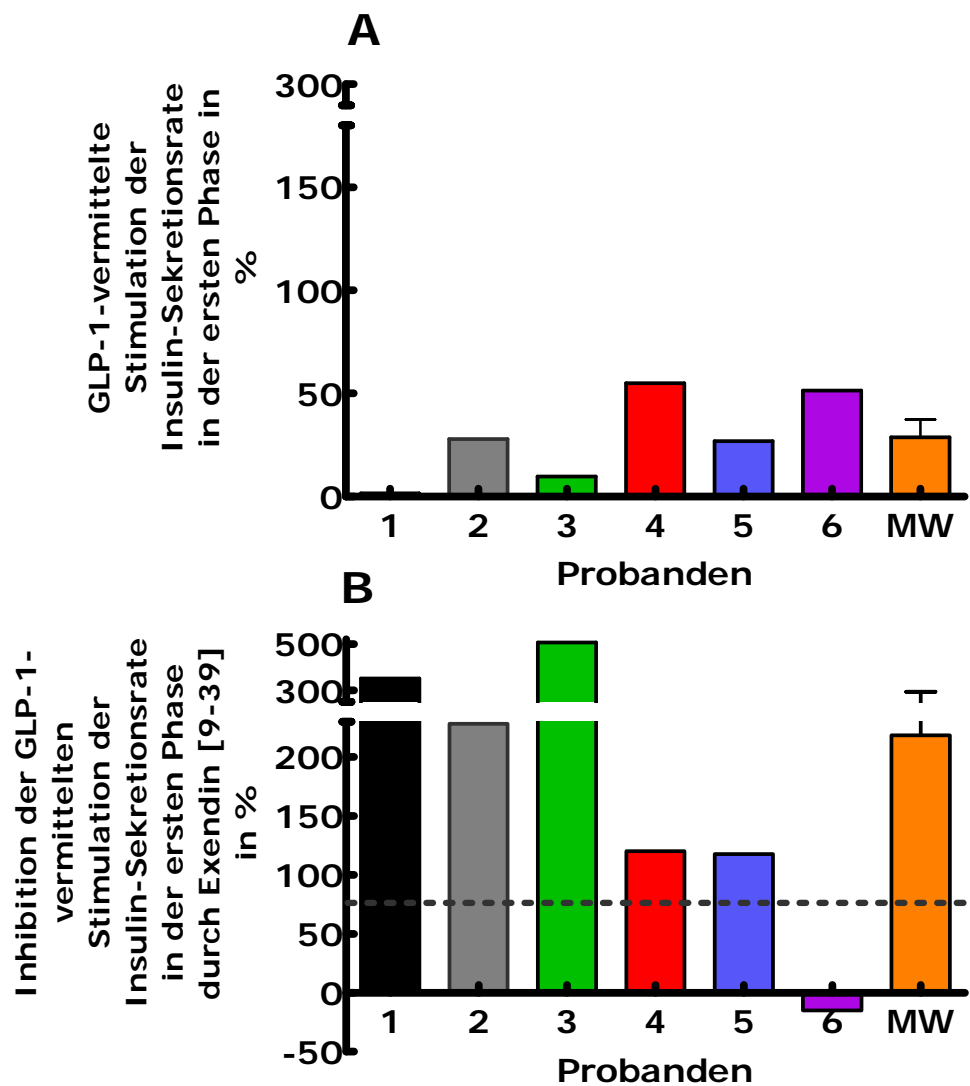


Abb 29: Individuelle, prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1[7-36-Amid]-Infusion (A) und die individuelle, prozentuale Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] (B) nach intravenöser Glukosestimulation bei den einzelnen Probanden (1 bis 6) in Projekt A. Die geforderte minimale Hemmung von 75% ist gestrichelt dargestellt.

3.3.3.2 Individuelle prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulinsekretion unter isolierter GLP-1-Infusion und individuelle prozentuale Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] in Projekt B

In Projekt B konnte bei guter Steigerung der Insulin-Sekretionsraten unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion nach intravenöser Glukosegabe im Vergleich zu NaCl 0,9 %-Infusion im weiteren Verlauf auch eine suffiziente Wirkung des GLP-1-Antagonisten Exendin [9-39] nachgewiesen werden. Dabei wurde die zuvor als Zielmarke definierte 75%-ige Hemmung der GLP-1-vermittelten insulinotropen Wirkung bei 5 der 6 Probanden auch zuverlässig erreicht. Wie bereits erwähnt, gelang das bei einem der Probanden (Proband 10) nicht. Hier fand sich rechnerisch lediglich eine Hemmung von 39%. Eine offensichtliche und plausible Erklärung fand sich auf der Basis der weiteren zur Verfügung stehenden Parameter nicht. Es scheint aber insgesamt eine hohe interindividuelle Bandbreite sowohl der Stimulationsfähigkeit der insulinotropen Effekte durch GLP-1 als auch bezüglich der Antagonisierbarkeit der GLP-1-vermittelten Effekte zu geben. Insgesamt lassen die gewonnenen Daten aber die Aussage zu, dass Exendin [9-39] in diesem Fall zuverlässig die GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekte antagonisiert, wenn auch in teils variabler Quantität.

Die berechneten Stimulationseffekte durch die isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion lagen zwischen 63% bis 275% und der Mittelwert betrug 130%. Die berechneten inhibitorischen Effekte durch Exendin [9-39] betrugen 39% bis 183% und der Mittelwert lag bei 98%.

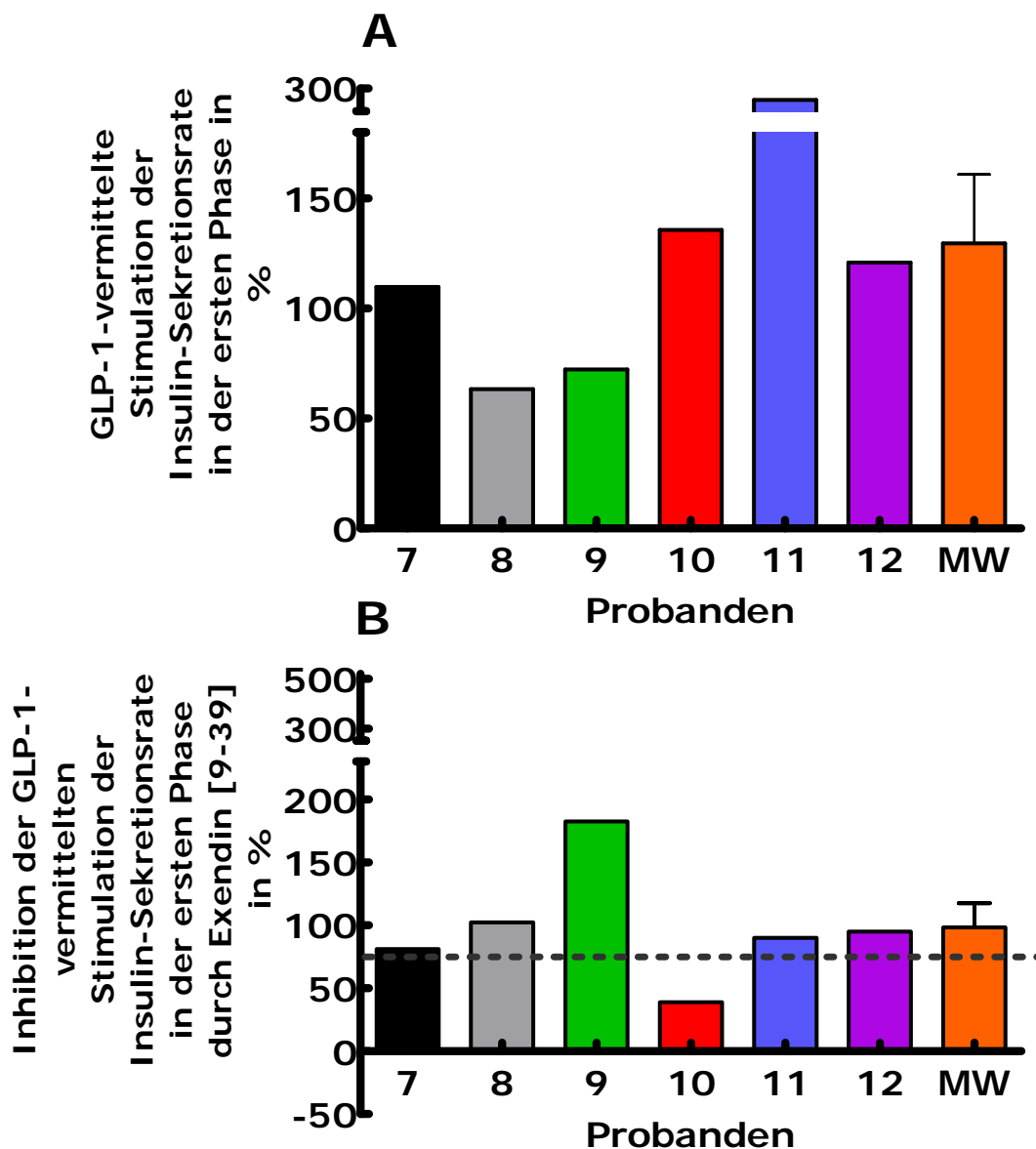


Abb 30: Individuelle, prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulin-Sekretion unter isolierter GLP-1[7-36-Amid]-Infusion (A) und die individuelle, prozentuale Hemmung der GLP-1-vermittelten Steigerung der insulinsekretorischen Antwort durch Exendin [9-39] (B) nach intravenöser Glukosestimulation bei den einzelnen Probanden (7 bis 12) in Projekt B. Die geforderte minimale Hemmung von 75% ist gestrichelt dargestellt.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass exogen zugeführtes GLP-1 in supra-physiologischer Dosierung einen ausgeprägten insulinotropen Effekt während einer iatrogen provozierte Hyperglykämie hat (Projekt B), dass Exendin [9-39] ein potenter GLP-1-Antagonist ist, der die insulinotropen Wirkungen des GLP-1 aufheben kann (Projekt B) und dass eine Zugabe von Albumin zu intravenösen GLP-1-Infusionen erforderlich ist, um einen vorhersagbaren und ausreichenden GLP-1-Spiegel im Blut aufbauen zu können (Vergleich Projekt A und Projekt B).

4.1 Diskussion des Vergleiches Projekt A und Projekt B

In Projekt A erfolgte die Vorbereitung und Gabe der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion ohne den Zusatz von Albumin. In Projekt B ist die Vorbereitung und Gabe der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion als 1%-ige Albuminlösung durchgeführt worden. Nur die Verwendung von albuminhaltiger GLP-1-Lösung war in der Lage, ausreichend hohe GLP-1-Konzentrationen im Blut der Patienten aufzubauen, um so eine GLP-1-vermittelte Wirkungen auszulösen. In Projekt A (ohne Albumin) wurden bei den Probanden GLP-1 Total-Konzentrationen zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion von $6,2 \pm 0,7$ pmol/l gemessen. Am Tag der NaCl 0,9 %-Infusion bestimmten wir zu diesem Zeitpunkt GLP-1 Total-Konzentrationen von $4,5 \pm 1,2$ pmol/l. Die Konzentration lag demnach trotz 30-minütiger GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion auf dem Niveau der Placebo Infusion. Unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] fanden sich zu dem Zeitpunkt GLP-1 Total-Konzentrationen von $8,6 \pm 1,4$ pmol/l. Diese waren zwar signifikant höher als unter der Placebo Infusion, lagen aber insgesamt deutlich unter den aus Voruntersuchungen zu erwartenden Werten bei einer GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit einer Dosierung von $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Unter dieser Dosierung konnten andere Arbeitsgruppen Konzentrationen zwischen 30 – 48 pmol/l nach 30-minütiger GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion erreichen [Edwards et al. (1999), Quddusi et al. (2003)]. Die GLP-1 Total-Konzentration blieb in dem Versuchsaufbau ohne Albuminzusatz in der Infusionslösung bis 60 Minuten nach isoliertem GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionsbeginn auf dem Niveau der NaCl 0,9 %-

Infusion. Erst nach 90 Minuten Infusionsdauer lagen die GLP-1 Total-Konzentrationen signifikant über den Werten der Placebo-Infusion.

Die kombinierte Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] ohne Zusatz von Albumin (Projekt A) konnte zwar bereits nach 30 Minuten eine signifikant höhere GLP-1 Total-Konzentration aufbauen als unter der Placebo Infusion, allerdings lagen auch diese Konzentrationen mit $8,6 \pm 1,4$ pmol/l unterhalb der zu erwartenden Werte. Über den gesamten Versuchsverlauf waren unter der kombinierten Infusion tendenziell höhere GLP-1 Total-Konzentration zu beobachten, ohne schnell ein Signifikanzniveau gegenüber der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion oder der NaCl 0,9 %-Infusion zu erreichen. Auch hier fanden sich erst nach 90-minütiger kombinierter Infusion signifikant höhere GLP-1 Total-Konzentrationen gegenüber der Placebo Infusionen. Dieser Trend des schnelleren, wenn auch erst spät signifikanten GLP-1 Total-Konzentrationsaufbaus lässt die Vermutung zu, dass es unter der kombinierten Gabe zu einem rascheren Absättigen der Kunststoffoberflächen im Infusionssystem durch beide Peptide (GLP-1 und Exendin [9-39]) kommt und daher mehr GLP-1 aus dem Infusionssystem in den Probandenkreislauf gelangen kann. Insgesamt ist davon auszugehen, dass es ohne Albuminzusatz nicht gelang, einen ausreichenden GLP-1 Total-Spiegel in den Probanden zu erreichen, da das Peptid GLP-1 [7-36-Amid] durch Bindungsverluste an den Kunststoffoberflächen des Infusionssystems in zu hohem Maße verloren ging. Leider liegen keine vergleichenden Messungen bezüglich der GLP-1 [7-36-Amid]-Konzentrationen prä- und postinfusionem aus der Perfusorspritze und dem Schlauchsystem vor, um diese Hypothese zu verifizieren. Grundlage dieser Vermutung ist daher der Vergleich mit den Ergebnissen und den erreichten GLP-1 Total-Konzentrationen aus Projekt B.

In Projekt B sind die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen während der Zubereitung und der Gabe als 1%-ige Albuminlösung appliziert worden. Im Gegensatz zu Projekt A wurde darüber hinaus die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit einer initialen Dosierung von $1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ gegeben und 15 Minuten früher begonnen, um zum Zeitpunkt der Glukosegabe mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit einen wirksamen GLP-1 Total-Spiegel zu haben. 30 Minuten vor der intravenösen Glukosegabe wurde dann wieder auf $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ reduziert. Unter diesem Versuchsaufbau konnten nach 15-minütiger Infusion mit $1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ supraphysiologische GLP-1 Total-Konzentrationen gemessen werden und auch nach Reduktion der Dosierung auf 0,5

$\text{pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ stellte sich ein Steady State auf supraphysiologischen Niveau ein. Somit entsprachen die GLP-1 Total-Konzentrationen den zu erwartenden Konzentrationen, welche unter ähnlichen Versuchsaufbauten erreicht werden konnten [Nauck et al. (1993c), Wettergren et al. (1997), Gutzwiller et al. (1999a), Little et al. (2006)]. Diese offensichtlichen Unterschiede bezüglich des Konzentrationsaufbaus der GLP-1 Total-Spiegel in Projekt A und Projekt B lassen die Vermutung zu, dass es ohne den Zusatz von humanen Serum-Albumin zu ausgeprägten Bindungsverlusten von GLP-1 [7-36-Amid] an den Kunststoffoberflächen des Infusionssystems kommt.

Da in beiden Projekten dieselben Infusionssysteme verwendet wurden und die Zubereitung der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion unter identischen Bedingungen erfolgte, können hier keine Erklärungsmöglichkeiten für die Unterschiede liegen. Zu bedenken sind mögliche Einflüsse in diesem Bereich, da das Ausmaß von Oberflächenphänomenen abhängig ist von der Proteinstruktur, der Feststoffoberfläche und den Umgebungsbedingungen [Horbett (1992), Gray (2004)].

