

**Aus dem Deutschen Diabetes-Zentrum
Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für klinische Diabetologie
Direktor: Prof. Dr. Michael Roden**

**Antigen-stimulierte Zytokinsekretion bei
Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA**

Dissertation

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

vorgelegt von
Mark Ooms

2017

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

gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Nanette Schloot

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Meissner

Meiner Familie

Zusammenfassung

"Antigen-stimulierte Zytokinsekretion bei Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA"

Bei den hier untersuchten Formen des Diabetes mellitus, Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA als Unterform des Typ 1 Diabetes, wird immunologischen Vorgängen eine mitwirkende Rolle zugeschrieben. Die immunvermittelte Form des Typ 1 Diabetes ist durch eine Reaktivität von T-Zellen gegen β -Zell-Strukturen gekennzeichnet und beim Typ 2 Diabetes ist die subklinische Inflammation durch erhöhte inflammatorische Zytokine charakterisiert.

Die hier vorliegende Arbeit untersucht mit einer *in vitro* Untersuchung die Antigen- und Mitogen-stimulierte Zytokinsekretion bei Typ 1 Diabetikern, LADA Diabetikern, Typ 2 Diabetikern und Kontrollprobanden. Es soll untersucht werden, wie sich die Antigenstimulation auf die Zytokinsekretion auswirkt und ob Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen. Weiter soll ein Zusammenhang zwischen der Zytokinsekretion und bestimmten anthropometrischen und klinisch-chemischen Einflussfaktoren untersucht sowie ein Zusammenhang zwischen der stimulierten Zytokinsekretion und der jeweiligen Zytokinkonzentration im Serum überprüft werden.

Hierzu wird im Rahmen einer Vollblutstimulation die Zytokinkonzentration in Vollblutproben nach Stimulation mit PHA, LPS, GAD und p277 und bei der Leukozytenstimulation der Zytokingehalt von Zellüberständen von ELISPOT-Ansätzen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin, HSP60, p277, GAD und pIA-2 mittels eines *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens bestimmt.

Eine Funktionsfähigkeit der Vollblutstimulation zeigte sich anhand einer starken stimulatorischen Wirkung von LPS bei IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IP10 sowie von PHA bei IP10. Die mit dem Typ 1 Diabetes assoziierten Antigene wiesen keine nachweisbare stimulatorische Wirkung auf. Zwischen einer tatsächlich nicht vorhandenen stimulatorischen Wirkung der Antigene und einer diesbezüglich fehlenden Sensitivität des Untersuchungsansatzes kann nicht unterschieden werden.

Im Wesentlichen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Bei der Vollblutstimulation zeigten die Diabetiker bei IL-1 β und IL-6 eine im Vergleich zu den gesunden Probanden erhöhte Ruhesekretion. Für die Stimulationsantwort auf LPS wiesen die Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern die höchste Sekretion von IL-6 sowie tendenziell die Diabetiker insgesamt im Vergleich zu den gesunden Probanden eine geringere Sekretion von RANTES auf. Die erwartungsgemäß erhöhte Ruhesekretion der Diabetiker für IL-1 β und IL-6 sowie die geringere Stimulationsantwort für RANTES könnte auf eine geringgradige unspezifische Grundaktivierung des Immunsystems mit einer abgeschwächten Immunantwort auf Stimulation im Rahmen der Diabeteserkrankung hinweisen. Bei der Leukozytenstimulation zeigten die LADA Diabetiker bei einer Stimulation mit PI eine im Vergleich zu den Typ 1 und Typ 2 Diabetikern geringere Sekretion von MCP-1.

