

Aus dem
**Institut für Klinische Diabetologie des
Deutschen Diabetes-Zentrums
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Michael Roden

und dem Institut für Epidemiologie des Helmholtz Zentrums München,
Deutsches Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg

Direktor: Prof. Dr. Dr. H.-Erich Wichmann

**Der Einfluss erhöhter Glukosekonzentrationen auf die
Produktion von Interleukin-6 *in vivo* und *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Niclas Kempkes

2011

Als
Inauguraldissertation
gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Stephan Martin
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Sven Schinner

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1 Typ 2 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.2 Definition des Diabetes mellitus	1
1.1.3 Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus und seiner Vorstufen	2
1.1.4 Epidemiologie des Diabetes mellitus	2
1.1.5 Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus	4
1.2 Subklinische Inflammation und Typ 2 Diabetes mellitus	6
1.2.1 Komponenten des Immunsystems und deren Aufgaben	6
1.2.2 Die Rolle der Zytokine im Immunsystem	7
1.2.3 Interleukin-6 (IL-6)	9
1.2.4 Die Verbindung zwischen Ernährung und Immunsystem	10
1.2.4.1 Die Rolle von Nahrungsmittelkomponenten, insbesondere Glukose, in der Pathogenese des T2D	11
1.2.4.2 Zelluläre Mechanismen der glukoseinduzierten Immunantwort	12
1.2.4.3 Immunmarker als Einflussfaktor in der Pathogenese des T2D	12
1.3 Ziele dieser Arbeit	14
2. <u>Material, Methoden und Probanden</u>	16
2.1 Material	16
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2 Geräte	17
2.1.3 Reagenzien/ Stimulantien	17
2.1.4 Zellkultur	18
2.1.4.1 Medien	18
2.1.5 ELISA	18
2.1.6 Sterilisation der Chemikalien und Geräte	19
2.1.7 Stammlösungen und –puffer	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Probandenkollektive	20
2.2.1.1 In vitro-Versuche	20

2.2.1.2	KORA Survey 4 (KORA S4)	20
2.2.1.2.1	Laborbestimmungen	22
2.2.1.2.2	Definition des metabolischen Syndroms nach IDF und NCEP ATP III	23
2.2.2	Glukosebelastung in vivo mittels oGTT in KORA-S4	24
2.2.3	In vitro Untersuchung	25
2.2.3.1	Herstellung der Vollblutkultur und Stimulation im Zellkulturröhrchen	25
2.2.3.2	Herstellung der Vollblutkultur und Stimulation in der Zellkultturplatte	26
2.2.3.3	Isolierung von PBMC aus Lithium-Heparinat-Vollblut	27
2.2.3.4	Bestimmung der Toxizität von Desferrioxamin bei PBMC mittels des MTT-Tests	29
2.2.3.5	Bestimmung der Glukosekonzentration in vitro	29
2.2.4	ELISA	30
2.2.4.1	Protokoll für Interleukin-6 Zytokin-ELISA	31
2.2.5	Statistische Auswertung	33
3.	<u>Ergebnisse</u>	34
3.1	Wirkung von Glukose auf die Leukozyten in vitro	34
3.1.1	Wirkung von LPS auf die IL-6 Produktion in der Vollblutkultur	35
3.1.2	Einfluss der Inkubationsdauer und verschiedener Glukosespiegel auf die IL-6 Produktion in der Vollblutkultur	37
3.1.3	Hypoxie als Einflussfaktor auf die IL-6 Produktion	40
3.1.3.1	Bestimmung der Toxizität des Derferrioxamin mittels des MTT-Tests	41
3.1.3.2.	Einfluss von Desferrioxamin und Glukose auf die IL-6 Produktion in der Vollblutkultur	42
3.1.4	Demographische und klinische Charakteristika der Studienpopulation der in vitro-Experimente	46
3.2	Wirkung von Glukose auf die IL-6 Spiegel in vivo	47
3.2.1	Demographische und klinische Charakteristika der KORA S4-Studienpopulation	48
3.2.2	IL-6 Spiegel im Serum vor und nach einem oralen Glukosetoleranztest (oGTT) bei Probanden mit normaler Glukosetoleranz	50
3.2.3	Demographische und klinische Charakteristika von Probanden mit normaler Glukosetoleranz (NGT) stratifiziert nach dem IL-6 Verlauf im oGTT	51
3.2.4	IL-6 Spiegel im Serum vor und nach einem oralen Glukosetoleranztest (oGTT) bei Probanden mit gestörter	54

	Glukosetoleranz (IGT)	
3.2.5	Demographische und klinische Charakteristika von Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT) stratifiziert nach dem IL-6 Verlauf oGTT	55
3.2.6	Einfluss des metabolischen Syndroms nach der Definition der IDF oder des NCEP-ATP III auf den IL-6 Verlauf im oGTT bei Personen mit normaler Glukosetoleranz (NGT)	57
3.2.6.1	Demographische und klinische Eigenschaften der Personen mit und ohne metabolischem Syndrom	58
4.	<u>Diskussion</u>	61
4.1	Einleitung	61
4.2	Glukoseinduzierte IL-6 Produktion in vitro	62
4.3	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der IL-6 Produktion in vitro	64
4.4	Hypoxie induziert die IL-6 Produktion	66
4.5	Interindividuelle Unterschiede der Zytokinsekretion	69
4.6	IL-6 Sekretionsmuster IGT vs. NGT	70
4.7	IL-6 Sekretionsmuster in Abhängigkeit vom metabolischen Syndrom	72
4.8	Weiterführende Überlegungen	74
5.	<u>Literaturverzeichnis</u>	75
6.	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	89
7.	<u>Danksagungen</u>	91
	<u>Lebenslauf</u>	92
	<u>Zusammenfassung</u>	93

1. Einleitung

1.1 Typ 2 Diabetes mellitus

1.1.1 Diabetes mellitus

Der Typ 2 Diabetes mellitus zählt aufgrund seiner hohen Prävalenz und seiner immensen Folgeschäden zu den wichtigsten Erkrankungen der heutigen Zeit und stellt eine große Belastung für das Gesundheitssystem dar. Die genauen Mechanismen der Krankheitsentstehung in ihrer Frühphase zu verstehen und präventive Maßnahmen vor Ausbruch der Erkrankung zu ergreifen sind zentrale Aufgaben, die von der heutigen Gesellschaft und insbesondere der heutigen Medizin zu bewältigen sind.

1.1.2 Definition des Diabetes mellitus

Seit 1997 gilt bei der Einteilung des Diabetes mellitus die von der amerikanischen Diabetes Gesellschaft (American Diabetes Association; ADA) vorgeschlagene¹ und von der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) übernommene Klassifikation². Diese unterteilt die verschiedenen Diabetes-Formen anhand ihrer unterschiedlichen Ätiologie in vier Unterformen.

Unter die erste Kategorie fällt der Typ 1 Diabetes, welcher durch eine autoimmun vermittelte Zerstörung der Insulin produzierenden β -Zellen des Pankreas gekennzeichnet ist, was zu einem absoluten Insulinmangel führt. Aufgrund dieses absoluten Mangels wurde diese Form früher auch als Insulin abhängiger Diabetes mellitus bezeichnet (IDDM). Die nächste Kategorie umfasst den Typ 2 Diabetes (T2D). Dieser Typ ist die häufigste Form des Diabetes im Erwachsenenalter. Ätiologisch steht bei dieser Form eine variable Kombination von Insulinresistenz bedingt durch Überernährung sowie Bewegungsmangel, eine Hyperinsulinämie sowie ein relatives Insulin-Sekretionsdefizit im Vordergrund. Diese Form des Diabetes wurde auch als nicht Insulin abhängiger Diabetes mellitus (NIDDM) bezeichnet. Unter der dritten Kategorie werden andere spezifische Diabetes-Typen zusammengefasst. Darunter fallen genetische Defekte der Betazelle, der Insulinwirkung, Endokrinopathien und Erkrankungen des exokrinen Pankreas. Außerdem werden auch Medikamenten-

induzierte Formen des Diabetes und ein Insulinmangel aufgrund einer Pankreatitis in dieser Gruppe subsumiert. Die vierte Kategorie bildet der Gestationsdiabetes, der durch eine erstmalig in der Schwangerschaft auftretende Zuckerfehlverwertung gekennzeichnet ist und mit einem hohen Risiko für das Auftreten eines späteren T2D verbunden ist.

1.1.3 Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus und seiner Vorstufen

Bei gesunden Menschen wird der Blutzuckerspiegel in geringen Schwankungen auf dem gleichen Niveau gehalten. Der Diabetes mellitus ist definiert als eine chronische Hyperglykämie im Blut des Patienten. Um einen Diabetes mellitus zu diagnostizieren, wurden im Jahre 2004 von der DDG die für Deutschland gültigen Diagnosekriterien eingeführt. Treten bei einem nicht nüchternen Patienten bei einer Blutentnahme Glukose-Werte über 200 mg/dl auf und hat dieser Patient noch zusätzlich Symptome einer Hyperglykämie wie z.B. Polydipsie oder Polyurie, so besteht laut Definition ein Diabetes mellitus. Gleiches gilt für einen dreimalig nachgewiesenen Plasmaglukosewert von ≥ 126 mg/dl bei einer im nüchternen Zustand abgenommenen Blutprobe, wobei Nüchternheit definiert ist als eine fehlende Nahrungsaufnahme für mindestens 8 Stunden. Werte zwischen ≥ 100 bis 125 mg/dl werden als erhöhte Nüchtern-Glukose (impaired fasting glucose; IFG) klassifiziert. Mittels einer definierten Gabe von 75 g Glukose in wässriger Lösung im Rahmen eines oralen Glukosetoleranztests (oGTT) lassen sich bisher unentdeckte Glukose-Verwertungsstörungen aufdecken. Wenn der Wert der Plasmaglukose nach zwei Stunden über 200 mg/dl liegt, ist dies ebenfalls als Diabetes mellitus definiert. Personen, die Nüchtern-Plasmaglukosewerte < 126 mg/dl und gleichzeitig einen 2 Stunden oGTT-Wert zwischen ≥ 140 -199 mg/dl aufweisen, fallen in die Kategorie der Personen mit gestörter Glukosetoleranz (impaired glucose tolerance; IGT).

1.1.4 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen des Menschen. Weltweit hat der Diabetes mellitus mittlerweile epidemische Ausmaße angenommen. Schätzungen zufolge betrug die Anzahl der Personen im Erwachsenenalter mit einem Diabetes mellitus im Jahre 2000 ungefähr 171

Millionen³. In einer älteren, konservativeren Schätzung wurde eine Zahl von 154 Millionen Personen mit einem Diabetes mellitus⁴ angegeben, obwohl diese Studie von einer größeren Weltbevölkerung ausging. In den letzten drei Dekaden konnte ein explosionsartiger Zuwachs der Diabetesprävalenz beobachtet werden, der zu einem Anstieg der Diabetiker weltweit auf aktuell 246 Millionen Menschen führte. Schätzungen der International Diabetes Federation (IDF) zufolge steigt die Zahl bis zum Jahre 2025 auf 334 Millionen Menschen⁵.

Aufgrund der hohen Prävalenz des Diabetes und dem Auftreten von Folgeschäden, die durch die Erkrankung bedingt sind, zählt er zu den kostenintensivsten Erkrankungen in westlichen Gesundheitssystemen. In Deutschland machten im Jahr 2000 die Ausgaben für Diabetiker im Gesundheitssystem 14,2% des Gesamt-Etats aus, was 30,6 Milliarden Euro entspricht. Pro Kopf betragen die direkten und indirekten Kosten für einen Diabetiker 10.281 Euro im Vergleich zu 6.446 Euro für Personen, die keinen Diabetes hatten⁶. Zusätzlich zu diesen wirtschaftlichen Einbußen kommen auch die immateriellen Kosten, die der Diabetes bei den Menschen verursacht, wie der Verlust von Lebensqualität und die Konsequenzen, die sich aus den Folgeerkrankungen wie Makroangiopathien, Herzinfarkt, Schlaganfall, die diabetische Retino- und Glomerulopathie, diabetische Neuropathien sowie das diabetische Fuß-Syndrom ergeben. Der Hauptteil (90 Prozent) des Zuwachses in der Prävalenz wird durch den Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) verursacht⁷. In Deutschland konnte durch die populationsbasierte KORA-Studie (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) gezeigt werden, dass die Prävalenz des Diabetes im Alter von 55-74 Jahren bei 16,6 Prozent lag, wobei 8,2 Prozent einen bisher nicht bekannten Diabetes mellitus hatten. Das entspricht einer Dunkelziffer von 50 Prozent in dieser Altersgruppe in Deutschland⁸. Das bedeutet, dass in Deutschland nach den Daten aus der KORA-Studie ca. 1,5 Millionen Menschen im Alter zwischen 55 und 74 Jahren mit einem undiagnostizierten T2D leben. Diese Zahlen sind deutlich höher als die bis dahin angenommene Prävalenz des undiagnostizierten Diabetes von 1 Prozent⁹.

Darüber hinaus besteht bei nur etwa 60 Prozent der 55 bis 74jährigen ein normaler Zuckerstoffwechsel, die Übrigen litten bereits an sogenannten prädiabetischen Formen des Diabetes, wie der erhöhten Nüchtern glukose oder der gestörten Glukosetoleranz (IFG; IGT). So wurde eine gestörte Glukosetoleranz (IGT) bei 16 Prozent der 55 bis 74 Jährigen gefunden. Von

diesen werden schätzungsweise etwa 6 bis 8 Prozent innerhalb eines Jahres einen manifesten Typ 2 Diabetes entwickeln¹⁰. In der KORA-Studie konnte gezeigt werden, dass das Risiko einen Diabetes mellitus zu entwickeln bei Personen mit einer gestörten Glukosetoleranz und erhöhten Nüchtern-glukose-Werten innerhalb von sieben Jahren im Vergleich zu Personen ohne Glukoseverwertungsstörung fast 22-fach erhöht ist, so dass festzuhalten ist, dass Personen mit einer IGT/IFT eine Hochrisikogruppe für die Entwicklung eines T2D darstellen¹¹.

1.1.5 Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus

Der Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) wird hervorgerufen durch eine Kombination einer Insulinresistenz an Leber-, Fett- und Muskelzellen sowie einer inadäquaten Insulinsekretion der pankreatischen β -Zellen¹². Obwohl es zunächst zu einer relativen Steigerung der Insulinsekretion und zu einer Vermehrung der β -Zellmasse kommt, fällt die Kapazität der Insulinsekretion nach Jahren kontinuierlich ab, was zu einer Manifestation des T2D führt (s. Abb. 1)¹³. Sowohl bei der peripheren Insulinresistenz als auch bei der inadäquaten Insulinsekretion spielen immunologische und inflammatorische Faktoren eine Rolle¹⁴. Schon früh konnte gezeigt werden, dass bei einem Diabetes mellitus Konzentrationen von inflammatorischen Markern wie Alpha-2-Makroglobulin, Haptoglobin, Alpha-1-Antitrypsin, Fibrinogen, Coeruloplasmin und C-reaktives Protein (CRP) im Blut erhöht waren¹⁵⁻¹⁷. Die gemessenen Konzentrationen der Akut-Phase-Proteine und der Zytokine lagen jedoch weit unter den Konzentrationen, die bei akuten Infektionen beobachtet werden können^{18,19}, so dass man in diesem Zusammenhang von einer subklinischen systemischen Inflammation spricht. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der subklinischen Inflammation und dem Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) wurde erstmals 1997/1998 postuliert^{20,21}. Auch wenn einige Autoren davon ausgehen, dass die inflammatorischen Veränderungen als Folge des Diabetes mellitus zu sehen seien²², kann dem entgegengehalten werden, dass in vielen prospektiven Studien gezeigt werden konnte, dass bereits Jahre vor der Entwicklung einer gestörten Glukosetoleranz oder eines T2D eine subklinische systemische Inflammation nachzuweisen war und dass diese die Erkrankung unabhängig von klassischen Risikofaktoren prädictieren kann^{20,23,24}. So kann die Assoziation zwischen gesteigerten IL-6 Spiegel und dem Auftreten

eines T2D oder dessen Vorläufer, der IGT, klar belegt werden²³. Zytokine und Chemokine, die mit Diabetes mellitus assoziiert sind, wirken auf pathogenetische Faktoren des T2D. Erhöhte Interleukin (IL)-6 Spiegel führen in vitro in Hepatozyten, Skelettmuskelzellen und Fettgewebe zu einer Verstärkung der Insulinresistenz²⁵⁻²⁷. Auch erhöhte TNF- α Spiegel führen zu einer Induktion der Insulinresistenz^{28,29}. Lebensstilfaktoren wie hochkalorische Ernährung, Bewegungsmangel und psychosozialer Stress scheinen eine wesentliche Rolle in der Aktivierung der subklinischen Inflammation und der Induktion der Insulinresistenz zu spielen³⁰. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhten Zytokinspiegeln und Betazelltod hergestellt werden. In Experimenten wurde dargestellt, dass in pankreatischen Inseln von Patienten mit T2D eine erhöhte Anzahl von Immunzellen, insbesondere Makrophagen, zu finden sind. Zusätzlich wurde eine vermehrte Sekretion der Zytokine IL-6, IL-1 β , G-CSF (Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) und IL-8 gefunden. IL-8 spielt eine wesentliche Rolle bei der Migration der Immunzellen in die Inseln, und IL-1 β scheint eine wichtige Rolle in der Regulation der Inflammation in den Inselzellen zu haben^{31,32}. Einen weiteren Beleg, der dafür spricht, dass die Inflammation eine kausale Rolle in der Pathogenese des T2D hat, liefern Experimente, in denen eine Behandlung mit einer Hochdosis-Aspirin-Therapie als anti-inflammatorische Behandlung zu einer Reduktion der Nüchtern glukose um ca. 25 Prozent geführt haben^{33,34}. Außerdem konnte durch die Behandlung mit dem IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra[®] eine Reduktion des HbA1c-Wertes sowie eine Steigerung der Betazellfunktion bei Patienten mit einem T2D erzielt werden³⁵. In einem weiteren Experiment führte die Behandlung mit dem anti-inflammatorischen Medikament Salsalat zu einer Reduktion der Glykämie, des CRP-Spiegels und des C-Peptids sowie zu einer gesteigerten Sekretion von Adiponektin bei jungen übergewichtigen Probanden³⁶.

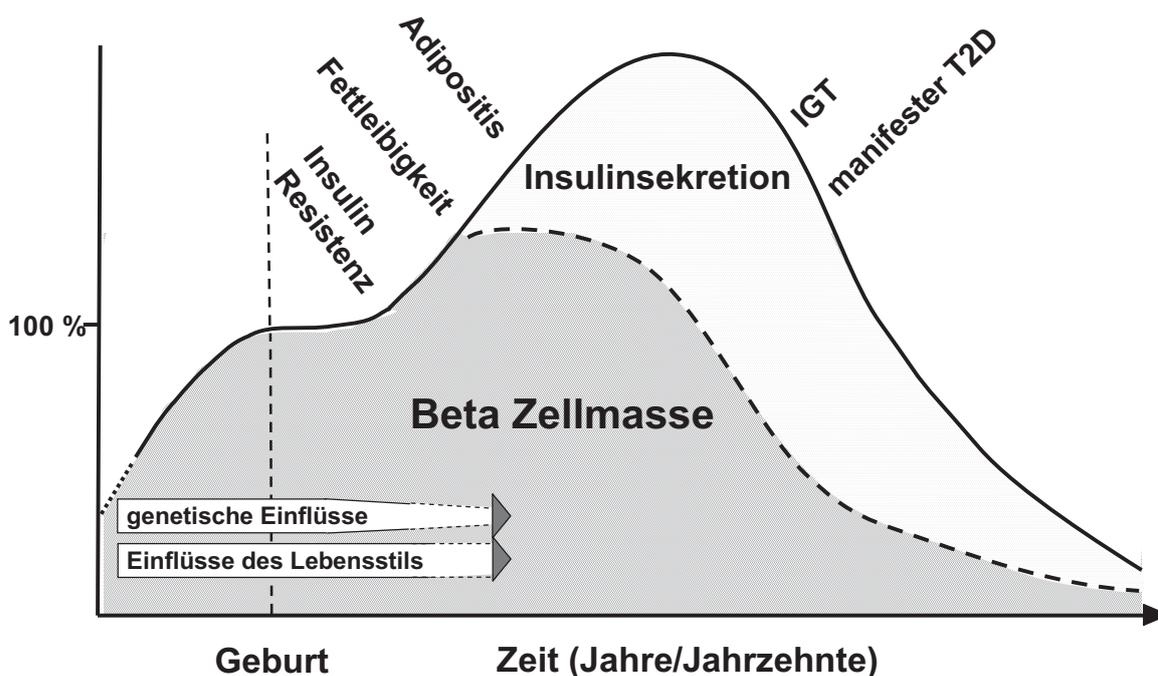


Abb. 1 Natürlicher Verlauf des Typ 2 Diabetes mellitus

vereinfacht und generalisiert dargestellt. Modifiziert nach Kempf K.³⁷

1.2 Subklinische Inflammation und Typ 2 Diabetes mellitus

1.2.1 Komponenten des Immunsystems und deren Aufgaben

Um die enge Verknüpfung des T2D mit Veränderungen des Immunsystems zu verstehen, sollen zu diesem Zweck die grundlegenden Komponenten des Immunsystems und deren Aufgaben im menschlichen Körper dargestellt werden. Das Immunsystem des Menschen hat die Aufgabe, den Organismus vor äußerlichen Krankheitserregern zu schützen. Um diese Aufgabe zu erfüllen, basiert das Immunsystem auf zwei unterschiedlichen Komponenten. Zum einen hat die angeborene oder auch natürliche Immunität die Aufgabe der schnellen, dafür aber auch relativ unspezifischen Abwehr gegen eingedrungene Fremdorganismen im Körper. Zum anderen kommt es bei der adaptiven oder erworbenen Immunität zu einer Reaktion auf Mikroorganismen, die erst zeitverzögert im Vergleich zu der natürlichen Immunität erfolgt, dafür jedoch hochspezifisch für den jeweiligen Fremdorganismus ist. Sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität des Menschen stehen bei der Abwehr gegen Krankheitserreger zelluläre Mechanismen und lösliche Abwehrstoffe zur Verfügung. Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen und Natürlichen

Killer (NK)-Zellen kommt die Aufgabe der zellulären Abwehr des angeborenen Immunsystems zu, während T-Lymphozyten das zelluläre Pendant der erworbenen Immunität darstellen. Die löslichen Faktoren der natürlichen Immunität bestehen aus dem Komplement-System, das unspezifisch an Oberflächen fremder Organismen bindet und dort eine proteolytische Enzymkaskade auslöst, sowie eine weitere Vielzahl von sezernierten Enzymen. Die von den B-Lymphozyten hergestellten Antikörper sind Produkte der erworbenen Immunität, die in der Lage sind, hochspezifisch an der Oberfläche von Fremdkörpern zu binden. Trotz der Unterscheidung in natürliche und erworbene Immunität sind diese Komponenten nicht strikt voneinander getrennt zu betrachten. Erst ein komplexes Ineinandergreifen beider Systeme und das Wechselspiel der Einzelkomponenten kann eine gezielte und effiziente Immunabwehr gewährleisten. Eine besondere Bedeutung in der Abstimmung der einzelnen Immunreaktionen haben hierbei insbesondere die Zytokine, die eine Art Regulierungs- und Vermittlerfunktion des Immunsystems innehaben³⁸.

1.2.2 Die Rolle der Zytokine im Immunsystem

Der Begriff „Zytokine“ beschreibt eine heterogene Gruppe von löslichen Proteinen, die als humorale Regulatoren Einfluss auf einzelne Zellen und Gewebeverbände nehmen. Diese Mediatoren sind praktisch in jede systemische Reaktion des menschlichen Körpers, wie z.B. die Regulation der Immunantwort, Embryogenese und Organentwicklung, Angiogenese³⁹, Hämatopoese⁴⁰ und Wundheilung involviert. Außerdem sind Zytokine in der Lage, eine Zell-Apoptose einzuleiten bzw. zu verhindern. Ihre Wirkung entfalten Zytokine über autokrine, parakrine und juxtakrine Weise. Die biologische Aktivität einiger Zytokine erfolgt zusätzlich auch über eine hormonähnliche Wirkweise. Im Gegensatz zu Hormonen werden Zytokine jedoch nicht von spezialisierten Zellen und Geweben produziert, sondern können von vielen verschiedenen Zellen des Körpers wie z.B. Makrophagen, Endothelzellen⁴¹, epithelialen Zellen⁴², Adipozyten^{28,43} und Fibroblasten⁴⁴ auf einen Stimulus wie z.B. einen eingedrungenen Mikroorganismus⁴⁵ produziert und sezerniert werden. Da die Zytokinrezeptoren eine besonders hohe Affinität zu ihren jeweiligen Zytokinen besitzen, liegt die Konzentration der sezernierten Stoffe meist im Bereich von Nanogramm bzw. Pikogramm pro Milliliter.

Dringt ein Fremdorganismus in den Körper ein, trifft er zunächst auf die humorale und zelluläre Abwehr des angeborenen Immunsystems. Die zellulären Bestandteile der angeborenen Immunität mit phagozytotischer Aufgabe (Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen) werden als antigenpräsentierende Zellen zusammengefasst (APC). Die APC erkennen Fremdorganismen über sogenannte Pattern Recognition Rezeptoren (PRR), die hochkonservierte Anteile der Zellmembranen wie z.B. das Lipopolysaccharid (LPS) von Fremdorganismen binden⁴⁶. Diese Rezeptoren haben zwei Hauptaufgaben. Zum einen leiten sie die Internalisierung/Phagozytose des Fremdorganismus ein und zum anderen werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst. APC haben die Aufgabe, den Fremdorganismus zu phagozytieren, intrazellulär abzubauen und Teile des Fremdorganismus auf ihrer Oberfläche den Zellen der adaptiven Immunität zu präsentieren. Desweiteren wird eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in Gang gesetzt. Die APC präsentieren die Antigene über den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex II (MHC-II), wobei die Kombination von MHC-II und Antigen von für das jeweilige Antigen spezifischen T-Zellrezeptoren erkannt wird. Kommt es zu einer Bindung von MHC-II und T-Zellrezeptor sowie weiteren Oberflächenmolekülen, führt dies zu einer Aktivierung des CD4⁺-T-Lymphozyten. Die aktivierten T-Zellen sezernieren Zytokine, die wiederum Makrophagen, B-Zellen, zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen aktivieren können (s.u.). APC stellen somit eine Verbindung zwischen natürlicher und erworbener Immunität her (s. Abb. 2).

Verschiedene Zytokine steuern die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort in unterschiedliche Richtungen. Bei den in der zellulären erworbenen Immunantwort beteiligten spezifischen T-Zellen, den sogenannten T-Helferzellen, unterscheidet man zwei verschiedene Zelltypen, T_H1- und T_H2-Zellen, die zu unterschiedlichen Immunantworten führen. Während T_H1-Zellen über die Sekretion der Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und IL-2 zu einer zellulären Immunantwort unter Beteiligung der T-Zellen und Makrophagen führen, kommt es bei T_H2-Zellen eher zu einer Antikörper-vermittelten Immunantwort durch B-Zellen, gesteuert über Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13^{47,48}.

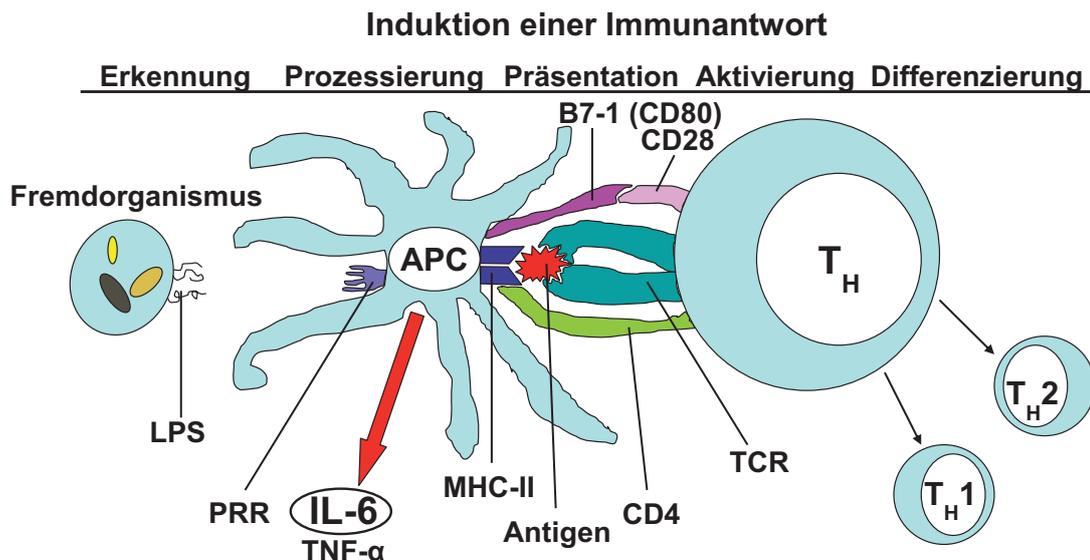


Abb. 2 Darstellung der Induktion einer Immunantwort

Schematische und vereinfachte Darstellung modifiziert nach Pleyer und Ritter⁴⁹. APC= antigenpräsentierende Zelle; T_H= T-Helferzelle; TCR= T-Zell-rezeptor; MHC-II= Haupthistokompatibilitäts-Komplex II; IL-6= Interleukin-6; TNF-α=Tumornekrosefaktor-α; PRR= Pattern Recognition Rezeptor; LPS= Lipopolysaccharid; CD= cluster of determination

1.2.3 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ein Protein aus 184 Aminosäuren. Sein Molekulargewicht hängt von posttranslationalen Veränderungen ab und liegt zwischen 21,5 und 28 kDa. Es wird von verschiedensten Zellen im menschlichen Körper hergestellt. Darunter befinden sich Immunzellen und mesenchymale Zellen wie Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Muskelzellen⁵⁰, Keratinozyten⁵¹, Lymphozyten und Gliazellen⁵². Aber auch das Fettgewebe und insbesondere die in ihm enthaltenen Makrophagen stellen einen wichtigen Herstellungsort für das IL-6 dar^{43,53,54}. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem große Fettzellen mehr Zytokine herstellen als kleinere Fettzellen⁵⁵. Die IL-6 Spiegel sind positiv mit dem Body-Mass-Index und dem Taillenumfang assoziiert⁵⁶. Ein weiterer Sekretionsreiz ist körperliche Aktivität. Es kommt nach sportlichen Betätigungen bzw. Muskelarbeit zu einer physiologischen Freisetzung von IL-6 aus Muskelzellen^{50,57} und aus dem Fettgewebe⁵⁸. Diese Freisetzung wird durch die Gabe von Glukose vor den Aktivitäten abgeschwächt^{50,58}. IL-6 wirkt besonders auf die Herstellung von Akut-Phase-Proteinen in der Leber, wie z.B. CRP, Serumamyloid A, Fibrinogen, Haptoglobin, Coeruloplasmin und

Komplement-Faktoren. Desweiteren führt es zu einer Differenzierung von aktivierten B-Lymphozyten zu Plasmazellen. IL-6 ist eines der am besten charakterisierten Zytokine, das eine Assoziation in Bezug auf die Entwicklung des Diabetes mellitus hat. So konnte nachgewiesen werden, dass IL-6 ein unabhängiger Prädiktionsfaktor für die Entwicklung eines T2D ist^{19,59,60}, ausserdem führt IL-6 zu Insulinresistenz. (s. 1.2.4.1). Auch in Zuständen akuter Hyperglykämie kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung des IL-6⁶¹.