In Projekt B wurde die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion 15 Minuten früher begonnen als in Projekt A. Doch in Anbetracht der Tatsache, dass es über einen Zeitraum von 90 Minuten in Projekt A unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion zu keinem nennenswerten GLP-1 Total-Konzentrationsanstieg kam, kann die zeitliche Komponente vernachlässigt werden. Als Erklärungsmöglichkeit für die Unterschiede bezüglich der erreichten GLP-1 Total-Konzentrationen ist die Dauer der Infusion daher nicht heranzuziehen.

Die GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion ist in Projekt B mit einer initialen Dosierung von $1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ appliziert worden und somit in einer doppelt so hohen Konzentration als in Projekt A. Damit erklärt sich aber lediglich ein höher zu erwartender GLP-1 Total-Spiegel und nicht ein überhaupt nachweisbarer GLP-1 Total-Konzentrationsanstieg. Bei intravenöser GLP-1 [7-36-Amid]-Gabe mit konstanter Rate stellt sich ein Steady State nach 10-15 Minuten ein. Bei Dosierung von $1,2 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ würde man Konzentrationen zwischen 70 – 120 pmol/l erwarten [Nauck et al. (1993a), Nauck et al. (1993c), Nauck et al. (2002)]. Auch bei niedrigeren Dosierungen konnten unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen rasche Steady State - Konzentrationen zwischen 20 - 50 pmol/l erreicht werden und in aller Regel 30 Minuten nach Infusionsbeginn suffiziente GLP-1 Total-Konzentrationen nachgewiesen werden [Edwards et al. (1999), Quddusi et al. (2003), Little et al. (2006)]. Somit ist das eigentliche Auftreten eines

Konzentrationsanstieges unter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion vorrangig nicht dosisabhängig, die Höhe des Anstieges aber wohl.

Eine wesentliche Gemeinsamkeit verbindet die Ergebnisse von Arbeitsgruppen, die erfolgreich mit GLP-1-Infusionen arbeiten und denen es regelmäßige, ausreichende und gut vorhersagbare GLP-1-Konzentrationen aufzubauen. Sie alle sorgen auf verschiedene Art und Weisen dafür, dass es nicht zu Bindungsverlusten des GLP-1 im Infusionssystem kommt. Die Überwiegende Mehrheit verwendet zu diesem Anlass 0,5 bis 1%-ige Albuminlösung aus humanem Serum-Albumin zur Vorbereitung und Gabe der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen [Nauck et al (1993c), Gutzwiller et al. (1999a), Little et al. (2006)]. Andere gaben zu der GLP-1-Infusion Plasma aus den basalen Blutentnahmen des jeweiligen Probanden, um Bindungsverluste zu minimieren (Long et al. 1999). Bei diesem Ansatz muss auf die Möglichkeit geachtet werden, dass durch den frühen Kontakt des GLP-1 zu der im Plasma des Probanden befindlichen DPP - 4 eine Degradation des Peptids bereits im Infusionssystem stattfinden kann. Dies könnte dazu führen, dass unzureichende Konzentrationen an intakten, biologisch aktiven GLP-1 im Körper der Probanden vorhanden waren. Es könnte daher sein, dass manche Versuchsanordnungen mit dieser Methodik keine kontrollierten GLP-1-Konzentrationen garantieren konnten und die Ergebnisse möglicherweise nicht nachvollziehbar sind. Ein weiterer interessanter Ansatz Bindungsverlust an der Kunststoffoberfläche zu vermeiden, ist die Möglichkeit das Infusionssystem zweimalig zu befüllen. Im ersten Schritt wird es mit dem zu applizierenden Protein gefüllt und mit einer Einwirkzeit von 10 Minuten belassen. Anschließend wird das Infusionssystem geleert und eine zweite Befüllung mit dem zu applizierenden Protein erfolgt. Diese sicher nicht sehr ökonomische Variante wurde erfolgreich mit GIP angewendet (Holle 2008).

Es finden sich in der gängigen Literatur keine konkreten Erfahrungsberichte, in denen über ähnliche Erfahrung mit GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen ohne den Zusatz von Albumin oder vergleichbaren Substanzen zur Vermeidung von Bindungsverlusten berichtet wird. In der Gesamtheit der Ergebnisse und den in der Literatur verfügbaren Erfahrungen im Umgang mit intravenös appliziertem GLP-1 ist im Falle der vorliegenden Arbeit davon auszugehen, dass es in einer GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion ohne den Zusatz von humanem Serum-Albumin zu ausgeprägten Bindungsverlusten an den Kunststoffoberflächen im Infusionssystem kommt und daher keine ausreichenden

GLP-1 Total-Konzentrationen aufgebaut werden können. Daher sollten bei intravenösen GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen Vorkehrungen getroffen werden, um derartige Bindungsverluste zu vermeiden. Dieses Phänomen lässt sich durch die Zugabe von Albumin in das Infusionssystem sicher vermeiden.

Um einen sicheren Beweis der geäußerten Vermutung zu führen, müssten vergleichende Konzentrationsbestimmungen in einem Infusionssystem mit GLP-1 [7-36-Amid] mit und ohne Zugabe von humanen Serum-Albumin durchgeführt werden. Dabei müssten prä- und postinfusionem die GLP-1-Konzentration in der Spritze, an verschiedenen Stellen des Schlauchsystems und im Probanden bestimmt werden und miteinander verglichen werden. Zusätzlich wäre der Einsatz unterschiedlicher Infusionssysteme mit variablen Kunststoffoberflächen zu erwägen, um weitere Erkenntnisse zu gewinnen.

4.2 Diskussion der GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekte und der Wirkung des Exendin [9-39] (Projekt B)

Exendin [9-39] wurde als Tool etabliert, um Wirkungen von endogenen GLP-1 zu identifizieren. In dieser Arbeit sollte demonstriert werden, dass Exendin [9-39] die Wirkungen von exogen zugeführten GLP-1 [7-36-Amid] antagonisieren kann als indirekten Nachweis dafür, dass Exendin [9-39] auch endogene GLP-1-Wirkungen antagonisieren kann.

Zu diesem Anlass wählten wir bewusst GLP-1-Dosen, die einen supraphysiologischen GLP-1-Spiegel erwarten ließen. Unter dem Versuchsaufbau in Projekt B konnten schnell supraphysiologische GLP-1-Konzentrationen durch die mit Albumin angefertigte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen aufgebaut werden. Nach 15 Minuten Infusionsdauer ließen sich unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit einer Dosis von $1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ GLP-1 Total-Konzentrationen von $83,0 \pm 29,4 \text{ pmol/l}$ und bei kombinierter Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] eine Konzentration von $137,5 \pm 25,2 \text{ pmol/l}$ messen. Beide Konzentrationen liegen deutlich oberhalb der zu erwartenden physiologischen Konzentrationen im postprandialen Zustand [Ørskov et al. (1994), Ahrén et al. (1997), Toft-Nielsen et al. (2001), Vilsbøll et al. (2001), Vollmer et al. (2008)]. Auch nach Reduktion der exogen zugeführten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion auf $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ lagen die gemessenen Konzentrationen an beiden

Versuchstagen auf einem supraphysiologischen Konzentrationsniveau. Unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion fanden sich Konzentrationen zwischen $52,7 \pm 13,7$ pmol/l zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe und $54,3 \pm 12,7$ pmol/l am Ende des Versuches. Unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] fanden sich Konzentrationen von $60,7 \pm 4,8$ pmol/l zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe und $67,2 \pm 13,1$ pmol/l am Ende des Versuches. Somit war ein maximaler inulinotroper Stimulus durch die künstlich aufgebauten supraphysiologische GLP-1-Konzentrationen an beiden Versuchstagen gegeben, welcher durch Exendin [9-39] exemplarisch gehemmt werden konnte.

In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass exogen aufgebaute GLP-1-Konzentrationen von 25 – 60 pmol/l einen ausgeprägten insulinotropen Effekt haben [Nauck et al. (1993b), Schirra et al. (1998b)]. Um einen GLP-1-vermittelte Verzögerung der Magenentleerungszeiten zu demonstrieren, waren in vorhergehenden Arbeiten GLP-1-Konzentrationen von 25 – 70 pmol/l erforderlich [Willms et al. (1996), Little et al. (2006)]. Unter GLP-1-Konzentrationen zwischen 12,5 – 150 pmol/l konnten Einflüsse des GLP-1 auf das Ausmaß der Nahrungsaufnahme und auf ein schnelleres Sättigungsgefühl nachgewiesen werden [Gutzweiler et al. (1999a), Gutzweiler et al. (1999b)]. GLP-1-Konzentrationen von 13 pmol/l zeigten in Studien bei einer exogenen GLP-1-Gabe mit einer Dosierung von $0,3 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ einen Glukagon-Konzentrations-senkenden Effekt additiv zum Hyperglykämie vermittelten Effekt (Schirra et al. 1998b). Somit können die in dieser Arbeit erzielten GLP-1-Konzentrationen (Projekt B) als hinreichend wirksam angenommen werden, um GLP-1-vermittelte Effekt im Organismus auszulösen und so die Wirksamkeit eines Antagonisten nachweisen zu können.

Es konnte eindrücklich gezeigt werden, dass die insulinsekretorische Antwort der ersten Phase der Insulin-Sekretion nach intravenöser Glukosegabe durch exogene GLP-1 [7-36-Amid]-Zufuhr deutlich gesteigert werden konnte. Die Insulin-Konzentrationen lagen ebenso wie die integrierten Anstiege über den Basalwerten für Insulin während der ersten Phase der Insulin-Sekretion deutlich über den Insulin-Konzentrationen unter den Placebo Infusionen. Die Insulin-Sekretion ließ sich im Vergleich zu Placebo im Mittel um 130% steigern. Diese Ergebnisse bestätigen vorhergehende Arbeiten [Nauck et al. (1993a), Nauck et al. (1993b), Quddusi et al. (2003), Schirra et al. (1998b)]. Interessanterweise fand sich 15 Minuten nach Beginn

der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion unter der höheren Dosierung von $1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ trotz normoglykämischer Blutglukose-Werte ein signifikanter Anstieg der Insulin-Konzentration und der Insulin-Sekretionsrate, die in Ihrer Wirkung eine Absenkung der Blutglukose provozierten und die zu signifikanten Unterschieden im Vergleich der Blutglukose-Konzentrationen an Versuchstagen mit Placebo- und kombinierter Infusion führten. Der Effekt der gesteigerten Insulin-Sekretion durch die isolierte GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion war vorübergehend und zum Zeitpunkt der Glukosegabe fanden sich keine Unterschiede mehr an den einzelnen Versuchstagen. Eine ähnlich Erfahrung machte auch eine Arbeitsgruppe, welche mit einer exogenen GLP-1-Infusion bei gesunden Probanden mit einer Konzentration von $0,45 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ arbeitete und dabei feststellte, dass es ebenfalls bei Normoglykämie zu einer Steigerung der Insulin-Konzentration von 118 pmol/l auf 210 pmol/l innerhalb von 40 Minuten kam und reaktiv die Blutglukose-Konzentrationen sanken. Im Anschluss normalisierten sich sowohl Insulin-Konzentrationen als auch Blutglukose-Konzentrationen wieder (Quddusi et al. 2003). Es ist bekannt, dass bei einer hyperglykämischen Stoffwechsellage wie z.B. bei schlecht kontrolliertem Typ-2 Diabetes mellitus die kontinuierliche exogene GLP-1-Zufuhr zu einer Steigerung der Insulin-Konzentrationen führt, bis eine Normalisierung der Blutglukose-Konzentrationen erreicht ist (Nauck et al. 1993c). In diesem Fall lag die mittlere Blutglukose-Konzentration jedoch bei $97 \pm 2 \text{ mg/dl}$ und somit im normoglykämischen Bereich. Da das GLP-1 die Insulin-Sekretion bis zu einem Blutglukose-Spiegel von 80 mg/dl steigern kann und erst ab dieser Schwelle den insulinsekretionstimulierenden Einfluss verliert, handelt es sich bei dieser Beobachtung am ehesten um einen Effekt, der durch den raschen GLP-1-Konzentrationsanstieg in Kombination mit einem Blutglukose-Wert $> 80 \text{ mg/dl}$ zu erklären ist (Nauck et al. 2002). Nachdem die Blutglukose-Konzentration zum Zeitpunkt der Glukosegabe unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion 80 mg/dl erreicht hatte, ließ sich auch keine erhöhte Insulin-Konzentration mehr nachweisen. Unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] fand sich dieser passagere Effekt der Erhöhung der Insulin-Konzentration und Insulin-Sekretionsrate nach Beginn der GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion nicht, obwohl die gemessenen GLP-1-Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt deutlich höher lagen, als am Tag der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. Dieses ist als Ausdruck einer potenten Antagonisierung dieses GLP-1-vermittelten Effektes durch die gleichzeitige Exendin [9-39]-Infusion zu werten.

Durch Exendin [9-39] konnte der insulinotrope Effekt des exogen zugeführten GLP-1 [7-36-Amid] auf die erste Phase der Insulin-Sekretion antagonisiert werden. Somit waren die Ergebnisse konform mit vorhergehenden Studien mit dem GLP-1-Antagonisten Exendin [9-39] [Schirra et al. (1998b), Edwards et al. (1999)]. Die erreichten Exendin [9-39] Konzentrationen im Blut lagen mit 148 ± 19 nmol/l zum Zeitpunkt 0 unter $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und einem Steady State unter $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ zwischen 166 ± 12 nmol/l und 176 ± 19 nmol/l im wirksamen Konzentrationsbereich. Die GLP-1 Total-Konzentrationen lagen zu diesem Zeitpunkt bei $52,7 \pm 13,7$ pmol/l (Versuchstag C') bzw. $60,7 \pm 4,9$ pmol/l (Versuchstag D'). Grob rechnerisch lag somit eine knapp 3000 - fach höherer Konzentration an Exendin [9-39] im Vergleich zur GLP-1 Total-Konzentration zum Zeitpunkt der Glukosegabe im Blut der Probanden vor. Schon aus *in vitro* Studien war bekannt, dass Exendin [9-39] in äquimolaren Konzentrationen GLP-1-vermittelte Effekte nicht antagonisieren kann. Eine 10 - fach erhöhte Konzentration reichte aber aus, um erste GLP-1-vermittelte Effekte anteilig zu antagonisieren. In derselben Untersuchung fand sich eine ausgesprochene Dosisabhängigkeit der antagonistischen Wirkung des Exendin [9-39] und es zeigte sich, dass bei 100 - facher Konzentrationserhöhung die GLP-1-vermittelte Wirkung auf die Inulinsekretion *in vitro* komplett antagonisiert werden konnte (Göke R. et al. 1993b). In anderen *in vitro* Affinitätsstudien zum GLP-1-Rezeptor fand sich eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für GLP-1 von 0,36 nM und 3,44 nM für Exendin [9-39]. Somit zeigte sich ein 10 - fach höhere Affinität des GLP-1 zum Rezeptor als die des Exendin [9-39], was erklären mag, dass mindestens eine 10 - fach höhere Exendin [9-39]-Konzentration anzustreben ist, um GLP-1-vermittelte Effekte anteilig antagonisieren zu können (Wang Z. et al. 1995). In derselben Arbeit konnte auch im Tiermodell nachgewiesen werden, dass die antagonisierende Wirkung des Exendin [9-39] dosisabhängig ist. So konnte ab einer 10 fach höheren Exendin [9-39]-Konzentration die GLP-1-vermittelte Steigerung der Insulin-Sekretion komplett aufgehoben werden. Aus humanen Vorstudien ist bekannt, dass eine gewählte Exendin [9-39]-Konzentration von $300 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ausreichend ist, um GLP-1-vermittelte insulinotrope Effekte einer exogenen GLP-1-Gabe mit einer Konzentration von $0,9 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ zu antagonisieren (Schirra et al. 1998b). Eine Dosis von $30 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Exendin [9-39] war bereits in der Lage, die GLP-1-vermittelte Hemmung der Glukagon-Sekretion zu antagonisieren (Schirra et al. 1998b). In der Summe der Betrachtungen erscheint somit

die von uns gewählte Dosierung für das Exendin [9-39] mehr als ausreichend, um eine sichere Antagonisierung der GLP-1-vermittelten Effekte zu erreichen.