1.2.4 Die Verbindung zwischen Ernährung und Immunsystem

Das Überleben vielzelliger Organismen hängt im Besonderen von der Fähigkeit des Organismus ab, Infektionen zu bekämpfen und Schäden zu reparieren sowie Energiereserven für Zeiten verstärkten Energiebedarfes oder verringerten Energieangebots anlegen zu können. Die dazu nötigen Stoffwechselwege zählen zu den am stärksten konservierten Mechanismen im ganzen Tierreich. Darüber hinaus existieren zwischen dem immunologischen und metabolischen System zahlreiche Verbindungen. Viele Hormone, Zytokine, Signalproteine, Transkriptionsfaktoren und bioaktive Lipide besitzen in beiden Systemen eine biologische Aktivität und beeinflussen oder regulieren einander⁶². Die Mobilisation von gespeicherten Lipiden zur Bereitstellung von Energie spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort⁶³. Folglich kommt es bei einer inflammatorischen Immunantwort zu einer katabolen Stoffwechseleinstellung, wohingegen anabole Stoffwechselwege gehemmt werden (s. 1.2.5). Durch diese enge Verbindung der beiden Systeme kann es dazu kommen, dass wenn ein System aus dem Gleichgewicht gerät, das andere System mit beeinträchtigt wird. So konnte der immunsuppressive Einfluss einer Mangelernährung auf den Organismus einhergehend mit einer erhöhten Infektanfälligkeit vielfach beobachtet werden⁶⁴⁻⁶⁶. Auch in historischen Hungersnöten konnte immer wieder der Zusammenhang zwischen Mangelernährung und Immunsuppression gesehen werden. In den letzten hundert Jahren ist es jedoch in industriell geprägten Ländern zu einer Überversorgung mit Nahrungsmitteln gekommen, was zu einem hohen Prozentsatz an Personen mit Übergewicht geführt hat⁶⁷. Mit diesem Anstieg der Zahl übergewichtiger Personen kam es zu einer Vielzahl neuer Probleme und Interferenzen der beiden Systeme. So stieg die Prävalenz der mit Fettleibigkeit assoziierten und durch eine chronische Inflammation

beeinflussten Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Entwicklung einer Fettleber, Atemwegserkrankungen und Arteriosklerose⁶⁸. Man kann also postulieren, dass metabolische Imbalance eine Imbalance des Immunsystems auslöst. Auf der einen Seite führt Mangelernährung zu Immunsuppression, auf der anderen Seite kann Übergewichtigkeit zum vermehrten Auftreten von inflammatorisch bedingten Erkrankungen führen.

1.2.4.1 Die Rolle von Nahrungsmittelkomponenten, insbesondere Glukose, in der Pathogenese des T2D

Der T2D ist eine der weltweit wichtigsten Erkrankungen des 21. Jahrhunderts. Risikofaktoren, die die Entwicklung eines T2D begünstigen, sind Lebensstilfaktoren wie übermäßige Nahrungszufuhr und körperliche Inaktivität. Auch eine sich daraus entwickelnde Fettleibigkeit ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung des T2D⁶⁹. Eine chronische subklinische Inflammation und eine Aktivierung des natürlichen Immunsystems haben großen Einfluss in der Pathogenese des T2D. So konnte gezeigt werden, dass Immunmarker wie IL-6 und CRP starke Prädiktoren für die Entwicklung eines T2D sind^{18,19,70}. Auf der anderen Seite führen körperliches Training und Gewichtsabnahme nicht nur zu einer Reduktion des Diabetesrisikos, sondern auch zu einer Abnahme der subklinischen Inflammation^{37,71-74}.

In großen epidemiologischen Studien wurde darüber hinaus eine Assoziation von der Aufnahme bestimmter Nahrungsbestandteile wie z.B. Kaffee, bestimmten Fetten sowie Kohlenhydraten und der Entwicklung eines Diabetes gefunden⁷⁵. Ebenso führen auch bestimmte Essgewohnheiten, also die Kombination verschiedener Nahrungsbestandteile, zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines T2D⁷⁶⁻⁷⁹ und sind auch mit erhöhten Spiegeln zirkulierender Immunmarker assoziiert, die wiederum unabhängige Prädiktoren für die Entwicklung eines T2D darstellen⁸⁰⁻⁸². In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Aufnahme von Vollkornprodukten, Ballaststoffen und Kleie bei Typ 2 Diabetikern und gesunden Probanden zu einem signifikanten Abfall der CRP-Spiegel und anderer Immunmarker wie z. B. IL-6 führt⁸³⁻⁸⁵. Diese Beobachtungen konnten in Interventionsstudien mit Testmahlzeiten reproduzierbar dargestellt werden. Umgekehrt zeigte sich nach Testmahlzeiten mit einem hohen glykämischen Index und darauf folgender Hyperglykämie ein signifikanter Anstieg

in der Plasmakonzentration von IL-6 sowohl bei übergewichtigen als auch bei schlanken Frauen, wobei die Höhe des Anstiegs positiv mit schlechteren metabolischen Parametern assoziiert war⁸⁶. Auch eine intravenöse Verabreichung von Glukoselösungen führt zu erhöhten IL-6 Spiegeln bei Probanden mit normaler und gestörter Glukosetoleranz⁶¹ sowie zu erhöhten Fibrinogenspiegeln bei Gesunden⁸⁷. Eine Hyperglykämie löst dabei eine vermehrte Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors κB (NF κB), einem wichtigen Vermittler der Inflammation auf Transkriptionsebene, aus⁸⁸. Die in vivo Befunde konnten auch durch in vitro Experimente bestätigt werden. So kommt es unter einer Inkubation mit erhöhten Glukosekonzentrationen zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6 und TNF- α ^{89,90}.

1.2.4.2 Zelluläre Mechanismen der glukoseinduzierten Immunantwort

Eine Hyperglykämie bewirkt in der Zelle eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die ROS induzieren direkt die Proteinkinase C (PKC)⁹¹, die eine proinflammatorische Immunantwort in der Zelle induziert. Die proinflammatorische Wirkung der PKC wird zum einen über die Mitogen aktivierte Protein Kinase p38 (p38MAPK) und zum anderen über den Transkriptionsfaktor NF κB vermittelt⁹²⁻⁹⁴. Sowohl p38MAPK als auch NF κB führen zu einer gesteigerten Produktion von IL-6. Ein weiterer Induktionsweg zur Aktivierung der PKC verläuft über Advanced Glycation Endprodukte (AGE). Zum vermehrten Auftreten von AGE kommt es durch nichtenzymatische Bindung von Zucker an Proteine und Fette. Dieser Vorgang wird durch ein hyperglykämisches Milieu beschleunigt^{95,96}. AGE wirken zum einen direkt intrazellulär, können aber auch aus der Zelle austreten und dann an AGE-Rezeptoren (RAGE) anderer Zellen binden⁹². Über diese Rezeptoren kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung der PKC und konsekutiv zu einer Produktion von IL-6 vermittelt durch p38MAPK und NF κB .

1.2.4.3 Immunmarker als Einflussfaktor in der Pathogenese des T2D

Ein möglicher Mechanismus für die Insulinresistenz besteht in einer direkten Interferenz proinflammatorischer Immunmarker wie TNF- α und IL-6 mit dem Signalweg des Insulins. Sowohl TNF- α als auch IL-6 wirken zum einen über eine

klassische Rezeptor-vermittelte Aktivierung der JNK (c-Jun Amino-terminale Kinase) sowie von IKK- α (I κ B Kinase- β)/NF- κ B (nuclear factor κ B), was zu einer Hochregulation inflammatorischer Immunmarker führt, zum anderen wirken die Zytokine jedoch auch über eine Hemmung der Phosphorylierung intrazellulärer Substrate durch den Insulinrezeptor. Ein gutes Beispiel für diese Hemmung ist die durch IL-6 hervorgerufene Induktion des SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling-3). Das SOCS-3 Protein bindet an den Insulinrezeptor und hemmt die insulinabhängige Autophosphorylierung des Rezeptors und die Phosphorylierung des IRS-1 (insulin receptor substrate-1)⁹⁷. Des Weiteren bindet SOCS-3 direkt an IRS-1 und IRS-2 und führt zu einem verstärkten Ubiquitin-vermittelten intrazellulären Abbau der Substrate⁹⁸. Indirekt führt IL-6 auch über eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen Achse zu einer erhöhten Ausschüttung von Kortison⁹⁹, welches zu einer verstärkten Glukoneogenese in der Leber führt. Auch die Freisetzung von Wachstumshormon und Katecholaminen wird durch IL-6 gesteigert, was ebenfalls zu einer Hyperglykämie und gegenregulatorisch zu einer Hyperinsulinämie führt, zwei wichtigen Charakteristika der peripheren Insulinresistenz¹⁰⁰.

Als zweite Komponente der Entwicklung des T2D wird die Sekretionsstörung der β -Zellen erachtet¹⁰¹. Unter normalen Voraussetzungen sind die β -Zellen in der Lage, eine periphere Insulinresistenz zu kompensieren und den Blutzuckerspiegel in physiologischen Grenzen zu regulieren. Auch bei Personen mit gestörter Glukosetoleranz oder T2D kommt es zu einer gesteigerten Insulinantwort, die jedoch in Relation zu der bestehenden Insulinresistenz zu gering ist¹⁰² und nur initial durch eine verstärkte Sekretion der β -Zellen und möglicherweise auch Vergrößerung der β -Zellmasse kompensiert werden kann. Der allmähliche Verlust der zellulären Insulinsekretion wird bei den meisten Typ 2 Diabetikern beobachtet und endet nach im Mittel 10 Jahren in einem absoluten Insulinmangel¹⁰³. Eine hochkalorische Diät mit den daraus resultierenden erhöhten Konzentrationen von FFA (free fatty acids) und Glukose werden als ursächliche Einflussfaktoren eines β -Zellverlustes angesehen¹⁰⁴. Die Tatsache, dass eine Hyperglykämie zu einer verminderten Insulinsekretion führt, hat zu dem Konzept der Glukotoxizität geführt. Dieses Konzept besagt, dass Glukose einen schädigenden Einfluss auf die insulinproduzierenden Zellen hat. In β -Zellen, die hohen Konzentrationen von Glukose oder FFA ausgesetzt sind, kommt es zu einer gesteigerten Produktion des Zytokins IL-1 β ^{105,106}, die in einer gestörten

Insulinsekretion und Apoptose der β -Zellen resultiert^{32,107}. Eine Behandlung mit dem IL-1 Rezeptor-Antagonisten Anakinra[®] bei Personen mit T2D führt zu einer Senkung des HbA1c-Wertes, der durch eine Verbesserung der β -Zellfunktion und eine Reduktion des β -Zellstress, gemessen durch die Ratio von Proinsulin zu Insulin, vermittelt wird³⁵.

Durch eine hoch-kalorische Diät kann der metabolische Stress zu gesteigertem oxidativem Stress und ebenfalls zu Störungen der β -Zellfunktion führen^{108,109}. In den β -Zellen des Pankreas kommt es durch erhöhte Glukosebelastung zu vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche normalerweise von Katalase und Superoxiddismutase verstoffwechselt werden. Eine besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang auch der Glutathion-Peroxidase zu. β -Zellen besitzen jedoch nur eine geringe Anzahl dieser protektiven Enzyme, so dass sie sehr anfällig für reaktive Sauerstoffspezies sind¹¹⁰, was zu zellulären Schäden führt und somit eine verminderte Insulinsekretion zur Folge hat. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Antioxidantien wie Glutathion-Peroxidase in vitro oder eine Behandlung mit Antioxidantien im Tiermodell vor dem schädigenden Einfluss der Glukose schützen kann¹¹¹⁻¹¹³. Der Verlust des Transkriptionsfaktors PDX-1 (Pankreas Duodenum Homeobox 1), ein wichtiger Regulator der Insulinpromoteraktivität, wird als weiterer zentraler pathogenetischer Mechanismus der Glukotoxizität angesehen. Dieser Verlust von PDX-1 konnte in verschiedenen Versuchen in Zucker Diabetes Fatty (ZDF) Ratten durch eine Verhinderung der Hyperglykämie verringert werden¹¹⁴.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Die Hyperglykämie stellt einen wichtigen pathogenetischen Faktor in der Entwicklung des T2D dar, Untersuchungen zu den direkten Wechselwirkungen von Glukose und Immunzellen gibt es aber kaum. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt von hohen Glukosespiegeln auf die Freisetzung des Zytokins Interleukin-6 sowohl in vitro als auch in vivo untersucht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Reaktion des Immunsystems auf hohe Glukosebelastungen in einem Vollblut-Testsystem durch Messung der IL-6 Spiegel mittels ELISA analysiert und relevante Einflussgrößen identifiziert werden. Da diese Effekte in vitro in einem möglichst physiologischen und

gleichzeitig einfachen Versuchsaufbau untersucht werden sollten, wurden die Versuche auf Basis eines Vollblutsystems durchgeführt. Erstmals wurden Vollblutsysteme 1982 zur Messung immunologischer Vorgänge vorgeschlagen¹¹⁵. Es konnte gezeigt werden, dass in Versuchen, in denen periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) verwendet wurden, inakkurate Konzentrationen und schwer reproduzierbare Ergebnisse zu messen waren¹¹⁶, was durch das unterschiedliche Verhältnis der verschiedenen immunkompetenten Zellen in den PBMC im Vergleich zum Vollblut-Assay erklärt werden könnte. Außerdem werden durch die Isolierung der Zellen sowohl Zytokine als auch aktivierende und hemmende Faktoren eliminiert, die im Vollblut-Assay zum Tragen kommen können. Die Messung von Zytokinen wurde in vielen Experimenten bereits beschrieben¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, welche Effekte eine Glukosebelastung auf die systemischen Spiegel des Zytokins IL-6 ausübt. Für diesen Teil der Arbeit sollten Daten und Bioproben aus dem KORA-Survey 4 verwendet werden. In dieser populationsbasierten epidemiologischen Studie wurde bei Personen ohne bekannten Diabetes ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT) durchgeführt, so dass IL-6-Spiegel im Serum der Probanden vor und zwei Stunden nach Glukosereiz gemessen werden konnten. Da zu diesen Teilnehmern zudem eine umfangreiche Datenbank mit demographischen, anthropometrischen und metabolischen Daten vorlag, sollte zudem geprüft werden, ob das Vorliegen eines metabolischen Syndroms mit dem Glukoseeffekt auf die IL-6 Konzentration interagiert.

2. Material, Methoden und Probanden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Blutentnahme

Surflo winged infusion set 22G x $\frac{3}{4}$ " (Terumo, Leuven, Belgien)

Membran Adapter Bn. 14.1112 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Lithium-Heparinat Plasmaröhrchen 9 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Einmalartikel

Micro Tubes Reagiergefäß 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Multiply Pro Tubes 0,2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Multiply Pro Tubes 0,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Pipetten (5 ml bis 25 ml) (Falcon, Heidelberg, Deutschland)

Pipettenspitzen (10 µl bis 1000 µl) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Zellkultur

24 Well Zellkulturplatten (Falcon, Heidelberg, Deutschland)

48 Well Zellkulturplatten (Falcon, Heidelberg, Deutschland)

Syringe-Filter 0,2 µm Porengröße (Nalgene, Rochester, USA)

Gewebekulturröhrchen Rundboden 12 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen 50 ml (Falcon, Heidelberg, Deutschland)

ELISA

96 Well Maxisorp® Nunc Immuno-Plates (Nunc Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)

Eppendorfgefäße (0,2 ml; 0,5 ml und 1,5 ml; Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Folien, selbstklebend (Lab Systems, Los Angeles, USA)

2.1.2 Geräte

Begasungsbrutschrank EC 5060 CO₂ (Heraeus, Osterode, Deutschland)
Dampfsterilisierautomat V (Webeco, Bad Schwartau, Deutschland)
Emax Microplate precision reader (Molecular Devices, München, Deutschland)
EPOS 5060 Autoanalysator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Feinwaage AC 88 Delta Range (Mettler, Gießen, Deutschland)
Waage MC1 LC4200 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Labor pH-Meter 340 pH/Temp Meter (Beckmann, Palo Alto, USA)
Magnetrührer (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Laminair HB 2472K (Heraeus, Osterode, Deutschland)
Nunc Immuno-Wash 8 (Nunc Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetus® akku (Hirschmann, Eberstadt, Deutschland)
Schüttler für Platten Titramax 100 (Heidolph, Saarbrücken, Deutschland)
Schüttler für Platten Titramax 1000 (Heidolph, Saarbrücken, Deutschland)
Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge Microspin FV 2400 (MolTech, Berlin, Deutschland)
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q UF Plus (Millipore, Molsheim, Frankreich)
Zentrifuge Allegra 21R (Beckman, Fullerton, USA)

2.1.3 Reagenzien/ Stimulantien

Desferrioxamin Kat.-Nr.: D-9533 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat Na₂HPO₄*2 H₂O (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Dinatriumcarbonathydrat Na₂CO₃*H₂O (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ficoll Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden)
D-Glukose Kat.-Nr.: G-7528 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
L-Glukose Kat.-Nr.: G-5500 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Lipopolysaccharid Kat.-Nr.: L-2654 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] Kat.-Nr.: 15655 (BioMol, Hamburg, Deutschland)

Kaliumchlorid KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3 (Serva, Heidelberg, Deutschland)
D-PBS (engl. phosphate buffered saline) (10x) Kat.-Nr.: 14200-067
(Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
TMB (Tetramethylbenzidin) Plus Ready to use Kat.-Nr.: 4390A
(Kem-Em-Tec A/S, Kopenhagen, Dänemark)
Trypanblau 0,4%, Kat.-Nr.: 15250-61 (Gibco Life Technologies, Karlsruhe,
Deutschland)
Türk-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Tween 20 pure Kat.-Nr.: 9127.1 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.4 Zellkultur

2.1.4.1 Medien

DMEM glukosefrei, ohne Natriumpyruvat, mit L-Glutamine (Gibco Life
Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Hank's Balanced Salt Solution HBSS (Gibco Life Technologies, Karlsruhe,
Deutschland)
HEPES 1 Molar (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Hitzeinaktiviertes Humanserum (ausgewähltes Lot mit geringer stimulatorischer
Aktivität; Deutsches Diabetes-Zentrum, Düsseldorf, Deutschland)
PBS Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Gibco Life Technologies, Karlsruhe,
Deutschland)
RPMI 1640-Medium mit GlutaMax I und 25 μM Hapes (Gibco Life Technologies,
Karlsruhe, Deutschland)

2.1.5 ELISA

PeliKine compact ELISA Kit für IL-6, Kat.-Nr.: M1916 (CLB/PeliKine, Amsterdam,
Niederlande)

2.1.6 Sterilisation der Chemikalien und Geräte

Hitzebeständige Lösungen und Glaswaren wurden bei 120 °C und 2 bar für 30 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilisiert.

2.1.7 Stammlösungen und -puffer

Blocking Reagent	500 µl Blocking Reagent Stocklösung ad 25 ml PBS (1x)
Coating Puffer	Lösung A: 1,24 g Na ₂ CO ₃ *H ₂ O ad 100 ml Aqua dest. Lösung B: 1,68 g NaHCO ₃ ad 300 ml Aqua dest. 70 ml von Lösung A mit Lösung B auf pH 9,6 einstellen Lagerung bei 4 °C für maximal 4 Wochen
DMEM mit HEPES	390 ml DMEM glukosefrei ad 10 ml HEPES
Extraktionspuffer für MTT	50 ml 40% SDS-Lösung 50 ml Dimethylformamid (C ₃ H ₇ NO) 833 µl 6N HCl
Glukoselösung 100 mg/ml	0,2 g Glukose ad 2 ml Zellkulturmedium
Hämolyse-Puffer	50 mg Digitonin (C ₅₆ H ₉₂ O ₂₉) 100 mg Maleinimid (C ₄ H ₃ NO ₂) ad 1.000 ml Aqua dest.
MTT-Stocklösung	110 mg MTT ad 10 ml RPMI Lagerung bei 4 °C
PBS (5x)	80 g NaCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O 1,92 g KH ₂ PO ₄ 2,0 g KCl

	ad 2 L Aqua dest., pH 7,5
PBS (1x)	200 ml PBS (5x) ad 1.000 ml Aqua dest.
Probenpuffer ELISA	20 ml HPE (im Kit enthalten) ad 100 ml Aqua dest.
Stopplösung	50 ml konzentrierte Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) ad 400 ml Aqua dest.
Waschpuffer	50 µl Tween 20 ad 1L PBS (1x)

2.2 Methoden

2.2.1 Probandenkollektive

2.2.1.1 In vitro-Versuche

Das Probandenkollektiv der in vitro-Versuche bestand aus 12 freiwilligen Probanden, denen für jedes Experiment Blut aus einer peripheren Vene in Lithium-Heparinat-beschichtete Blutentnahmeröhrchen entnommen wurde. Im Anschluss wurde das Material innerhalb eines Zeitraums von maximal 30 Minuten unter einer sterilen Arbeitsbank weiterverarbeitet. Alle Arbeiten fanden bei Raumtemperatur statt.

2.2.1.2 KORA Survey 4 (KORA S4)

Beim KORA –Survey 4 (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) handelt es sich um eine Querschnittstudie, in der eine möglichst repräsentative Kohorte der deutschen Bevölkerung in Augsburg und zwei angrenzenden Landkreisen rekrutiert wurde. Die KORA-Studienplattform wurde 1996 gestartet und stellt eine Fortsetzung des WHO-MONICA-Projektes (Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) dar¹²⁰. In der Zeit zwischen 1984 bis 1995 fanden im Rahmen der WHO-MONICA-Studie drei unabhängige populationsbezogene Querschnittsuntersuchungen in der Region Augsburg statt. Aufbauend auf dem Design dieser Studien wurde der KORA - Survey 4 (KORA S4) konzipiert, dessen Ziel die Gewinnung von Daten war, die eine prospektive Nachverfolgung im Bereich der Epidemiologie,

Gesundheitsökonomie und Versorgungsforschung erlauben. Die Stichprobe der gesamten Studie umfasste insgesamt 6.640 Männer und Frauen. Die Erfassungsrate lag bei 67% aller angeschriebenen Personen. Die Probanden wurden nach einem standardisierten Verfahren in Form von Fragebögen mit geschulten Interviewern befragt. Es wurden neben dem Alter detaillierte Fragen zum Gesundheitszustand, sozialem Umfeld, ethnischer Herkunft, Medikamenteneinnahme, körperlicher Bewegung und Ernährung gestellt. Zu Zwecken der Studienteilnahme wurden 2.656 Personen im Alter zwischen 55 und 75 Jahren angeschrieben, bei denen zusätzlich ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT) geplant war. 1.003 Personen nahmen nicht an der Studie teil, von denen 911 Personen die Teilnahme verweigerten, nicht kontaktierbar waren, zu krank waren oder keine Zeit hatten. 92 Personen waren für die Studie ungeeignet, weil sie vor dem Studienbeginn verstarben, verzogen waren oder mangelnde Deutschkenntnisse aufwiesen. Somit nahmen 1.653 Personen an der Studie teil, von denen bei 131 Personen kein oGTT aus Gründen eines bereits bekannten Diabetes mellitus durchgeführt wurde, bei den restlichen 1.522 Studienteilnehmern wurde der oGTT durchgeführt. Bei 169 Personen führten Ausschlusskriterien dazu, dass der oGTT nicht ausgewertet werden konnte, so dass die Ergebnisse von 1.353 oGTTs für die weiteren Analysen zur Verfügung standen. Bei 119 Probanden konnte durch den oGTT ein Diabetes mellitus neu diagnostiziert werden. Zu diesen 119 neu entdeckten Diabetikern wurden alters- und geschlechtsgematcht 118 Personen mit gestörter Glukosetoleranz (IGT) bzw. 119 Personen mit normaler Glukosetoleranz (NGT) aus der Studienpopulation zufällig gezogen (s. Abb. 3). Diese beiden letztgenannten Gruppen (NGT und IGT) wurden für die weiteren Analysen verwendet.

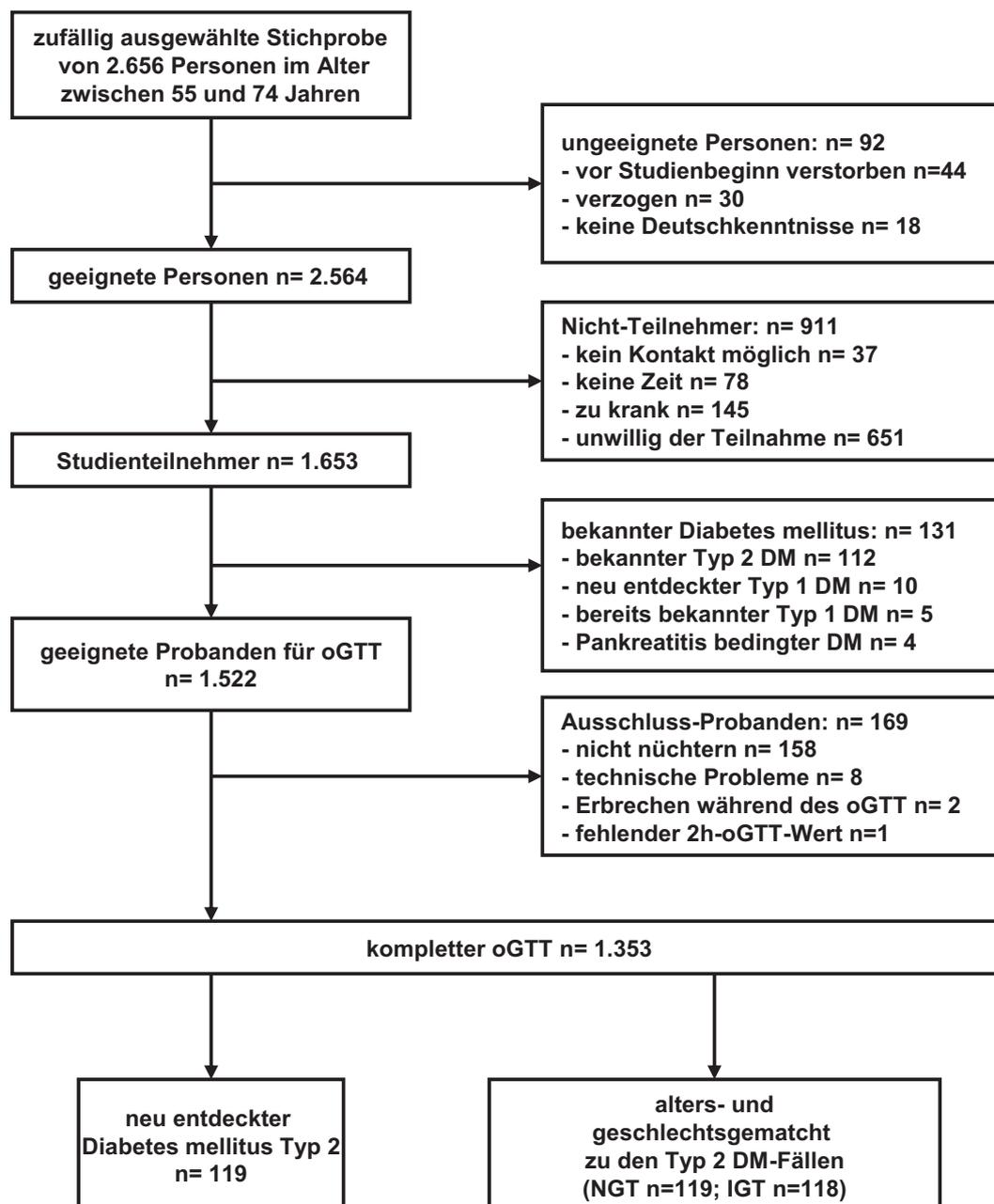


Abb. 3 Darstellung der Teilnahme am oGTT im Rahmen der KORA-Studie

Modifiziert nach Rathmann et al.⁸

2.2.1.2.1 Laborbestimmungen

Das Blut wurde unter minimaler Stase entnommen und bei 4 bis 8°C gekühlt. Die gekühlten Proben wurden innerhalb von 2 bis 4 Stunden in Kühlhalteboxen in das Labor des Klinikum Augsburg versandt. Die Blutglukosekonzentration wurde mittels Hexokinase-Methode bestimmt (Gluco-quant; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die HbA1c-Werte wurde mit Hilfe eines turbodimetrischen immunologischen Assays analysiert (Tina-quant, Roche

Diagnostics). Gesamtcholesterin wurde über die CHOD-PAP-Methode bestimmt, das HDL-Cholesterin nach Fällung mit Phosphorwolframsäure und die Triglyzeride über die GPO-PAP-Untersuchung. Die Serumharnsäure wurde bestimmt mittels der Urikase-Methode.