Die Insulin- und die C-Peptid-Konzentrationen nach intravenöser Glukosegabe lagen unter der kombinierten GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion auf dem Niveau der Konzentrationen unter ausschließlicher Placebo Infusion. Während die integrierten Anstiege über Basalwerte für Insulin- und Insulin-Sekretionsrate unter der isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion mit $952 \pm 132 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und $234 \pm 40 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ signifikant höher lagen als unter Placebo Infusion mit $408 \pm 68 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und $103 \pm 13 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, fand sich unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der Placebo Infusion mit Werte von $419 \pm 82 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und $111 \pm 14 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Insgesamt gelang es, durch die Koinfusion des Exendin [9-39] im Mittel die GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekte um 98% zu inhibieren.

Die vor Studienbeginn definierte erforderliche Hemmung von 75% der insulinotropen GLP-1-vermittelten Effekte konnte nicht bei allen Probanden erreicht werden. Insgesamt zeichnete sich eine weite Streubreite des Ausmaßes der Inhibition durch Exendin [9-39] ab. So lag die prozentuale Hemmung zwischen 39% und 183%. Von besonderem Interesse ist hierbei der Proband, bei welchem lediglich eine Hemmung von 39% der GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekte gelang. Bei diesem Probanden fand sich eine unterhalb des Mittelwertes liegende GLP-1 Total-Konzentration von 36 pmol/l zum Zeitpunkt der Glukosegabe bei einer GLP-1 Total-Mittelwert-Konzentration zu diesem Zeitpunkt von $83 \pm 29 \text{ pmol/l}$. Dennoch konnte eine GLP-1-vermittelte Stimulation der Insulin-Sekretion nach intravenöser Glukosegabe von 135% im Vergleich zur Insulin-Sekretion unter Placebo Infusion bei diesem Probanden nachgewiesen werden. Das kann als Ausdruck einer suffizienten insulinotropen Wirkung der bestehenden GLP-1-Konzentrationen gewertet werden. Im Mittel konnte bei allen Probanden eine GLP-1-vermittelte Steigerung der Insulin-Sekretion von $129 \pm 31\%$ nachgewiesen werden. Als Ursache für die unzureichende Hemmung der insulinsekretionssteigernden Wirkung des GLP-1 durch das Exendin [9-39] bei diesem Probanden hätte auch eine unzureichende Exendin [9-39]-Konzentration in Frage kommen können. Es zeigte sich aber, dass zum Zeitpunkt der intravenösen Glukosegabe eine Exendin [9-39]-Konzentrationen von 204 nmol/l bestimmt wurden, wobei die mittlere Konzentration bei allen Probanden zu diesem Zeitpunkt bei 148 ± 19

nmol/l lag. Auch im weiteren Versuchsverlauf fanden sich bei dem Probanden eher höhere Exendin [9-39]-Konzentrationen als bei den übrigen Probanden, bei denen eine zuverlässige Hemmung der GLP-1-vermittelten insulinotropen Wirkungen von > 75% durch das Exendin [9-39] nachgewiesen werden konnten. Auch die erreichten maximalen Blutzucker-Konzentrationen unterschieden sich an den einzelnen Versuchstagen bei den Probanden mit Messungen zwischen 295 bis 319 mg/dl nicht signifikant als eventuell variabler Insulin-Sekretionsstimulus. Somit ist in der Gesamtschau der Parameter für die im Vergleich zu den anderen Probanden unzureichende Inhibition nicht plausibel zu erklären. In bisherigen Publikationen finden sich keine Hinweise auf eine hohe individuelle Schwankungsbreite der Ansprechbarkeit auf den GLP-1-Antagonisten Exendin [9-39], so dass es sich vermutlich bei diesem Probanden um Ausdruck einer hohen interindividuellen Variabilität des Ausmaßes der Hemmung GLP-1-vermittelter Effekte durch Exendin [9-39] handelt.

Bezüglich der Frage der GLP-1-spezifischen Antagonisierung des Exendin [9-39] gibt es verschiedene Untersuchungsergebnisse. In den frühen *in vitro* und *in vivo* Studien mit Exendin [9-39] wurden Erfahrungen gesammelt, die sich teils widersprachen. In Untersuchungen an isolierten humanen Pankreasinzellen zeigte sich, dass durch Zugabe von Exendin [9-39] die GLP-1-vermittelte Steigerung der Insulin-Freisetzung unter Wirkung einer Hyperglykämie im Medium komplett aufgehoben werden konnte. In derselben Arbeit zeigte sich dann unter Zugabe von GIP zu den Zellen in einem hyperglykämischen Medium unter gleichzeitiger Exendin [9-39] Zugabe keine Absenkung der Insulinfreisetzung. In diesem Fall fand sich kein Hinweis darauf, dass Exendin [9-39] die GIP-vermittelten Effekte beeinflusst (Edwards et al. 1999). In anderen Arbeiten hingegen gab es durchaus Hinweise, dass Exendin [9-39] nicht ausschließlich GLP-1-vermittelte Effekte antagonisiert. Bei Untersuchungen mit den Antagonisten Exendin [9-39] und dem spezifischen GIP-Antagonisten (Pro³)GIP-Antagonist fanden sich bei *in vitro* Untersuchungen an Hamsterzellen, dass Exendin [9-39] nicht nur die Insulin-Freisetzung unter GLP-1-Einfluss um 44% senken konnte, sondern auch die unter GIP-Einfluss um 57%. In derselben Versuchsanordnung zeigte sich bei (Pro³)GIP-Antagonistgabe als Ausdruck der Spezifität dieses Antagonisten keine Beeinflussung der GLP-1-vermittelten Effekte auf die Insulin-Konzentration. Eine kombinierte Gabe beider Antagonisten hatten keinen additiven Effekt (Gault et al. 2003). Sollte Exendin [9-39] tatsächlich einen antagonisierenden Effekt auf GIP-

vermittelte Effekte im menschlichen Körper haben, müssten Untersuchungen mit Exendin [9-39] bezüglich der Funktionen und Einflüsse auf den menschlichen Organismus durch GLP-1 kritisch betrachtet werden, da bei der Interpretation der Ergebnisse die GLP-1-Wirkungen überbewertet werden könnten. In der Gesamtheit finden sich aber überwiegend Hinweise, dass Exendin [9-39] vorrangig GLP-vermittelte Effekte antagonisiert. Es gab zwar bereits frühere Hinweise auf einen Einfluss von Exendin [9-39] auf GIP-vermittelte Effekte, aber die klinische Relevanz ist fraglich. So konnte im Tierversuch bei Ratten gezeigt werden, dass Exendin [9-39] die GIP-Rezeptorbindung um 39% senken konnte. Trotz dieser Tatsache fanden sich aber keine Hinweise darauf, dass dieses Phänomen einen Einfluss auf die GIP-vermittelten Effekte hatte (Wheeler et al. 1995). Exendin [9-39] bindet mit nur sehr geringer Affinität an den humanen GIP-Rezeptor [Gremlich et al. (1995), Volz et al. (1995)]. In weiteren in vivo Untersuchungen an Tieren gab es keine Hinweise darauf, dass Exendin [9-39] Einfluss auf GIP-vermittelte insulinotrope Wirkungen hat. So hatten Exendin [9-39]-Konzentrationen, die ausreichend den GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekt antagonisierten, keinen Einfluss auf den insulinotropen Effekt des GIP [Kolligs et al. (1995), Wang Z. et al. (1995)]. Eine wichtige Erkenntnis konnte aus einer Arbeit gezogen werden, die beschreibt, dass beim Menschen die Infusion von Exendin [9-39] mit einer Konzentration von 300 pmol/kg/min die insulinotropen Effekte von GLP-1 um 84% senken konnte, dabei aber keinen Einfluss auf die GIP-vermittelten insulinotropen Wirkungen einer GIP-Infusion hatte (Schirra et al. 1998b). Bei Studien an Cardiomyozyten von Mäusen zur Untersuchung von cardioprotectiven Effekten von GLP-1 [7-36] Amid und GLP-1 [9-36] zeigte sich, dass Effekte durch GLP-1 [9-36] ebenfalls durch Exendin [9-39] antagonisiert werden können. Diese Untersuchungen fanden an klassischen GLP-1-Rezeptor-Knock-out-Mäusen ($Glpr1^{-/-}$ Mäuse) statt, so dass es sich ausschließlich um GLP-1 [7-36] Amid unabhängige Effekte durch GLP-1 [9-36] handeln musste. Aus dieser Beobachtung heraus postulierten die Autoren den Verdacht, dass Exendin [9-39] auch ein Antagonist an einem noch unidentifizierten Rezeptor ist, welcher isolierte GLP [9-36] Wirkungen vermittelt (Ban et al. 2010).

Bezüglich der Glukohomöostase bei Menschen scheint Exendin [9-39] jedoch ein spezifischer GLP-1-Rezeptor Antagonist ohne jegliche agonistische Komponente zu sein. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

GLP-1, GLP-2 (Glucagon-like peptide 2) und Glukagon sind auf einem Gen codiert und entstammen der posttranslationalen Prozessierung des Proglukagon Moleküls. Somit liegt der Verdacht nahe, dass diese Hormone ähnliche Rezeptoren als Ziel haben und das Exendin [9-39] ggf. auch die Wirkungen des GLP-2 und des Glukagon beeinflusst (Bell 1986). GLP-2 ist im Gastrointestinaltrakt an der Steuerung der Motilität, der Nahrungsadsorption, der Epithelpermeabilität, der Zellproliferation und der Zellapoptose beteiligt (Drucker 2001). Die Rezeptoren für die oben genannten Hormone gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Klasse B. Innerhalb dieser Gruppe existieren Subgruppen der Glukagon-Rezeptor - Familie für Glukagon, GLP-1, GLP-2, GIP, Growth Hormone Releasing Hormone und Sekretin [Harmar (2001), Mayo et al. (2003), Harmar (2004), Foord et al. (2005)]. Es konnte nachgewiesen werden dass die jeweiligen Hormone mit einer Ausnahme mit hoher Affinität und Spezifität ohne jegliche Kreuzreaktivität an ihre jeweiligen Rezeptoren binden. Lediglich Glukagon bindet auch an GLP-1-Rezeptoren, jedoch mit einer 100 – bis 1000 - fach geringeren Affinität, so dass bei den physiologischen zu erwartenden Glukagon-Konzentrationen dieses Phänomen keine Auswirkungen hat [Thorens (1992), Fehmann et al. (1994)]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass am GLP-2 Rezeptor weder GLP-1 noch GIP oder Exendin-4 (GLP-1-Rezeptor-Agonist) einen agonistischen Effekt hatten (Munroe et al. 1999). Es ist daher nicht davon auszugehen, dass Exendin [9-39] antagonistische Effekte an den anderen Rezeptoren ausübt, auch wenn dies in der vorliegenden Arbeit nicht explizit untersucht wurde.

Der Anstieg der Glukagon-Konzentration unter der Exendin [9-39]-Infusion war in beiden Projekten unabhängig von der GLP-1-Konzentration und der zu dem Zeitpunkt gemessenen kapillären Blutglukose-Konzentrationen. Der erste gemessene Anstieg fand sich zum Zeitpunkt 0 vor der intravenösen Glukosegabe. Zu diesem Zeitpunkt liefen die Exendin [9-39]-Infusionen seit 60 Minuten mit einer Konzentration von $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Projekt A und B). Die kapillaren Blutglukose-Konzentrationen und die Insulin-Konzentrationen unterschieden sich zum Zeitpunkt 0 an den unterschiedlichen Versuchstagen nicht, so dass eine Glukagon-Sekretionshemmende Wirkung durch diese Parameter als Erklärung nicht in Frage kommt. Aus in vivo Experimenten ist bekannt, dass GLP-1 an gesunden Probanden die Glukagon-Sekretion hemmt [Kreyman et al. (1987), Elahi et al. (1994)]. Andererseits ergaben sich bei tierexperimentellen in vitro Studien Hinweise, dass GLP-1 an alpha – Zellen die

Ausschüttung von Glukagon stimulieren kann [Ding et al. (1997), Heller et al. (1997)]. Unbestritten ist, dass GLP-1 die Insulin-Sekretion steigern kann und dass Insulin in der Lage ist, die Glukagon-Sekretion potent zu hemmen (Maruyama H. et al. 1985b). Interessanterweise ist die Fähigkeit des GLP-1 bei C-Peptid negativen Typ-1 Diabetikern die Glukagon-Sekretion zu hemmen weiterhin nachweisbar (Creutzfeldt et al. 1996), so dass eine ausschließliche Hemmung der Glukagon-Sekretion durch Steigerung der Insulin-Konzentrationen durch das GLP-1 als Erklärung nicht ausreicht. Zumal in dieser Arbeit ein Effekt zu einem Glukagon-Anstieg geführt haben muss, der durch Hemmung eines GLP-1 vermittelten Prozesses unabhängig von der Insulinkonzentrationen auftrat. Es wird vermutete, dass GLP-1 die Glukagon-Sekretion indirekt über eine Steigerung der Somatostatin-Konzentration hemmt. GLP-1 vermittelt eine Stimulation der Somatostatin sezernierenden Zellen des Pankreas und über parakrine Interaktionen kommt es zu einer Hemmung der Glukagon-Sekretion [Ørskov et al. (1988), Fehmann 1995]]. Im weiteren zeigte sich in Studien, dass die Glukagon-Sekretion bereits durch basale GLP-1-Konzentrationen im Nüchternzustand gehemmt werden kann [Schirra et al. (1998b), Schirra et al. (2006)]. Durch die Aufhebung dieser GLP-1-vermittelten Mechanismen ist der Anstieg der Glukagon-Konzentration unter dem Einfluss des Exendin [9-39] zu sehen. Der hemmende Effekt des GLP-1 auf die Glukagon-Sekretion ist abhängig von der Glukose-Konzentration im Blut. Sinken die Glukose-Konzentrationen unter einen Schwellenwert, kann die Glukagon-Sekretion trotz GLP-1-Einflusses ansteigen, um den Blutzucker im Rahmen einer Gegenregulation anheben zu können (Nauck et al. 2002). Diesen Effekt sehen wir auch in der vorliegenden Arbeit in Projekt B am Tag der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion. An diesem Tag kommt es 50 Minuten nach der intravenösen Glukosegabe trotz supraphysiologischen GLP-1-Konzentrationen zu einem Anstieg der Glukagon-Konzentration als Reaktion auf die abgesunkenen Plasmaglukose-Konzentrationen.

Einschränkend muss bei der Interpretation der vorliegenden Daten berücksichtigt werden, dass nach neueren Untersuchungen der verwendete Assay zur Bestimmung der Glukagon-Konzentrationen eine Kreuzreaktivität von $< 0,01\%$ zu Exendin [9-39] aufweist. Dieses war zum Zeitpunkt der Untersuchung und Durchführung der laborchemischen Analysen noch nicht bekannt. Somit sind bei der Bestimmung der Glukagon-Konzentration falsch zu hoch gemessene Werte zu erwarten. Zur Einschätzung des Ausmaßes der Abweichung zur realen Konzentration ist ein

Korrekturfaktor berechnet worden. Bei Anwendung dieses Faktors konnte gezeigt werden, dass bei einer Exendin [9-39]-Konzentration von 200 nmol/l in dem verwendeten Glukagon-Assay eine Exendin [9-39]-Konzentration von 26,5 pmol/l bestimmt werden würde. Es ist somit denkbar, dass die bestimmten Konzentrationen des Glukagons nach Beginn der Exendin [9-39]-Infusion überwiegend Folge dieser Kreuzreaktivität sind und eher die Erhöhung der Exendin [9-39]-Konzentrationen wiedergeben. Leider lagen aus dieser Versuchreihe keine Plasmareserven vor, um Glukagon-Konzentrationen mit einem anderen Assay bestimmen zu lassen. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte auf den Einsatz dieses Assay zur Glukagon-Konzentrationsbestimmung verzichtet werden, um objektive Ergebnisse zu erhalten.

Die vorliegende Arbeit bietet somit keine neuen Erklärungsansätze für die GLP-1-vermittelte Hemmung der Glukagon-Sekretion, und Somatostatin-Spiegel wurden nicht bestimmt. Es konnten aber die Beobachtungen aus den vorhergehenden Studien bestätigt werden und gezeigt werden, dass durch Exendin [9-39] dieser GLP-1-vermittelte Effekt auf die Glukagon-Sekretion scheinbar suffizient antagonisiert werden konnte. Das kann als Hinweis gewertet werden, dass Exendin [9-39] neben der insulinotropen Wirkung auch weitere Wirkungen von endogenem GLP-1 hemmen kann.

Ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass Exendin [9-39] zuverlässig weitere endogene GLP-1-vermittelte Effekte antagonisiert, fand sich in jüngeren Studien. Es konnte gezeigt werden, dass auch die GLP-1-vermittelten, hemmenden Wirkungen auf die antroduodenale Motilität im Fasten- und im postprandialen Zustand durch Exendin [9-39] in einer Dosierung mit $300 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ antagonisiert wurden (Schirra et al. 2006).

Im Rahmen der Untersuchungen zur Wirkung von GLP-1 und dessen Metabolite am kardiovaskulären System wurde häufig die Vermutung geäußert, dass noch weitere Rezeptoren zur Vermittlung der GLP-1-Effekte existieren müssten. Es ist bekannt, dass GLP-1-Rezeptoren sowohl im menschlichen Herz als auch in zentralnervösen Regionen vorkommen, die die autonome kardiale Kontrolle beeinflussen. [Bullock et al. (1996), Yamamoto et al. (2002), Nakagawa et al. (2004), Nikolaidis et al. (2004a)]. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit weder unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion noch unter der kombinierten Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] Veränderungen an den Kreislaufparametern zu erkennen war so weisen doch Ergebnisse aus Voruntersuchungen darauf hin, dass GLP-1 einen Wirkeffekt im

kardiovaskulären System hat. Über welche Rezeptoren und in welchen Regionen die GLP-1-Wirkungen im kardiovaskulären System vermittelt werden, ist weiterhin im Fokus des Interesses. GLP-1-Rezeptoren konnten immunhistochemisch auch in Kardiomyozyten, in Endothelzellen der Koronarien und Gefäßen und in glatter Muskulatur nachgewiesen werden (Ban et al. 2008). Bei Ratten induziert eine intravenöse GLP-1-Gabe einen Anstieg des systolischen und diastolischen Blutdruckes und steigert die Herzfrequenz (Barragan et al. 1994). Denselben Effekt entdeckten weitere Arbeitsgruppen. Da der Anstieg des Blutdruckes nicht durch zentralnervös wirkende Antihypertensiva limitiert werden konnte, nahm man eine direkte Wirkung von GLP-1 an den GLP-1-Rezeptoren am Herzen und im Gefäßsystem an (Ahrén 2004). Andererseits fand sich sowohl bei intravenöser - peripherer Gabe, als auch bei rein zentraler Applikation von GLP-1 bei Ratten in beiden Fällen ein Anstieg des Blutdruckes und der Herzfrequenz, so dass eine ausschließliche direkte Wirkung am Herzen wieder unplausibel erscheint (Yamamoto et al. 2002). Neben den Einflüssen auf die Kreislaufparameter zeigten sich weitere Effekte von GLP-1 an geschädigten Herzen. In tierexperimentellen Studien zeigte sich bei Hunden mit induzierter dilatativer Kardiomyopathie nach GLP-1-Gabe eine verbesserte Ejektionsfraktion, ein geringerer linksventrikulärer enddiastolischer Druck, eine verbesserte Insulin-Sensitivität und eine erhöhte Glukose-Aufnahme in die Myozyten (Nikolaidis et al. 2004b). Beim Menschen mit Herzinsuffizienz zeigte sich unter GLP-1-Gabe ebenfalls eine Verbesserung der linksventrikulären Auswurfleistung und eine klinische Verbesserung, ohne dass Blutdruck oder Herzfrequenz beeinflusst worden wären. Dies wurde als Hinweis gewertet, dass GLP-1 noch andere Wirkansätze habe muss als eine reine Steigerung der Inotropie oder Chronotropie (Sokos et al. 2006). Da sich in Tierversuchen zeigte, dass GLP-1-Gaben vor induziertem Myokardinfarkt das Infarktgebiet in der Ausdehnung stärker begrenzte als in der Placebogruppe (Bose et al. 2005), wurden vergleichbare Studien auch bei Patienten mit Herzinfarkt durchgeführt (Nikolaidis et al. 2005b). In diesen Humanstudien zeigte sich, dass die GLP-1-Gabe über 72 Stunden nach erfolgter Reperfusion bei einem Patienten mit Herzinfarkt und zuvor eingeschränkter linksventrikulärer Funktion die linksventrikuläre Funktion verbessern konnte, die regionalen Wandbewegungsstörungen in der Perinfarktzone senken konnte und die Krankenhausaufenthaltsdauer verkürzen konnte (Nikolaidis et al. 2004a). Diese Effekte waren unabhängig von den Kreislaufparametern und sowohl bei Diabetikern als auch

Nichtdiabetikern nachzuweisen. Bei Patienten, die sich einer Bypass Operation unterziehen mussten, konnte der Bedarf an inotropen Substanzen und der Insulin-Bedarf durch GLP-1-Gabe vermindert werden, was wiederum Ausdruck einer direkten inotropen GLP-1-Wirkung sein kann (Sokos et al. 2007). Es bleibt weiterhin unklar, ob die kardioprotektiven GLP-1-Wirkungen direkt über den bekannten GLP-1-Rezeptor vermittelt werden oder indirekt durch eine Verbesserung der Glukose-Homöostase und Insulin-Wirkung oder durch komplett alternative Wege hervorgerufen werden. In den Fokus des Interesses bezüglich der Wirkung von GLP-1 zur Kardioprotektion rückt ein Metabolit des GLP-1 Stoffwechsels. GLP-1 [7-36-Amid] wird im menschlichen Organismus rasch durch die DPP 4 N-terminal zu GLP-1 (9-36) metabolisiert (Mentlein et al. 1993). Auch wenn GLP-1 (9-36) scheinbar auf die Glukose-Homöostase keinen Einfluss hat, so weisen Studienergebnisse auf Wirkungen am Herz-Kreislaufsystem hin. Bei gesunden Menschen und bei Diabetikern hat GLP-1 (9-36) keinen Einfluss auf die Blutglukose- und Insulin-Konzentrationen [Vahl et al. (2003), Zander et al. (2006)]. Auch bindet GLP-1 (9-36) nicht an den bekannten GLP-1-Rezeptor [Deacon et al. (1995a), Kieffer et al. (1995)]. Aber bei Hunden mit induzierter dilatativer Kardiomyopathie konnte GLP-1 (9-36) die linksventrikuläre Funktion verbessern und die myokardiale Glukose-Aufnahme steigern (Nikolaidis et al. 2005a). An Rattenherzen mit induzierten Ischämieschaden konnte GLP-1 (9-36) die linksventrikuläre Funktion stabilisieren, jedoch nicht das Infarktareal begrenzen oder verkleinern (Sonne et al. 2008). Um die Bedeutung von GLP-1 am kardiovaskulären System besser zu verstehen, wurden Untersuchungen an Mäusen begonnen, welche keine der bekannten GLP-1-Rezeptoren exprimierten ($Glp1r^{-/-}$) (Gros et al. 2003). Bei derartigen Mäusen fand sich unter einer GLP-1-Infusion nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden dieselbe Verbesserung des linksventrikulären Drucks wie bei Mäusen mit vorhandenem GLP-1-Rezeptor. Die Gabe des GLP-1-Rezeptor-Agonisten Exendin-4 bewirkte in diesem Fall keine Besserung bei den $Glp1r^{-/-}$ Mäusen. Daraus konnte abgeleitet werden, dass hier ein Wirkmechanismus unabhängig vom bekannten GLP-1-Rezeptor bestehen musste und es zeigte sich, dass dieser am ehesten durch den Metaboliten des GLP-1-Stoffwechsels GLP-1 (9-36) vermittelt wird (Ban et al. 2008). Insgesamt wurde aus den Ergebnissen die Möglichkeit einer Vermittlung der kardioprotektiven GLP-1-Wirkungen über zwei Wege postuliert: Zum einen durch die direkte GLP-1-Rezeptor vermittelte inotrope Wirkung, die Steigerung der myokardialen Glukose-Aufnahme, die milde vasodilatorische Funktion

und die allgemeine Verbesserung der Glukose-Homöostase. Zum anderen durch die GLP-1-Rezeptor unabhängige kardioprotektive Wirkungen vermittelt durch z.B. GLP-1 (9-36). Auch in weiterführenden Studien konnte gezeigt werden, dass GLP-1 (9-39) kardioprotektive Funktionen ausübt, die über andere Rezeptoren vermittelt werden mussten. Insbesondere die Erkenntnis, dass durch Exendin-4 als sehr potenten GLP-1-Rezeptor-Agonisten nicht alle kardioprotektiven Wirkungen erreicht wurden, die mit GLP-1 (9-36) erzielt werden konnten, führt zu der Annahme, dass alternative Wirkmechanismen zu den klassischen GLP-1-Rezeptor existieren müssen. Über welche Rezeptoren und über welche konkreten Mechanismen muss weiter differenziert untersucht werden. In diesem Zusammenhang sind jüngeren Arbeiten mit Hinweisen hilfreich, dass Exendin [9-39] GLP-1 (9-36)-vermittelte Effekte antagonisieren kann (Ban et al. 2010). Es besteht also der Verdacht, dass Exendin [9-39] auch ein Antagonist an der Rezeptorklasse ist, welche die GLP-1 (9-36)-Effekte vermittelt. Dies könnte man sich für weitere Studien am Herz-Kreislauf-System zu nutze machen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Untersuchungen mit intravenöser GLP-1 [7-36-Amid]-Gabe der Infusionslösung Albumin zugesetzt werden sollte, um vorhersagbare, kalkulierbare und ausreichende GLP-1-Konzentrationen aufbauen zu können. Bei der intravenösen Gabe von GLP-1 [7-36-Amid] ohne den Zusatz von Albumin in das Infusionssystem konnten in dieser Arbeit keine ausreichenden GLP-1-Konzentrationen aufgebaut werden, um einen verstärkten insulinotropen Effekt nach intravenöser Glukosegabe zu bewirken. Aus diesem Grund konnte in diesem Versuchsaufbau auch die Wirksamkeit eines GLP-1-Antagonisten nicht hinreichend geprüft werden. Auch wenn die GLP-1-Konzentrationen im Infusionssystem vor und nach der intravenösen Gabe nicht analysiert wurden und daher mögliche Erklärung nur theoretischer Natur sind, waren die Unterschiede im Vergleich zu den GLP-1-Konzentrationen nach intravenöser GLP-1 [7-36-Amid] mit Albuminzusatz derart eklatant, dass Rückschlüsse auf die Ursache doch legitim erscheinen. Am ehesten handelte es sich um Bindungsverluste im Infusionssystem durch eine verstärkte Bindung des Peptids GLP-1 [7-36-Amid] an den Kunststoffoberflächen. War die Infusionslösung bei der Zubereitung und der intravenösen Gabe jedoch mit Albumin versetzt, konnten hinreichende GLP-1-Konzentrationen während der Versuchstage aufgebaut werden, die insulinsekretorische Antwort auf eine Glukose-Belastung GLP-1-vermittelt gesteigert werden und demzufolge auch der GLP-1-Antagonist Exendin [9-39] hinreichend auf seine Wirksamkeit geprüft werden. Als ursächlich hierfür sind vorrangig geringere Bindungsverluste im Infusionssystem zu sehen, da die Kunststoffoberflächen bereits durch das Albumin stärker abgesättigt waren. Es ist daher zukünftig darauf zu achten, dass bei Versuchsaufbauten mit intravenösen GLP-1 [7-36-Amid]-Infusionen Maßnahmen ergriffen werden, die Kunststoffoberflächen des Infusionssystems abzusättigen, damit humane Experimente nicht unnötig wegen mangelnder Wirksamkeit oder unzureichender Konzentration des Substrates wiederholt werden müssen.

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass unter der Berücksichtigung der Zugabe von Albumin zu der Infusionslösung unter einer Dosierung von $1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ schon nach 15 Minuten hohe, wirksame GLP-1-Konzentrationen aufgebaut werden können. Sie lagen unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei $83 \pm 29,4$

pmol/l und unter kombinierter Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] bei $137,5 \pm 25,2$ pmol/l. Nach Reduktion der Dosis auf $0,5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ im weiteren Versuchsverlauf fand sich unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion ein Steady State zwischen $52,7 \pm 13,7$ pmol/l und $54,3 \pm 12,7$ pmol/l, unter kombinierter Infusion mit GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] zwischen $60,7 \pm 4,9$ pmol/l und $67,2 \pm 13,1$ pmol/l. Zu allen Zeitpunkten wurden die angestrebten supraphysiologischen GLP-1-Konzentrationen erreicht. Durch die supraphysiologischen GLP-1-Konzentrationen wurde die insulinsekretorische Antwort auf die intravenöse Glukosegabe an dem Versuchstag mit der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion deutlich gesteigert. Dagegen konnte am Versuchstag der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] dieser insulinotrope Effekt des GLP-1 durch den Antagonisten potent gehemmt werden, obwohl die gemessenen GLP-1-Konzentrationen an den beiden Versuchstagen vergleichbar waren. Die Insulin-Sekretion lag unter der kombinierten Infusion von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] auf dem Niveau des Placebo Versuchstages. Diese Tatsache fand sich in den integrierten Anstiegen über Basalwerte für die Insulin-Sekretion und die Insulin-Konzentration in der ersten Phase der Insulin-Sekretion wieder. Die integrierten Werte für die erste Phase der Insulin-Sekretion lagen unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion bei $234,2 \pm 40,6 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, wohingegen unter der kombinierten GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion Werte von $111,4 \pm 14,0 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und unter NaCl 0,9 %-Infusion Werte von $103,2 \pm 13,1 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ vorlagen. Für die Insulin-Konzentration fanden sich korrespondierend damit unter der isolierten GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion Werte von $952 \pm 132,7 \text{ mU l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, wohingegen unter der kombinierten GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion Werte von $419,8 \pm 82,3 \text{ mU l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und unter NaCl 0,9 %-Infusion Werte von $408,4 \pm 68,6 \text{ mU l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ vorlagen. In der Summe können die Ergebnisse als Ausdruck einer potenten Antagonisierung der GLP-1-vermittelten insulinotropen Wirkungen durch den GLP-1-Antagonisten Exendin [9-39] gewertet werden. Es wurde der Nachweis erbracht, dass Exendin [9-39] in der in diesem Versuchsaufbau verwendeten Dosierung die GLP-1-induzierte Steigerung der insulinsekretorischen Antwort auf eine intravenöse Glukose-Belastung antagonisieren kann. Das zuvor definierte Ziel von 75%-iger Inhibition der GLP-1-vermittelten insulinotropen Wirkung durch Exendin [9-39] konnte nicht bei allen Probanden erreicht werden. Es gab aber keinen „Non Responder“ auf Exendin [9-39] und eine Inhibition in variabler Ausprägung ließ sich bei allen Probanden nachweisen.

Es konnte bestätigt werden, dass auch der die Glukagon-Konzentration regulierende und senkende Effekt des GLP-1 durch die Gabe von Exendin [9-39] aufgehoben werden konnte. So zeigte sich am Versuchstag der kombinierten Gabe von GLP-1 [7-36-Amid] und Exendin [9-39] schon kurz nach Beginn der Exendin [9-39]-Infusion ein signifikanter Anstieg der Glukagon-Konzentrationen und diese blieben bis zum Ende der Infusion bestehen. Wobei in diesem Fall für die Interpretation der Daten die Kreuzreaktivität des verwendeten Glukagon-Assays mit Exendin [9-39] berücksichtigt werden muss. Es ist durchaus denkbar, dass aufgrund der Kreuzreaktivität des Assay vorrangig die steigende Exendin [9-39]-Konzentration gemessen wurde. Die Beurteilung und Bewertung der Glukagon-Ergebnisse sind daher unter Vorbehalt zu betrachten.

Somit konnte in der Summe die aus Voruntersuchungen bekannte insulinotrope Wirkung des GLP-1 bestätigt werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Exendin [9-39] in der in dieser Arbeit gewählten Dosierung ein potenter Antagonist am GLP-1-Rezeptor ist, der den insulinotropen Effekt des GLP-1 auch unter supraphysiologischen GLP-1-Konzentrationen ausreichend hemmen kann. Es ist daher davon auszugehen, dass Exendin [9-39] auch weitere GLP-1-Rezeptor-vermittelte Effekte im menschlichen Körper antagonisieren kann und vermutlich auch noch an weitere, bisher nicht bekannte Rezeptoren binden kann. Dahingehend sind weitere Untersuchungen in Zukunft erforderlich.