Das Körpergewicht wurde in leichter Kleidung durch geschultes Personal mit einer Genauigkeit von 0,1 kg bestimmt. Die Körpergröße konnte bis zu einer Genauigkeit von 0,5 cm gemessen werden. Der Taillenumfang wurde am minimalen Bauchumfang gemessen und der Hüftumfang an der größten Hervorhebung der Hüften in Höhe der Symphysis pubis, jeweils mit einer Genauigkeit von 0,1 cm. Die Taille-Hüft-Quotient (Waist-to-Hip-Ratio) ergab sich aus der Division von Taillen- und Hüftumfang. Die Insulinresistenz wurde mittels HOMA-IR (homoeostasis model assessment-insulin resistance) aus dem Produkt von Nüchtern-Glukose in mmol/l und dem Nüchtern-Insulinspiegel in $\mu\text{U/ml}$, geteilt durch den Faktor 22,5, bestimmt. Der Blutdruck wurde dreimalig mittels eines elektronischen Messgerätes (OMRON HEM 705-CP) im Sitzen nach 15minütiger Ruhepause bestimmt.

2.2.1.2.2 Definitionen des metabolischen Syndroms nach IDF und NCEP ATP III

Zusätzlich wurden die Personen mit einem normalen Glukosestoffwechsel anhand des Vorliegen eines metabolischen Syndroms stratifiziert.

Die Einteilung in die beiden Gruppen erfolgte entweder nach der Definition des metabolischen Syndroms nach der International Diabetes Federation (IDF) oder nach der Definition des Adult Treatment Panel III des National Cholesterol Education Program (NCEP-ATP III).

Nach Definition der IDF haben folgende Personen ein metabolisches Syndrom¹²¹: Personen mit zentraler Adipositas (für eurasische Herkunft: Männer mit einem Taillenumfang ≥ 94 cm und Frauen mit einem Taillenumfang von ≥ 80 cm) plus zwei der folgenden vier Faktoren:

- 1) Triglyzerid-Werte ≥ 150 mg/dl oder eine Behandlung mit Lipidsenkern,
- 2) HDL-Cholesterin < 40 mg/dl bei Männern bzw. < 50 mg/dl bei Frauen oder eine Behandlung mit Lipidsenkern,

- 3) systolischer Blutdruck ≥ 130 mmHg und/oder diastolischer Blutdruck ≥ 85 mmHg oder eine Behandlung mit Antihypertensiva,
- 4) Nüchtern-Glukosewert ≥ 100 mg/dl oder ein vorher diagnostizierter Typ 2 Diabetes mellitus.

Nach der NCEP-ATP III Definition haben folgende Personen ein metabolisches Syndrom, die drei oder mehr der folgenden Faktoren aufweisen¹²²:

- 1) Taillenumfang ≥ 102 cm bei Männern und ≥ 88 cm bei Frauen,
- 2) Triglyzerid-Werte ≥ 150 mg/dl,
- 3) HDL-Cholesterin < 40 mg/dl bei Männern bzw. < 50 mg/dl bei Frauen oder eine Behandlung mit Lipidsenkern,
- 4) systolischer Blutdruck ≥ 130 mmHg und/oder diastolischer Blutdruck ≥ 85 mmHg oder eine Behandlung mit Antihypertensiva,
- 5) Nüchtern-Glukosewert ≥ 110 mg/dl oder ein vorher diagnostizierter Typ 2 Diabetes mellitus.

2.2.2 Glukosebelastung in vivo mittels oGTT in KORA –S4

Der oGTT wurde nach einem genau festgelegten Protokoll durchgeführt. Zwischen dem Beginn des oGTT zwischen 7.00 Uhr und 11.00 Uhr morgens und der letzten Mahlzeit sollten mindestens 10 Stunden gelegen haben, stärkere körperliche Anstrengungen am Vortag der Untersuchung sowie das Rauchen unmittelbar bevor und während des Tests sollten vermieden werden. Ein bekannter Diabetes mellitus, die Einnahme von Diabetes-Medikamenten, akute Infektionen und Magen-Darm-Erkrankungen sowie ein Beginn des oGTT nach 11 Uhr waren Ausschlusskriterien für die Durchführung des oGTT. Bereits bekannte Diabetes-Fälle wurden definiert durch Berichte des Probanden über eine Diagnosestellung durch einen Arzt oder die Einnahme von antidiabetischen Medikamenten. Zunächst wurde Blut im Nüchtern-Zustand entnommen. Danach erfolgte die orale Gabe von 75 g Glukose in einer standardisierten Lösung (Dextro OGT, Boehringer Mannheim, Germany). Nach im Mittel 120 Minuten \pm 6 Minuten erfolgte eine erneute Blutentnahme. Die Einteilung in gestörte Nüchtern-Glukose (Impaired Fasting Glukose), gestörte Glukose-Toleranz (Impaired Glukose Tolerance) und Typ 2 Diabetes mellitus erfolgte nach den Kriterien der WHO von 1999 für venöses Plasma. Diese Kriterien sehen vor, dass ein

manifesten Diabetes mellitus bei Nüchtern-Blutglukosewerten von ≥ 126 mg/dl bzw. bei einem 2-Stunden oGTT-Wert von ≥ 200 mg/dl vorliegt. Kriterien für eine IGT sind Nüchtern-Blutglukosewerte < 126 mg/dl und Werte von mindestens 140 mg/dl bis maximal 200 mg/dl Glukose 2 Stunden nach oGTT-Beginn. Die IFG ist definiert durch Nüchtern-Blutglukosewerte zwischen ≥ 110 mg/dl und < 126 mg/dl bei einem unauffälligen 2-Stunden-Wert im oGTT (< 140 mg/dl). Personen mit normaler Glukosetoleranz (NGT) haben einen Nüchtern-Blutglukosewert von < 110 mg/dl und einen 2-Stunden-Wert < 140 mg/dl.

Um Typ 1 Diabetiker von Anfang an aus den weiteren Untersuchungen auszuschließen, wurde das Blut der Probanden auf einen Typ 1 Diabetes mellitus spezifischen Antikörper, den Glutamatdecarboxylase(GAD)-Antikörper, untersucht. Dieser Test erlaubt die Diagnose eines Typ 1 Diabetes mellitus mit einer Sensitivität von 81% und einer Spezifität von 99%. Als oberer Grenzwert für die Positivität auf den GAD-Antikörper wurde die 99. Perzentile der GAD-Antikörper Werte bei gesunden Probanden gewählt (6,5 GAD Antikörper-Einheiten)¹²³. Aufgrund des Testes wurden 10 Probanden als Typ 1 Diabetiker identifiziert und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Weitere fünf Probanden hatten einen bereits bekannten Typ 1 Diabetes mellitus und wurden ebenfalls ausgeschlossen. Vier Probanden hatten einen Diabetes mellitus aufgrund von Pankreatitiden. Von den 1.522 getesteten Probanden traten bei 169 Personen Probleme bei der Durchführung des oGTT auf, die zum Abbruch des oGTT führten. Von diesen 169 Personen waren 158 nicht nüchtern, bei acht Probanden gab es technische Probleme, bei zwei Personen kam es im Verlauf des Tests zu Übelkeit und Erbrechen und bei einer Person fehlte der 2-Stunden oGTT Wert. In der Gruppe der 1.353 Probanden mit korrekt durchgeführten oGTT konnte durch diesen bei 119 Personen ein Diabetes mellitus neu diagnostiziert werden (Abb.3).

2.2.3 In vitro Untersuchungen

2.2.3.1 Herstellung der Vollblutkultur und Stimulation im Zellkulturröhrchen

Für die Vollblutkultur wurde das entnommene Blut aus den Lithium-Heparinat-Röhrchen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit DMEM-Zellkulturmedium ohne Glukose im Verhältnis 1:3 verdünnt. Im nächsten Schritt wurde dem verdünnten Blut das entsprechende Volumen der

Glukosestocklösung (100 mg/ml) hinzugefügt, um jeweils eine Stammkultur mit einer Glukosekonzentration von 160 bzw. 500 mg/dl herzustellen. Das Vollblut wurde nun in 12 ml Gewebekulturröhrchen pipettiert. Die unterschiedlichen Stimuli wurden in verschiedenen Konzentrationen (LPS oder Desferrioxamin, s. Ergebnisteil) zugegeben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 3 ml. Es wurden pro Stimulationsansatz Duplikate angesetzt. Zur Analyse kurzfristig erhöhter Glukosespiegel wurden die Stimulationsansätze nach einer festgelegten Zeit (2 bzw. 24 Stunden) abzentrifugiert, der Mediumüberstand abpipettiert und durch glukosefreies DMEM-Zellkulturmedium ersetzt. Die Glukosekonzentration wurde daraufhin auf einen physiologischen Wert von 100 mg/dl mit Glukoselösung eingestellt und durch wiederholte Zugabe von Glukoselösung zu festgelegten Zeitpunkten (24 bzw. 48 Stunden) auf einem konstanten Level gehalten. Die Kontrolle der Höhe der Glukosespiegel erfolgte durch wiederholte Blutzuckermessungen. Alle Zellkulturansätze wurden für 24 h bzw. 72 h unter gleich bleibenden Bedingungen bei 37°C, 5% Kohlendioxidgehalt und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank inkubiert. Nach der festgelegten Inkubationszeit wurden die Überstände in ein Eppendorfgefäß pipettiert, bei 3000g für 5 Minuten zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2 Herstellung der Vollblutkultur und Stimulation in der Zellkulturplatte

Zunächst wurden für die Ansätze in den Zellkulturröhrchen 2 ml Medium und für die Ansätze der 24 Well-Zellkulturplatte 800 µl Medium der jeweiligen Glukosekonzentration vorgelegt. Im nächsten Schritt wurden die Zusätze (Desferrioxamin und LPS) in der jeweiligen Konzentration hinzugefügt. Dazu wurden 25 µl Zusatz in die Röhrchen bzw. 10 µl Zusatz in die Zellkulturplatte pipettiert. Daraufhin wurden 1 ml bzw. 400 µl des von den Probanden entnommenen Blutes zu dem Ansatz in die Röhrchen bzw. Platten gegeben und gemischt. Das Gesamtvolumen im Zellkulturröhrchen betrug 3 ml, in der Zellkulturplatte war es 1200 µl. Am Ende lag ein 1:3 Verhältnis (1 Volumenanteil Blut, 2 Volumenanteile Medium) von Blut zu Medium vor mit einer Endkonzentration von 160 mg/dl bzw. 500 mg/dl Glukose. Pro Stimulationsansatz wurden Triplikate für 24, 48 bzw. 72 Stunden im Brutschrank unter gleich bleibenden Bedingungen bei 37 °C, 5% Kohlendioxidgehalt und Wasserdampf-

gesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationsdauer wurden die Überstände entnommen und in Eppendorfgefäße überführt und bei 3000g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden in Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Analyse mittels ELISA bei -20°C eingefroren.

2.2.3.3 Isolierung von PBMC aus Lithium-Heparinat-Vollblut

Die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus Lithium-Heparinat-Vollblut erfolgt mittels der Dichtegradientenzentrifugation. Bei dieser Methode werden die verschiedenen Blutzellen sowohl nach ihrer spezifischen Dichte als auch nach ihrer jeweiligen Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt. Dadurch können verschiedene Zellfraktionen differenziert werden: Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und PBMC. Nach der Zentrifugation stellt sich als oberste Schicht ein Gemisch aus Medium, Plasma und Thrombozyten dar. Daran anschließend befindet sich eine dünne Schicht, welche ausschließlich aus PBMC besteht, die direkt auf der viskosen Phase des synthetischen Polysaccharids (Ficoll) liegt, das eine etwas höhere Dichte hat. Das unterste Kompartiment bilden die Erythrozyten und Granulozyten.

Das Zellkompartiment der PBMC besteht im Wesentlichen aus zwei unterschiedlichen Zellanteilen: Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen.

Zunächst wurden einer Versuchsperson 10 ml Blut in ein Lithium-Heparinat beschichtetes Entnahmeröhrchen entnommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Abnahmeröhrchen wurden mit 5-10 ml HBSS (Hank's balanced salt solution) durchgespült, und das HBSS wurde zum restlichen Blut hinzugefügt. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen mit HBSS auf 35 ml aufgefüllt.

Im nächsten Schritt wurden 13 ml der Ficoll-Lösung untergeschichtet, das Röhrchen in eine Zentrifuge gegeben und bei 800 g für 25 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die sich nun darstellende Zellphase der PBMC wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und mit HBSS auf 15 ml aufgefüllt. Daran anschließend folgte eine weitere Zentrifugation mit 675 g mit maximaler Bremse für 10 Minuten. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgeschüttet, das am Boden befindliche Zell-Pellet resuspendiert und auf 13 ml mit HBSS aufgefüllt. Es folgte eine dritte

Zentrifugation mit 400 g und maximaler Bremse für weitere 10 Minuten. Anschließend wurde der Überstand nach Möglichkeit vollständig abgegossen und das verbleibende Pellet in 1 ml RPMI (RPMI 1640 Medium mit Glutamax-I und HEPES) mit 5,5% Humanserum resuspendiert. Durch die verschiedenen Zentrifugationsschritte konnten die PBMC von Thrombozyten und der Ficoll-Lösung getrennt werden. Die so gewonnenen aufgereinigten PBMC wurden als nächstes mit Hilfe einer Zählkammer gezählt, wobei die Zellen jeweils mit Trypanblau und mit Türk-Lösung angefärbt wurden. Durch die Trypanblau-Färbung werden tote Zellen angefärbt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion die Proteine des Zytoplasmas bindet. Der Farbstoff dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen hindurch. Tote Zellen färben sich blau, lebende Zellen erscheinen leuchtend hell. Bei der Türk-Lösung handelt es sich um eine Vitalfärbung. In der Lösung ist ein hoher Anteil Essigsäure enthalten, der zur Hämolyse der Erythrozyten führt. Als weitere Komponente der Lösung ist Gentianaviolett enthalten, welches die Kerne der Leukozyten anfärbt. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Es wurden in zwei Großquadranten jeweils die Gesamtzahl der Leukozyten und die Anzahl der toten Zellen ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Da sich bei der Anfärbung mit Türk-Lösung die toten Zellen nicht von den lebenden Zellen unterscheiden, wurde durch Subtraktion der Anzahl der toten Zellen von der Gesamtzahl der Zellen die Anzahl der vitalen Zellen pro ml errechnet. Diese Zahl wurde den weiteren Berechnungen zu Grunde gelegt. Die Vitalität wurde als Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzahl der Zellen berechnet und betrug in allen Versuchen mehr als 90%. Für den folgenden Versuch wurde in die jeweiligen Wells einer 96-Well Zellkulturplatte eine Menge von 90 µl einer hergestellten PBMC-Lösung mit $0,2 \times 10^6$ Zellen pipettiert. Im Anschluss daran wurden die aufgereinigten PBMC mit Desferrioxamin und LPS verschiedener Konzentration auf ein Gesamtvolumen von 100 µl versetzt. Die Proben wurden jeweils als Triplikate auf die Platte aufgetragen und für 48 Stunden bei gleichbleibenden Bedingungen bei 37°C, 5% Kohlendioxidgehalt und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank inkubiert. Zusätzlich zu der Zellkulturplatte für den MTT-Test wurde eine weitere 96-Well Platte nach dem gleichen Schema inkubiert, um die Überstände auf eine veränderte IL-6 Produktion hin mittels ELISA zu untersuchen.

2.2.3.4 Bestimmung der Toxizität von Desferrioxamin bei PBMC mittels des MTT-Tests

Bei dem MTT-Test handelt es sich um einen kolorimetrischen Test zur Bestimmung der Viabilität von Zellen. In den Mitochondrien lebender Zellen wird das gelbe Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) mit NADH durch zelluläre Dehydrogenasen zu blauvioletten Formazan-Kristallen reduziert. Die Menge des entstandenen gelösten Formazans kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 550-570 nm quantifiziert werden. Durch die parallele Inkubation und Messung einer unbehandelten Kontrollkultur kann eine relative Abnahme der Zellviabilität errechnet werden. Aus diesem Grund benötigt man für diesen Test PBMC und kann nicht auf Vollblut zurückgreifen. Nach Inkubation der PBMC mit Desferrioxamin (DFX) verschiedener Konzentrationen, ohne und mit LPS über 72 Stunden wurde in jedes Well 10 µl der MTT-Stocklösung pipettiert und die Platte für weitere vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Um das durch die mitochondriale Dehydrogenase entstandene unlösliche, kristalline Formazan für die photometrische Messung in Lösung zu bringen, wurde in jedes Well 100 µl Extraktionspuffer pipettiert und die Platte für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur abgedunkelt auf einem Schüttler inkubiert. Die Menge des gelösten Formazans konnte nun mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 550-570 nm bestimmt werden.

2.2.3.5 Bestimmung der Glukosekonzentration in vitro

In jeden Stimulationsansatz wurde die Glukose-Konzentration zu Beginn und im Verlauf des Versuches gemessen. Die Konzentration wurde mittels der Hexokinase-Enzymreaktion in einem EPOS 5060 Autoanalysator gemessen. Dazu wurden 20 µl Probe des jeweiligen Ansatzes entnommen und in einen Hämolyse-Puffer pipettiert, wodurch die weitere Verstoffwechslung der Glukose verhindert wurde und die Lösung für eine photometrische Messung vorbereitet wurde. Das hämolytische Gemisch konnte nun in den Analysator gegeben werden, in dem mittels Hexokinase-Enzymreaktion der Blutzuckergehalt bestimmt wurde.

Das Enzym Hexokinase setzt spezifisch D-Glukose und ATP zu D-Glukose-6-Phosphat und ADP um. Anschließend wird in der Mess- und Indikatorreaktion mit Hilfe des Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase das entstandene D-Glukose-6-Phosphat und NADP^+ zu D-Glukonat-6-Phosphat und $\text{NADPH} + \text{H}^+$ reduziert. Dadurch entsteht eine der Ausgangsmenge an Glukose äquimolare Stoffmenge NADPH, die mit dem Photometer bestimmt werden kann. NADPH zeigt zwei Maxima in der Absorptionskurve, eines bei 260 nm und ein weiteres bei 340 nm, wohingegen NADP^+ ausschließlich ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigt. Aufgrund dieser unterschiedlichen Absorptionskurven lässt sich die Menge des NADPH in der Lösung bestimmen, die Zunahme der Extinktion ist proportional zur Glukosemenge in der Probe. Die Genauigkeit der Messung erfolgt mittels eines Abgleich mit Kontrollproben bekannter Glukosekonzentrationen.

2.2.4 ELISA

Zur Konzentrationsbestimmung von löslichen Analyten wurde der sogenannte „Sandwich“-ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) verwendet. Bei dieser Methode werden Antikörper und Analyt in der Art eines Sandwiches geschichtet. Die erste Schicht des ELISA bildet ein Antikörper, der den Analyt spezifisch bindet. Dieser primäre Antikörper wird an die Plastikoberfläche einer ELISA-Platte gebunden. Dazu wird der Antikörper in definierter Konzentration in die vorhandenen Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert. Im nächsten Schritt wird die Platte mit einer Proteinlösung geblockt, um unspezifische Bindungen des Analyten, des sekundären Antikörpers oder des Enzymkonjugats an die Plastikoberfläche zu verhindern. Die nächste Schicht bildet der Analyt. Die Platte wird mit dem Analyt inkubiert, welcher nun an den ersten Antikörper bindet. Als nächstes wird der sekundäre Antikörper hinzugefügt, der den Analyt ebenfalls spezifisch, aber an anderen Epitopen bindet. Der sekundäre Antikörper ist kovalent mit Biotin gekoppelt, an das in einem weiteren Schritt ein Streptavidin-Enzymkomplex binden kann, der ein geeignetes chromogenes Substrat (z.B. TMB) in einer Enzymreaktion zu einem Farbstoff umsetzt. Die Bindung des zweiten Antikörpers und somit auch des Enzymkomplexes an den Analyten ist direkt proportional zu der Menge des vorhandenen Analyten, was dazu führt, dass auch die Geschwindigkeit des Farbumschlages der Enzymreaktion

ebenfalls direkt proportional zu der Menge des gebundenen Analyten ist. Demzufolge führen höhere Konzentrationen des Analyten zu einem schnelleren Farbumschlag. Diese Reaktion folgt bis zu einem gewissen Punkt einer linearen Kinetik. Die Farbreaktion kann durch Zugabe einer Stopplösung (z.B. 2N Schwefelsäure) beendet werden und durch eine photometrische Messung die entstandene Farbmenge quantitativ bestimmt werden. Wird die Reaktion in der linearen Phase gestoppt, kann aus einer Standardverdünnungsreihe mit definierten Mengen des Analyten eine Eichkurve erstellt werden, anhand derer die Menge des vorhandenen Analyten in der Probe bestimmt werden kann.

2.2.4.1 Protokoll für Interleukin-6 Zytokin-ELISA

1. Beschichtung mit primärem Antikörper

Der den Analyten spezifisch bindende Antikörper wurde mit einer speziellen Pufferlösung aus einer Stocklösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Im Anschluss wurde die Lösung in die Vertiefungen einer ELISA-Platte (Nunc MaxiSorp Immuno-Plates) pipettiert und 24 Stunden bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Zum Schutz vor Verunreinigungen und Verdunstung wurde die Platte mit Klebefolie abgeklebt. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte dreimal mit PBS (1x) gewaschen, um ungebundenen primären Antikörper zu entfernen.

2. Blocken

Um unspezifische Bindungen des Zytokins, des sekundären Antikörpers oder des Enzymsubstrats zu verhindern, wurde die Platte im Folgenden mit Blocking Reagent, einer unspezifischen Proteinlösung, inkubiert. Dazu wurden 250 µl der Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

3. Auftragen von Standard und Proben

Zur Herstellung einer Standardreihe wurde ein Aliquot der Stocklösung bestehend aus rekombinantem humanem Zytokin in Probenpuffer seriell verdünnt. Auch die Proben wurden in Probenpuffer verdünnt. Danach wurden Proben und Standard in die Vertiefungen der ELISA-Platte aufgetragen, die Platte mit Klebefolie bedeckt und bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler bei

inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte wiederum ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, um ungebundenes Protein zu entfernen.

4. Sekundärer Antikörper

Der mit Biotin konjugierte Detektionsantikörper wurde aus einer Stocklösung mit Probenpuffer verdünnt und auf die ELISA-Platte aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Darauf folgten drei Waschschriffe mit Waschpuffer, wodurch ungebundener Antikörper entfernt wurde.

5. Bindung des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats

Das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wurde mit Probenpuffer verdünnt und auf die Platte aufgetragen. Danach folgte eine 30minütige Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur, an die sich dreimaliges Waschen mit Waschpuffer anschloss.

6. Chromogene Reaktion des Enzymkomplexes

Nach Zugabe des chromogenen Substrats TMB wurde die Umwandlung des farblosen Substrats in einen blauen Farbstoff durch die gebundene Peroxidase gestartet. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter einer lichtundurchlässigen Abdeckung für 30 Minuten. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Stopplösung (2N Schwefelsäure) unterbrochen, um im linearen Bereich der Reaktion zu bleiben. Durch die Zugabe der Stopplösung erfolgte ein Farbumschlag von blau zu gelb.

7. Photometrische Messung

Die Messung der Farbreaktion erfolgte mittels eines Microplate-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Standardkurve wurde durch Log-Log-Interpolation mit Hilfe der SOFTmax®-Software (Molecular Devices GmbH, Version 2.35) erstellt und anhand dieser Kurve die Mengen des jeweiligen Zytokins in der Probe unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung bestimmt. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung gemessen und daraus der Mittelwert, die Standardabweichung sowie der Variations-Koeffizient (CV) errechnet. Lag der CV der Triplikate des Zellkulturansatzes bzw. der Duplikate der Zellkulturrohrrchen <20%, wurden aus den Ergebnissen der Mittelwert und die Standardabweichung

errechnet. Diese Zahlen wurden den weiteren Auswertungen sowie den Abbildungen und Tabellen zugrunde gelegt.

2.2.5 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse der ELISA-Messungen wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung der Triplikate bzw. Duplikate der Zellkultur dargestellt. Die Bearbeitung der Messungen des ELISA-Readers erfolgte mit Hilfe des Programms SOFTmax® Version 2.35 für Windows (Molecular Devices GmbH). Die Verwaltung der Daten erfolgte in Excel® Version 2002 SR-1 für Windows (Microsoft, Verl, Deutschland). Statistische Auswertungen sowie die graphische Darstellung der Daten wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism® Version 4.2 (GraphPad Software Incorporation, San Diego, USA) für Windows erstellt. In den Abbildungen und Tabellen sind die Werte entweder als Mittelwert \pm Standardabweichung oder als Median (25. und 75. Perzentile) angegeben. Die statistische Auswertung für normalverteilte und verbundene Stichproben erfolgte mittels des t-Tests für verbundene Stichproben oder des ANOVA mit Nachtest nach Dunnett für den Vergleich von mehr als zwei Datensätzen. Die Analyse von normalverteilten, unverbundenen Stichproben erfolgte mittels des t-Test für unverbundene Stichproben für einfache und mittels ANOVA und Bonferroni Nachtest für multiple Vergleiche. Waren die Daten nicht normalverteilt, erfolgte die Auswertung bei verbundenen Stichproben mit dem Wilcoxon Test für den Vergleich zweier Datensätze. Bei unverbundenen Stichproben wurde der Mann-Whitney-Test bzw. der Kruskal-Wallis Test für multiple Datensätze verwendet. Häufigkeitsverteilungen wurden mit dem exakten Test nach Fisher statistisch überprüft. Die linearen Regressionsanalysen wurden mit dem Programm SAS Version 9.1 TS Level 1M3 (SAS Inc., Carey, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

Ziel der im Folgenden beschriebenen Versuche war es, zunächst ein einfaches Testsystem zur Analyse der Auswirkung von Glukose auf Immunzellen zu etablieren. Das Testsystem bestand aus Vollblutkulturen, die mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen sowie weiteren modulierenden Substanzen inkubiert wurden. Die jeweilige Immunantwort wurde anhand der IL-6 Produktion quantifiziert.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit sich die Ergebnisse dieser in vitro-Glukosestimulation auch auf eine Glukosestimulation in vivo übertragen lassen. Dazu wurden die IL-6 Spiegel vor und 2 Stunden nach einer Glukosestimulation mittels oralem Glukosetoleranztest bei Teilnehmern aus dem KORA –Survey 4 (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) analysiert.

3.1 Wirkung von Glukose auf die Leukozyten in vitro

Um den Einfluss von Glukose auf die IL-6 Produktion der Leukozyten in der Vollblutkultur zu untersuchen, wurde die Vollblutkultur mit Glukose in zwei verschiedenen Konzentrationen (160 bzw. 500 mg/dl) für 72 Stunden inkubiert. Danach wurden Überstände entnommen und die IL-6 Produktion mittels ELISA gemessen. Es wurde insgesamt Blut von 12 verschiedenen Probanden untersucht. Bei Analyse der IL-6 Spiegel fiel auf, dass 3 Personen bei einer Glukosekonzentration von 500 mg/dl mit einer Steigerung der Zytokinproduktion (Median [25. Perzentile; 75. Perzentile]; 489,4 [170,7; 1.587,0] pg/ml) reagierten, während bei 9 anderen Probanden keine Steigerung der Zytokinproduktion auftrat (3,1 [1,9; 6,2] pg/ml; $p < 0,001$; Abb. 3). Die erste Gruppe soll im Folgenden als Responder bezeichnet werden. Ein ähnlicher Anstieg konnte auch bei einer Glukosekonzentration von 160 mg/dl beobachtet werden (6,2 [2,4; 486,0] pg/ml), der Unterschied zu den Non-Respondern (2,50 [1,95; 4,85] pg/ml) war aber nicht signifikant ($p = 0,16$), da innerhalb der Gruppe der Responder große Unterschiede bezüglich der IL-6 Produktion bei dieser Glukosekonzentration bestanden. Damit

konnte gezeigt werden, dass Glukose bei bestimmten Probanden, sogenannten Respondern, reproduzierbar zu einer Stimulation der IL-6 Produktion führt, die näher untersucht werden soll.