6. Anhang: Tabellen 1A–3A, Gleichungen 1A–5A, Abbildungen 1A–5A

Tabelle 1A: Probanden-Charakteristika; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Parameter	Einheit	MW \pm SD		Spanne aller Werte: "Range"		Normal- bereich
		Projekt A	Projekt B	Projekt A	Projekt B	
Geschlecht	m/w	5 m / 1 w	4 m / 2 w	-		-
Alter	Jahre	47 \pm 8	45 \pm 12	40 - 61	31 - 58	-
Gewicht	kg	80,9 \pm 13,6	73,1 \pm 12,3	62,7 – 95,5	62,8 – 96,5	-
Größe	cm	176,7 \pm 4,8	175,8 \pm 13,8	172 - 183	155 – 196	-
Body-Mass Index	kg/m ²	25,9 \pm 4,2	23,5 \pm 1,9	20 - 32	21 - 26	18 - 25
Blutdruck systolisch	mmHg	119 \pm 9	121 \pm 11	135 - 110	135 - 110	< 140
Blutdruck diastolisch	mmHg	76 \pm 7	81 \pm 9	90 - 70	95 - 70	< 90
Puls	/min	63 \pm 2	62 \pm 10	60 - 64	52 - 80	50 - 100
Blutzucker nüchtern	mg/dl	87 \pm 9	85 \pm 10	78 - 99	67 - 97	< 100,0
HbA _{1c}	%	5,2 \pm 0,3	5,3 \pm 0,1	4,7 – 5,5	5,1 – 5,5	< 6,0
Hämoglobin	g/dl	14,9 \pm 0,8	14,5 \pm 1,3	13,8 – 16,1	12,9 – 16,3	14,0 – 18,0
Erythrozyten	/pl	5,1 \pm 0,3	5,3 \pm 0,7	4,7 – 5,6	4,4 – 6,1	4,2 – 6,3
MCV	fl	94,1 \pm 3,4	90,3 \pm 6,4	88,5 – 97,9	77,9 – 94,8	82,0 – 101,0
MCH	pg	29,3 \pm 1,0	27,8 \pm 2,3	27,9 – 30,7	23,4 – 29,3	27,0 – 34,0

Fortsetzung Tabelle 1A: Probanden-Charakteristika; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Parameter	Einheit	MW \pm SD		Spanne aller Werte: "Range"		Normal- bereich
		Projekt A	Projekt B	Projekt A	Projekt B	
Thrombozyten	$\times 10^3/\mu\text{l}$	225 \pm 41	287 \pm 46	165 - 267	225,0 – 337,0	140,0 – 440,0
Leukozyten	/nl	5,9 \pm 1,1	6,4 \pm 1,1	4,9 – 7,3	5,1 – 7,7	4,3 – 10,0
Kalium	mmol/l	4,6 \pm 0,2	4,5 \pm 0,3	4,4 – 5,0	4,1 – 5,1	3,5 – 5,5
Natrium	mmol/l	142 \pm 1	144 \pm 2	140 - 143	141 – 146	136 – 148
Chlorid	mmol/l	104 \pm 1	103 \pm 3	102 - 105	100 – 108	80 – 120
HDL- Cholesterin	mg/dl	46 \pm 11	60 \pm 20	36 - 61	38 – 86	40 – 60
LDL- Cholesterin	mg/dl	122 \pm 20	119 \pm 44	87 - 146	44 – 169	< 150,0
Bilirubin gesamt	mg/dl	0,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,3	0,3 – 0,9	0,3 – 1,1	0,2 – 1,0
Protein gesamt	g/dl	7,6 \pm 0,2	7,4 \pm 0,4	7,3 – 7,9	7,0 – 8,0	6,4 – 8,2
Triglyceride	mg/dl	118 \pm 53	124 \pm 70	65 - 217	47 - 242	50 – 150
Cholesterin gesamt	mg/dl	193 \pm 30	204 \pm 53	140 - 210	105 – 260	0 – 200
LDH	U/l	154 \pm 14	152 \pm 28	138 - 172	108 – 182	100 – 190
γ -GT	U/l	26 \pm 8	24 \pm 2	17 - 40	21 – 27	5 – 85
Calcium	mg/dl	9,2 \pm 0,2	9,1 \pm 0,2	8,8 – 9,3	8,9 – 9,2	8,5 – 10,1
Kreatinin	mg/dl	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2	0,8 – 1,2	0,7 – 1,1	0,6 – 1,3
Alpha- Amylase	U/l	75 \pm 50	85 \pm 33	28 - 139	51 – 133	28 – 100

Fortsetzung Tabelle 1A: Probanden-Charakteristika; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Parameter	Einheit	MW \pm SD		Spanne aller Werte "Range"		Normal- bereich
		Projekt A	Projekt B	Projekt A	Projekt B	
Albumin	g/l	46,5 \pm 2,1	46 \pm 3	45 - 51	42 - 51	35 - 52
Alkalische Phosphatase	U/l	78 \pm 11	87 \pm 24	63 - 93	61 - 129	50 - 136
Organisches Phosphat	mg/dl	2,9 \pm 0,5	3,5 \pm 0,5	2,3 - 3,5	2,8 - 4,1	2,5 - 4,9
ALT	U/l	29 \pm 5	26 \pm 10	21 - 34	20 - 46	30 - 65
AST	U/l	21 \pm 3	17 \pm 3	17 - 25	12 - 21	15 - 37
Harnsäure	mg/dl	5,2 \pm 1,2	5,2 \pm 0,5	3,4 - 6,7	4,3 - 5,6	2,6 - 6,0
Kreatinkinase	U/l	122 \pm 55	122 \pm 40	75 - 194	68 - 192	21 - 232
Lipase	U/l	260 \pm 53	243 \pm 23	205 - 359	221 - 278	114 - 286
Harnstoff	mg/dl	26 \pm 10	30 \pm 4	16 - 44	27 - 37	15 - 38

Tabelle 2A: Mögliche Infusionsabfolgen in Abhängigkeit zur Randomisierung (Projekt A)

Randomisierung	1. Versuchstag	2. Versuchstag	3. Versuchstag	4. Versuchstag
1	GLP-1	Placebo	GLP-1 + Exendin[9-39]	Exendin[9-39]
2	Exendin[9-39]	GLP-1	Placebo	GLP-1 + Exendin[9-39]
3	GLP-1 + Exendin[9-39]	Exendin[9-39]	GLP-1	Placebo

Tabelle 3A: Mögliche Infusionsabfolgen in Abhängigkeit zur Randomisierung (Projekt B)

Randomisierung	1. Versuchstag	2. Versuchstag	3. Versuchstag
1	GLP-1	Placebo	GLP-1 + Exendin[9-39]
2	Placebo	GLP-1 + Exendin[9-39]	GLP-1
3	GLP-1 + Exendin[9-39]	GLP-1	Placebo

Gleichung 1A:

Formel zur Berechnung des Bedarfs an Basis GLP-1 [7-36-Amid] für die Infusionen mit GLP-1 an den Versuchstagen C und D (Projekt A):

$$Y \text{ (ml)} = \frac{0,5 \text{ pmol} \times B \text{ (kg)} \times 60 \text{ min} \times 3297,7 \text{ g} \times 50 \text{ ml}}{\text{kg} \times \text{min} \times 6 \text{ ml} \times \text{mol} \times 25 \mu\text{g} / \text{ml}}$$

$$Y \text{ (ml)} = B \text{ (kg)} \times 0,032977 \text{ ml/kg}$$

Gleichung 2A:

Formel zur Berechnung des Bedarfes an Basis-Exendin [9-39]-Lösung zur Herstellung der Exendin [9-39]-Infusion am Versuchstag D und D' (Projekt A und Projekt B):

$$C \text{ (ml)} = \frac{1,18 \text{ (mg / ml)} \times 1,02 \times 50 \text{ (ml)}}{5 \text{ (mg / ml)}}$$

$$C \text{ (ml)} = 12,0 \text{ ml}$$

Gleichung 3A:

Gleichung zur Berechnung der Flussrate (Y) für $500 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Exendin [9-39] an Versuchstag D und D' (Projekt A und Projekt B):

$$Y \text{ (ml/min)} = \frac{0,1 \text{ (ml / min)} \times B \text{ (kg)}}{70 \text{ kg}}$$

Gleichung 4A:

Gleichung zur Berechnung der Flussrate (Z) für $350 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Exendin [9-39] an Versuchstag D und D' (Projekt A und Projekt B):

$$Z \text{ (ml/min)} = \frac{Y \text{ (ml/min)} \times 350 \text{ (pmol)}}{500 \text{ (pmol)}}$$

Gleichung 5A:

Formel zur Berechnung des Bedarfs an Basis GLP-1 [7-36-Amid] für die Infusionen mit GLP-1 an den Versuchstagen C' und D' (Projekt B):

$$Y \text{ (ml)} = \frac{0,5 \text{ pmol} \times B \text{ (kg)} \times 60 \text{ min} \times 3297,7 \text{ g} \times 50 \text{ ml}}{\text{kg} \times \text{min} \times 10 \text{ ml} \times \text{mol} \times 25 \mu\text{g} / \text{ml}}$$

$$Y \text{ (ml)} = B \text{ (kg)} \times 0,0197862 \text{ ml/kg}$$

Abbildung 1A: Vergleichende Übersichtsdarstellung der Diagramme aus Projekt A und Projekt B für Blutglukose-, Insulin-, C-Peptid- Konzentrationen und Insulin-Sekretionsraten.

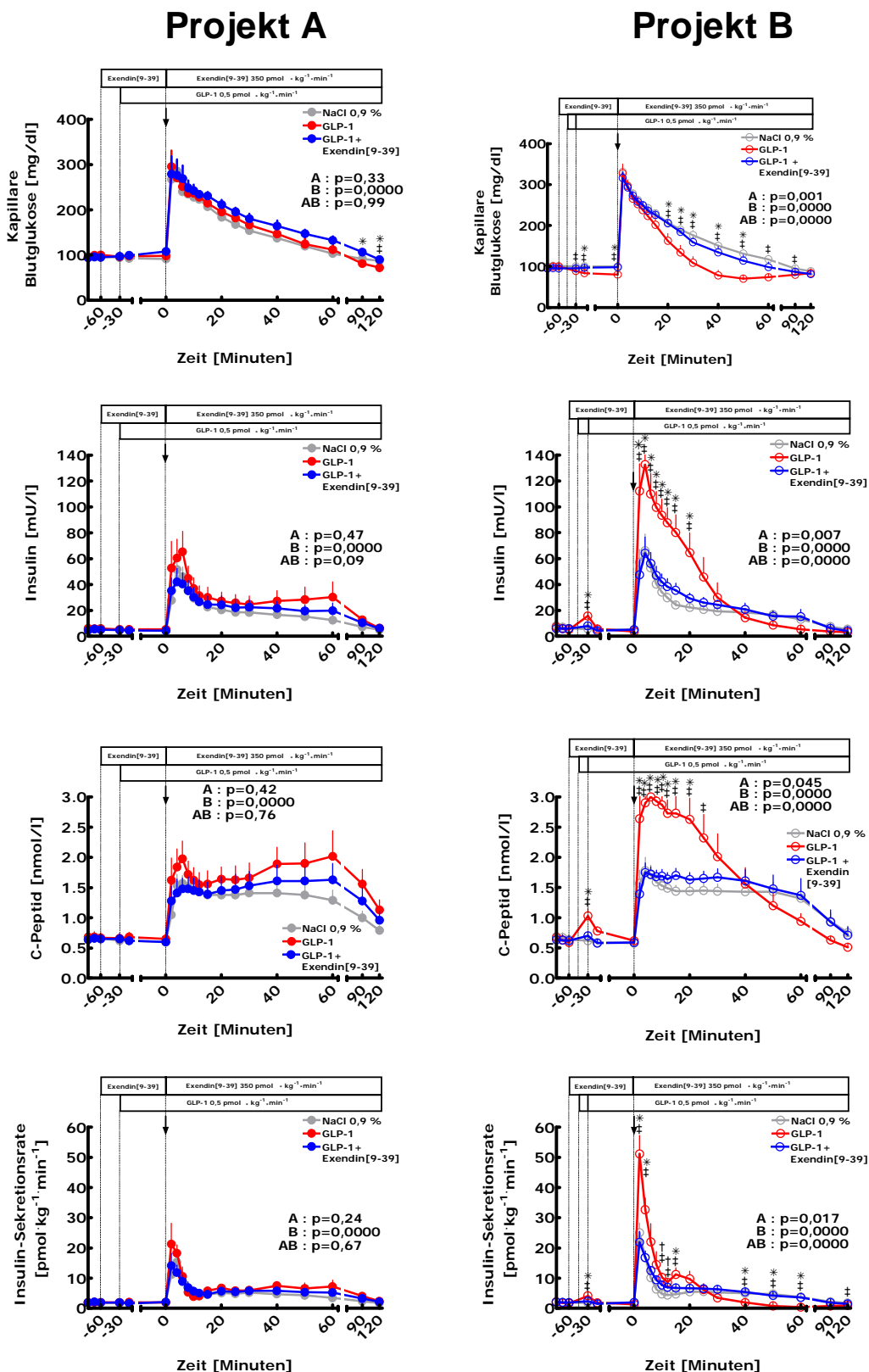


Abbildung 2A: Vergleichende Übersichtsdarstellung der Diagramme aus Projekt A und Projekt B für Glukagon-, GLP-1 Total-, Exendin [9-39]- Konzentrationen und GLP-1 Intakt (Projekt B).

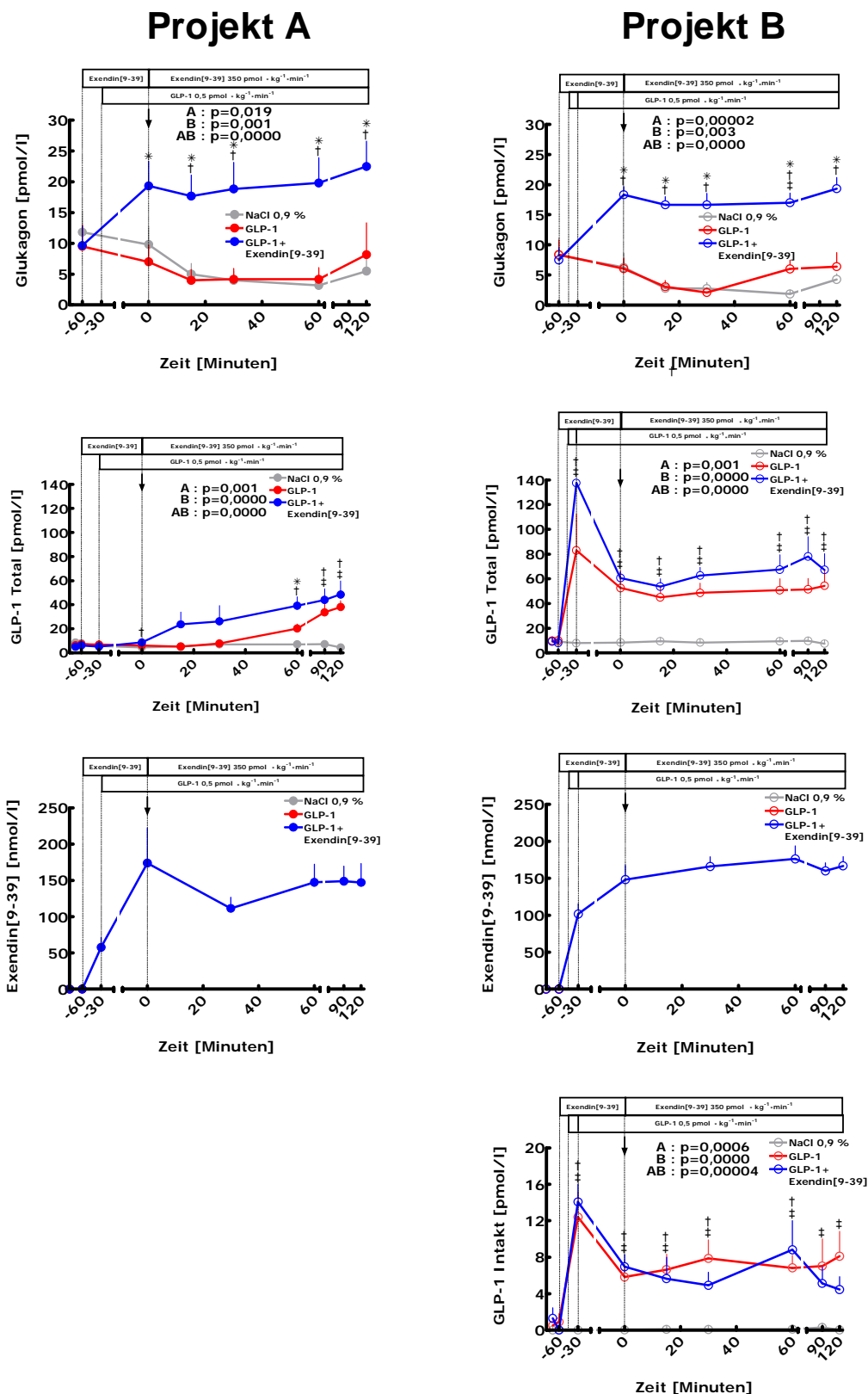


Abbildung 3A: Vergleichende Übersichtsdarstellung der Diagramme aus Projekt A und Projekt B für integrierte Anstiege über Basalwerte für Insulin- Konzentration und Insulin-Sekretionsrate.

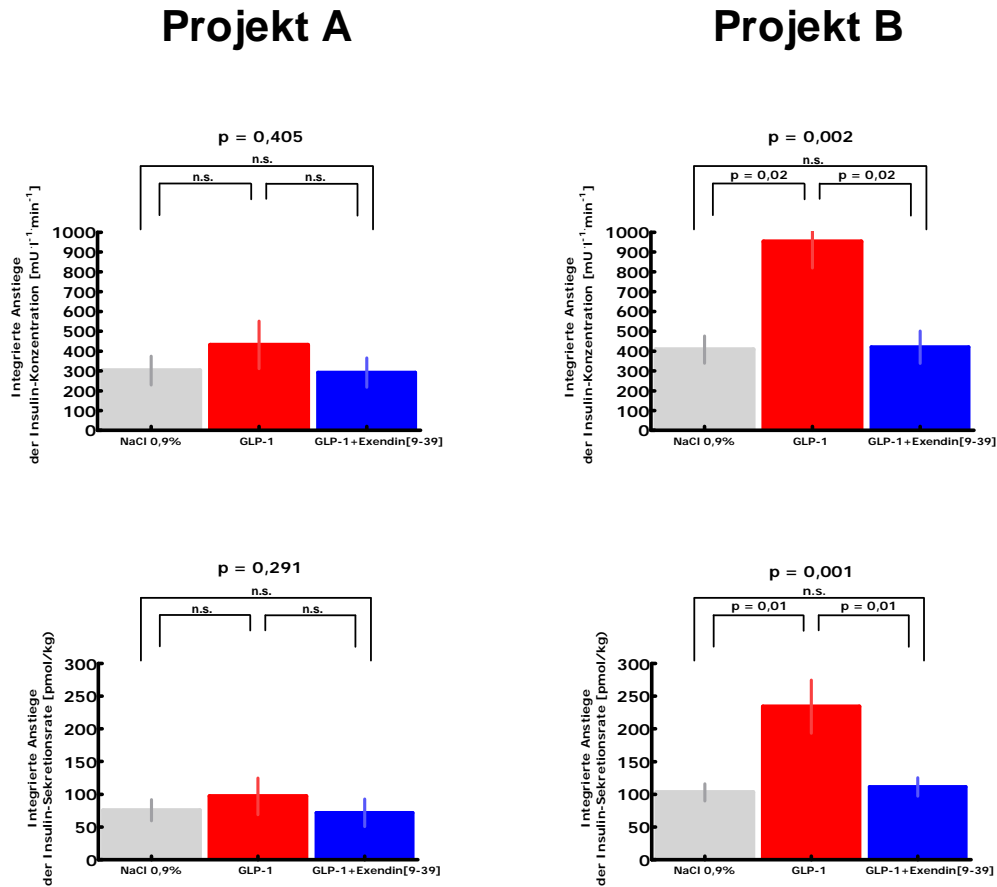
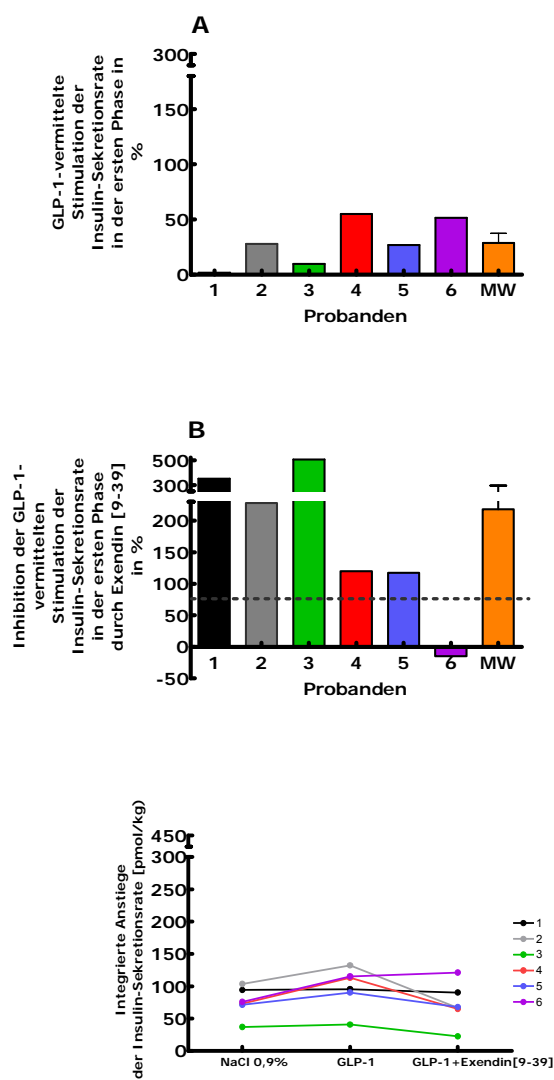


Abbildung 4A: Vergleichende Übersichtsdarstellung der Diagramme aus Projekt A und Projekt B für die individuelle, prozentuale Stimulation der ersten Phase der Insulinsekretion unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion, die individuelle Hemmung der GLP-1-vermittelten insulinotropen Effekte durch Exendin [9-39] und die individuellen Insulin-Sekretionsraten der einzelnen Probanden an den einzelnen Versuchstagen.

Projekt A



Projekt B

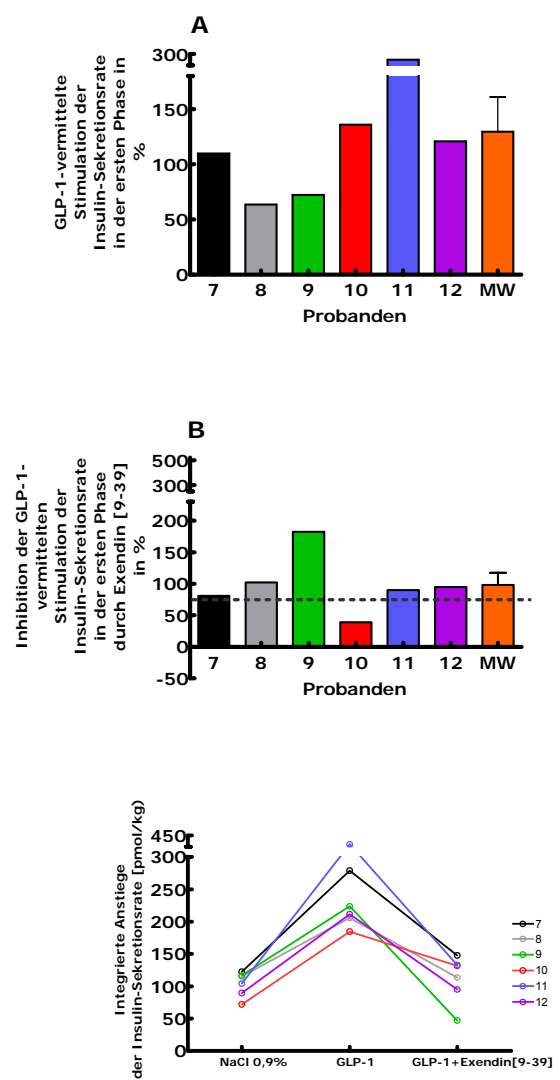
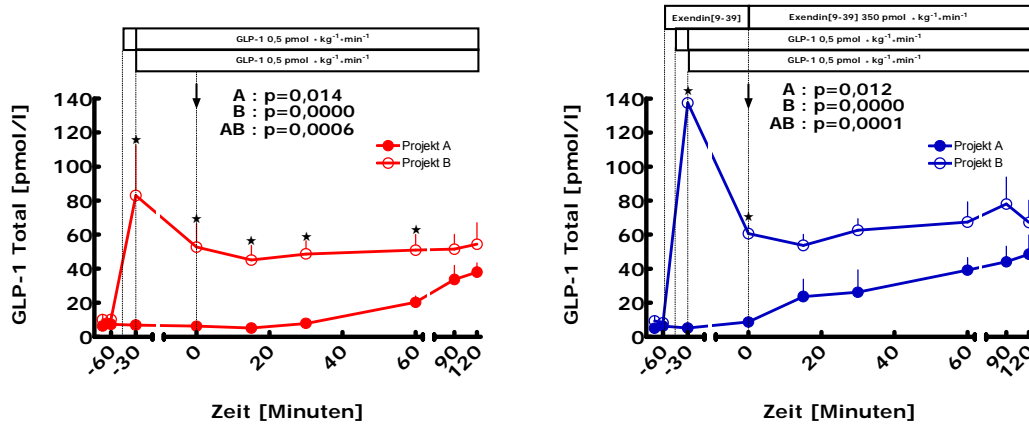


Abbildung 5A: Vergleichende Darstellung der GLP-1 Total-Konzentrationen unter isolierter GLP-1 [7-36-Amid]-Infusion und kombinierter GLP-1 [7-36-Amid]- und Exendin [9-39]-Infusion in Projekt A und Projekt B.



7. Literaturverzeichnis

Ahrén B (2004): GLP-1 and extra-islet effects. *Horm Metab Res* 36:842-845

Ahrén B, Holst JJ (2001): The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanism and is important for postprandial glycemia. *Diabetes* 50:1030-1038

Ahrén B, Larsson H, Holst JJ (1997): Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 82:473-478

Ahrén B, Holst JJ, Effendic S (2000): Antidiabetogenic action of cholecystokinin-8 in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1043-1048

Andrade JD: Principles in protein adsorption. In: Surface and interfacial aspects of biomedical polymers. Hrsg: Andrade JD, Band 2, Plenum Publishing Corporation New York 1985, 1-80

Arbeitskreis Blut (1998): Was bedeutet die neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit für die Sicherheit von Blutprodukten. *Dtsch Ärztebl* 95:A1627-A1628

Balks HJ, Holst JJ, von zur Mühlen A, Brabant G (1997): Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:786-790

Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefler J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M (2008): Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* 117:2340-2350

Ban K, Kim HK, Cho CK, Sauvé M, Diamandis EP, Backx PH, Drucker DJ, Husain M (2010): Glucagon-like peptide (GLP)-1(9-36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin[9-39] yet does not require the known GLP-1 receptor. *Endocrinology* 151:1520-1531

Barragán JM, Rodriguez RE, Blásquez E (1994): Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in rats. *Am J Physiol* 266:E459-E466

Bataille D, Coudray AM, Carlqvist M, Rosselin G, Mutt V (1982): Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum. Isolation of peptide. *FEBS Lett* 146:73-78

Bayliss WM, Starling EH (1902): The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol* 28:325-353

Bell GI (1986): The glucagon superfamily: precursor structure and gene organization. *Peptides* 7:27-36

Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT (1983): Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302:716-718

Bhattacharya AA, Curry S, Franks NP (2000): Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structure. *J Biol Chem* 275:38731-38738

Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM (2005): Glucagon like peptide-1 is protective against myocardial ischemia/reperfusion injury when given either as a preconditioning mimetic or at reperfusion in an isolated rat heart model. *Cardiovasc Drugs Ther* 19:9-11

Brash JL, Horbett TA : Proteins at interfaces – An overview. In: Horbett TA, Brash JL (Hrsg), *Proteins at interfaces: Fundamentals and applications*, American Chemical Society Washington D.C. 1995 1-23

Brown JC, Dryburgh JR (1971): A gastric inhibitory polypeptide II. The complete amino acid sequence. *Can J Biochem* 49:867-872

Brown JC, Mutt V, Pederson RA (1970): Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. *J Physiol* 209:57-64

Bullock BP, Heller RS, Habener JF (1996): Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 137:2968-2978

Buteau J, El-Assaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M (2004): Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity. *Diabetologia* 47:806-815

Campos RV, Lee YC, Drucker DJ (1994): Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 134:2156-2164

Carter DC, Ho JX (1994): Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 45:153-203

Chisholm C, Greenberg GR (2002): Somatostatin-28 regulates GLP-1 secretion via somatostatin receptor subtype 5 in rat intestinal cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E311-E317

Cochrane Injuries Group Albumin Reviewers (1998): Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomised controlled trials. *BMJ* 317:235-240

Cohn EJ, Oncley JL, Strong LE, Hughes WL, Armstrong SH (1944): Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. I. The characterization of the protein fractions of human plasma. *J Clin Invest* 23:417-432

Conlon JM (1988): Proglucagon-derived peptides: nomenclature, biosynthetic relationships and physiological roles. *Diabetologia* 31:563-566

Creutzfeldt W (1979): The incretin concept today. *Diabetologia* 16:75-85

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

Cullinan CA, Brady EJ, Saperstein R, Leibowitz MD (1994): Glucose-dependent alterations of intracellular free calcium by glucagon-like peptide-1(7-36) in individuals ob/ob mouse beta-cells. *Cell Calcium* 15:391-400

Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N (1998): Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol* 5:827-835

Dai H, Gustavson SM, Preston GM, Eskra JD, Calle R, Hirshberg B (2008): Non-linear increase in GLP-1 levels in response to DPP-IV Inhibition in healthy adult subjects. *Diabetes Obes Metab* 10:506-513

D'Alessio DA, Fujimoto WY, Ensink JW (1989): Effects of glucagonlike peptide 1-(7-36) on release of insulin, glucagon and somatostatin by rat pancreatic islet cell monolayer cultures. *Diabetes* 38:1534-1538

D'Alessio DA, Vogel R, Prigeon R, Laschansky E, Koerker D, Eng J, Ensink JW (1996): Elimination of the action of glucagon-like peptide 1 causes an impairment of glucose tolerance after nutrient ingestion on healthy baboons. *J Clin Invest* 97:133-138

Damholt AB, Kofod H, Buchan AM (1999): Immunocytochemical evidence for paracrine interaction between GIP and GLP-1-producing cells in canine small intestine. *Cell Tissue Res* 298:287-293

Deacon CF (2010): "Cross Affinity Glucagon Assay vs Exendin 9-39?". Københavns Universitet, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Biomedicinsk Institut, Panum Institut 12.2.23, Blegdamsvej 3B, 2200 København N. Email vom 2.11.2010

Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ (1995a): Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 80:952-957

Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ (1995b): Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 44:1126-1131

Dillon JS, Tanizawa Y, Wheeler MB, Leng XH, Ligon BB, Rabin DU, Yoo-Warren H, Permut MA, Boyd AE 3rd. (1993): Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. *Endocrinology* 133:1907-1910

Ding WG, Renström E, Rorsman P, Buschard K, Gromada J (1997): Glukagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca²⁺-induced secretion in rat alpha-cells by a protein kinase A-mediated mechanism. *Diabetes* 46:792-800

Dockal M, Chang M, Carter DC, Rüker F (2000): Five recombinant fragments of human serum albumin – tools for the characterization of the warfarin binding site. *Prot Sci* 9:1455-1465

Drucker DJ (2001) Glucagon-like peptide 2. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1759-1764

Drucker DJ, Nauck MA (2006): The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368:1696-1705

Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF (1987): Glucagon-like peptide-1 stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3434-3438

Dugaiczky A, Law SW, Dennison OE (1982): Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:71-75