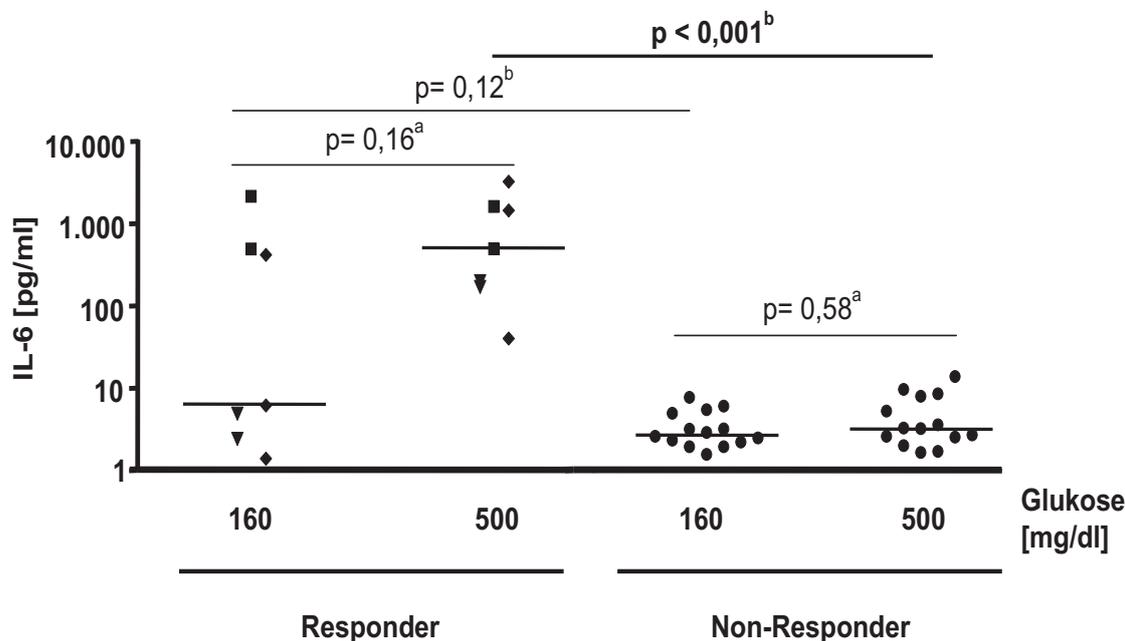


Abb. 3 Wirkung von unterschiedlichen Glukosekonzentrationen auf Vollblutkulturen unterschiedlicher Testpersonen

Glukose wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (160 mg/dl und 500 mg/dl) der Vollblutkultur zugefügt. Nach 72 h Inkubation wurden Überstände abgenommen und die IL-6 Produktion mittels ELISA bestimmt. Die Symbole stellen die Ergebnisse der Einzelerperimente dar, die zwei- bis dreimal wiederholt wurden, wobei die 3 Responder unterschieden wurden (Raute, Dreieck, Quadrat), während die Ergebnisse der Non-Responder nicht individualisiert dargestellt sind. Die Linie bezeichnet den Median. Die Analyse der Daten erfolgte mittels des ^aWilcoxon Tests für den Vergleich von verbundenen Stichproben, sowie mit Hilfe des ^bMann-Whitneys Test für den Vergleich von unverbundenen Proben.

3.1.1 Wirkung von LPS auf die IL-6 Produktion in der Vollblutkultur

Um zu untersuchen, ob die höchste Konzentration Glukose zu einer maximalen Stimulation der IL-6 Produktion in der Vollblutkultur führt, wurde diese zum Vergleich mit Lipopolysaccharid (LPS) über einen breiten Konzentrationsbereich stimuliert. Das bakterielle Oberflächen-Glykolipid LPS ist ein klassischer Induktor

der IL-6 Produktion von Zellen der natürlichen Immunität. Die basale IL-6 Produktion nach 72 Stunden Inkubation in der unstimulierten Vollblutkultur lag bei $2,1 \pm 1,0$ pg/ml. LPS führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der IL-6 Produktion bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml (12.060 ± 2.672 pg/ml; $p < 0,01$). Eine weitere Erhöhung der LPS Konzentration in der Vollblutkultur auf bis zu 1.000 ng/ml führte zu keiner zusätzlichen relevanten Erhöhung der IL-6 Produktion (Abb. 4). Vergleicht man die Werte der IL-6 Produktion mit den IL-6 Werten der mit Glukose stimulierten Vollblutkultur, so wird deutlich, dass durch die Glukosestimulation keine maximale IL-6 Antwort erreicht wird.

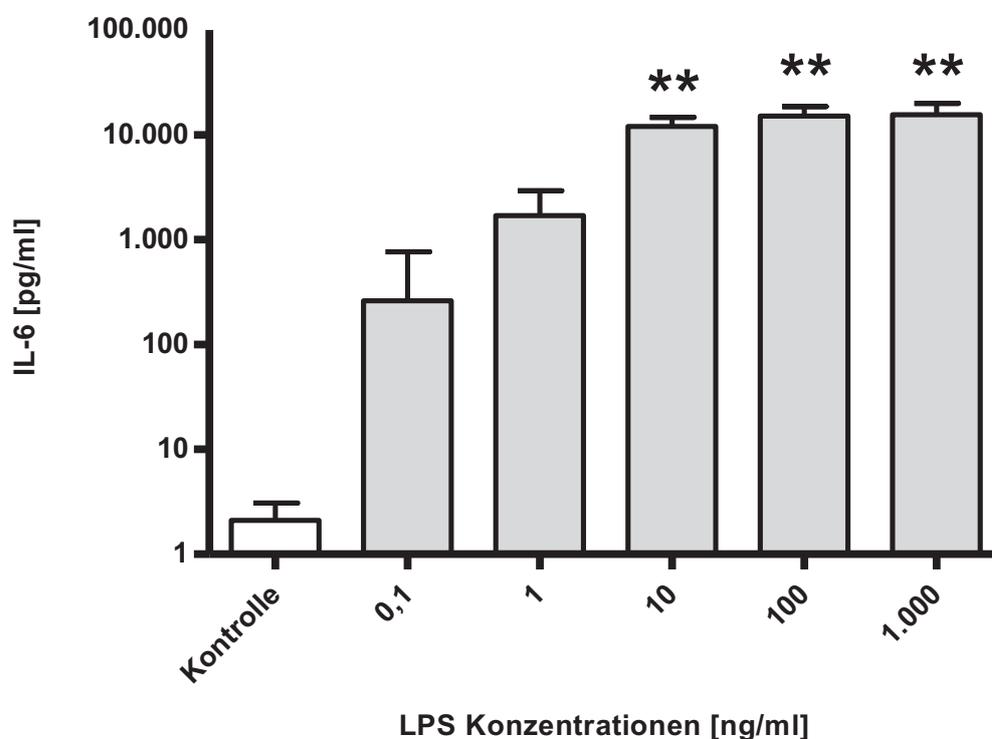


Abb. 4 IL-6 Spiegel nach 72 Stunden Inkubation mit Lipopolysaccharid (LPS)

Es wurde eine Vollblutstimulation mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen (0,1 bis 1.000 ng/ml; grau), sowie eine Kontrolle ohne LPS (weiß) in Triplikaten durchgeführt, die Überstände nach 72 Stunden entnommen und die IL-6 Produktion analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus vier Experimenten. Die Analyse der Daten erfolgte mittels ANOVA und Dunnett's Nachtest.

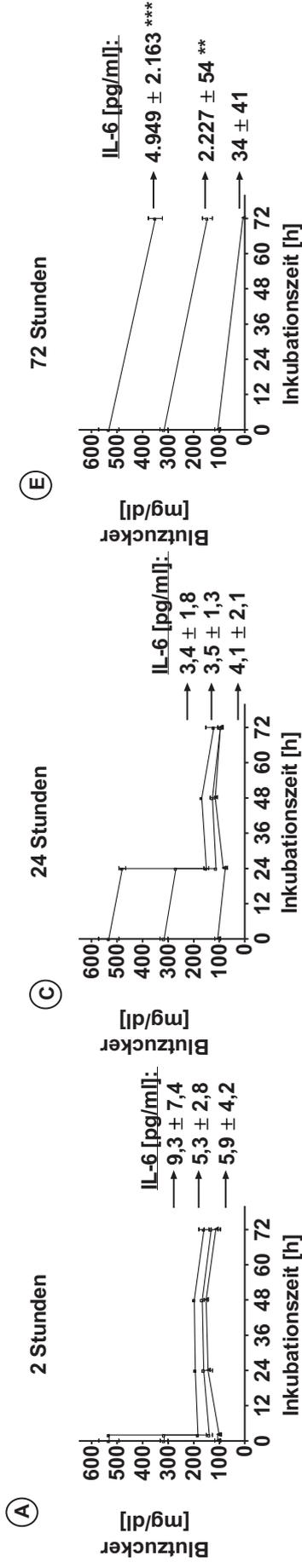
** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrollkultur

3.1.2 Einfluss der Inkubationsdauer und verschiedener Glukosespiegel auf die IL-6 Produktion in der Vollblutkultur

Um zu untersuchen, ob die IL-6 Produktion bei Respondern von der Dauer der Stimulation mit erhöhten Glukosespiegeln bzw. von der Höhe der angesetzten Glukosekonzentrationen abhängig ist, wurde die Zellkultur mit Glukose verschiedener Konzentration (100, 300 bzw. 500 mg/dl) für unterschiedliche Dauer (2, 24 bzw. 72 Stunden) inkubiert (Abb. 5). Alle 24 Stunden wurde die Glukosekonzentration konstant auf 100 mg/dl eingestellt und die IL-6 Produktion nach 72 Stunden analysiert. In der Abbildung 5 ist der Verlauf der Glukosekonzentration in der Kultur auf einer Zeitachse dargestellt. Weder bei dem Responder noch bei dem Non-Responder war bei allen Glukosekonzentrationen eine erhöhte IL-6 Produktion zu beobachten, wenn für 2 bzw. 24 Stunden eine erhöhte Glukosekonzentration vorlag. Dem gegenüber führte beim Responder erst eine Inkubation für 72 Stunden mit kontinuierlich hohen Glukosespiegeln zu einem dosisabhängigen Anstieg der IL-6 Produktion von 34 ± 41 pg/ml bei 100 mg/dl Glukose, auf 2.227 ± 54 pg/ml bei 300 mg/dl Glukose ($p < 0,01$ vs. 300 mg/dl nach 2 Stunden), bis hin zu 4.949 ± 2.163 pg/ml bei 500 mg/dl Glukose ($p < 0,001$ vs. 500 mg/dl nach 2 Stunden). Im Vergleich dazu findet sich bei dem Non-Responder wie zuvor auch nach 72 Stunden Inkubation bei keiner der angesetzten Glukosekonzentrationen eine nennenswerte Steigerung der IL-6 Produktion (maximal $1,60 \pm 0,71$ pg/ml). Die Steigerung der IL-6 Produktion bei dem Responder lag bei einer Glukosekonzentration von 300 mg/dl und 500 mg/dl nach 72stündiger Inkubation signifikant über der IL-6 Produktion des Non-Responders ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$). Um einen osmotischen Effekt auf die Stimulation der IL-6 Produktion in der Vollblutkultur ausschließen zu können, wurde zusätzlich noch mit L-Glukose in einer Konzentration von 500 mg/dl für 72 Stunden inkubiert. Das Enantiomer L-Glukose ist stoffwechsellinaktiv, jedoch ist es in gleichem Maße wie D-Glukose osmotisch aktiv. Bei der Analyse der IL-6 Produktion nach 72 stündiger Inkubation mit 500 mg/dl L-Glukose konnte keine Stimulation der IL-6 Produktion weder beim Responder noch beim Non-Responder nachgewiesen werden ($4,5 \pm$

3,25 pg/ml; Daten nicht abgebildet). Es lässt sich damit festhalten, dass eine Stimulation der Zytokinproduktion erst bei einer dauerhaft erhöhten Glukosekonzentration von 72 Stunden nachweisbar ist. Die kurzzeitigen Stimulationen von 2 bzw. 24 Stunden führten zu keiner Erhöhung des IL-6 Spiegels. Eine Stimulation ist außerdem abhängig von der Höhe der angesetzten Glukosekonzentration. Es lässt sich eine Konzentrationsabhängigkeit nachweisen. Zudem handelt es sich tatsächlich um einen Effekt der Glukose und nicht der höheren osmotischen Wirkung, da keine Stimulation nach Inkubation mit L-Glukose nachweisbar war.

Responder



Non-Responder

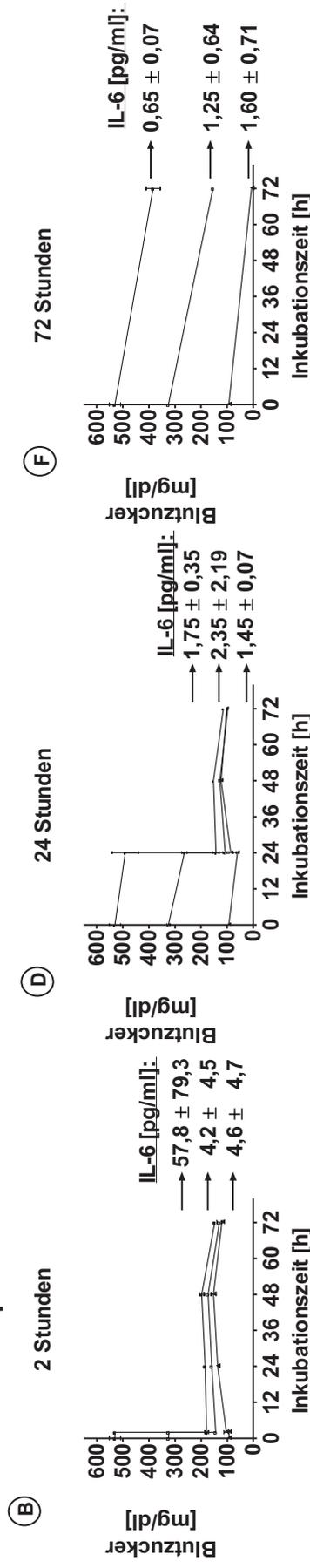


Abb. 5 Zeit- und konzentrationsabhängige Glukosespiegel in der Vollblutkultur und resultierende IL-6 Produktion

Einer Vollblutkultur wurde Glukose in unterschiedlichen Konzentrationen (100, 300, 500 mg/dl) zugefügt. Die Kulturen wurden für 2 Stunden (A und B), 24 Stunden (C und D) bzw. 72 Stunden (E und F) mit den jeweiligen Glukosekonzentrationen inkubiert, wobei nach den angegebenen Zeiträumen ein Mediumwechsel durchgeführt und die Glukosekonzentration bis zum Ende der Inkubationszeit auf 100 mg/dl konstant eingestellt wurde. Nach 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die IL-6 Konzentration bestimmt.

Dargestellt ist der Verlauf der Glukosespiegel in der Kultur nach 2, 24 und 72 Stunden sowie die IL-6 Produktion nach 72 Stunden als Mittelwert ± Standardabweichung aus jeweils 2 Experimenten von einem Responder (A, C, E) und von einem Non-Responder (B, D, F). Die Analyse der Daten erfolgte mittels ANOVA und dem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche.

** p<0,01 vs. entsprechendem 2 Stunden- und 24 Stunden-Wert; *** p<0,001 vs. entsprechendem 2 Stunden- und 24 Stunden-Wert

3.1.3 Hypoxie als Einflussfaktor auf die IL-6 Produktion

Die zuvor dargestellten Experimente wurden in Zellkulturröhrchen durchgeführt. In diesen Zellkulturröhrchen konnte man bereits nach 24 Stunden Inkubation eine deutliche Sedimentation der im Vollblut enthaltenen Zellen beobachten (Abb. 6). Da eine Versorgung der Zellen mit Sauerstoff in der Zellkultur nur passiv über Diffusion stattfindet, könnte aufgrund des wachsenden Abstandes der Zellen zur Oberfläche eine zunehmende Hypoxie einen zusätzlichen Stimulus bedeuten. Um diese Effekte zu minimieren, wurden die Experimente analog zu den bereits beschriebenen in Zellkulturplatten durchgeführt, in denen die Höhe des Überstandes deutlich geringer ist und somit die Diffusionsstrecke kürzer ist. Dadurch ist die Sauerstoffversorgung des Zellsediments verbessert. Um eine Hypoxie in der Zellkulturplatte gezielt zu simulieren, wurde der Chelatbildner Desferrioxamin (DFX) eingesetzt. DFX bindet das Eisen in der Zelle und führt dazu, dass der Transkriptionsfaktor HIF1 α , welcher durch eisenabhängige Hydroxylasen abgebaut wird, in den Zellen akkumuliert. Dieser Vorgang geschieht auch unter hypoxischen Verhältnissen und führt zu einer Umstellung des Stoffwechsels der Zelle, der an die Hypoxie angepasst ist. Mit diesem Testsystem wurde im Folgenden der zusätzliche Einfluss der Hypoxie auf die glukosestimulierte IL-6 Produktion untersucht.

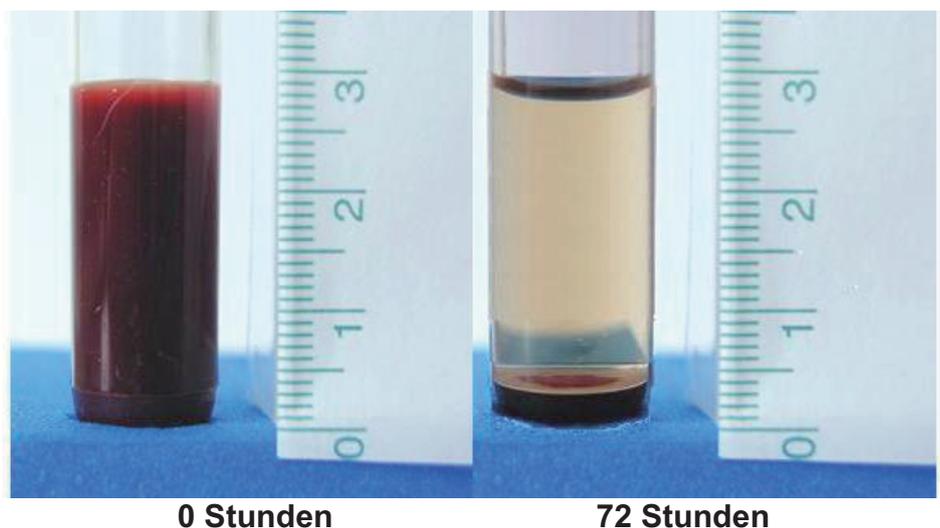


Abb. 6 Zellkulturröhrchen mit Ansatz

Zu erkennen ist der Inhalt des Zellkulturröhrchens nach 0 und 72 Stunden Inkubation im Brutschrank.

3.1.3.1 Bestimmung der Toxizität des Desferrioxamin mittels des MTT-Tests

Um einen möglichen toxischen Einfluss der durch Desferrioxamin DFX induzierten Hypoxiereaktion auf die Zellen auszuschließen, wurde zunächst die Viabilität von PBMCs nach DFX-Inkubation unter Verwendung des MTT-Testsystems gemessen. In einem weiteren Schritt wurde ebenfalls die IL-6 Produktion der PBMCs im ELISA quantitativ bestimmt. Anhand der Abb. 7A ist zu erkennen, dass nach 72stündiger Inkubation bei den Ansätzen mit den unterschiedlichen Konzentrationen des DFX (1-1.000 μM) im Vergleich zu dem Ansatz ohne DFX keine relevanten oder signifikanten Einbußen in der Viabilität nachweisbar waren. Das Gleiche gilt auch für die Ansätze, die zusätzlich mit LPS stimuliert wurden. Die Abb. 7B zeigt die IL-6 Produktion nach 72 Stunden im Inkubator. Der IL-6 Spiegel ohne DFX und ohne LPS beträgt $470,6 \pm 119,7$ pg/ml. Während bei einer Konzentration von 3 μM DFX die IL-6 Produktion leicht erniedrigt war ($345,8 \pm 25,2$ pg/ml; $p < 0,01$), führten höhere Konzentrationen ab 100 μM zu einer dosisabhängigen Steigerung der IL-6 Produktion bis 1.059 ± 242 pg/ml ($p < 0,01$). Dem gegenüber führt die zusätzliche Stimulation mit 10 ng/ml LPS zu einer deutlichen Steigerung der IL-6 Produktion auf 59.012 ± 4.717 pg/ml im Vergleich zur unstimulierten Kultur. Während bei einer Konzentration von 3 μM DFX die IL-6 Produktion signifikant erhöht ist (77.482 ± 25.115 pg/ml; $p < 0,01$ vs. Kultur ohne DFX), sinkt die Menge des produzierten IL-6 ab einer DFX Konzentration von 100 μM kontinuierlich ab bis auf 33.758 ± 3.256 pg/ml ($p < 0,01$ vs. Kultur ohne DFX). Es konnte gezeigt werden, dass DFX keinen Einfluss auf die Zellviabilität der PBMCs hat. Bei zunehmender DFX-Konzentration ist die IL-6 Produktion jedoch als Ausdruck einer zunehmenden Hypoxie bis auf das doppelte des Ausgangswertes gesteigert gewesen. Dieser Effekt war abhängig von der Konzentration des DFX in der Zellkultur. Für die weiteren Experimente wurde eine Konzentration von 100 bis 200 μM DFX gewählt, bei der nur eine geringe Stimulation der IL-6 Produktion zu beobachten war.

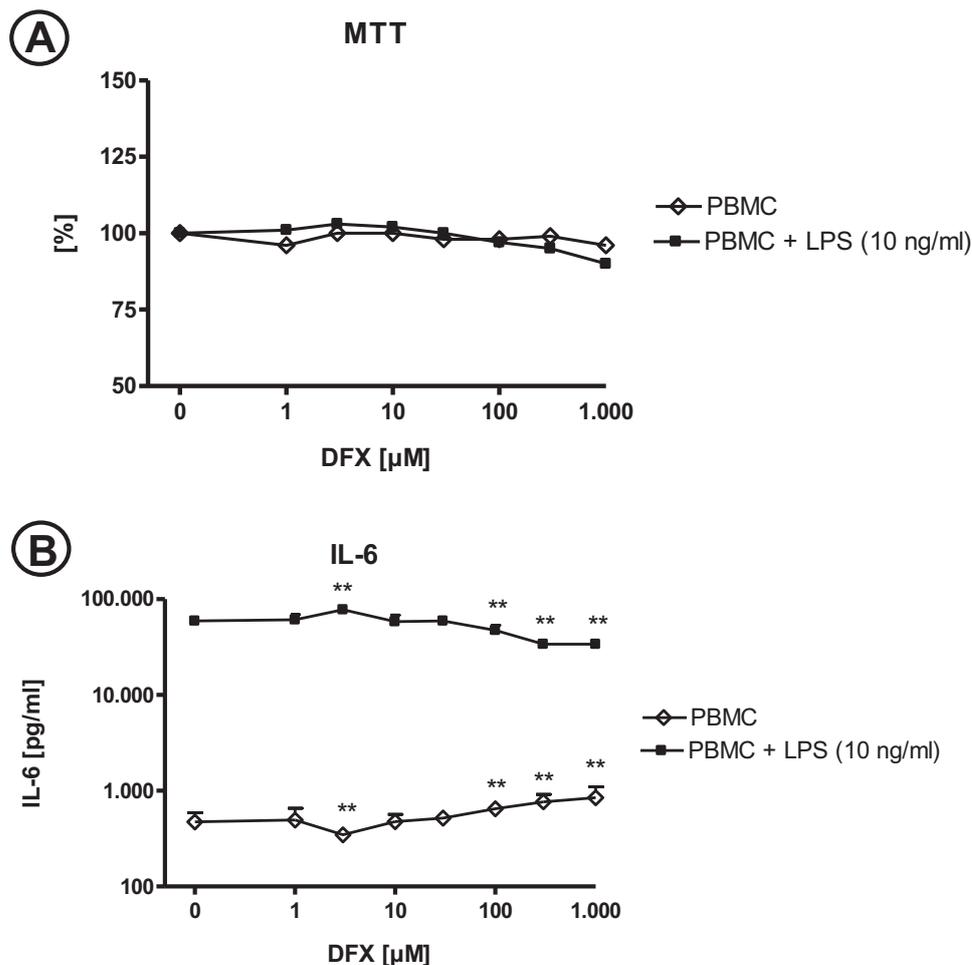


Abb. 7 Zellviabilität und IL-6 Produktion in PBMC's nach 72 Stunden Inkubation mit Desferrioxamin

Den PBMCs wurde DFX verschiedener Konzentration (1-1.000 μM DFX) hinzugefügt. Die Messung des MTT-Tests (A) und der IL-6 Produktion (B) erfolgte nach 72stündiger Inkubation. Dargestellt sind die Doppelwerte eines Experiments. In Abb. 7A ist die Viabilität der Zellen als Prozentzahl angegeben, wobei die jeweilige DFX-freie Kultur als 100 % gesetzt wurde. In der Abb. 7B ist der jeweilige Mittelwert \pm Standardabweichung der IL-6 Konzentration aufgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des ANOVA und Dunnett's Nachtest gegen die DFX-freie Kultur. ** $p < 0,01$.

3.1.3.2 Einfluss von Desferrioxamin und Glukose auf die IL-6 Produktion in der Vollblutkultur

Ziel des Experiments war es, den Einfluss einer Hypoxie in Zusammenhang mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen auf die IL-6 Produktion der

Vollblutkultur zu untersuchen. Hierzu wurde eine Vollblutkultur mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (160 mg/dl bzw. 500 mg/dl Glukose) angesetzt. Um eine Hypoxie in der Zellkulturplatte zu simulieren, wurde dem Ansatz außerdem DFX in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt (100 bzw. 200 μ M DFX) und die IL-6 Produktion nach 24, 48 und 72stündiger Inkubation gemessen. Die Abbildung 8 zeigt die IL-6 Produktion der Non-Responder und Responder bei den unterschiedlichen DFX-Konzentrationen sowie den zwei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen eines repräsentativen Experiments von dreien. Aufgrund eines fehlenden Einflusses der Hypoxie zeigt sich sowohl bei dem Responder als auch bei dem Non-Responder in der Zellkulturplatte in den DFX-freien Ansätzen keine Steigerung der IL-6 Produktion an allen drei Tagen und bei beiden Glukosekonzentrationen. Dagegen führt bei dem Responder eine DFX-Konzentration von 200 μ M sowohl bei 160 mg/dl Glukose als auch 500 mg/dl Glukose bereits nach 24 Stunden zu einem Anstieg der IL-6 Produktion auf $37,6 \pm 59,7$ pg/ml bzw. $27,2 \pm 42,6$ pg/ml, die aber noch keine statistische Signifikanz erreicht. Nach 48 Stunden findet sich ein weiterer Anstieg der IL-6 Produktion bei einer Konzentration von 200 μ M DFX sowohl bei einer Glukosekonzentration von 160 mg/dl (8.092 ± 2.568 pg/ml) als auch bei einer Konzentration von 500 mg/dl (11.801 ± 1.182 pg/ml) gegenüber der jeweiligen Kontrolle ohne DFX ($p < 0,001$). Nun ist auch bei einer Konzentration von 100 μ M DFX und der hohen Glukosekonzentration eine leichte, nicht signifikante Steigerung der IL-6 Produktion ($20,5 \pm 30,2$ pg/ml) zu beobachten. Diese verstärkt sich nach 72 Stunden Inkubation und ist nun auch bei einer Glukosekonzentration von 160 mg/dl zu sehen, während die IL-6 Produktion unter 200 μ M DFX und 160 mg/dl bzw. 500 mg/dl Glukose weiter ansteigt (3.989 ± 6.233 pg/ml bzw. 10.814 ± 1.010 pg/ml). Dem gegenüber ist beim Non-Responder lediglich nach Inkubation mit 200 μ M DFX bei einer Glukosekonzentration von 500 mg/dl nach 48 bzw. 72 Stunden Inkubation ein Anstieg des IL-6 Spiegels auf $473,1 \pm 811,4$ pg/ml bzw. $605,4 \pm 1.042,3$ pg/ml zu beobachten. Das bedeutet, dass durch einen maximalen Stimulus von 200 μ M DFX bei einer erhöhten Glukosekonzentration und einer ausreichend langen Inkubationszeit eine gesteigerte IL-6 Produktion auch bei einem Non-Responder induziert werden kann. Die Ergebnisse der beiden dargestellten Experimente deuten einen dosisabhängigen Einfluss des DFX auf die IL-6-Produktion an, der

zusätzlich durch eine erhöhte Glukosekonzentration und eine verlängerte Inkubationsdauer gesteigert werden kann. Anhand dieser Ergebnisse wird ein zusätzlicher hypoxischer Einfluss auf die IL-6 Produktion in den Zellkulturröhrchen nahe gelegt.

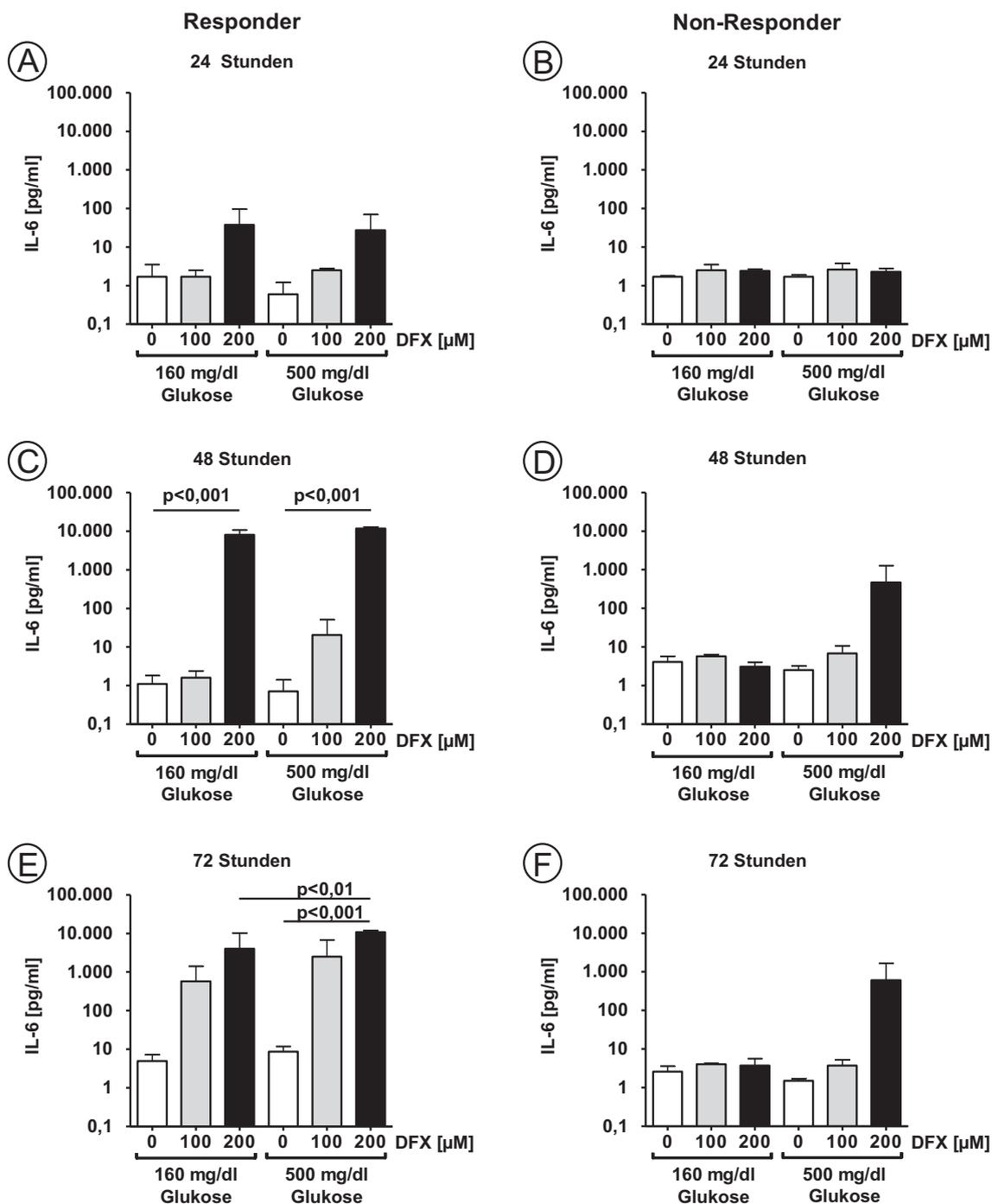


Abb. 8 IL-6 Spiegel nach 72 Stunden Inkubation mit Glukose und Desferrioxamin (DFX)

Der Vollblutkultur wurden Glukose (160 mg/dl und 500 mg/dl) und DFX (100 μ M und 200 μ M) zugegeben. Nach 24 (A und B), 48 (C und D) und 72 Stunden (E und F) wurden die Überstände entnommen und IL-6 mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von drei eines Responders (A, C und E)

und eines Non-Responders (B, D und F). Angegeben ist Mittelwert \pm Standardabweichung der Triplikate. Die Analyse der Daten erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni's Multiple Comparison Test.

3.1.4 Demographische und klinische Charakteristika der Studienpopulation der in vitro-Experimente

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, reagierten die Responder auf erhöhte Glukosekonzentrationen in vitro dosis- und zeitabhängig mit einer gesteigerten IL-6 Produktion, während bei den Non-Responder keine Reaktion auf die Glukosestimulation erkennbar war. Um zu untersuchen, ob Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei klinischen oder biochemischen Variablen vorliegen, die diese unterschiedliche Reaktion erklären könnten, wurde den 12 Probanden zusätzlich Blut entnommen und untersucht sowie anthropometrische Daten erhoben. Aufgrund der geringen Fallzahl der Responder (n=3) konnten keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich des Alters, Body-Mass-Index (BMI), Nüchtern-Plasmaglukose, HbA1c, Blutfette, Blutdruck, Leukozyten und hsCRP zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Tab. 1). Bei der Betrachtung der metabolischen Parameter fällt jedoch auf, dass in der Gruppe der Responder tendenziell höhere Gesamtcholesterin- (243 [206; 256] mg/dl vs. 188 [117; 287] mg/dl) und Triglyzeridwerte (97 [80; 109] mg/dl vs. 79 [42; 180] mg/dl) sowie höhere Nüchternglukosewerte (106 [89; 111] mg/dl; vs. 83 [67; 101] mg/dl) vorlagen. Das lässt die Vermutung zu, dass metabolische Veränderungen einen Einfluss auf das Verhalten der Zellen in vitro haben könnten.

	Gesamte Studiengruppe	Responder	Non-Responder
Demographie			
Anzahl (w/m) [n]	4/8	1/2	3/6
Alter [Jahre] ^a	44,67 ± 9,37	51,0 ± 2,6	42,6 ± 10,0
BMI (kg/m ²) ^b	23,5 (17,5; 35,0)	24 (23,0; 25,7)	21,0 (17,5; 35,0)
Klinische Parameter			
Gesamtcholesterin [mg/dl] ^b	202 (117; 287)	243 (206; 256)	188 (117; 287)
HDL-Cholesterin [mg/dl] ^b	55 (38; 84)	59 (53; 82)	51 (38; 84)
LDL-Cholesterin [mg/dl] ^b	132 (60; 201)	158 (125; 171)	120 (60; 201)
Triglyceride [mg/dl] ^b	81 (42; 180)	97 (80; 109)	79 (42; 180)
Syst. Blutdruck [mmHg] ^b	122 (110; 163)	124 (115; 140)	120 (110; 163)
Diast. Blutdruck [mmHg] ^b	78 (69; 96)	80 (75; 90)	76 (69; 96)
Nüchtern-Glukose [mg/dl] ^b	87 (67; 111)	106 (89; 111)	83 (67; 101)
HbA1C [%] ^b	5,0 (4,4; 5,6)	5,3 (4,9; 5,5)	5,0 (4,4; 5,6)
Leukozyten [/nl] ^b	5,4 (3,2; 7,9)	5,7 (4,7; 5,9)	5,1 (3,2; 7,9)
hsCRP [mg/dl] ^b	0,02 (0,02; 5,08)	0,02 (0,02; 0,1)	0,02 (0,02; 0,28)
Erythrozyten [x10 ⁶ /μl]	4,54 (3,99; 5,08)	4,53 (4,32; 4,84)	4,55 (3,99; 5,08)

Tab. 1 Charakteristika der Studienpopulation

Angegeben sind ^aMittelwert ± Standardabweichung und ^bMedian (Minimum und Maximum). Die Daten wurden mittels ^bMann-Whitney Test bzw. ^aunpaired t-Test analysiert, es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden.

3.2. Wirkung von Glukose auf die IL-6 Spiegel in vivo

Um zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse der in vitro-Versuche auch auf die Verhältnisse in vivo übertragen lassen, wurden die Auswirkungen einer Glukosebelastung, repräsentiert durch einen oralen Glukosetoleranztest, auf die systemischen IL-6 Spiegel im Blut untersucht. Zu diesem Zweck wurden Probanden des populationsbasierten KORA-Survey 4 (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) verwendet. In dieser Studie wurden bei 1.353 nicht diabetischen Probanden im Alter von 55-74 Jahren ein oGTT durchgeführt. Aus dieser Gruppe standen 119 Personen mit normaler Glukosetoleranz zur Analyse der glukosestimulierten IL-6 Produktion zur Verfügung. Um auch einen eventuellen Einfluss einer längerfristig erhöhten Glukosekonzentration in vivo untersuchen zu können, wurden zusätzlich noch 118 Personen mit gestörter Glukosetoleranz analysiert. Der oGTT stellt in beiden Fällen das Analogon in vivo zu der Stimulation mit erhöhten Glukosekonzentrationen in vitro dar.

3.2.1 Demographische und klinische Charakteristika der KORA S4-Studienpopulation

Für die Analysen wurden aus den 1.353 KORA S4-Probanden, bei denen ein oGTT durchgeführt worden ist, einerseits Probanden mit einer normalen Glukosetoleranz (NGT; n=119) und andererseits Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT; n=118) ausgewählt. Die Auswahl erfolgte alters- und geschlechtsgematcht zu den neu entdeckten Diabetikern in der Studienpopulation.

In Tabelle 2 sind demographische und klinische Parameter der beiden Gruppen dargestellt. Wie zu erwarten wiesen die Probanden mit einer normalen Glukosetoleranz im Vergleich zu Probanden mit einer IGT einen niedrigeren BMI-Wert ($27,9 \pm 4,1 \text{ kg/m}^2$ vs. $29,7 \pm 3,9 \text{ kg/m}^2$; $p < 0,001$), einen geringeren Taillenumfang ($95,0 \pm 11,9 \text{ cm}$ vs. $99,9 \pm 10,1 \text{ cm}$; $p < 0,001$) und eine kleinere Waist-to-Hip-Ratio ($0,90 \pm 0,09$ vs. $0,93 \pm 0,07$; $p = 0,02$) auf. Das Gesamtcholesterin liegt bei beiden Vergleichsgruppen über der Norm, zwischen den Gruppen besteht jedoch kein signifikanter Unterschied. Das HDL-Cholesterin ist bei den Probanden mit IGT erniedrigt gegenüber Personen mit NGT ($54,9 \pm 15,9$ vs. $58,6 \pm 15,5$; $p = 0,03$), während die Triglyzeride ($130 [95; 192] \text{ mg/dl}$ vs. $106 [80; 145] \text{ mg/dl}$; $p < 0,001$) und die Harnsäure ($6,18 \pm 1,50 \text{ mg/dl}$ vs. $5,68 \pm 1,46 \text{ mg/dl}$; $p < 0,01$) bei diesen Probanden erhöht sind. Der systolische Blutdruck ist bei den Personen mit IGT mit $142 \pm 19 \text{ mmHg}$ ebenfalls signifikant erhöht zu Personen mit NGT ($136 \pm 19 \text{ mmHg}$; $p < 0,01$), ebenso der diastolische Blutdruck ($83 \pm 10 \text{ mmHg}$ vs. $80 \pm 11 \text{ mmHg}$; $p = 0,04$). Neben den erhöhten 0- und die 2-Stunden Glukosespiegeln der Personen mit IGT ($104,8 \pm 10,4 \text{ mg/dl}$ vs. $95,8 \pm 7,3 \text{ mg/dl}$; $163,5 \pm 17,0 \text{ mg/dl}$ vs. $105,7 \pm 21,0 \text{ mg/dl}$; $p < 0,0001$) sind ebenso der Insulinspiegel ($12,08 [9,15; 17,10] \mu\text{U/ml}$ vs. $9,45 [6,60; 13,20] \mu\text{U/ml}$; $p < 0,0001$), der HOMA-IR ($3,24 [2,26; 4,54]$ vs. $2,15 [1,54; 3,28]$; $p < 0,001$) sowie der HbA1c ($5,66 \pm 0,38\%$ vs. $5,55 \pm 0,37\%$; $p = 0,03$) erhöht. Personen mit IGT haben außerdem signifikant höhere Spiegel der Akut-Phase-Proteine CRP ($2,35 [1,25; 4,34] \text{ mg/l}$ vs. $1,60 [0,76; 3,33] \text{ mg/l}$; $p < 0,01$) und Serumamyloid A ($4,05 [2,55; 7,60] \text{ mg/l}$ vs. $3,60 [2,20; 5,80] \text{ mg/l}$; $p = 0,04$), wohingegen Fibrinogen nicht unterschiedlich ist.

Demographie	NGT	IGT	p-Wert
Anzahl m/w [n]	72/47	71/47	n.z.
Alter [Jahre] ^a	64,9 ± 5,4	64,9 ± 5,6	n.z.
BMI [kg/m ²] ^a	27,9 ± 4,1	29,7 ± 3,9	<0,001
Taillenumfang [cm] ^a	95,0 ± 11,9	99,9 ± 10,1	<0,001
Waist-to-Hip-Ratio ^a	0,90 ± 0,09	0,93 ± 0,07	0,02
Klinische Parameter			
Gesamtcholesterin [mg/dl] ^a	247,49 ± 44,47	240,91 ± 37,51	0,22
HDL-Cholesterin [mg/dl]^a	58,55 ± 15,47	54,91 ± 15,85	0,03
LDL-Cholesterin [mg/dl] ^a	159,71 ± 42,15	151,97 ± 33,26	0,12
Triglyzeride [mg/dl] ^b	106 (80; 145)	130 (95; 192)	<0,001
Harnsäure [mg/dl] ^a	5,68 ± 1,46	6,18 ± 1,50	<0,01
Albumin [g/l] ^a	38,0 ± 3,7	38,7 ± 3,5	0,14
Sys. Blutdruck [mmHg] ^a	136 ± 19	142 ± 19	<0,01
Diast. Blutdruck [mmHg] ^a	80 ± 11	83 ± 10	0,04
0h Glukosewert [mg/dl] ^a	95,8 ± 7,3	104,8 ± 10,4	<0,0001
2h Glukosewert [mg/dl] ^a	105,7 ± 21,0	163,5 ± 17,0	<0,0001
Nüchtern-Insulinspiegel [µU/ml] ^b	9,45 (6,60; 13,20)	12,08 (9,15; 17,10)	<0,0001
HOMA-IR ^b	2,15 (1,54; 3,28)	3,24 (2,26; 4,54)	<0,0001
HbA1c [%] ^a	5,55 ± 0,37	5,66 ± 0,38	0,03
Leukozyten [l/ml] ^b	5,70 (5,20; 6,60)	6,20 (5,20; 7,00)	0,09
CRP [mg/l] ^b	1,60 (0,76; 3,33)	2,35 (1,25; 4,34)	<0,01
SAA [mg/l] ^b	3,60 (2,20; 5,80)	4,05 (2,55; 7,60)	0,04
Fibrinogen [g/l] ^b	2,80 (2,48; 3,20)	2,95 (2,53; 3,30)	0,37

Tab. 2 Demographische und klinische Eigenschaften der Studienpopulation

Angegeben sind ^aMittelwert ± Standardabweichung und ^bMedian (25% Perzentile und 75% Perzentile); NGT= normale Glukose-Toleranz; IGT= gestörte Glukosetoleranz. Fett dargestellt sind Werte, die signifikante Unterschiede zeigen (p<0,05). Die Daten wurden mittels

^aUnpaired t-Test, ^bMann-Whitney Test oder ^cFisher's exact Test statistisch analysiert. n.z.= nicht zutreffend (Matching Variablen)

3.2.2 IL-6 Spiegel im Serum vor und nach einem oralen Glukosetoleranztest (oGTT) bei Probanden mit normaler Glukosetoleranz

Um den Einfluss einer oralen Glukosebelastung auf die IL-6 Produktion zu untersuchen, wurde Serum von 119 Probanden vor und zwei Stunden nach einem oGTT analysiert und die IL-6 Konzentration mittels ELISA bestimmt (Abb.9). Der IL-6 Spiegel bei nüchternen Probanden lag im Median bei 2,86 [2,00; 4,47] pg/ml. Zwei Stunden nach dem oGTT wurden signifikant niedrigere Serumspiegel gemessen (2,14 [1,53; 3,44] pg/ml, $p < 0,0001$).

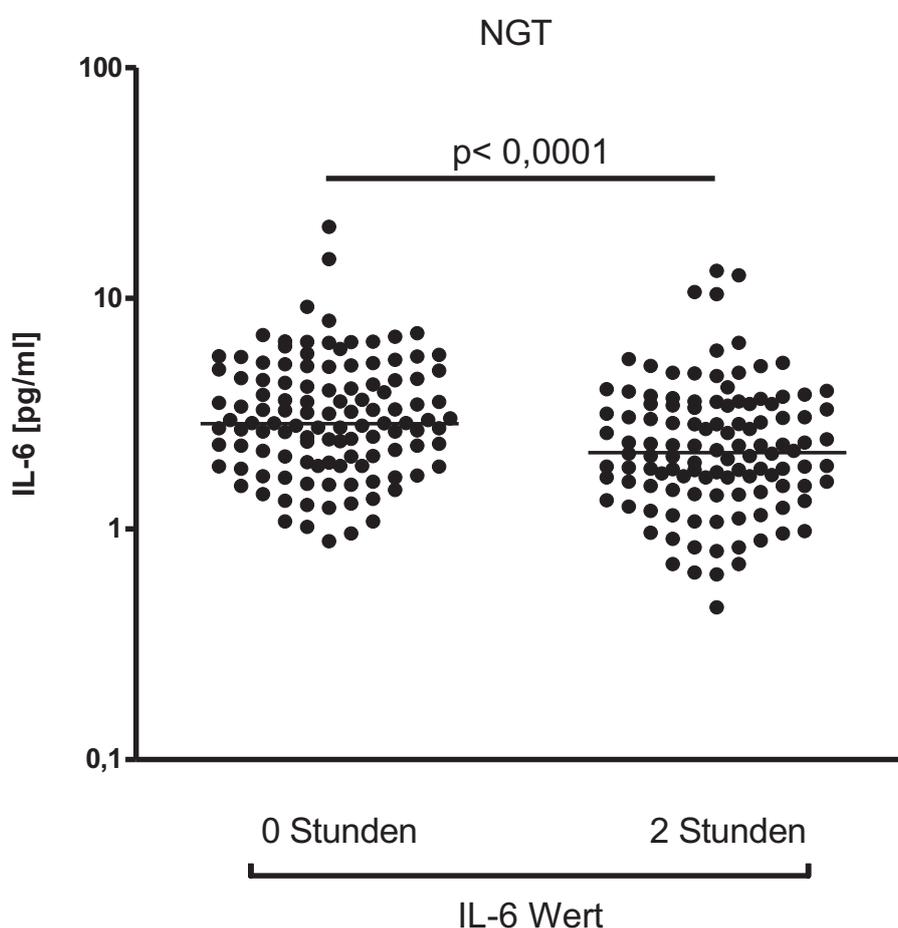


Abb. 9 IL-6 Spiegel im Serum vor (0 Std.) und nach (2 Std.) oGTT bei Personen mit normaler Glukosetoleranz (NGT)

Probanden wurde Blut vor und 2 Stunden nach einem oGTT entnommen und die IL-6 Konzentration im Serum mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Werte der Messung bei 0 und bei 2 Stunden, jeder Punkt repräsentiert ein Individuum, die Linie kennzeichnet den Median. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon Test für den Vergleich von verbundenen Stichproben.

3.2.3 Demographische und klinische Charakteristika von Probanden mit normaler Glukosetoleranz (NGT) stratifiziert nach dem IL-6 Verlauf im oGTT

Wenn auch der Großteil der Probanden mit einer normalen Glukosetoleranz mit einem Abfall der IL-6 Spiegel nach oGTT reagierten, kam es bei einigen Probanden zu einem Anstieg des IL-6 Spiegels ($n=28$). Um zu untersuchen, ob es Unterschiede zwischen den Probanden gab, die mit einem Anstieg bzw. einer Reduktion der IL-6 Produktion im oGTT reagiert haben, wurden die Probanden anhand der IL-6 Ratio (2h/0h) in zwei Gruppen unterteilt. Die Ratio wurde als Quotient der 2 Stunden IL-6 Werte geteilt durch die 0 Stunden Werte berechnet. Somit bedeutet eine Ratio <1 eine Reduktion der IL-6 Produktion nach 2 Stunden, während eine Ratio ≥ 1 einen Anstieg des IL-6 Spiegel darstellt. In Tabelle 3 sind die demographischen und klinischen Parameter der beiden Gruppen aufgeführt, die statistische Auswertung wurde unadjustiert und mittels linearer Regressionsanalyse adjustiert nach Alter und Geschlecht durchgeführt. Bei dem Vergleich der klinischen Parameter fällt zunächst auf, dass die Geschlechtsverteilung in beiden Gruppen unterschiedlich war, in der Gruppe mit einer IL-6 Ratio ≥ 1 sind mehr Frauen. Die Waist-to-Hip-Ratio zeigte sich zwar bei Personen mit einer Ratio ≥ 1 erniedrigt ($p=0,02$), dieser Unterschied war jedoch nach einer Adjustierung auf Alter und Geschlecht nicht mehr nachweisbar ($p=0,47$). Ähnliches gilt für die vor Adjustierung erniedrigten Harnsäurespiegel ($p=0,01$ vor vs. $p=0,09$ nach Adjustierung). Demgegenüber waren die HDL-Cholesterinwerte bei Personen mit einer IL-6 Ratio ≥ 1 niedriger ($56,46 \pm 14,31$ mg/dl vs. $60,33 \pm 15,85$ mg/dl; $p=0,23$). Nach Alters- und Geschlechtsadjustierung war dieser Unterschied schwach signifikant ($p=0,04$), während bei den restlichen Parametern des Lipidstoffwechsels kein Unterschied zu finden war. In Bezug auf den Kohlenhydratstoffwechsel findet sich bei den Probanden, die mit einer gesteigerten IL-6 Produktion auf den oGTT reagiert haben, ein niedrigerer HbA_{1c}-Wert auch nach Adjustierung im Vergleich zu der Gruppe mit einem Abfall der IL-6 Produktion ($5,41 \pm 0,32$ % vs. $5,60 \pm 0,38$ %; $p=0,01$ nach Adjustierung). Interessanterweise haben Personen, die mit einer Steigerung der IL-6 Produktion auf einen Glukosereiz reagiert haben, signifikant niedrigere IL-6-Ausgangsspiegel als Personen mit einer IL-6 Ratio <1 ($1,97$ [1,35;

2,79] pg/ml vs. 3,26 [2,35; 5,07] pg/ml; $p < 0,004$ adjustiert), die IL-6 Werte nach oGTT unterscheiden sich dagegen nicht. Der Unterschied des HDL-Cholesterins ist analog zu finden bei den Probanden der in vitro Versuche. Außerdem fällt auf, dass die Probanden, die mit einer Steigerung der IL-6 Spiegel nach dem oGTT reagierten, niedrigere IL-6 Ausgangswerte hatten und nach dem Test tendenziell höhere Spiegel hatten, als Personen, die mit einer Verringerung der IL-6 Spiegel reagierten.

	IL-6 (2h/0h) <1	IL-6 (2h/0h) ≥1	p-Wert (unadjustiert)	p-Wert (alters- und geschlechtsadjustiert)
Demographie				
Anzahl m/w [n]	57/28	12/16	0,03	n.z.
Alter [Jahre] ^a	65,1 ± 5,5	64,7 ± 5,5	0,74	n.z.
BMI [kg/m ²] ^a	28,0 ± 4,3	28,1 ± 3,9	0,92	0,93
Taillenumfang [cm] ^a	96,0 ± 12,2	92,5 ± 11,5	0,19	0,87
Waist-to-Hip-Ratio^a	0,91 ± 0,08	0,87 ± 0,08	0,02	0,47
Klinische Parameter				
Gesamtcholesterin [mg/dl] ^a	251,36 ± 45,63	237,05 ± 42,54	0,15	0,12
HDL-Cholesterin [mg/dl]^a	60,33 ± 15,85	56,46 ± 14,31	0,23	0,04
LDL-Cholesterin [mg/dl] ^a	162,03 ± 42,54	152,36 ± 40,99	0,29	0,36
Triglyzeride [mg/dl] ^b	106,0 (77,0; 136,5)	117,5 (82,0; 157,5)	0,37	0,31
Harnsäure [mg/dl]^a	5,92 ± 1,47	5,12 ± 1,30	0,01	0,09
Albumin [g/l] ^a	37,9 ± 3,4	38,5 ± 4,7	0,50	0,34
Systolischer Blutdruck [mmHg] ^a	135 ± 18	137 ± 22	0,74	0,52
Diastolischer Blutdruck [mmHg] ^a	80 ± 11	80 ± 12	0,99	0,95
0 h Glukosewert [mg/dl] ^a	96,4 ± 6,96	94,8 ± 7,95	0,31	0,54
2 h Glukosewert [mg/dl] ^a	104 ± 21	109 ± 16	0,27	0,38
Insulinspiegel [μU/ml] ^b	8,70 (6,23; 13,05)	10,95 (8,78; 14,63)	0,05	0,10
HOMA-IR ^b	1,97 (1,51; 3,30)	2,61 (2,03; 3,60)	0,06	0,11
HbA1c [%]^a	5,60 ± 0,38	5,41 ± 0,32	0,02	0,01
Leukozyten [/nl] ^b	5,70 (5,40; 6,65)	5,80 (4,55; 6,60)	0,15	0,17
CRP [mg/l] ^b	1,69 (0,79; 3,43)	1,25 (0,58; 2,40)	0,26	0,16
SAA [mg/l] ^b	3,50 (2,30; 6,35)	3,00 (1,85; 5,05)	0,52	0,35
Fibrinogen [g/l] ^b	2,80 (2,46; 3,20)	2,79 (2,53; 3,18)	0,98	0,69
IL-6 (0 h) [pg/ml]^b	3,26 (2,35; 5,07)	1,97 (1,35; 2,79)	0,003	0,004
IL-6 (2 h) [pg/ml] ^b	2,06 (1,42; 3,35)	2,29 (1,67; 3,68)	0,11	0,09

Tab. 3 Demographische und klinische Daten der Probanden mit normaler Glukosetoleranz stratifiziert nach dem IL-6 Verlauf im oGTT

Angegeben sind ^aMittelwert ± Standardabweichung und ^bMedian (25. Perzentile und 75. Perzentile). Die p-Werte wurden mittels linearem Regressionsmodell errechnet. Fett dargestellt sind Werte, die signifikante Unterschiede zeigen (p<0,05).

3.2.4 IL-6 Spiegel im Serum vor und nach einem oralen Glukosetoleranztest (oGTT) bei Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT)

Der Vorgang glich dem in 3.2.2, wobei das Probandenkollektiv nun eine gestörte Glukosetoleranz aufwies (n= 118). Im Vergleich zu den Daten der Personen mit NGT war der Median der Glukosekonzentration bei Personen mit IGT sowohl vor als auch 2 Stunden nach einem oGTT mit 3,41 [2,44; 4,65] pg/ml bzw. 2,79 [1,92; 3,76] pg/ml jeweils höher. Der 2 Stunden IL-6 Wert ist im individuellen Vergleich signifikant niedriger als der 0 Stunden IL-6 Wert ($p < 0,0001$).

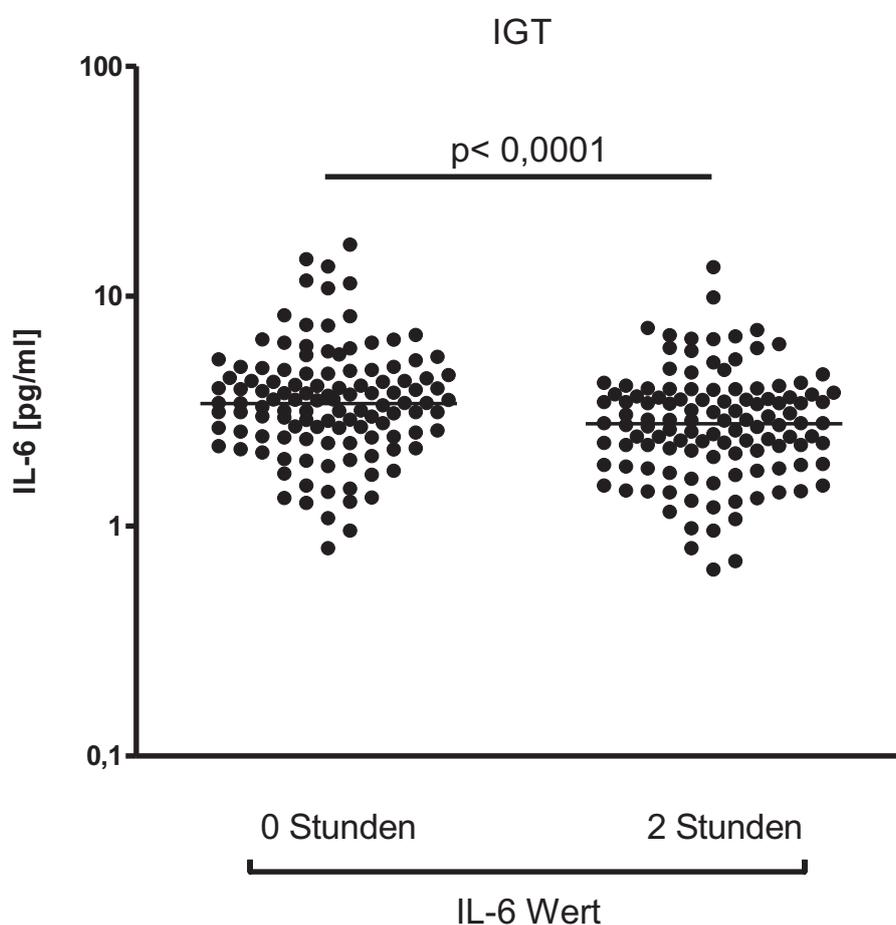


Abb. 10 IL-6 Spiegel im Serum vor (0 Std.) und nach (2 Std.) oGTT bei Personen mit gestörter Glukosetoleranz (IGT)

Probanden wurde Blut vor und 2 Stunden nach einem oGTT entnommen und die IL-6 Konzentration im Serum mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Werte der Messung bei 0 und bei 2 Stunden, jeder Punkt repräsentiert ein Individuum, die Linie kennzeichnet den Median. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon Test für den Vergleich von verbundenen Stichproben.