Dumoulin V, Dakka T, Plaisancie P, Chayvialle JA, Cuber JC (1995): Regulation of glucagon-like peptide-1(7-36) amide, peptide YY, and neurotensin secretion by neurotransmitters and gut hormones in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology* 136:5182-5188

Dunphy JL, Taylor RG, Fuller PJ (1998): Tissue distribution of rat glucagon receptor and GLP-1 receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 141:179-186

Dupre J, Ross SA, Watson D, Brown JC (1973): Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* 37:826-828

Eaton RP, Allen RC, Schade DS, Erickson KM, Standefer J (1980) Prehepatic insulin production in man: kinetic analysis using peripheral connecting peptide behaviour. *J Clin Endocrinol Metab* 51:520-528

Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang RM, Ghatei MA, Bloom SR (1999): Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes* 48:86-93

Edwards CM, Stanley SA, Davis R, Brynes AE, Frost GS, Seal LJ, Ghatei MA, Bloom SR (2001): Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E155-E161

Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Göke B (1992): Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* 22:283-291

Elahi D, McAloon-Dyke M, Fukagawa NK, Meneilly GS, Sclater AL, Minaker KL, Haberner JF, Andersen DK (1994): The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1(7-37) in normal and diabetic subjects. *Regul Pept* 51:63-74

Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V (1993): Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 138:159-166

Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ Jr, Arai Y (1964): Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab* 24:1076-1082

Expertengruppe Humanalbumin, Vorsitz: Pasch T (Universitätsspital Zürich) (2000): Indikation für Humanalbumin-Lösungen: ein Expertenbericht. *Schweiz Med Wochenschr* 130:516-522

Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R (2003): Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 144:5149-5158

Fehmann HC, Haberner JF (1992): Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology* 130:159-166

Fehmann HC, Jiang J, Schweinfurth J, Dörsch K, Wheeler MB, Boyd AE 3rd, Goke B (1994): Ligand-specificity of the rat GLP-I receptor recombinantly expressed in Chinese hamster ovary (CHO-) cells. *Z Gastroenterol* 32:203-207

Fehmann HC, Göke R, Göke B (1995): Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev* 16:390-410

Fehske KJ, Schläfer U, Wollert U, Müller WE (1982): Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high – affinity binding sites of warfarin and azapropazone. *Mol Pharmacol* 21:387-393

Fieseler P, Bridenbaugh S, Nustede R, Martell J, Ørskov C, Holst JJ, Nauck MA (1995): Physiological augmentation of amino acid-induced insulin secretion by GIP and GLP-1 but not by CCK-8. *Am J Physiol* 268:E949-E955

Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ (1998): Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest* 101:515-520

Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ (2005): International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* 57:279-288

Foster PR, Welch AG, McLean C, Griffin BD, Hardy JC, Bartley A, MacDonald S, Bailey AC (2000): Studies on the removal of abnormal prion protein by processes used in the manufacture of human plasma products. *Vox Sang* 78:86-95

Gault VA, O'Harte FP, Harriott P, Mooney MH, Green, BD, Flatt PR (2003) Effects of the novel (Pro3)GIP antagonist and exendin(9-39)amide on GIP- and GLP-1-induced cyclic AMP generation, insulin secretion and postprandial insulin release in obese diabetic (ob/ob) mice: evidence that GIP is the major physiological incretin. *Diabetologia* 46:222-230

Gebhard B, Holst JJ, Biegelmayer C, Miholic J (2001): Postprandial GLP-1, norepinephrin, and reactive hypoglycemia in dumping syndrom. *Dig Dis Sci* 46:1915-1923

Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S (2005): Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol* 353:38-52

Göke B, Hoppe B, Konrad A, Schirra J (2002): A therapeutic option for type-2 diabetes. The incretin hormone GLP-1. *Pharm Unserer Zeit* 31:294-299

Göke R, Conlon JM (1988): Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36) amide on rat insulinoma-derived cells. *J Endocrinol* 116:357-362

Göke R, Wagner B, Fehmann HC, Göke B (1993a): Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on the rat pancreas. *Res Exp Med (Berl)* 193:97-103

Göke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, Göke B (1993b): Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem* 267:19650-19655

Gray JJ (2004): The interaction of proteins with solid surfaces. *Curr Opin Struct Biol* 14:110-115

Greenberg GR, Chan B, McDonald TJ, Alleyne J (1985): The role of vagal integrity in gastrin releasing peptide stimulated gastroenteropancreatic hormone release and gastric acid secretion. *Regul Peptid* 10:179-187

Gregori L, Maring JA, MacAuley C, Dunston B, Rentsch M, Kempf C, Rohwer RG (2004): Partitioning of TSE infectivity during ethanol fractionation of human plasma. *Biologicals* 32:1-10

Gremlich S, Porret A, Hani EH, Cherif D, Vionnet N, Froguel P, Thorens B (1995): Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. *Diabetes* 44:1202-1208

Gros R, You X, Baggio LL, Kabir MG, Sadi AM, Mungrue IN, Parker TG, Huang Q, Drucker DJ, Husain M (2003): Cardiac function in mice lacking the glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 144:2242-2252

Gutzwiller JP, Drewe J, Göke B, Schmidt H, Rohrer B, Lareida J, Beglinger C (1999a): Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am J Physiol* 276:R1541-R1544

Gutzwiller JP, Göke B, Drewe J, Hildebrand P, Ketterer S, Handschin D, Winterhalder R, Conen D, Beglinger C (1999b): Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut* 44:81-86

Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ (1999): Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 140:5356-5363

Hansen L, Hartmann B, Bisgaard T, Mineo H, Jørgensen PN, Holst JJ (2000): Somatostatin restrains the secretion of glucagon-like peptide-1 and -2 from isolated perfused porcine ileum. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E1010-E1018

Harmar AJ (2001): Family-B G-protein-couplet receptors. *Genome Biol* 2:reviews 3013.1-3013.10

Harmar AJ (2004): Clinical endocrinology and metabolism. Receptors for gut peptides. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18:463-475

Hauner H (1998): Verbreitung des Diabetes mellitus in Deutschland. *Dtsch Med Wochenschrift* 123:777-782

Haverkamp JB, Lipke U, Zapf T, Galensa R, Lipperheide C (2007): Interaktion zwischen Arzneimittel und Primärverpackung. Untersuchung von halbfesten Darreichungsformen und Aluminiumtuben mit epoxidphenolhaltiger Innenbeschichtung. *Apotheken-Magazin* 25:8-14.

Heller RS, Kieffer TJ, Habener JF (1997): Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes* 46:785-791

Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B (1995): Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56:117-126

Herrmann-Rinke C, Vöge A, Hess M, Göke B (1995): Regulation of glucagon-like peptide-1 secretion from rat ileum by neurotransmitters and peptides. *J Endocrinol* 147:25-31

Hildebrand P, Ensink JW, Ketterer S, Delco F, Mossi S, Bangerter U, Beglinger C (1991): Effect of a cholecystinin antagonist on meal-stimulated insulin and pancreatic polypeptide release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1123-1129

Ho LT, Pu HF, Sheu WJ, Wang WC, Wang PS (1987): Inhibition of somatostatin on glucose-induced release of gastric inhibitory polypeptide in rats. *Chin J Physiol* 30:45-53

Holle H (2008): Untersuchung zum Vorliegen einer Tachyphylaxie als Ursache für den verminderten insulinotropen Effekt von Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) bei Diabetes mellitus Typ 2. Med. Diss. Göttingen 2008

Holst JJ (1980): Evidence that glicentin contains the entire sequence of glucagon. *Biochem J* 187:337-343,

Holst JJ (1982): Evidence that enteroglucagon (II) is identical with the C-terminal sequence (33-69) of glicentin. *Biochem J* 207:381 – 388

Holst JJ (1997): Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol* 59:257-271

Holz GG 4th, Kühtreiber WM, Habener JF (1993): Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* 361:362-365

Horbett TA : Adsorption of proteins and peptides at interfaces. In: Stability of protein pharmaceuticals. Hrsg: Ahern TJ und Manning MC, Part A, Plenum Press New York 1992 195-214

Hovorka R, Jones RH (1994): How to measure insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 10:91-117

Hui H, Nourparva A, Zhao X, Perfetti R (2003): Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphat-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 144:1444-1455

Jacobsen J (1969): Binding of bilirubin to human serum albumin – determination of the dissociation constants. *FEBS Lett* 5:112-114

Jia X, Brown JC, Kwok YN, Pederson RA, McIntosh CH (1994): Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1(7-36) amide exert similar effects on somatostatin secretion but opposite effects on gastrin secretion from the rat stomach. *Can J Physiol Pharmacol* 72:1215-1219

Kieffer TJ, Habener JF (1999): The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* 20:876-913

Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA (1995): Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136:3585-3596

King H, Aubert RE, Herman WH (1998): Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431

Kjems LL, Holst JJ, Vølund A, Madsbad S (2003): The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* 52:380-386

Kolligs F, Fehmman HC, Göke R, Göke B (1995): Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide-1 receptor antagonist exendin (9-39) amide. *Diabetes* 44:16-19

Komatsu R, Matsuyama T, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Kono N, Tarui S (1989): Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide 1-(7-36)-amide. *Diabetes* 38:902-905

Kratz F (2008): Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 132:171-183

Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR (1987): Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 1987,2:1300-1304

Ladegaard-Pedersen HJ (1969): Plasma volume and plasma colloid osmotic pressure. *Scand J Clin Lab Invest* 23:153-158

Larsson LI, Holst JJ, Håkanson R, Sundler F (1975): Distribution and properties of glucagon immunoreactivity in the digestive tract of various mammals: an immunohistochemical and immunochemical study. *Histochemistry* 44:281-290

La Barre J (1932) : Sur les possibilités d'un traitement du diabète par l'incrétine. *Bull Acad R Med Belg* 12:620-634

La Barre J, Still EU (1930): Studies on the physiology of secretin. *Am J Physiol* 91:649-653

Lee DC, Stenland CJ, Hartwell RC, Ford EK, Cai K, Miller JL, Gilligan KJ, Rubenstein R, Fournel M, Petteway SR Jr. (2000): Monitoring plasma processing steps with a sensitive Western blot assay for the detection of the prion protein. *J Virol Methods* 84:77-89

Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ (2003): Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem* 278:471-478

Little TJ, Pilichiewicz AN, Russo A, Phillips L, Jones KL, Nauck MA, Wishart J, Horowitz M, Feinle-Bisset C (2006): Effects of intravenous glucagon-like peptide-1 on gastric emptying and intragastric distribution in healthy subjects: relationship with postprandial glycemic and insulinemic responses. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1916-1923

Long SJ, Sutton JA, Amaee WB, Giouvanoudi A, Spyrou NM, Rogers PJ, Morgan LM (1999): No effect of glucagon-like peptide-1 on short-term satiety and energy intake in man. *Br J Nutr* 81:273-279

Lu CF, Nadarajan A, Chittur KK (1994): A comprehensive model of multiprotein adsorption on surfaces. *J Coll Interf Sci* 168:152-161

MacDonald PE, El-Kholy W, Riedel MJ, Salapatek AM, Light PE, Wheeler MB (2002): The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 51:434-442

Manning MC, Patel K, Borchardt RT (1989): Stability of protein pharmaceutical. *Pharm Res* 6:903-918

Margaron MP, Soni N (1998): Serum albumin: touchstone or totem? *Anaesthesia* 53:789-803

Martin AN : Grenzflächenphänomene. In: *Physikalische Pharmazie*, Hrsg: Leuenberger, H. 4.Auflage , Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Basel 2002 215-256

Martin PA, Faulkner A (1996): Effects of somatostatin-28 on circulating concentrations of insulin and gut hormones in sheep. *J Endocrinol* 151:107-112

Maruyama K, Nishigori H, Iwatsuru M (1985a): Characterization of the benzodiazepine binding site (diazepam site) on human serum albumin. *Chem Pharm Bull* 33:5002-5012

Maruyama H, Tominaga M, Bolli G, Orci L, Unger RH (1985b): The alpha cell response to glucose change during perfusion of anti-insulin serum in pancreas isolated from normal rats. *Diabetologia* 28:836-840

Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens B, Drucker DJ (2003): International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev* 55:167-194

McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS (1965): Intestinal factors in the control of insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 25:1317 – 1324

Meeran K, O'Shea D, Edwards CM, Turton MD, Heath MM, Gunn I, Abusnana S, Rossi M, Small CJ, Goldstone AP, et al. (1999): Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology* 140:244-250

Meier JJ, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegel WH, Nauck MA (2001): Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:2497-2504

Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, Holst JJ, Deacon CF, Gaeckler D, Schmidt WE, Gallwitz B (2004): Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes* 53:654-662

Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE (1993): Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 214:829-835

Miholic J, Ørskov C, Holst JJ, Kotzerke J, Meyer HJ (1991): Emptying of the gastric substitute, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), and reactive hypoglycemia after total gastrectomy. *Dig Dis Sci* 36:1361-1370

Miholic J, Ørskov C, Holst JJ, Kotzerke J, Pichlmayr R (1993): Postprandial release of glucagon-like peptide-1, pancreatic glucagon, and insulin after esophageal resection. *Digestion* 54:73-78

Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF (1986): Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 261:11880-11889

Moore B (1906): On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane. *Biochem J* 1:28-38

Munroe DG, Gupta AK, Kooshesh F, Vyas TB, Rizkalla G, Wang H, Demchyshyn L, Yang ZJ, Kamboj RK, Chen H, et al. (1999): Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1569-1573

Nakagawa A, Satake H, Nakabayashi H, Nishizawa M, Furuya K, Nakano S, Kigoshi T, Nakayama K, Uchida K (2004): Receptor gene expression of glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic polypeptide, in rat nodose ganglion cells. *Auton Neurosci* 110:36-43

Nakane PK, Pierce GB Jr. (1967): Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol* 33:307-318

Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K (2001): On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng* 91:233-244

Nauck MA (1998): Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective. *Acta Diabetol* 35:117-129

Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton R, Ebert R, Creutzfeldt W (1986): Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 63:492-498

Nauck MA, Heimesaat MM, Ørskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W (1993a): Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91:301-307

Nauck MA, Bartels E, Ørskov C, Ebert R, Creutzfeldt W (1993b): Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 76:912-917

Nauck MA, Kleine N, Ørskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W (1993c): Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 36:741-744

Nauck MA, Siemsglüss J, Ørskov C, Holst JJ (1996): Release of glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]), gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin in response to oral glucose after upper and lower intestinal resections. *Z Gastroenterol* 34:159-166

Nauck MA, Holst JJ, Willms B, Schmiegel W (1997a): Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) as a new therapeutic approach for typ 2-diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105:187-195

Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Ørskov C, Ritzel R, Schmiegel WH (1997b): Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol* 273:E981-E988

Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, Holst JJ, Nauck MS, Ritzel R, Hübner M, Schmiegel WH (2002): 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* 87:1239-1246

Nauck MA, Baller B, Meier JJ (2004): Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of typ 2 diabetes. *Diabetes* 53:190-196

Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, Shannon RP (2004a): Effects of glucagon like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation* 109:962-965

Nikolaidis LA, Elahi D, Hentosz T, Doverspike A, Huerbin R, Zourelas L, Stolarski C, Shen YT, Shannon RP (2004b): Recombinant gluacgon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in concious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110:995-961

Nikolaidis LA, Elahi D, Shen YT, Shannon RP (2005a): Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in concious dogs with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2401-H2408

Nikolaidis LA, Doverspike A, Hentosz T, Zourelas L, Shen YT, Elahi D, Shannon RP (2005b): Glucagon-like peptide-1 limits myocardial stunning following brief coronary occlusion and reperfusion in conscious canines. *J Pharmacol Exp Ther* 312:303-308

Oratz M, Rothschild MA, Schreiber SS (1970): Effects of dextran infusions on protein synthesis by hepatic microsomes. *Am J Physiol* 218:1108-1112

Ørskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS, Nielsen OV (1986): Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology* 119:1467-1475

Ørskov C, Holst JJ, Poulsen SS, Kierkegaard P (1987): Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. *Diabetologia* 30:874-881

Ørskov C, Holst JJ, Nielsen OV (1988): Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum and nonantral stomach. *Endocrinology* 123:2009-2013

Ørskov C, Wettergren A, Holst JJ (1993): Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide 1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes* 42:658-661

Ørskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. (1994): Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes* 43: 535-539

Parving HH, Rossing N (1973): Simultaneous determination of the transcapillary escape rate of albumin and IgG in normal and long-term juvenile diabetic subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 32:239-244