3.2.5 Demographische und klinische Charakteristika von Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT) stratifiziert nach dem IL-6 Verlauf im oGTT

Analog zu der Stratifizierung der Personen mit normaler Glukosetoleranz nach einem Anstieg bzw. Abfall der IL-6 Ratio nach oGTT erfolgte die Stratifizierung auf dieselbe Weise bei Personen mit einer gestörten Glukosetoleranz. Es ist davon auszugehen, dass der Glukosespiegel bei Personen mit einer IGT über längere Zeit erhöht ist. Da in den in vitro Versuchen die IL-6 Produktion ebenfalls von der Dauer der Zeit abhängig war, könnte dies ebenfalls einen Einfluss auf die IL-6 Produktion in vivo haben. Die klinischen und demographischen Daten sind in Tabelle 4 dargestellt. Zunächst fällt auf, dass bei den Personen mit IGT, ebenso wie bei den Personen mit einer NGT, die Probanden mit einer Ratio ≥ 1 eine signifikant erniedrigte Waist-to-Hip-Ratio hatten ($p=0,001$). Dieser Unterschied wurde jedoch durch die Adjustierung für Alter und Geschlecht aufgehoben ($p=0,17$). Der Taillenumfang ist bei Personen mit einer Ratio ≥ 1 ebenfalls geringer ($p=0,01$), wobei dieser Unterschied ebenfalls nach Adjustierung nicht mehr nachweisbar war ($0,24$). Das HDL-Cholesterin war bei Personen, die mit einer Steigerung der IL-6 Produktion reagiert haben, erhöht ($p=0,03$), wobei auch dieser Unterschied nach der Adjustierung auf Alter und Geschlecht nicht mehr bestand. Die übrigen Parameter des Fettstoffwechsels zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch in den Werten des Kohlenhydratstoffwechsels zeigten sich genauso wie bei den Immunparametern keine nennenswerten Unterschiede. Bei der Betrachtung der IL-6 Spiegel fällt erneut auf, dass die Personen mit einer Ratio ≥ 1 einen geringeren IL-6 Ausgangswert hatten ($p=0,004$ vor Adjustierung). Im Gegensatz zu den Personen mit normaler Glukosetoleranz ist die Signifikanz jedoch nach Adjustierung nur noch grenzwertig ($p=0,051$). Weiterhin sind jedoch die IL-6 Werte nach dem oGTT tendenziell bei den Personen mit einer Ratio ≥ 1 höher als bei den Probanden, die mit einer Senkung des IL-6 Spiegels reagiert haben.

Es bleibt festzuhalten, dass die Personen, die mit einer Steigerung der IL-6 Produktion reagiert haben, sowohl Personen mit IGT als auch Personen mit NGT erniedrigte basale IL-6 Spiegel aufwiesen und die IL-6 Werte nach dem oGTT tendenziell höher waren, was den Schluss zulässt, dass die Veränderung der IL-6 Produktion abhängig ist von der basalen IL-6 Zytokinproduktion.

Demographie	IL-6 (2h/0h) <1	IL-6 (2h/0h) ≥1	p-Wert (unadjustiert)	p-Wert (alters- und geschlechtsadjustiert)
Demographie				
Anzahl [n] m/w	58/27	13/20	0,006	n.z.
Alter [Jahre]^a	65,58 ± 5,6	63,21 ± 5,21	0,03	n.z.
BMI [kg/m ²] ^a	29,92 ± 3,79	29,14 ± 4,27	0,33	0,25
Waist-Hip-Ratio^a	0,94 ± 0,06	0,89 ± 0,09	0,001	0,17
Taillenumfang [cm]^a	101,4 ± 9,56	96,3 ± 10,66	0,01	0,24
Klinische Parameter				
Gesamtcholesterin [mg/dl] ^a	242,3 ± 36,39	237,3 ± 40,10	0,52	0,14
HDL-Cholesterin [mg/dl]^a	52,98 ± 15,00	59,94 ± 17,57	0,03	0,13
LDL-Cholesterin [mg/dl] ^a	153,44 ± 30,75	148,03 ± 38,90	0,43	0,15
Triglyzeride [mg/dl] ^b	137 (105,5; 197,5)	117 (83; 163)	0,09	0,14
Harnsäure [mg/dl] ^a	6,31 ± 1,50	5,83 ± 1,46	0,12	0,80
Albumin [g/l] ^a	38,61 ± 3,44	39,05 ± 3,76	0,55	0,48
Systolischer Blutdruck [mmHg] ^a	142 ± 18	144 ± 22	0,56	0,11
Diastolischer Blutdruck [mmHg] ^a	83 ± 10	83 ± 9	0,87	0,95
0 h Glukosewert [mg/dl] ^a	105,7 ± 10,31	102,4 ± 10,39	0,13	0,32
2 h Glukosewert [mg/dl] ^a	162,4 ± 15,8	166,3 ± 19,69	0,27	0,10
Insulinspiegel [μU/ml] ^b	12,45 (9,3; 18,2)	10,5 (8,3; 14,0)	0,49	0,65
HOMA-IR ^b	3,38 (2,38; 4,59)	2,79 (2,00; 3,57)	0,43	0,53
HbA1c [%] ^a	5,67 ± 0,40	5,62 ± 0,34	0,59	0,81
Leukozyten [nl] ^b	6,1 (5,2; 7,0)	6,5 (5,4; 7,1)	0,83	0,51
CRP [mg/l] ^b	2,41 (1,36; 4,28)	1,88 (0,80; 4,73)	0,82	0,77
SAA [mg/l] ^b	4,1 (2,6; 7,3)	4,0 (2,2; 9,9)	0,76	0,72
Fibrinogen [g/l] ^b	2,95 (2,55; 3,30)	2,86 (2,52; 3,33)	0,92	0,90
IL-6 (0 h) [pg/ml]^b	3,77 (2,87; 4,88)	2,56 (1,95; 3,41)	0,004	0,05
IL-6 (2 h) [pg/ml] ^b	2,74 (1,77; 3,64)	2,99 (2,32; 4,01)	0,38	0,13

Tab. 4 Demographische und klinische Daten der Studienpopulation mit gestörter Glukosetoleranz stratifiziert nach dem IL-6 Verlauf im oGTT

Angegeben sind ^aMittelwert ± Standardabweichung und ^bMedian (25. Perzentile und 75. Perzentile). Die p-Werte der Daten wurden mittels linearer Regressionsanalyse errechnet. Fett dargestellt sind Werte, die signifikante Unterschiede zeigen (p<0,05).

3.2.6 Einfluss des metabolischen Syndroms nach der Definition der IDF oder des NCEP-ATP III auf den IL-6 Verlauf im oGTT bei Personen mit normaler Glukosetoleranz (NGT)

Da in den in vitro-Versuchen ein Hinweis dafür vorlag, dass die Responder in ihren klinischen Parametern leicht erhöhte Cholesterin, Nüchtern-Glukose und Triglyzeridwerte aufwiesen, sollte untersucht werden, ob Personen mit normaler Glukosetoleranz, bei denen ein metabolisches Syndrom nach der Definition der IDF bzw. des NCEP-ATP III vorlag, unterschiedlich auf den Glukosestimulus des oGTT reagierten. Bei Personen, die nach der Definition der IDF ein metabolisches Syndrom haben, liegt die mediane IL-6 Ratio bei 0,74 (0,59; 0,97), d.h. die Mehrheit reagiert auch hier mit einem Abfall der IL-6 Spiegel auf einen Glukosereiz (Abb. 10A). Die mediane IL-6 Ratio in der Gruppe ohne metabolisches Syndrom liegt bei 0,70 (0,56; 0,92). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist nicht signifikant ($p=0,69$). Nahezu identische Ergebnisse finden sich bei den Probanden, die nach der Definition des NCEP-ATP III ein metabolisches Syndrom haben (0,73 [0,56; 1,06] vs. 0,70 [0,56; 0,92]; $p=0,93$), obwohl in dieser Gruppe weniger Personen waren ($n=27$). Damit zeigt sich, dass eine Aufteilung nach dem Vorliegen eines metabolischen Syndroms anhand der zwei gebräuchlichsten Definitionen nicht zu Unterschieden in der IL-6 Produktion bei oGTT führt.

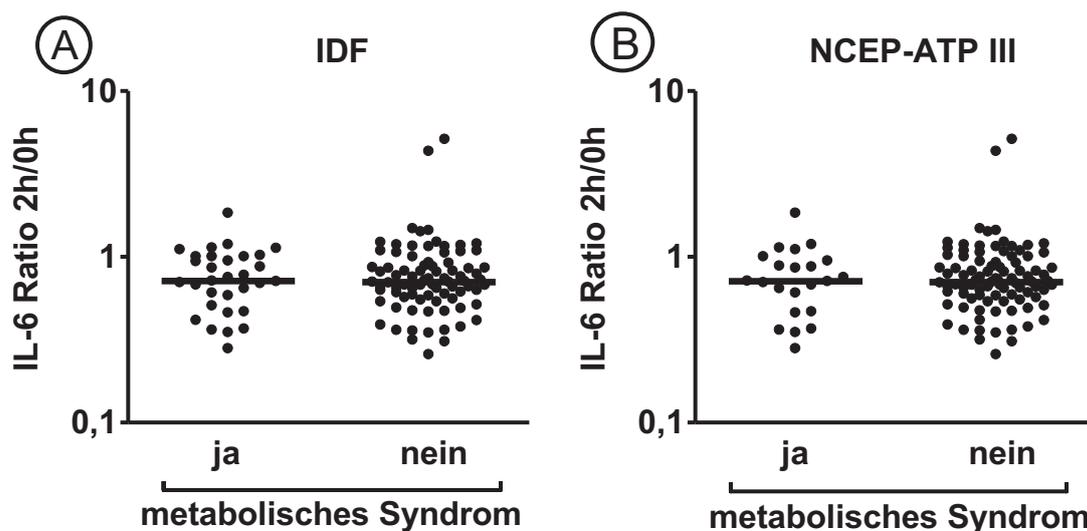


Abb. 11 Ratio der 2h/0h IL-6 Spiegel stratifiziert nach met. Syndrom nach IDF oder NCEP-ATP III

Die Studienpopulation wurde stratifiziert nach Personen mit und ohne met. Syndrom nach den Definitionen der IDF (A) oder des NCEP-ATP III (B). Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Ratio der IL-6 Werte (Quotient 2 Stunden zu 0 Stunden) nach oGTT. Die Linie kennzeichnet den Median. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney für unverbundene Stichproben.

3.2.6.1 Demographische und klinische Eigenschaften der Personen mit und ohne metabolischem Syndrom

Die Personen mit normaler Glukosetoleranz wurden hinsichtlich ihrer demographischen und klinischen Eigenschaften stratifiziert nach Vorliegen eines metabolischen Syndroms miteinander verglichen, zunächst anhand der Definition der IDF (Tab. 5). Wie zu erwarten zeigen sich signifikante Unterschiede bei den metabolischen Parametern, die in der Definition des metabolischen Syndroms nach IDF enthalten oder stark mit dieser assoziiert sind. So finden sich signifikante Unterschiede für den Taillenumfang ($p=0,001$ unadjustiert bzw. $p=0,008$ nach alters-, geschlechts- und BMI-Adjustierung), die Triglyzeridwerte ($p<0,0001$), das HDL-Cholesterin ($p=0,001$ unadjustiert), den BMI ($29,3 \pm 2,9$ kg/m^2 vs. $27,4 \pm 4,4$ kg/m^2 ; $p=0,03$ unadjustiert), wobei diese Signifikanz nach Adjustierung auf Alter, Geschlecht und Taillenumfang nicht mehr bestand ($p=0,22$), und die Waist-to-Hip-Ratio ($0,94 \pm 0,07$ vs. $0,89 \pm 0,09$; $p=0,002$

unadjustiert). Darüber hinaus finden sich bei Personen mit metabolischem Syndrom in Bezug auf die Immunparameter, dass auch hier Personen mit einem metabolischen Syndrom höhere CRP-Spiegel (2,00 [1,37; 4,35] mg/l vs. 1,33 [0,61; 2,54] mg/l; $p = 0,03$ unadjustiert) und Fibrinogen-Spiegel (3,06 [2,57; 3,41] g/l vs. 2,76 [2,43; 3,12] g/l) aufwiesen. Nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und BMI bzw. Taillenumfang war der Unterschied der CRP-Spiegel nicht mehr signifikant ($p=0,07$ bzw. $p=0,1$), in Bezug auf die Fibrinogen-Spiegel konnte eine deutliche Signifikanz erst nach Adjustierung auf Alter und Geschlecht gezeigt werden ($p=0,03$). Außerdem haben Personen mit einem metabolischen Syndrom tendenziell höhere 0 Stunden IL-6 Spiegel (3,26 [2,33; 4,90] pg/ml vs. 2,79 [1,93; 4,39] pg/ml; $p = 0,32$ unadjustiert) wohingegen die 2 Stunden IL-6 Spiegel tendenziell niedriger waren (2,06 [1,39; 3,33] pg/ml vs. 2,17 [1,53; 3,47] pg/ml; $p = 0,89$ unadjustiert), dieser Unterschiede ist jedoch weder vor noch nach Adjustierung auf die verschiedenen Parameter signifikant. In einem weiteren Schritt wurden die Personen stratifiziert nach Vorliegen eines metabolischen Syndroms anhand der Definition des NCEP ATP III. Die Untersuchung der klinischen und demographischen Eigenschaften zeigte aber bis auf signifikant erhöhte Insulinspiegel (12,6 [9,3; 15,6] μ U/ml vs. 8,7 [6,15; 12,00] μ U/ml; $p<0,01$ unadjustiert) und HOMA-IR-Spiegel (2,97 [2,09; 3,89] vs. 1,97 [1,50; 2,99]; $p<0,01$ unadjustiert) bei Personen mit metabolischem Syndrom keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu der Stratifizierung nach IDF (Daten nicht dargestellt). Die metabolischen Veränderungen scheinen keinen Einfluss auf die glukosestimulierte IL-6 Produktion in vivo zu haben, aber einen Einfluss auf die systemischen IL-6- Spiegel, die basal erhöht waren in der Gruppe der Personen mit metabolischen Syndrom und nach einer Stimulation durch einen 2 Stunden oGTT tendenziell niedriger waren als in der Gruppe ohne metabolisches Syndrom. Das Verhältnis der IL-6 Spiegel vor und nach der Stimulation war in beiden Gruppen gleich.

Demographie	kein metabolisches Syndrom (n=86)	metabolisches Syndrom (n=33)	p-Wert unadjustiert	Modell 1 alters- und geschlechts-adjustiert	Modell 1 +Adjustierung auf BMI	Modell 1 +Adjustierung auf Waist
Demographie						
Anzahl [n] m/w	50/36	22/11	0,53	n.z.	n.z.	n.z.
Alter [Jahre] ^a	65,0 ± 5,9	64,8 ± 4,3	0,04	n.z.	n.z.	n.z.
BMI [kg/m ²] ^a	27,4 ± 4,4	29,3 ± 2,9	0,03	0,03		0,22
Waist-to-Hip-Ratio ^a	0,89 ± 0,09	0,94 ± 0,07	0,002	<0,0001	0,001	0,02
Taillenumfang [cm] ^a	92,8 ± 12,8	100,6 ± 6,7	0,001	0,001	0,008	
klinische Parameter						
Gesamtcholesterin [mg/dl] ^a	246,5 ± 40,8	252,7 ± 53,3	0,43	0,42	0,43	0,34
HDL-Cholesterin [mg/dl]^a	62,1 ± 15,7	52,3 ± 11,6	0,001	0,002	0,01	0,03
LDL-Cholesterin [mg/dl] ^a	157,1 ± 40,4	165,7 ± 45,9	0,32	0,36	0,48	0,45
Triglyzeride [mg/dl]^b	96 (72; 123)	159 (125; 190)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Harnsäure [mg/dl]^a	5,45 ± 1,31	6,26 ± 1,68	0,006	0,009	0,04	0,09
Albumin [g/l] ^a	37,76 ± 3,96	38,73 ± 2,78	0,20	0,25	0,22	0,22
Sys. BP [mmHg] ^a	133,8 ± 19,8	140,9 ± 16,6	0,07	0,08	0,15	0,16
Dias. BP [mmHg] ^a	79,6 ± 11,0	82,4 ± 12,5	0,24	0,26	0,39	0,39
0h Glukosewert [mg/dl] ^a	95,8 ± 7,4	95,6 ± 7,1	0,87	0,74	0,33	0,29
2h Glukosewert [mg/dl] ^a	103,6 ± 22,3	111,0 ± 16,3	0,09	0,06	0,12	0,16
Insulinspiegel [μU/ml] ^b	8,7 (6,0; 12,0)	11,7 (7,8; 14,3)	0,07	0,05	0,10	0,21
HOMA-IR ^b	2,00 (1,48; 2,99)	2,74 (1,83; 3,55)	0,07	0,06	0,13	0,28
HbA1c [%] ^a	5,58 ± 0,39	5,47 ± 0,29	0,12	0,15	0,07	0,10
Leukozyten [nl] ^b	5,7 (5,1; 6,6)	5,8 (5,6; 6,7)	0,27	0,30	0,27	0,29
CRP [mg/l]^b	1,33 (0,61; 2,54)	2,00 (1,37; 4,35)	0,03	0,02	0,07	0,10
SAA [mg/ml] ^b	3,3 (2,2; 5,2)	4,9 (2,7; 6,5)	0,70	0,81	0,99	0,84
Fibrinogen [g/l]^b	2,76 (2,43; 3,12)	3,06 (2,57; 3,41)	0,05	0,03	0,05	0,05
Ratio 2h/0h ^b	0,71 (0,57; 0,92)	0,71 (0,51; 1,00)	0,58	0,6	0,58	0,52
IL-6 (0 Stunden) [pg/ml] ^b	2,79 (1,93; 4,39)	3,26 (2,33; 4,90)	0,32	0,32	0,52	0,71
IL-6 (2 Stunden) [pg/ml] ^b	2,17 (1,53; 3,47)	2,06 (1,39; 3,33)	0,89	0,89	0,82	0,59

Tab. 5 Demographische und klinische Daten der Studienpopulation stratifiziert nach dem metabolischem Syndrom nach der Definition der IDF

Angegeben sind ^aMittelwert ± Standardabweichung und ^bMedian (25% Perzentile und 75% Perzentile). Die p-Werte wurden mittels linearem Regressionsmodell errechnet. Fett dargestellt sind Werte, die signifikante Unterschiede zeigen (p<0,05). n.z.= nicht zutreffend

4. Diskussion

4.1 Einleitung

Bei der Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) spielen inflammatorische Einflüsse eine wichtige Rolle¹⁴, wobei zwischen dem Immunsystem und dem Glukosemetabolismus enge Verbindungen bestehen⁶². In verschiedenen epidemiologischen Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen Störungen des Glukosemetabolismus und erhöhten Konzentrationen von IL-6 im Blut aufgezeigt werden^{18,23,60,124,125}.

Neben den epidemiologischen Assoziationen gibt es aber nur wenige Arbeiten, die den Einfluss einer induzierten Erhöhung der Glukosekonzentration in vivo und in vitro auf eine Steigerung der Zytokinproduktion als einen möglichen zugrunde liegenden Pathomechanismus untersucht haben. Zu den verwendeten Glukosestimuli in vivo gehören der klassische 2-Stunden oGTT¹²⁶, eine definierte Testmahlzeit^{86,127} oder der intravenöse Glukosetoleranztest⁶¹. Untersuchungen in vitro wurden bislang an mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC)^{89,90} und der monozytären Zelllinie THP-1^{94,128,129} durchgeführt. Daten über den Einfluss einer erhöhten Glukosekonzentration auf die Zytokinproduktion in einem Vollblut-Testsystem liegen derzeit noch nicht vor.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden,

1. welchen Einfluss eine hohe Glukosekonzentration auf die Immunzellen in einem Vollblut-Testsystem hat,
2. welche modulierenden Einflüsse es auf die Immunreaktion gibt,
3. ob sich die Ergebnisse der in vitro Versuche auch auf Reaktionsmuster in vivo übertragen lassen,
4. ob es Einflussfaktoren in vivo gibt, die eine Immunantwort modulieren könnten.

4.2 Glukoseinduzierte IL-6 Produktion in vitro

Die Ergebnisse der in vitro Versuche haben gezeigt, dass eine erhöhte Glukosekonzentration in der Vollblutkultur einiger Probanden zu einer starken Steigerung der Produktion des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) geführt hat. Ein möglicher Mechanismus der gezeigten Freisetzung von IL-6 liegt in der vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (s. Abb. 12). Eine Hyperglykämie führt in der Zelle zu einer vermehrten Produktion von ROS^{130,131}. Weiterhin führt eine Hyperglykämie zur Hochregulation von Enzymen mit antioxidativen Aufgaben im Metabolismus der Zelle¹³²⁻¹³⁵. Dieser Anstieg der ROS führt in Zellen zu einer Aktivierung der Protein Kinase C (PKC)^{91,136,137}. Die PKC hat für die Freisetzung des IL-6 eine entscheidende Rolle, was sich u. a. in Versuchen zeigt, in denen eine Blockierung der PKC mittels spezifischer Inhibitoren zu einer signifikanten Verminderung der IL-6 Spiegel führt⁹⁴. Die proinflammatorische Wirkung der PKC wird zum einen über die Mitogen-aktivierte Protein Kinase p38 (p38MAPK) und zum anderen über den Transkriptionsfaktor NFκB vermittelt⁹²⁻⁹⁴. Durch eine spezifische Blockierung der p38MAPK wurde sowohl die Sekretion von Zytokinen vermindert als auch die Aktivität von NFκB, was zeigt, dass p38MAPK seine Wirkung zumindest teilweise über diesen Weg vermittelt^{94,138}. NFκB wird auch direkt durch die PKC aktiviert und ist vermehrt aktiv in einem hypoxischen Milieu^{88,139}. Der Transkriptionsfaktor NFκB stellt einen wichtigen Vermittler der Transkription proinflammatorischer Gene dar. Er befindet sich im nicht aktivierten Zustand im Zellplasma. Nach seiner Aktivierung erfolgt die Translokation in den Zellkern, wo er unter Bindung an regulatorische Abschnitte der DNS die Transkription proinflammatorischer Gene positiv verstärkt. Dadurch wird eine erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Proteine mediiert¹⁴⁰⁻¹⁴². Analog zu den Ergebnissen der Blockierung der p38MAPK findet sich auch ein Rückgang der Zytokinproduktion bei spezifischer Blockierung des Transkriptionsfaktors NFκB⁹⁴. Neben den ROS gibt es noch einen weiteren Weg, über den die PKC aktiviert werden kann und die Sekretion inflammatorischer Zytokine induziert wird. Es handelt sich um eine Aktivierung der PKC über AGEs (advanced glycation end products). AGEs entstehen durch nichtenzymatische Glukoxidation von Proteinen und Lipiden. Diese Glukoxidation ist ein natürlicher Prozess, der jedoch in einem hyperglykämischen Milieu stark beschleunigt wird^{95,96}. Neben vielfach direkt

modulierenden Einflüssen auf intrazelluläre Strukturen wirken die AGEs insbesondere auch über spezifische AGE-Rezeptoren (RAGE). Binden AGEs an RAGE, wird die Produktion inflammatorischer Zytokinen über NF κ B und MAPK über Aktivierung der PKC induziert^{92,143,144}. Zusätzlich kommt es noch zur Bildung von ROS, die ihrerseits die Aktivierung der PKC einleiten⁹³. Die Glukoxidation ist ein nicht-enzymatischer Vorgang und somit ein relativ langsamer Prozess. Die ersten AGE sind in vitro erst nach einer Woche Inkubation mit erhöhten Glukosekonzentrationen zu erkennen. Aus diesem Grund ist ein Einfluss in der Zellkultur bei einer Inkubation von 72 Stunden mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

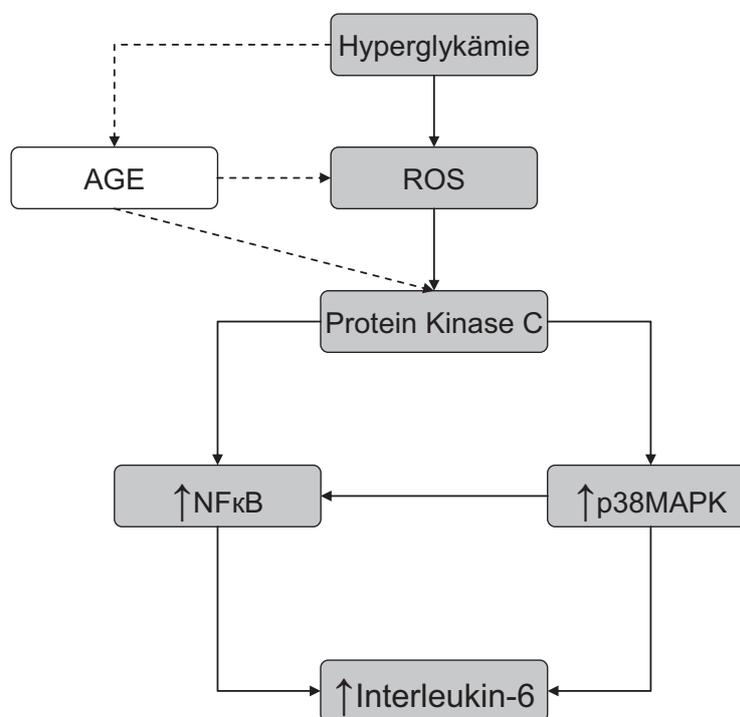


Abb. 12 Schematische Darstellung des Mechanismus, über den Hyperglykämie eine Zytokinfreisetzung vermittelt

modifiziert nach Devaraj⁹⁴ ROS= reaktive Sauerstoffspezies; AGE= advanced glycation end products; NF κ B= Nukleärer Transkriptionsfaktor κ B; p38MAPK= Mitogen aktivierte Protein Kinase p38

4.3 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der IL-6 Produktion in vitro

Die beobachtete IL-6 Produktion ist abhängig von verschiedenen Faktoren in der Zellkultur. Einen wichtigen Einfluss auf die IL-6 Produktion haben die Höhe der Glukosekonzentration, mit der die Vollblutkultur inkubiert wurde, sowie die Inkubationsdauer mit hohen Glukosekonzentrationen. Es wurde eine konzentrationsabhängige Steigerung der IL-6 Produktion in der Zellkultur beobachtet.

In einer weiteren Arbeit, in der Vollblutkulturen mit erhöhten Glukosekonzentrationen (100 mg/dl vs. 500 mg/dl) inkubiert wurden, konnte konkordant zu unseren Ergebnissen ein erhöhter IL-6 Spiegel nach 72stündiger Inkubation nachgewiesen werden, wobei ein positiver Effekt ausschließlich bei Vollblut von Personen mit einem metabolischen Syndrom nachzuweisen war, wohingegen in der Vollblutkultur von Personen ohne metabolisches Syndrom eher ein erniedrigter IL-6 Spiegel nach der Inkubation zu messen war¹⁴⁵. In vorherigen Studien mit PBMCs konnte eine Steigerung der IL-6 Produktion ebenfalls nachgewiesen werden, wobei die Zellen vor der Inkubation mit hohen Glukosespiegeln mit LPS vorinkubiert wurden¹⁴⁶.

Auch in Arbeiten mit PBMCs ohne vorherige LPS-Stimulation konnte dieser Effekt der Konzentrationsabhängigkeit dargestellt werden⁸⁹. Morohoshi benutzte Glukosekonzentrationen von 200 mg/dl und 600 mg/dl zur Erzeugung einer Hyperglykämie. Nach einer 24stündigen Inkubation war eine deutliche Abhängigkeit der IL-6 Produktion von der Höhe der eingesetzten Glukosekonzentration (200 mg/dl vs. 600 mg/dl) zu erkennen. Nach einer 48stündigen Inkubation war die IL-6 Produktion in der Zellkultur, die mit einer mittleren Glukosekonzentration inkubiert wurde, jedoch höher als in der Zellkultur, die mit der größeren Glukosekonzentration inkubiert wurde, so dass die Abhängigkeit von der eingesetzten Glukosekonzentration nicht mehr nachzuweisen war. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die sowohl eine Konzentrations- als auch eine Zeitabhängigkeit der IL-6 Produktion zeigen konnte. Ein möglicher Grund der unterschiedlichen Reaktion liegt in einem unterschiedlichen Versuchsaufbau. Während Morohoshi et al. die Inkubation nach 24 bzw. 48 Stunden abgebrochen haben⁸⁹, kam es in dieser Arbeit ausschließlich zu einem Mediumwechsel nach 2 bzw. 24 Stunden, während die Inkubationsdauer von insgesamt 72 Stunden beibehalten wurde. Dies könnte dazu geführt haben, dass durch Abbrechen der

Inkubation nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden eine sich anschließende Veränderung des IL-6 Spiegels unterbrochen wurde.

Shanmugam et al. konnten zeigen, dass es in der humanen monozytären Zellkulturlinie THP-1, die für 24 bzw. 72 Stunden mit hohen Glukosespiegeln inkubiert wurde, zu unterschiedlichen Reaktionsmustern der Zytokinsekretion auf transkriptioneller Ebene kam¹²⁸. So konnte für TNF- α (Tumor-Nekrosefaktor- α) eine Hochregulation schon nach 24 Stunden Inkubation gesehen werden, wohingegen eine Hochregulation des Chemokins MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) erst nach 72 Stunden nachzuweisen war¹²⁸. Die eingesetzte Glukosekonzentration bei den Versuchen von Shanmugan lag bei 270 mg/dl. Durch eine Hochregulation des TNF- α kann es auch konsekutiv über NF κ B zu einer Hochregulation des IL-6 kommen¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Dies deutet auf einen starken Zusammenhang zwischen Inkubationsdauer und Sekretionsmuster der Zytokine hin. Anzumerken ist jedoch, dass die Untersuchungen auf transkriptionaler Ebene nicht ohne weiteres mit der Proteinebene verglichen werden können.

Ein osmotischer Effekt auf die Zytokinproduktion wird in der Literatur derzeit kontrovers diskutiert. Während einige Arbeiten einen stimulierenden Effekt auf die Zytokinproduktion gefunden haben^{90,146,150}, gibt es andere Untersuchungen, die eine Hemmung der Zytokinsekretion festgestellt haben¹⁵¹. In dieser Arbeit konnte keinerlei Effekt auf die Zytokinproduktion gezeigt werden. Zur Herstellung eines osmotischen Gradienten wurde L-Glukose benutzt. Die stoffwechsellaktive L-Glukose ist das Enantiomer der stoffwechselaktiven D-Glukose und kommt in dieser Form in der Natur nicht vor, sondern ist ein künstlich erzeugtes Molekül. Enantiomer bedeutet, dass die beiden Kohlenhydrate formell den gleichen molekularen Aufbau besitzen, jedoch eine unterschiedliche Anordnung. Sie verhalten sich wie Bild und Spiegelbild und können nicht durch Drehung der Atome in Deckung gebracht werden. Aufgrund dieses strukturellen Unterschiedes sind Enzyme nicht in der Lage, die L-Glukose zu verstoffwechseln. Damit hat man einen identischen osmotischen Effekt, ohne jedoch Veränderungen durch Stoffwechselfvorgänge zu erzeugen. Aufgrund der unterschiedlichen Methode zur Erzeugung eines osmotischen Gradienten in den verschiedenen Studien ist eine divergierende Reaktion möglicherweise zu erklären.

So erfolgte bei der Verwendung der Substanz Mannitol immer eine Hochregulation der Zytokinproduktion^{90,146}, wohingegen in Gegenwart von hohen NaCl-Konzentrationen sowohl eine gesteigerte¹⁵⁰ als auch eine verminderte¹⁵¹

Zytokinproduktion beobachtet wurde. Eine weitere Arbeit, in der ebenfalls L-Glukose als osmotische Kontrolle verwendet wurde, zeigte wie in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die IL-6 Produktion¹⁴⁵. Das legt die Vermutung nahe, dass eine Beeinflussung der Zytokinproduktion durch die stoffwechselaktiven Substanzen NaCl und Mannitol zumindest jedoch nicht ausgeschlossen werden kann.

Eine durch Hyperglykämie ausgelöste Steigerung der IL-6 Produktion konnte sowohl in in vitro Versuchen mit Zelllinien^{94,128} als auch mit frisch isolierten PBMCs gezeigt werden^{89,90,146}. Die experimentellen Bedingungen sind jedoch nur eingeschränkte Betrachtungsweisen des physiologischen Milieus. Zelllinien können anders reagieren als frisch isolierte PBMCs, da sie zum einen nur einen bestimmten Leukozytensubtyp repräsentieren und zum anderen in der Regel aufgrund ihres neoplastischen Ursprungs oft genetische Aberrationen aufweisen.

Aber auch PBMCs stellen nicht die Vielzahl der interagierenden Zellen im Körper dar, sondern bilden nur einen Teilbereich der komplexen Vorgänge zellulärer Interaktion ab. So ist beispielsweise zur Erzeugung einer messbaren Reaktion auf einen Stimulus ein starker und teilweise auch unphysiologischer zusätzlicher Stimulus von Nöten wie z.B. Anti-CD3 Antikörper oder Phytohämaglutinine¹⁵².

Nach der Isolierung und Kultivierung der PBMCs in synthetischen Medien zeigen sich bei der Messung der Zytokin-Spiegel schwer reproduzierbare und ungenaue Werte im Vergleich zur Vollblutkultur¹¹⁶. Dies mag zum einen daran liegen, dass durch den Vorgang der Isolierung eine gewisse Vorstimulation der Zellen erfolgt und zum anderen auch andere Zytokine und inhibierende und stimulierende Co-Faktoren durch die Isolation entfernt werden. In der Vollblutkultur stehen alle vorhandenen Zellen für Zell-Zell-Interaktionen zur Verfügung und es erfolgte kein Entfernen von inhibierenden oder stimulierenden Faktoren, so dass ein möglichst physiologisches Abbild der Vorgänge im menschlichen Körper erreicht wird.

4.4 Hypoxie induziert die IL-6 Produktion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Zytokinausschüttung in der Zellkultur durch eine mittels Desferrioxamin (DFX) simulierte Hypoxie hervorgerufen werden konnte. Unter diesen Bedingungen war es sogar möglich, eine inflammatorische Reaktion bei Non-Respondern zu erzeugen, die unter normoxischen Bedingungen nicht mit einer IL-6-Induktion auf einen Glukosestimulus

antworteten. Es konnte bereits früh gezeigt werden, dass eine Hypoxie in der Zelle zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Immunmarker, insbesondere des IL-6, führte^{153,154}.

Die zellbiologischen Mechanismen, die zu einer Ausschüttung dieser Immunmarker führen, sind heute zumindest zum Teil verstanden. So ist HIF-1 (Hypoxie induzierter Faktor-1) einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren, der die Genregulation unter hypoxischen Verhältnissen steuert¹⁵⁵. HIF-1 ist ein Dimer bestehend aus HIF-1 α und HIF-1 β , welche unter normoxischen Verhältnissen voneinander räumlich getrennt vorliegen. Dies liegt daran, dass HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen im Proteasom stetig abgebaut wird. Unter hypoxischen Verhältnissen kommt es zu einem verminderten Abbau des HIF-1 α , welches nun in den Nukleus wandert und dort mit dem HIF-1 β ein Dimer bildet. Das Dimer bindet an HREs (Hypoxie regulierende Elemente) in verschiedenen Promotorsequenzen, wodurch eine Reihe von Genen wie z.B. Erythropoietin, VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), Glukosetransporter und glukolytische Enzyme aktiviert werden¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. HIF-1 α induziert des weiteren die Produktion des IL-6^{160,161}. Die Tatsache, dass nur 65 Prozent der durch Hypoxie induzierten Gene auf eine HRE-vermittelte Aktivierung zurückzuführen sind, zeigt an, dass noch weitere Mechanismen eine entscheidende Rolle in der Umstellung der Zelle unter hypoxischen Verhältnissen haben¹⁶². So kommt es zu einer schnellen Steigerung der MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Aktivität bei Eintritt einer Hypoxie. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Hemmung der p38MAPK durch spezifische Inhibitoren die Produktion von IL-6 gesenkt werden konnte¹⁶¹. Zusätzlich führte eine Hemmung der MAPK zu einer verminderten Expression des HIF-1 α ^{163,164}. Auch der Transkriptionsfaktors NF κ B ist ein wichtiger Regulator der Genaktivität in der Hypoxie¹⁶⁵. Durch die spezifische Hemmung des NF κ B konnte die IL-6 Produktion ebenfalls gesenkt werden^{160,161}. Daraus ergeben sich drei Mechanismen, durch die eine IL-6 Produktion in der Zelle in einem hypoxischen Milieu gesteigert werden kann (Abb. 13).

In dem anaeroben Stoffwechsel der Zelle kommt es außerdem zu der vermehrten Herstellung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)¹⁶⁶, die Einfluss auf den Transkriptionsfaktor HIF-1 α haben. Außerdem aktivieren ROS NF κ B und p38MAPK (s. 4.2). Betrachtet man die Mechanismen, über die es zu einer IL-6 Produktion sowohl unter hypoxischen (s. Abb. 13) als auch unter hyperglykämischen (s. Abb. 12) Verhältnissen kommt, so fällt auf, dass ähnliche zelluläre Pfade benutzt werden. Dies

könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Hyperglykämie und eine Hypoxie synergistisch auf die IL-6 Produktion in der Zelle wirken könnten. Eine Hyperglykämie induziert ähnliche pathophysiologische Veränderungen und zelluläre Schäden wie eine Hypoxie. Bereits 1993 postulierten Williamson et al. einen pseudohypoxischen Effekt, hervorgerufen durch eine Hyperglykämie¹⁶⁷. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Glukoseaufnahme in einer in vitro Zellkultur von Mesangiumzellen zu einer verstärkten Produktion von IL-6 führte, die von einer gesteigerten Expression des HIF-1 α begleitet wurde¹⁶⁸. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da eine gleichzeitig bestehende Hyperglykämie und Hypoxie ebenfalls zu einer Verstärkung der IL-6 Antwort geführt haben. Im Gegensatz dazu stehen jedoch Arbeiten, die gezeigt haben, dass eine Aktivierung des HIF-1 α und der HIF-1 abhängigen Gene durch eine Hyperglykämie vermindert werden^{169,170}. Ob es eine Verbindung der Mechanismen der Stoffwechsellagen unter hypoxischen und hyperglykämischen Verhältnissen gibt und wie diese Verbindung aussieht, bedarf einer weiteren Abklärung.

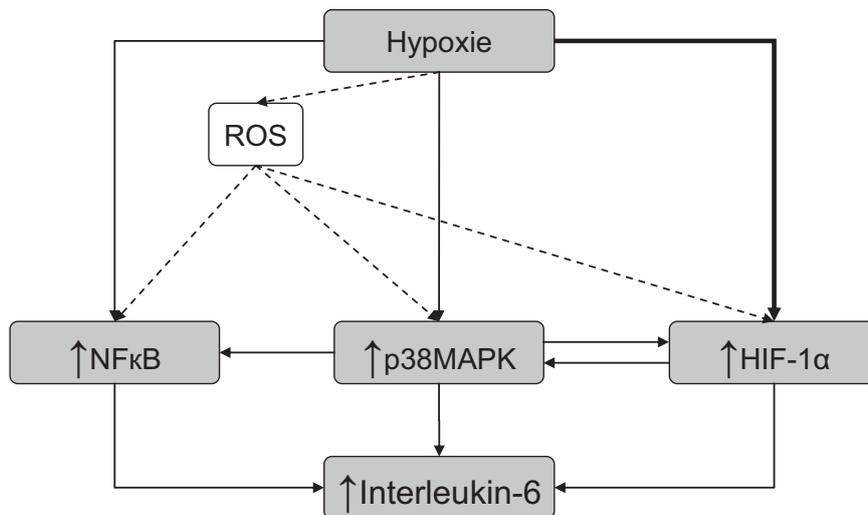


Abb. 13 Schematische Darstellung des Mechanismus, über den Hypoxie eine Zytokinfreisetzung vermittelt

HIF-1 α = Hypoxie induzierter Faktor-1 α ; NF κ B= Nukleärer Transkriptionsfaktor κ B;
 p38MAPK= Mitogen aktivierte Protein Kinase p38; ROS= reaktive Sauerstoffspezies

4.5 Interindividuelle Unterschiede der Zytokinsekretion

Anhand der Höhe der Zytokinproduktion der Probanden auf den Glukosereiz ließen sich zwei Gruppen unterscheiden: zum einen die Responder mit einer deutlich gesteigerten IL-6 Produktion im Verlauf der Inkubation und zum anderen die Non-Responder, die keine Erhöhung der IL-6 Produktion aufwiesen.

Ein möglicher kausaler Ansatzpunkt für diese interindividuellen Unterschiede ist eine unterschiedliche metabolische Konstitution der beiden Gruppen. So fiel bei der Betrachtung der klinischen Parameter der Probanden auf, dass die Responder etwas schlechtere metabolische Parameter hatten als die Non-Responder. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Blut von Probanden mit einem metabolischen Syndrom (MetS) nach Inkubation mit einer hoch dosierten Glukosekonzentration zu einer Hochregulation der IL-6 Produktion sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene kam¹⁴⁵. Dieser Anstieg der IL-6 Spiegel konnte jedoch nicht bei Personen ohne MetS nachgewiesen werden. Eine Glukoseaufnahme resultiert damit nicht zwangsläufig in einer Inflammation, sondern führt erst bei metabolisch dysregulierten Individuen zu einer Aktivierung einer Immunantwort in Leukozyten³⁷. Diese Befunde zeigen, dass eine metabolische Dysbalance eine Immunreaktion auf einen Glukosereiz begünstigen kann. Eine weitere Erklärung für die ausschließliche Hochregulation der IL-6 Produktion bei den Respondern sind möglicherweise auch Gen-Polymorphismen. Es konnte dargestellt werden, dass in vitro Leukozyten von Probanden mit verschiedenen SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) für IL-6 mit unterschiedlichen Reaktionen der IL-6 Antwort auf Lipopolysaccharid als Stimulanz reagierten¹⁷¹. Die Abhängigkeit der IL-6 Produktion von Gen-Polymorphismen konnte auch in vivo gezeigt werden. Die maximale IL-6 Produktion nach koronaren Bypass-Operationen wurde signifikant durch Gen-Polymorphismen beeinflusst¹⁷². Die natürliche Immunantwort wird durch zahllose Gene kodiert. Diese Gene gehören zu den am stärksten konservierten Strukturen, doch trotz dieser hohen Konservierung gibt es auch starke interindividuelle Unterschiede, die zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Entwicklung von Krankheiten führen können¹⁷³. Selbst kleine Veränderungen in den Genen, die für die Erkennung zwischen Selbst und Fremd kodieren, können zu großen Veränderungen in den darauf folgenden Stoffwechselwegen führen.

Auch in diesem Kontext kann nicht ausgeschlossen werden, dass Polymorphismen in Genen, die für einzelne Komponenten der Hyperglykämie-Antwort kodieren, zu interindividuellen Unterschieden in der Hochregulation von bestimmten Immunmediatoren als Reaktion auf erhöhte Glukosespiegel führen. So würden Veränderungen in gemeinsamen Stoffwechselwegen des hypoxischen und hyperglykämischen Milieus zu konkordanten Veränderungen führen. Allerdings gibt es zu diesem Thema bislang keine Arbeiten, so dass diese Erklärung nicht mit Daten aus anderen Arbeitsgruppen belegt werden kann.

4.6 IL-6 Sekretionsmuster IGT vs. NGT

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde stammen aus Ergebnissen des KORA Survey 4. Bei dieser Studie handelt es sich um eine populationsbasierte Querschnittsstudie, die mit dem Ziel der Erhebung von Daten durchgeführt wurde, die eine prospektive Nachverfolgung im Bereich der Epidemiologie, Gesundheitsökonomie und Versorgungsforschung erlauben. Es erfolgte die Aufteilung der Population in Hinblick auf Glukosetoleranzstatus in Personen mit normaler und gestörter Glukosetoleranz. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der IL-6 Spiegel von Probanden mit einer normalen und einer gestörten Glukosetoleranz vor und nach einem 2h-oGTT fällt auf, dass der IL-6 Spiegel unabhängig vom bestehenden Glukosetoleranzstatus abfällt. Das heißt, dass entgegen den Beobachtungen in der Vollblutkultur durch einen Glukosereiz eine verminderte Produktion des IL-6 induziert wird.

Aktuell erhobene Daten aus in vivo Studien mit einem ähnlichen Versuchsaufbau sind bislang zu widersprüchlichen Ergebnissen in Bezug auf die IL-6 Produktion nach Glukosereiz gekommen. Im Wesentlichen gibt es Arbeiten aus drei verschiedenen Arbeitsgruppen zu diesem Thema. Zum einen konnten die Arbeitsgruppen von Gonzalez und Ceriello zeigen, dass es nach einem Glukosereiz zu einer geringeren IL-6 Produktion kommt^{174,175}. Im Gegensatz dazu stehen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppen von van Oostrom und Manning, in denen eine glukoseinduzierte verstärkte IL-6 Produktion nachgewiesen werden konnte^{86,126,127}.

Gonzalez konnte zeigen, dass es zu einem signifikanten Abfall der IL-6 Spiegel in mononukleären Zellen kommt, die 2 Stunden nach einer oralen Gabe von 75 g Glukose aus dem Blut gesunder Probanden isoliert wurden¹⁷⁵.

In Arbeiten von Ceriello konnte gezeigt werden, dass bei einem oGTT bei Diabetikern der IL-6 Spiegel 60 min. nach der Ingestion sein Maximum erreicht und danach kontinuierlich wieder abfällt. Nach 4 Stunden war der IL-6 Spiegel sogar unter den Ausgangswert abgesunken¹⁷⁴.

Die Arbeitsgruppe um Manning zeigte im Gegensatz dazu, dass es zu einem Anstieg des IL-6 Spiegels nach Glukosebelastung kommt. Manning wählte für seine Studien Patienten aus mit einem BMI von mindestens 27 kg/m². Die Studienpopulation hatte einen durchschnittlichen BMI von 37,3 kg/m²⁸⁶. Auch der Taillenumfang war im Vergleich zu den Testpersonen unserer Studie deutlich höher (109±13 cm vs. 95±12 cm und 100±10 cm). Die Werte der postprandialen IL-6 Ausschüttung waren nach dem Gewichtsverlust vergleichbar mit der von Patienten mit einer normalen Glukosetoleranz. Als Kontrollgruppe rekrutierte Manning in seiner Studie normalgewichtige Probanden mit einem BMI von 22,9±1,9 kg/m²⁸⁶. In der Kontrollgruppe konnte er signifikant niedrigere IL-6 Plasmaspiegel messen als bei den übergewichtigen Probanden. Da das Fettgewebe ein wichtiger Produzent des zirkulierenden IL-6 ist^{69,176,177}, ist zu erwarten, dass aufgrund des vermehrt vorliegenden Fettgewebes eine stärkere inflammatorische Reaktion auf einen Reiz folgt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es durch Gewichtsverlust zu einer verringerten postprandialen Freisetzung des IL-6 aus Skelettmuskelzellen bei Männern mit einer gestörten Glukosetoleranz kommt¹⁷⁸. Der Faktor des Übergewichts scheint in diesem Zusammenhang also entscheidender zu sein als der Status der Glukosetoleranz. Dem widerspricht jedoch die Beobachtung in dieser Arbeit, dass die Probanden, die mit einer Steigerung der IL-6 Produktion auf den oGTT reagierten, unabhängig von der Glukosetoleranz, durchschnittlich einen geringeren Taille-Hüft-Quotienten aufwiesen.

Manning konnte des weiteren zeigen, dass während eines oGTT eine Besonderheit in Bezug auf die Kinetik der IL-6 Produktion bei adipösen Probanden vorliegt¹²⁶. Es zeigte sich, dass 30 und 60 min. nach der Ingestion von 75g Glukose ein signifikanter Abfall der IL-6 Spiegel zu messen war. Nach 120 min. zeigte sich kein signifikanter Unterschied des IL-6 Spiegels im Vergleich zum Nüchtern-IL-6 Spiegel. Auch in dieser Testreihe zog Manning als Probanden ausschließlich adipöse Versuchspersonen heran mit einem mittleren BMI von 33,4 kg/m². Einen ähnlichen Abfall des IL-6 Spiegels konnte er auch bei seinen Testreihen mit glukosereichen Probemahlzeiten und im Vergleich von adipösen gegenüber normalgewichtigen

Probanden nach 60 min. feststellen⁸⁶. Manning führte diesen Effekt auf eine spiegelbildlich zum IL-6 Abfall erhöhte Insulinsekretion zurück¹²⁶.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Studien von van Oostrom, der den Effekt glukosereicher Nahrung auf gesunde männliche Versuchsprobanden untersuchte¹²⁷. Erst nach 4 Stunden zeigte sich jeweils ein signifikanter Anstieg der IL-6 Spiegel im Vergleich zum initial gemessenen IL-6.

In der hier vorgestellten Arbeit erfolgte keine Messung der Insulinspiegel zwei Stunden nach dem Glukosereiz, so dass diesbezüglich keine Vergleiche gemacht werden können. Es könnte jedoch sein, dass in den hier durchgeführten Messungen der zeitliche Abstand der Messung zum Glukosereiz zu niedrig gewählt ist. Wichtig ist daneben jedoch noch zu erwähnen, dass die Daten Mannings und van Oostroms jeweils auf niedrigen Probandenzahlen beruhen und eine Extrapolation nicht ohne weiteres auf eine größere Population möglich ist.

Vergleicht man die klinischen Parameter der Probanden in dieser Arbeit fällt auf, dass Probanden, bei denen eine Steigerung des IL-6 Spiegels 2 Stunden nach Glukoseaufnahme erfolgte, einen niedrigeren basalen IL-6 Spiegel hatten unabhängig von dem Status der Glukosetoleranz. Im Vergleich der basalen IL-6 Spiegel fällt auf, dass die basalen IL-6 Spiegel in den Studien von Manning ebenfalls relativ niedrig sind. Es scheint ein Zusammenhang zu bestehen zwischen den basalen IL-6 Spiegeln und der inflammatorischen Reaktion auf einen Glukosereiz. Letztendlich bedarf es jedoch einer weiteren Klärung über Studien und experimentellen Versuchsaufbauten, um diesen Zusammenhang weiter zu klären.

Ein weiterer Kritikpunkt bei dem Vergleich der unterschiedlichen Arbeiten stellt die Größe des Probandenkollektivs dar. In den Arbeiten von Manning und van Oostrom wurden nur sehr kleine Probandengruppen untersucht. Ein Vergleich mit dem relativ großen KORA S4 Probandenkollektiv ist aus diesem Grund nicht ohne weiteres möglich.

4.7 IL-6 Sekretionsmuster in Abhängigkeit vom metabolischen Syndrom

Auch bei der Stratifizierung der Probanden nach den Einschlusskriterien eines metabolischen Syndroms und dem Vergleich der IL-6 Spiegel vor und nach dem oGTT wurden Daten des populationsbasierten KORA-Survey 4 entnommen und das Studienkollektiv aufgeteilt in Personen mit und ohne metabolisches Syndrom. Es fällt

auf, dass es keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die 2h/0h-Ratio der IL-6 Produktion gibt. Die Ratio von <1 zeigt an, dass der IL-6 Spiegel nach dem oGTT wie bei dem Vergleich von NGT versus IGT niedriger war als vor der Glukosebelastung, unabhängig von der zugrunde liegenden Definition nach der die Probanden eingeteilt wurden. Wie bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, war der basale IL-6 Spiegel bei Personen mit einem metabolischen Syndrom im Vergleich zu Personen ohne metabolisches Syndrom signifikant erhöht^{145,179}. Im Unterschied zu diesen Studien konnte in dieser Studie jedoch kein Anstieg des IL-6 Spiegels nach einem oGTT gesehen werden, unabhängig von der metabolischen Kategorisierung. Die IL-6 Spiegel waren nach der Glukosebelastung bei den Personen mit metabolischem Syndrom sogar tendenziell eher vermindert gegenüber den IL-6 Spiegeln bei Personen ohne metabolisches Syndrom, wenn auch nicht signifikant. Diese Ergebnisse sind konkordant zu den Beobachtungen bei der Aufteilung der Probanden nach IGT und NGT. Kempf et al. konnten auf transkriptionaler Ebene in Leukozyten eine deutliche Steigerung der Genexpression für Personen mit einem metabolischen Syndrom 2 Stunden nach dem oGTT nachweisen. Für Personen, die nach der Definition kein metabolisches Syndrom haben, konnte jedoch konkordant zu unseren Beobachtungen ein Rückgang der Genexpression für IL-6 gesehen werden, wobei dieser nicht signifikant war¹⁴⁵. Ein Grund für die gesteigerte IL-6 Genexpression könnte in der Tatsache begründet sein, dass durch das Legen einer Venenverweilkanüle und Blutentnahmen aus dieser, wie in der Studie von Kempf et al. geschehen, per se eine Steigerung der IL-6 Serumkonzentration nach sich ziehen kann¹⁸⁰. Außerdem sind die Ergebnisse lediglich auf transkriptioneller Ebene in Leukozyten erfasst und lassen sich nicht ohne weiteres auf die Ergebnisse der endgültigen IL-6 Serumkonzentrationen übertragen. Die gemessenen IL-6 Spiegel sind 2 Stunden nach Glukoseaufnahme erfolgt und eine darüber hinaus gehende Veränderung des IL-6 Spiegels durchaus möglich¹²⁷.

Aufgrund der immunmodulatorischen Wirkung des Insulins könnte es sein, dass durch eine glukoseinduzierte Insulin-Ausschüttung die IL-6 Produktion negativ beeinflusst worden ist^{126,181,182,183}. Insulin führt zu einer verminderten Lipolyse in den Adipozyten des Fettgewebes und zu einer geringeren Konzentration von freien Fettsäuren im Blutplasma, was zu einer verringerten Aktivierung proinflammatorischer Kreisläufe führt¹⁸⁴. Bei der Betrachtung der 2h/0h-Ratio der IL-6 Spiegel von Personen ohne metabolisches Syndrom fällt auf, dass es zwei

Probanden im Kollektiv gab, die mit einer sehr starken Erhöhung der IL-6 Spiegel auf den Glukosereiz reagierten. Dies könnten Probanden sein, die in unseren in vitro Versuchen als Responder kategorisiert worden wären. Somit könnte es sich eine besondere Prädisposition für eine gesteigerte IL-6 Produktion auf einen Glukosereiz hin handeln. Dies ist die erste Arbeit, die einen solchen Zusammenhang aufzeigt, so dass zur Unterstützung der Hypothese weitere Untersuchungen stattfinden sollten.

4.8 Weiterführende Überlegungen

Der Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und Gefäßveränderungen konnte mehrfach gezeigt werden und ist gut belegt^{185,186,187}. Die dem zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht ausreichend erforscht. Wichtige Mechanismen scheinen in diesem Zusammenhang die chronische Entzündung und die Hypoxie zu sein¹⁸⁸. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den in vitro Versuchen ein direkter Synergismus von Hypoxie und Hyperglykämie in Bezug auf die Herstellung inflammatorischer Proteine wie IL-6 hat. Dieser in vitro gut darstellbare Effekt ließ sich nicht in vivo darstellen. In dem Studienkollektiv kam es nach einer Glukosebelastung vielmehr zu einer Reaktion in Abhängigkeit von den vorherrschenden IL-6 Spiegeln. Bei hohen basalen IL-6 Spiegeln war eher mit einer verminderten Immunreaktion zu rechnen und bei niedrigen eher mit einer erhöhten IL-6 Produktion im Sinne einer Immunreaktion. Dies zeigt, dass multiple Mechanismen modulierend auf die Reaktion des Organismus auf hyperglykämische Reize Einfluss haben. Es sind mehr Studien und Experimente von Nöten, um ein genaueres Verständnis der genauen Mechanismen der Stoffwechselreaktionen im Körper zu erlangen. Die Tatsache, dass es in dem hier verwendeten Probandenkollektiv der in vitro Versuche Responder und Non-Responder gibt, wirft die Frage auf, ob es gegebenenfalls genetische Gründe für die unterschiedlichen Reaktionsmuster auf den Glukosereiz gibt. Eine genauere Investigation sollte für zukünftige Projekte zumindest in Betracht gezogen werden. Auch in dem großen Studienkollektiv des KORA-Survey 4 gibt es Probanden, die auf den Glukosereiz mit einer stark erhöhten IL-6 Produktion reagierten. Ob diese Probanden ein erhöhtes Risiko für atherosklerotische Veränderungen oder für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms oder einer Glukosetoleranzstörung aufweisen, ließe sich nur durch prospektive Kohortenstudien zeigen.

5.Literaturverzeichnis

1. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **20**, 1183-1197 (1997).
2. Kerner W., Brückel J. & Kiess W. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft. 2004.
3. Wild,S., Roglic,G., Green,A., Sicree,R. & King,H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 1047-1053 (2004).
4. King,H., Aubert,R.E. & Herman,W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* **21**, 1414-1431 (1998).
5. Diabetes Atlas: Executive Summary (second edition). 2003.
6. Koster,I., von Ferber,L., Ihle,P., Schubert,I. & Hauner,H. The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany--the CoDiM study. *Diabetologia* **49**, 1498-1504 (2006).
7. Zimmet,P.Z. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. *Diabetologia* **42**, 499-518 (1999).
8. Rathmann,W. *et al.* High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia* **46**, 182-189 (2003).
9. Thefeld,W. [Prevalence of diabetes mellitus in the adult German population]. *Gesundheitswesen* **61 Spec No**, S85-S89 (1999).
10. Tuomilehto,J. *et al.* Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1343-1350 (2001).
11. Rathman,W. & Strassburger K. Incidence of Type 2 Diabetes in the Elderly German Population and the Effect of Clinical and Lifestyle Risk Factors: KORA S4/F4 Cohort Study. (Diabet Med, Accepted Article, doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02863.x). 23-9-2009.
12. Stumvoll,M., Goldstein,B.J. & van Haeften,T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* **365**, 1333-1346 (2005).
13. Tabak,A.G. *et al.* Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet* **373**, 2215-2221 (2009).
14. Kolb,H. & Mandrup-Poulsen,T. An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia* **48**, 1038-1050 (2005).