Parving HH, Ranek L, Lassen NA (1977): Increased transcapillary escape rate of albumin in patients with cirrhosis of the liver. *Scand J Clin Invest* 37:643-648

Patzelt C, Schiltz E (1984): Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5007-5011

Pauling L, Corey RB (1951): Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: Two new pleated sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 37:729-740

Pauling L, Corey RB, Branson HR (1951): The structure of proteins; Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 37:205-211

Perley MJ, Kipnis DM (1967): Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: Studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 46:1954-1962

Peters T Jr. (1985): Serum Albumin. *Adv Protein Chem* 37:161-245

Peters T Jr. : All about Albumin: Biochemistry, genetics and medical applications. Academic Press, London 1996

Plaisancie P, Bernard C, Chayvialle JA, Cuber JC (1994): Regulation of glucagon-like peptide-1(7-36)amide secretion by intestinal neurotransmitters and hormones in the isolated vascularly perfused rat colon. *Endocrinology* 135:2398-2403

Polonsky KS, Licinio-Paixao J, Given BD, Pugh W, Rue P, Galloway J, Karrison T, Frank B (1986): Use of biosynthetic human C-peptide in the measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and typ I diabetic patients. *J Clin Invest* 77:98-105

Quddusi S, Vahl TP, Hanson K, Prigeon RL, D'Alessio DA (2003): Differential effects of acute and extended infusion of glucagon-like peptide-1 on first- and second-phase insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Diabetes Care* 26:791-798

Raufmann JP, Singh L, Singh G, Eng J (1992): Truncated glucagon-like peptide-1 interacts with exendin receptors on dispersed acini from guinea pigs pancreas: Identification of a mammalian analogue of the reptilian peptide exendin-4. *J Biol Chem* 267:21432-21437

Roberge JN, Brubaker PL (1993): Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology* 133:233-240

Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, Knudsen LB (2002): The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increase beta-cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E745-E752

Rossing N (1978): Intra- and extravascular distribution of albumin and immunoglobulin in man. *Lymphology* 11:138-142

Rubin RJ, Altman WM, Medelson DN (1994): Health care expenditure for people with diabetes mellitus, 1992. *J Clin Endocrinol Metab* 78:809A-809F

Salera M, Pironi L, Giacomoni P, Venturi S, Capelli M, Miglioli M, Barbara L (1982): Effect of somatostatin on fasting and glucose-stimulated gastric inhibitory polypeptide release in man. *Digestion* 24:126-132

Samols E, Bonner-Weir S, Weir GC (1986): Intra-islet insulin-glucagon-somatostatin relationships. *Clin Endocrinol Metab* 15:33-58

Scheid P (1996): Säure-Basen-Gleichgewicht. In *Lehrbuch der Physiologie*, Hrsg: Klinke R und Silbernagel S, Thieme, Stuttgart/New York 1996 269-282

Schirra J, Katschinski M, Weidmann C, Schäfer T, Wank U, Arnold R, Goke B (1996): Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *J Clin Invest* 97:92-103

Schirra J, Kuwert P, Wank U, Leicht P, Arnold R, Göke B, Katschinski M (1997): Differential effects of subcutaneous GLP-1 on gastric emptying, antroduodenal motility, and pancreatic function in men. *Proc Assoc Am Physicians* 109:84-97

Schirra J, Leicht P, Hildebrand P, Beglinger C, Arnold R, Göke B, Katschinski M (1998a): Mechanisms of the antidiabetic actions of subcutaneous glucagon-like peptide-1(7-36)amide in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Endocrinol* 156:177-186

Schirra J, Sturm K, Leicht P, Arnold R, Göke B, Katschinski M (1998b): Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans. *J Clin Invest* 101:1421-1430

Schirra J, Nikolaus M, Craney C, Arnold R, Göke B, Katschinski M (2001): Regulation of antro-pyloro-duodenal and fundic motility by GLP-1(7-36)amide (GLP-1): Involvement of cholinergic pathways. *Gastroenterology* 120:A73-A74

Schirra J, Nikolaus M, Roggel R, Katschinski M, Storr M, Woerle HJ, Göke B (2006): Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antro-pyloro-duodenal motility in humans. *Gut* 55:243-251

Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W (1985): Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia* 28:704-707

Schumacher K, Winter G, Mahler HC (2003): Instabilitäten von Proteinarzneimitteln. *PZ Prisma* 1:15-18

Schwarzendrube J, Niederau M, Lüthen R, Niederau C (1991): Effects of cholecystokinin-receptor blockade on pancreatic and biliary function in healthy volunteers. *Gastroenterology* 100:1683-1690

Sokos GG, Nikolaidis LA, Mankad S, Elahi D, Shannon RP (2006): Glucagon-like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 12:694-699

Sokos GG; Bolukoglu H, German J, Hentosz T, Magovern GJ Jr, Maher TD, Dean DA, Bailey SH, Marrone G, Benckard DH, et al. (2007): Effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) on glycemic control and left ventricular function in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol* 100:824-829

Sollenne NP, Means GE (1979): Characterization of a specific drug binding site of human serum albumin. *Mol Pharmacol* 15:754-757

Sonne DP, Engstrøm T, Treiman M (2008): Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Regul Pept* 146:243-249

Standl T: Albumin. In: Volumenersatztherapie. Hrsg: Boldt J. Thieme, Stuttgart/New York 2001 39-61

Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM (2000): Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49:741-748

Stryer L: Biochemie, 3.Auflage, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft Heidelberg 1990

Strynadka NC, James MNG (1996): Lysozyme: A model enzyme in protein cristalography. *EXS* 75:185-222

Sudlow G, Birkett DJ, Wadem DN (1975): The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 11:824-832

Sudlow G, Birkett DJ, Wadem DN (1976): Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 12:1052-1061

Tang-Christensen M, Larsen PJ, Göke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Møller M, Sheik SP (1996): Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol* 271:R848-R856

Theodorakis MJ, Carlson O, Michopoulos S, Doyle ME, Juhaszova M, Petraki K, Egan JM (2006): Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E550-E559

Thim L, Moody AJ (1981): The primary structure of porcine glicentin (proglucagon). *Regul Peptid* 2:139-150

Thim L, Moody AJ (1982): Purification and chemical characterization of a glicentin-related pancreatic peptide (proglucagon fragment) from porcine pancreas. *Biochim Biophys Acta* 703:134-141

Thorens B (1992): Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8641-8645

Thorens B, Porret A, Buhler L, Deng SP, Morel P, Widmann C (1993): Cloning and functional expression of human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42:1678-1682

Toft-Nielsen MB, Madsbad S, Holst JJ (1999): Continuous subcutaneous infusion of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22:1137-1143

Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, Holst JJ (2001): Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3717-3723

Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, et al. (1996): A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379:69-72

Unger RH, Eisentraut AM (1969): Entero-insular axis. *Arch Intern Med* 123:261-266

Vahl TP, Paty BW, Fuller BD, Pigeon RL, D'Allesio DA (2003): Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1772-1779

Van Couter E, Mestrez F, Sturis J, Polonsky KS (1992) Estimation of insulin secretion rates from C-Peptide levels. Comparison of individual and standard kinetic parameters for C-Peptide clearance. *Diabetes* 41: 368-377

Van Eyll B, Lankat-Buttgereit B, Bode HP, Göke R, Göke B (1994): Signal transduction of the GLP-1- receptor cloned from a human insulinoma. *FEBS Lett* 348:7-13

Vilsbøll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001): Reduced postprandial concentrations of Intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50:609-613

Vilsbøll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ (2002): Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Typ II diabetic patients. *Diabetologia* 45:1111-1119

Vilsbøll T, Agersø H, Krarup T, Holst JJ (2003a): Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:220-224

Vilsbøll T, Krarup T, Sonne J, Madsbad S, Vølund A, Juul AG, Holst JJ (2003b): Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Metab* 88:2706-2713

Vincent JL, Wilkes MM, Navickis RJ (2003): Safety of human albumin – serious adverse events reported worldwide in 1998 – 2000. *Br J Anaesth* 91: 625-630

Violant BN, Siegel NR (2000): Protein and peptide chemical and physical stability. In: *Peptide and protein drug analysis*. Hrsg: Reid, RE. Marcel Dekker Inc; New York 2000 257-285

Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, Meier JJ (2008): Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* 57:678-687

Volz A, Göke R, Lankat-Buttgereit B, Fehmann HC, Bode HP, Göke B (1995): Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma. *FEBS Lett* 373:23-29

Vroman L, Adams AL, Klings M, Fischer GC, Munoz PC, Solensky RP (1977): Reactions of formed elements of blood with plasma proteins at interfaces. *Ann NY Acad Sci* 283:65-76

Wang W (2005): Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm* 289:1-30

Wang Z, Wang RM, Owij AA, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR (1995): Glucagon-like peptide-1 is a physiological incretin in rat. *J Clin Invest* 95:417-412

Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ (1993): Truncated GLP-1(proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci* 38:665-673

Wettergren A, Wøjdemann M, Meisner S, Stadil F, Holst JJ (1997): The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation. *Gut* 40:597-601

Wei Y, Mojsov S (1995): Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-1: Brain, heart, pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett* 358:219-224

Wheeler MB, Lu M, Dillon JS, Leng XH, Chen C, Boyd AE 3rd (1993): Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. *Endocrinology* 133:57-62

Wheeler MB, Gelling RW, McIntosh CH, Georgiou J, Brown JC, Pederson RA (1995): Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signalling properties. *Endocrinology* 136:4629-4639

Wild D: The immunoassay handbook. 3.Auflage. Elsevier Science publishing company, Amsterdam,Boston,Oxford 2005

Wilkes MM, Navickis RJ (2001): Patient survival after human albumin administration. A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med* 135:149-164

Willms B, Werner J, Holst JJ, Ørskov C, Creutzfeld W, Nauck MA (1996): Gastric emptying, glucose response, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81:327-332

Xiao MH, Daniel CC (1992): Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358:209-215

Yalow RS, Berson SA (1959): Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184:1648-1649

Yamamoto H, Lee CE, Marcus JN, Williams TD, Overton JM, Lopez ME, Hollenberg AN, Baggio L, Saper CB, Drucker DJ, et al. (2002): Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increased blood pressure, and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *J Clin Invest* 110:43-52

Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M (1996): Characterization of a site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochem Biophys Act* 1295:147-157

Yamasaki K, Maruyama T, Yoshimoto K, Tsutsumi Y, Narazaki R, Fukuhara A, Kragh-Hansen U, Otagiri M (1999): Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect on the neutral-to-base transition. *Biochem Biophys Acta* 1432: 313-323

Yanaihara C, Matsumoto T, Hong YM, Yanaihara N (1985): Isolation and chemical characterization of glicentin C-terminal hexapeptide in porcine pancreas. FEBS Lett 189:50-56

Yang H, Egan JM, Wang Y, Moyes CD, Roth J, Montrose MH, Montrose-Rafizadeh C (1998): GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different from pancreatic GLP-1 receptor. Am J Physiol 275:C675-C683

Zander M, Madsbad S, Deacon CF, Holst JJ (2006): The metabolite generated by dipeptidyl-peptidase 4 metabolism of glucagon-like peptide-1 has no influence on plasma glucose levels in patient with type 2 diabetes. Diabetologia 49:369-374

Zhu L, Yang F, Chen L, Meehan E, Huang M (2008): A new drug binding subsite on human serum albumin an drug-drug interaction studied by X-ray crystallography. J Struct Biol 162: 40-49

Zimmer A (2003): Problem Arzneistoffstabilität. Galenische Formulierung rekombinanter Wirkstoffe. Pharm Unserer Zeit 32:384-389

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Nauck, der es mir ermöglichte unter seiner Leitung und mit seiner Hilfe sowohl die klinischen Experimente durchzuführen, als auch aus den daraus gewonnenen Ergebnissen diese Dissertation zu erarbeiten. Ich verdanke ihm viele konstruktive Anregungen bei der Durchführung der Untersuchungen und bei der Anfertigung der Dissertation.

Darüber hinaus möchte ich Frau Dr. med. Andrea El-Ouaghli namentlich erwähnen, die insbesondere während der technischen Vorbereitungszeit der Untersuchungen eine große Hilfe war.

Wesentliche Unterstützung bei der Rekrutierung der Probanden und bei der Durchführung der Versuche erhielt ich vom „Forschungsteam“ des Stoffwechsellabors des Diabeteszentrums Bad Lauterberg. Namentlich seien hier Frau Brigitte Nawrodt und Frau Katharina Rotenberger genannt, denen mein besonderer Dank gilt.

Für die hervorragende Zusammenarbeit danke ich auch dem gesamten Team des Zentrallabors des Diabeteszentrums Bad Lauterberg, wobei ich hier stellvertretend für alle die Leiterin Frau Sabine Schminkel nennen möchte.

Hilfe und vielfältige Anregungen erhielt ich auch von der Leiterin des Projektes der Firma Novartis Frau Lise Kjems (M.D., Ph.D., Senior Director, Translational Medicine, Novartis), die mir in vielen Telefonkonferenzen und E-mails mit Rat und Tat zur Seite stand.

Unterstützung erhielt ich auch aus Berlin durch Matthias Broschag, der bei der Firma Parexel dieses Projekt im Rahmen der Vorbereitung auf eine nachfolgende Studie begleitete.

Ebensolcher Dank gilt den Mitarbeitern des Labors von Prof. Dr. med. Jens J. Holst und Dr. rer. nat. Carolyn Deacon am Institut für Medizinische Physiologie der Universität Kopenhagen einschließlich all ihrer Mitarbeiter.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Diabeteszentrums Bad Lauterberg, die mir immer hilfreich zur Seite standen und mich tatkräftig unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt letztendlich den Probanden, die sich für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben und so diese Arbeit ermöglichten.

Dank auch allen „Korrekturlesern“, insbesondere meiner Frau Vanessa Köthe.

Lebenslauf

Am 24.04.1970 wurde ich als zweites Kind in der Ehe des Arztes Dr. med. Erwin Köthe und der Erzieherin Ulla Köthe, geb. Rögner, in Marburg an der Lahn geboren.

In Bad Harzburg besuchte ich von 1976-1980 die Gerhardt-Hauptmann Grundschule, von 1980-1982 die Orientierungsstufe Deilich, von 1982-1984 das Werner-von-Siemens Gymnasium, von 1984-1987 das Burgberggymnasium, um dann von 1987 bis 1990 auf das Niedersächsische Internatsgymnasium zu wechseln, wo ich mit der allgemeinen Hochschulreife meine Schulausbildung abschloss.

Von 1990 bis 1994 studierte ich an der Universität Hannover Lehramt für Realschule (Sport/Geographie), an der Universität Göttingen (Dipl. Geographie) und an der Fachhochschule Oldenburg (Geodäsie), ohne einen Abschluss zu erreichen.

1994 begann ich eine Ausbildung zum Physiotherapeuten an der Fachschule für Physiotherapie Dr. Muschinsky in Bad Lauterberg und schloss diese 1997 mit dem Staatsexamen ab.

Im Herbst 1997 nahm ich mein Medizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen auf.

Im Frühjahr 2001 bestand ich den I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und den II. Abschnitt absolvierte ich erfolgreich im Frühjahr 2003.

Das praktische Jahr verbrachte ich im St. Martini Krankenhaus in Duderstadt und mein Wahlfach Psychiatrie absolvierte ich in der Psychiatrie des Universitätsklinikums Göttingen

Den III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung habe ich am 25.05.2004 am Universitätsklinikum Göttingen abgelegt.

Von 07/2004 bis 06/2005 arbeitete ich als Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Krankenhaus St. Martini in Duderstadt und wechselte danach von 07/2005 bis 06/2006 in das Landeskrankenhaus in Göttingen in die Psychiatrie als Assistenzarzt. Anschließend absolvierte ich eine chirurgisch-orthopädische Weiterbildung von 07/2006 bis 12/2006 im Fritz König Stift Bad Harzburg. 12/2006 wechselte ich an das Diabeteszentrum Bad Lauterberg und arbeitete sowohl in der klinischen Forschung, als auch als Assistenzarzt in der internistisch-diabetologischen Weiterbildung. Von Juli 2010 bis September 2010 arbeitete ich für drei Monate als internistischer Weiterbildungsassistent im Stadt- und Kreiskrankenhaus Witzenhausen, um dann im Oktober 2010 ins Diabeteszentrum zurückzukehren.