15. Ganrot,P.O., Gydell,K. & Ekelund,H. Serum concentration of alpha-2-macroglobulin, haptoglobin and alpha-1-antitrypsin in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **55**, 537-544 (1967).
16. Jonsson,A. & Wales,J.K. Blood glycoprotein levels in diabetes mellitus. *Diabetologia* **12**, 245-250 (1976).
17. McMillan,D.E. Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes. *Metabolism* **38**, 1042-1046 (1989).
18. Muller,S. *et al.* Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia* **45**, 805-812 (2002).
19. Herder,C. *et al.* Systemic immune mediators and lifestyle changes in the prevention of type 2 diabetes: results from the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* **55**, 2340-2346 (2006).
20. Pickup,J.C., Mattock,M.B., Chusney,G.D. & Burt,D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* **40**, 1286-1292 (1997).
21. Pickup,J.C. & Crook,M.A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* **41**, 1241-1248 (1998).
22. Greenfield,J.R. & Campbell,L.V. Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: 'cause or effect'? *Curr. Diabetes Rev.* **2**, 195-211 (2006).
23. Pradhan,A.D., Manson,J.E., Rifai,N., Buring,J.E. & Ridker,P.M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* **286**, 327-334 (2001).
24. Thorand,B. *et al.* C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men: results from the MONICA Augsburg cohort study, 1984-1998. *Arch. Intern. Med.* **163**, 93-99 (2003).
25. Senn,J.J., Klover,P.J., Nowak,I.A. & Mooney,R.A. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* **51**, 3391-3399 (2002).
26. Rotter,V., Nagaev,I. & Smith,U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* **278**, 45777-45784 (2003).
27. Dietze,D. *et al.* Inhibitor kappaB kinase is involved in the paracrine crosstalk between human fat and muscle cells. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **28**, 985-992 (2004).
28. Hotamisligil,G.S., Shargill,N.S. & Spiegelman,B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91 (1993).

29. Feinstein,R., Kanety,H., Papa,M.Z., Lunenfeld,B. & Karasik,A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J. Biol. Chem.* **268**, 26055-26058 (1993).
30. Kolb,H. & Mandrup-Poulsen,T. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* **53**, 10-20 (2010).
31. Ehses,J.A. *et al.* Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* **56**, 2356-2370 (2007).
32. Donath,M.Y. *et al.* Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. *Diabetes Care* **31 Suppl 2**, S161-S164 (2008).
33. Hundal,R.S. *et al.* Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest* **109**, 1321-1326 (2002).
34. Shoelson,S.E., Lee,J. & Yuan,M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **27 Suppl 3**, S49-S52 (2003).
35. Larsen,C.M. *et al.* Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1517-1526 (2007).
36. Fleischman,A., Shoelson,S.E., Bernier,R. & Goldfine,A.B. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care* **31**, 289-294 (2008).
37. Kempf,K. *et al.* Inflammation in metabolic syndrome and type 2 diabetes: Impact of dietary glucose. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1084**, 30-48 (2006).
38. Janeway, Travers, Walport & Shlomchik. Immunobiology: the immune system in health and disease; 6th Edition. 2005.
39. Beilmann,M., Birk,G. & Lenter,M.C. Human primary co-culture angiogenesis assay reveals additive stimulation and different angiogenic properties of VEGF and HGF. *Cytokine* **26**, 178-185 (2004).
40. Kaushansky,K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2034-2045 (2006).
41. Sawa,Y. *et al.* LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium. *J. Histochem. Cytochem.* **56**, 97-109 (2008).
42. Wang,Z., Malmberg,P., Ek,A., Larsson,K. & Palmberg,L. Swine dust induces cytokine secretion from human epithelial cells and alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **115**, 6-12 (1999).
43. Fried,S.K., Bunkin,D.A. & Greenberg,A.S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 847-850 (1998).

44. Rizzo,A. *et al.* Modulation of cytokine and beta-defensin 2 expressions in human gingival fibroblasts infected with Chlamydia pneumoniae. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 1239-1247 (2008).
45. Svanborg,C., Godaly,G. & Hedlund,M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 99-105 (1999).
46. Lee,M.S. & Kim,Y.J. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol. Cells* **23**, 1-10 (2007).
47. Croft,M. & Swain,S.L. B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6. *J. Immunol.* **146**, 4055-4064 (1991).
48. Schipf,A. *et al.* Th2 cells shape the differentiation of developing T cell responses during interactions with dendritic cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1697-1706 (2003).
49. Pleyer,U. & Ritter,T. Gene therapy in immune-mediated diseases of the eye. *Prog. Retin. Eye Res.* **22**, 277-293 (2003).
50. Febbraio,M.A., Steensberg,A., Starkie,R.L., McConell,G.K. & Kingwell,B.A. Skeletal muscle interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha release in healthy subjects and patients with type 2 diabetes at rest and during exercise. *Metabolism* **52**, 939-944 (2003).
51. Paquet,P. & Pierard,G.E. Interleukin-6 and the skin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **109**, 308-317 (1996).
52. Papanicolaou,D.A. & Vgontzas,A.N. Interleukin-6: the endocrine cytokine. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **85**, 1331-1333 (2000).
53. Scherer,P.E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* **55**, 1537-1545 (2006).
54. Fain,J.N., Madan,A.K., Hiler,M.L., Cheema,P. & Bahouth,S.W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**, 2273-2282 (2004).
55. Skurk,T., Alberti-Huber,C., Herder,C. & Hauner,H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **92**, 1023-1033 (2007).
56. Herder,C. *et al.* Low-grade inflammation, obesity, and insulin resistance in adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **92**, 4569-4574 (2007).
57. Steensberg,A. *et al.* Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J. Physiol* **529 Pt 1**, 237-242 (2000).

58. Keller,C., Keller,P., Marshal,S. & Pedersen,B.K. IL-6 gene expression in human adipose tissue in response to exercise--effect of carbohydrate ingestion. *J. Physiol* **550**, 927-931 (2003).
59. Barzilay,J.I. *et al.* The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes* **50**, 2384-2389 (2001).
60. Spranger,J. *et al.* Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* **52**, 812-817 (2003).
61. Esposito,K. *et al.* Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* **106**, 2067-2072 (2002).
62. Wellen,K.E. & Hotamisligil,G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest* **115**, 1111-1119 (2005).
63. Khovidhunkit,W. *et al.* Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* **45**, 1169-1196 (2004).
64. Chandra,R.K. & Kumari,S. Effects of nutrition on the immune system. *Nutrition* **10**, 207-210 (1994).
65. Blackburn,G.L. Pasteur's Quadrant and malnutrition. *Nature* **409**, 397-401 (2001).
66. Chandra,R.K. Nutrient regulation of immune functions. *Forum Nutr.* **56**, 147-148 (2003).
67. Hedley,A.A. *et al.* Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA* **291**, 2847-2850 (2004).
68. Hotamisligil,G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-867 (2006).
69. Bastard,J.P. *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 4-12 (2006).
70. Pickup,J.C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**, 813-823 (2004).
71. Jellema,A., Plat,J. & Mensink,R.P. Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur. J. Clin. Invest* **34**, 766-773 (2004).
72. Esposito,K. *et al.* Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* **289**, 1799-1804 (2003).

73. Marfella,R. *et al.* Effect of weight loss on cardiac synchronization and proinflammatory cytokines in premenopausal obese women. *Diabetes Care* **27**, 47-52 (2004).
74. Herder,C., Peltonen,M. & Koenig,W. Anti-inflammatory effect of lifestyle changes in the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia* **52 (3)**, 433-442 (2009).
75. Schulze,M.B. & Hu,F.B. Primary prevention of diabetes: what can be done and how much can be prevented? *Annu. Rev. Public Health* **26**, 445-467 (2005).
76. van Dam,R.M., Rimm,E.B., Willett,W.C., Stampfer,M.J. & Hu,F.B. Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men. *Ann. Intern. Med.* **136**, 201-209 (2002).
77. Fung,T.T., Schulze,M., Manson,J.E., Willett,W.C. & Hu,F.B. Dietary patterns, meat intake, and the risk of type 2 diabetes in women. *Arch. Intern. Med.* **164**, 2235-2240 (2004).
78. Montonen,J. *et al.* Dietary patterns and the incidence of type 2 diabetes. *Am. J. Epidemiol.* **161**, 219-227 (2005).
79. Heidemann,C. *et al.* A dietary pattern protective against type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)--Potsdam Study cohort. *Diabetologia* **48**, 1126-1134 (2005).
80. Fung,T.T. *et al.* Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 61-67 (2001).
81. Lopez-Garcia,E. *et al.* Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 1029-1035 (2004).
82. Schulze,M.B. *et al.* Dietary pattern, inflammation, and incidence of type 2 diabetes in women. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**, 675-684 (2005).
83. Ajani,U.A., Ford,E.S. & Mokdad,A.H. Dietary fiber and C-reactive protein: findings from national health and nutrition examination survey data. *J. Nutr.* **134**, 1181-1185 (2004).
84. King,D.E., Mainous,A.G., III, Egan,B.M., Woolson,R.F. & Geesey,M.E. Fiber and C-reactive protein in diabetes, hypertension, and obesity. *Diabetes Care* **28**, 1487-1489 (2005).
85. King,D.E., Egan,B.M. & Geesey,M.E. Relation of dietary fat and fiber to elevation of C-reactive protein. *Am. J. Cardiol.* **92**, 1335-1339 (2003).
86. Manning,P.J. *et al.* Postprandial Cytokine Concentrations and Meal Composition in Obese and Lean Women. *Obesity. (Silver. Spring)* (2008).
87. Ceriello,A. *et al.* Hyperglycemia may determine fibrinopeptide A plasma level increase in humans. *Metabolism* **38**, 1162-1163 (1989).

88. Dickinson,S., Hancock,D.P., Petocz,P., Ceriello,A. & Brand-Miller,J. High-glycemic index carbohydrate increases nuclear factor-kappaB activation in mononuclear cells of young, lean healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 1188-1193 (2008).
89. Morohoshi,M., Fujisawa,K., Uchimura,I. & Numano,F. The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **748**, 562-570 (1995).
90. Morohoshi,M., Fujisawa,K., Uchimura,I. & Numano,F. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* **45**, 954-959 (1996).
91. Hua,H., Munk,S., Goldberg,H., Fantus,I.G. & Whiteside,C.I. High glucose-suppressed endothelin-1 Ca²⁺ signaling via NADPH oxidase and diacylglycerol-sensitive protein kinase C isozymes in mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 33951-33962 (2003).
92. Sheetz,M.J. & King,G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* **288**, 2579-2588 (2002).
93. Brownlee,M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615-1625 (2005).
94. Devaraj,S., Venugopal,S.K., Singh,U. & Jialal,I. Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c- α and - β . *Diabetes* **54**, 85-91 (2005).
95. Dyer,D.G. *et al.* Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J. Clin. Invest* **91**, 2463-2469 (1993).
96. Brownlee,M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med.* **46**, 223-234 (1995).
97. Senn,J.J. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 13740-13746 (2003).
98. Rui,L., Yuan,M., Frantz,D., Shoelson,S. & White,M.F. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* **277**, 42394-42398 (2002).
99. Tsigos,C. *et al.* Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology* **66**, 54-62 (1997).
100. Tsigos,C. *et al.* Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **82**, 4167-4170 (1997).
101. Kahn,S.E. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**, 4047-4058 (2001).

102. Weyer,C., Bogardus,C., Mott,D.M. & Pratley,R.E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* **104**, 787-794 (1999).
103. Wallace,T.M. & Matthews,D.R. Coefficient of failure: a methodology for examining longitudinal beta-cell function in Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* **19**, 465-469 (2002).
104. Cnop,M., Hannaert,J.C., Hoorens,A., Eizirik,D.L. & Pipeleers,D.G. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* **50**, 1771-1777 (2001).
105. Heitmeier,M.R., Arnush,M., Scarim,A.L. & Corbett,J.A. Pancreatic beta-cell damage mediated by beta-cell production of interleukin-1. A novel mechanism for virus-induced diabetes. *J. Biol. Chem.* **276**, 11151-11158 (2001).
106. Maedler,K. *et al.* Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest* **110**, 851-860 (2002).
107. Ehses,J.A., Boni-Schnetzler,M., Faulenbach,M. & Donath,M.Y. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 340-342 (2008).
108. Robertson,R.P., Harmon,J., Tran,P.O., Tanaka,Y. & Takahashi,H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* **52**, 581-587 (2003).
109. Robertson,R.P., Harmon,J., Tran,P.O. & Poitout,V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S119-S124 (2004).
110. Robertson,R.P. & Harmon,J.S. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 177-184 (2006).
111. Tanaka,Y., Tran,P.O., Harmon,J. & Robertson,R.P. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 12363-12368 (2002).
112. Tanaka,Y., Gleason,C.E., Tran,P.O., Harmon,J.S. & Robertson,R.P. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10857-10862 (1999).
113. Kaneto,H. *et al.* Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* **48**, 2398-2406 (1999).
114. Harmon,J.S. *et al.* In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. *Diabetes* **48**, 1995-2000 (1999).

115. Kirchner,H., Kleinicke,C. & Digel,W. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *J. Immunol. Methods* **48**, 213-219 (1982).
116. De Groote,D. *et al.* Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* **4**, 239-248 (1992).
117. DeForge,L.E. & Remick,D.G. Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 18-24 (1991).
118. DeForge,L.E., Billeci,K.L. & Kramer,S.M. Effect of IFN-gamma on the killing of *S. aureus* in human whole blood. Assessment of bacterial viability by CFU determination and by a new method using alamarBlue. *J. Immunol. Methods* **245**, 79-89 (2000).
119. Hermann,C., von Aulock,S., Graf,K. & Hartung,T. A model of human whole blood lymphokine release for in vitro and ex vivo use. *J. Immunol. Methods* **275**, 69-79 (2003).
120. Holle,R., Happich,M., Lowel,H. & Wichmann,H.E. KORA--a research platform for population based health research. *Gesundheitswesen* **67 Suppl 1**, S19-S25 (2005).
121. Alberti,K.G., Zimmet,P. & Shaw,J. International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabet. Med.* **24**, 451-463 (2007).
122. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486-2497 (2001).
123. Herder,C. *et al.* Systemic monocyte chemoattractant protein-1 concentrations are independent of type 2 diabetes or parameters of obesity: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4). *Eur. J. Endocrinol.* **154**, 311-317 (2006).
124. Hu,F.B., Meigs,J.B., Li,T.Y., Rifai,N. & Manson,J.E. Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes* **53**, 693-700 (2004).
125. Cardellini,M. *et al.* Plasma interleukin-6 levels are increased in subjects with impaired glucose tolerance but not in those with impaired fasting glucose in a cohort of Italian Caucasians. *Diabetes Metab Res. Rev.* **23**, 141-145 (2007).
126. Manning,P.J., Sutherland,W.H., Walker,R.J., de Jong,S.A. & Berry,E.A. The effect of glucose ingestion on inflammation and oxidative stress in obese individuals. *Metabolism* **57**, 1345-1349 (2008).
127. van Oostrom,A.J. *et al.* Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J. Lipid Res.* **44**, 576-583 (2003).

128. Shanmugam,N., Reddy,M.A., Guha,M. & Natarajan,R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* **52**, 1256-1264 (2003).
129. Shanmugam,N., Gaw,G., I & Natarajan,R. Molecular mechanisms of high glucose-induced cyclooxygenase-2 expression in monocytes. *Diabetes* **53**, 795-802 (2004).
130. Hiramatsu,K. & Arimori,S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes* **37**, 832-837 (1988).
131. Mohanty,P. *et al.* Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **85**, 2970-2973 (2000).
132. Tesfamariam,B. & Cohen,R.A. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am. J. Physiol* **263**, H321-H326 (1992).
133. Ceriello,A., dello,R.P., Amstad,P. & Cerutti,P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* **45**, 471-477 (1996).
134. Weidig,P., McMaster,D. & Bayraktutan,U. High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes Obes. Metab* **6**, 432-441 (2004).
135. Srinivasan,S. *et al.* Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* **47**, 1727-1734 (2004).
136. Studer,R.K., Craven,P.A. & DeRubertis,F.R. Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Metabolism* **46**, 918-925 (1997).
137. Nishikawa,T. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**, 787-790 (2000).
138. Craig,R. *et al.* p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *J. Biol. Chem.* **275**, 23814-23824 (2000).
139. Hattori,Y., Hattori,S., Sato,N. & Kasai,K. High-glucose-induced nuclear factor kappaB activation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **46**, 188-197 (2000).
140. Shimizu,H., Mitomo,K., Watanabe,T., Okamoto,S. & Yamamoto,K. Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol. Cell Biol.* **10**, 561-568 (1990).

141. Barnes,P.J. Nuclear factor-kappa B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 867-870 (1997).
142. Barnes,P.J. & Karin,M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1066-1071 (1997).
143. Schmidt,A.M. & Stern,D.M. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends Endocrinol. Metab* **11**, 368-375 (2000).
144. Schmidt,A.M., Yan,S.D., Yan,S.F. & Stern,D.M. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest* **108**, 949-955 (2001).
145. Kempf,K. *et al.* The metabolic syndrome sensitizes leukocytes for glucose-induced immune gene expression. *J. Mol. Med.* **85**, 389-396 (2007).
146. Otto,N.M. *et al.* Hyperosmotic stress enhances cytokine production and decreases phagocytosis in vitro. *Crit Care* **12**, R107 (2008).
147. Vanden Berghe,W. *et al.* Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1185-1195 (2000).
148. Tian,B., Nowak,D.E., Jamaluddin,M., Wang,S. & Brasier,A.R. Identification of direct genomic targets downstream of the nuclear factor-kappaB transcription factor mediating tumor necrosis factor signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 17435-17448 (2005).
149. Tian,B., Nowak,D.E. & Brasier,A.R. A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-kappaB control. *BMC. Genomics* **6**, 137 (2005).
150. Shapiro,L. & Dinarello,C.A. Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production. *Exp. Cell Res.* **231**, 354-362 (1997).
151. Hatanaka,E., Shimomi,F.M., Curi,R. & Campa,A. Sodium chloride inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils and mononuclear cells. *Shock* **27**, 32-35 (2007).
152. Rose,B., Herder,C., Loffler,H., Kolb,H. & Martin,S. Combined activation of innate and T cell immunity for recognizing immunomodulatory properties of therapeutic agents. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 624-630 (2004).
153. Minami,M., Kuraishi,Y. & Satoh,M. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 593-598 (1991).
154. Baba,T. *et al.* Production of interleukin-6 induced by hypoxia linked to peripheral arterial disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **811**, 542-548 (1997).
155. Yamashita,K., Discher,D.J., Hu,J., Bishopric,N.H. & Webster,K.A. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-

- inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J. Biol. Chem.* **276**, 12645-12653 (2001).
156. Semenza,G.L. Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **8**, 863-884 (1994).
157. Semenza,G.L., Roth,P.H., Fang,H.M. & Wang,G.L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **269**, 23757-23763 (1994).
158. Semenza,G.L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* **7**, 345-350 (2001).
159. Wenger,R.H., Stiehl,D.P. & Camenisch,G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. STKE.* **2005**, re12 (2005).
160. Jeong,H.J. *et al.* Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1alpha and NF-kappaB activation on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 805-811 (2003).
161. Jeong,H.J. *et al.* Hypoxia-induced IL-6 production is associated with activation of MAP kinase, HIF-1, and NF-kappaB on HEI-OC1 cells. *Hear. Res.* **207**, 59-67 (2005).
162. Bosco,M.C. *et al.* Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology* **213**, 733-749 (2008).
163. Shemirani,B. & Crowe,D.L. Hypoxic induction of HIF-1alpha and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma lines is mediated by stress activated protein kinases. *Oral Oncol.* **38**, 251-257 (2002).
164. Duyndam,M.C., Hulscher,S.T., van der,W.E., Pinedo,H.M. & Boven,E. Evidence for a role of p38 kinase in hypoxia-inducible factor 1-independent induction of vascular endothelial growth factor expression by sodium arsenite. *J. Biol. Chem.* **278**, 6885-6895 (2003).
165. Battaglia,F. *et al.* Hypoxia transcriptionally induces macrophage-inflammatory protein-3alpha/CCL-20 in primary human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)-kappaB. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 648-662 (2008).
166. Haddad,J.J. & Harb,H.L. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 461-483 (2005).
167. Williamson,J.R. *et al.* Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* **42**, 801-813 (1993).
168. Pfafflin,A. *et al.* Increased glucose uptake and metabolism in mesangial cells overexpressing glucose transporter 1 increases interleukin-6 and vascular endothelial growth factor production: role of AP-1 and HIF-1alpha. *Cell Physiol Biochem.* **18**, 199-210 (2006).

169. Catrina,S.B., Okamoto,K., Pereira,T., Brismar,K. & Poellinger,L. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1alpha protein stability and function. *Diabetes* **53**, 3226-3232 (2004).
170. Katavetin,P. *et al.* High glucose blunts vascular endothelial growth factor response to hypoxia via the oxidative stress-regulated hypoxia-inducible factor/hypoxia-responsible element pathway. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1405-1413 (2006).
171. Rivera-Chavez,F.A., Peters-Hybki,D.L., Barber,R.C. & O'Keefe,G.E. Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. *Shock* **20**, 218-223 (2003).
172. Brull,D.J. *et al.* Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1458-1463 (2001).
173. Lazarus,R. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol. Rev.* **190**, 9-25 (2002).
174. Ceriello,A. *et al.* Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. *Circulation* **111**, 2518-2524 (2005).
175. Gonzalez,F., Rote,N.S., Minium,J., O'leary,V.B. & Kirwan,J.P. Obese reproductive-age women exhibit a proatherogenic inflammatory response during hyperglycemia. *Obesity. (Silver. Spring)* **15**, 2436-2444 (2007).
176. Mohamed-Ali,V. *et al.* Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **82**, 4196-4200 (1997).
177. Gletsu,N. *et al.* Increased plasma interleukin 6 concentrations and exaggerated adipose tissue interleukin 6 content in severely obese patients after operative trauma. *Surgery* **140**, 50-57 (2006).
178. Corpeleijn,E. *et al.* Postprandial interleukin-6 release from skeletal muscle in men with impaired glucose tolerance can be reduced by weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **90**, 5819-5824 (2005).
179. Kowalska,I. *et al.* Insulin resistance, serum adiponectin, and proinflammatory markers in young subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* **57**, 1539-1544 (2008).
180. Gudmundsson,A. *et al.* Serum concentrations of interleukin-6 are increased when sampled through an indwelling venous catheter. *Clin. Chem.* **43**, 2199-2201 (1997).
181. Aljada,A., Ghanim,H., Mohanty,P., Kapur,N. & Dandona,P. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF)

- and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **87**, 1419-1422 (2002).
182. Dandona,P., Aljada,A., O'donnell,A., Dhindsa,S. & Garg,R. Insulin Is an Anti-inflammatory and Anti-atherosclerotic Hormone. *Metab Syndr. Relat Disord.* **2**, 137-142 (2004).
183. Dandona,P., Aljada,A., Chaudhuri,A., Mohanty,P. & Rajesh,G. A novel view of metabolic syndrome. *Metab Syndr. Relat Disord.* **2**, 2-8 (2004).
184. Suganami,T., Nishida,J. & Ogawa,Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2062-2068 (2005).
185. Eschwege,E. *et al.* Coronary heart disease mortality in relation with diabetes, blood glucose and plasma insulin levels. The Paris Prospective Study, ten years later. *Horm. Metab Res. Suppl* **15**, 41-46 (1985).
186. Pannacciulli,N. *et al.* Effect of family history of type 2 diabetes on the intima-media thickness of the common carotid artery in normal-weight, overweight, and obese glucose-tolerant young adults. *Diabetes Care* **26**, 1230-1234 (2003).
187. Ceriello,A. The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia* **46 Suppl 1**, M9-16 (2003).
188. Greenstein,A.S. *et al.* Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation* **119**, 1661-1670 (2009).

6. Abkürzungsverzeichnis

ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	Advanced glycation end products
ATP	Adenosintriphosphat
ATP III	Adult Treatment Panel III
APC	Antigen präsentierende Zellen
BMI	Body-Mass-Index
CD	Cluster of determination
CRP	C-reaktives Protein
CV	Variationskoeffizient
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DFX	Desferrioxamin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FFA	Free fatty acids
GAD	Glutamatdecarboxylase
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
HBSS	Hanks balanced salt solution
HDL	High density Lipoprotein
HIF-1 α	Hypoxie induzierter Faktor-1
HRE	Hypoxie regulierende Elemente
IDDM	Insulin dependent Diabetes mellitus
IDF	International Diabetes Federation
IFG	Impaired fasting glucose
IFN- γ	Interferon- γ
IGT	Impaired glucose tolerance
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IRS-1	Insulin receptor substrate-1
JNK	C-Jun amino-terminale Kinase

KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
LDL	Low density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MetS	metabolisches Syndrom
MHC	Major histocompatibility complex
MONICA	Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCEP	National Cholesterol Education Program
NFκB	Nukleärer Transkriptionsfaktor κB
NIDDM	Non-Insulin dependent Diabetes mellitus
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
p38MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate buffered saline
PDX-1	Pankreas Duodenum Homeobox-1
PKC	Proteinkinase C
PPR	Pattern recognition Rezeptor
RAGE	AGE-Rezeptor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAA	Serumamyloid A
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOCS-3	Suppressor of cytokine signaling-3
T2D	Diabetes mellitus Typ 2
TCR	T-Zellrezeptor
T _H 1-Zellen	T-Helfer-Typ1-Zellen
T _H 2-Zellen	T-Helfer-Typ2-Zellen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaureat
VEGF	Vascular endothelial growth factor

7. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stephan Martin für die Überlassung des Themas und die Anregungen und Überlegungen, die meine Arbeit stetig vorangetrieben und immer wieder neue Perspektiven offen gelegt haben.

Insbesondere gilt mein großer Dank Frau Dr. med. Bettina Nowotny und Herrn Dr. phil. nat. Christian Herder, welche mich immer wieder ermutigt haben und mit Ihren weiterführenden Anregungen und Diskussionen diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben. Eine bessere Betreuung kann man sich nicht wünschen.

Ich danke außerdem dem Institut für Epidemiologie des Helmholtz Zentrums München, Deutsches Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg für die Möglichkeit, meine Fragestellungen im Rahmen des KORA Surveys 4 bearbeiten und die daraus gewonnenen Daten in dieser Arbeit verwenden zu dürfen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Gabi Gornitzka und Frau Ulrike Poschen bedanken, die mir immer eine große Hilfe im täglichen Laborbetrieb waren und mich immer nach Kräften unterstützten.

Mein Dank gilt auch Frau Heike Löffler für die Einarbeitung in die Zellkultur- und ELISA-Technik und Herrn Dr. rer.nat. Burkhard Haastert für die Selektion der KORA-Probanden.

Ich danke allen Mitarbeitern des Deutschen Diabetes-Zentrums für die Schaffung einer wirklich guten Arbeitsatmosphäre, die es einem immer ermöglicht hat, mit kleinen und großen Fragen auf ein freundliches Ohr zu treffen, was die Lösung von Problemen enorm erleichterte.

Angaben zur Person

Name	Niclas Cornelius Kempkes
Wohnort	Niedieckstrasse 27 41334 Nettetal
Geburtsdatum und –ort	16.07.1981 in Nettetal
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1987-1991	Katholische Grundschule in Nettetal-Lobberich
1991-2001	Werner-Jaeger-Gymnasium in Nettetal Lobberich Abschluss: Abitur (Note 1,9)

Hochschulstudium

2001	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2008	Abschluss: Ärztliche Prüfung (Note: sehr gut)

Berufliche Tätigkeit

seit 01.11.2008	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik des Evangelischen Krankenhauses Düsseldorf
-----------------	--

Zusammenfassung

Der Einfluss erhöhter Glukosekonzentrationen auf die Produktion von Interleukin-6 in vivo und in vitro

Niclas Kempkes

Die Entstehung des Diabetes mellitus, vor allem in der Frühphase, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Aus präventivmedizinischer Sicht ist es von besonderem Interesse, die Mechanismen besser zu verstehen, um eine Entstehung der Erkrankung vorzeitig abwenden zu können. Eine proinflammatorische Reaktion des Immunsystems ist in der Pathogenese des Diabetes mellitus von entscheidender Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Nahrungsmittelkomponenten einen entscheidenden Einfluss auf die eben genannte subklinische Immunreaktion haben. In dieser Arbeit kommt der Glukose als proinflammatorischem Nahrungsmittel besondere Beachtung zu. Es konnte im Rahmen experimenteller Versuchsanordnungen gezeigt werden, dass es in Vollblutkulturen bestimmter Probanden nach Inkubation mit pathophysiologisch hohen Glukosekonzentrationen zu einer ausgeprägten Erhöhung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) kam, wohingegen bei anderen Versuchspersonen keinerlei Reaktion festgestellt werden konnte. Dies war Anlass für weitere Experimente, in denen sowohl eine Abhängigkeit der IL-6 Freisetzung von der Inkubationszeit als auch von der Glukosekonzentration gezeigt werden konnte. Als weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Zytokinproduktion konnte die Hypoxie indentifiziert werden. Im Rahmen der oben beschriebenen Pathogenese des Diabetes mellitus und des Immunsystems sollten die beschriebenen Ergebnisse der in vitro Versuche im populationsbasierten KORA-Survey 4 (KORA S4) überprüft werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus den in vitro Studien konnte der beobachtete Anstieg des IL-6 nicht gesehen werden. Vielmehr zeigte sich in den Proben der meisten KORA S4-Probanden ein Abfall der Konzentration des untersuchten Zytokins. Insgesamt zeigen sowohl die in vitro Versuche als auch die Daten aus dem KORA S4, dass die Reaktion auf einen Glukosereiz interindividuell sehr heterogen ist. Es fanden sich erste Hinweise darauf, dass es eine Interaktion von Glukosebelastung mit metabolischen Faktoren sowie mit einer hypoxischen Stoffwechsellage gibt, die die Freisetzung von IL-6 beeinflusst. Auch ein Einfluss genetischer Faktoren erscheint möglich.