Es wurden nur wenige Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und den Einflussfaktoren aufgezeigt. Bei der Vollblutstimulation zeigte sich bei den Typ 2 Diabetikern und gesunden Probanden ein positiver Zusammenhang zwischen der Ruhesekretion von IL-6 und den Triglyceriden. Bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der GAD stimulierten Sekretion von RANTES und dem C-Peptid aufgezeigt werden, was bedeutet, dass die proinflammatorische Antwort mit noch erhaltener Insulinsekretion assoziiert ist. Ein positiver Zusammenhang zwischen der Ruhesekretion und dem Alter zeigte sich bei den Typ 1 Diabetikern für IL-1 β und bei den gesunden Probanden für IL-6. Die Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und Triglyceriden, C-Peptid und Alter könnten auf eine bestehende metabolische Interaktion mit dem Immunsystem, eine im Verlauf der Diabeteserkrankung abnehmende Reaktivität der Immunzellen und eine im Alter gesteigerte Grundaktivität des Immunsystems hinweisen. Ein Zusammenhang zwischen der Zytokinsekretion bei Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum konnte nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit keine stimulatorische Wirkung der Typ 1 Diabetes-assoziierten Antigene nachgewiesen, nur wenige Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen aufgezeigt und nur in einer geringen Anzahl Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und bestimmten Einflussfaktoren festgestellt werden. Aufgrund der eher geringen Gruppengröße und den multiplen statistischen Tests sind die Ergebnisse als explorativ zu werten. Die Ergebnisse sollten mit einem größeren Studienkollektiv überprüft werden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Diabetes mellitus	1
1.2.1 Definition des Diabetes mellitus	1
1.2.2 Einteilung des Diabetes mellitus	1
1.2.3 Epidemiologie des Diabetes mellitus	3
1.2.4 Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus	4
1.2.5 Klinik des Diabetes mellitus	8
1.2.6 Diagnostik des Diabetes mellitus	9
1.2.7 Therapie des Diabetes mellitus	10
1.3 Immunsystem	12
1.3.1 Grundlagen	12
1.3.2 Zytokine	15
1.3.3 Antigene und Mitogene	20
1.3.4 Immunologie des Diabetes mellitus	25
1.4 Untersuchungsansatz	28
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Untersuchungsmaterial	30
2.1.2 Geräte und Pipetten	34
2.1.3 Gefäße	36
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	37
2.1.5 Reagenzien	38
2.1.6 Lösungen	39
2.1.7 Rekombinante Proteine	40
2.1.8 <i>Capture</i> -Antikörper	41
2.1.9 <i>Bead</i> -Körper	42
2.1.10 <i>Detection</i> -Antikörper	43
2.2 Methoden	44
2.2.1 Beschreibung des <i>multiplex-bead-array-assay</i> -Verfahrens	44
2.2.2 Protokoll zum Kopplungsverfahren der <i>bead</i> -Körper mit <i>capture</i> -Antikörper	47

2.2.3	Protokoll zur Messung mit dem <i>multiplex-bead-array-assay</i> -Verfahren.....	51
2.2.4	Kalkulation der Messwerte.....	54
2.2.5	Fehlerkontrolle der Messergebnisse.....	56
2.2.6	Auswertung der Daten.....	58
3	Ergebnisse	69
3.1	Charakterisierung der Probandenkollektive	69
3.1.1	Probandenkollektiv der Vollblutstimulation.....	69
3.1.2	Probandenkollektiv der Leukozytenstimulation.....	71
3.2	Ergebnisse der Vollblutstimulation	73
3.2.1	Zytokinkonzentration nach Stimulation von Vollblut.....	73
3.2.2	Vergleich der Gruppen nach Vollblutstimulation.....	79
3.2.3	Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und anthropometrischen oder klinisch-chemischen Einflussfaktoren bei Vollblutstimulation.....	89
3.3	Ergebnisse der Leukozytenstimulation	98
3.3.1	Vergleich der Gruppen nach Leukozytenstimulation.....	98
3.3.2	Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und anthropometrischen oder klinisch-chemischen Einflussfaktoren bei Leukozytenstimulation.....	105
3.3.3	Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion nach Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum.....	110
4	Diskussion	116
4.1	Vollblutstimulation	118
4.1.1	Zytokinkonzentration nach Stimulation von Vollblut.....	118
4.1.2	Vergleich der Gruppen nach Vollblutstimulation.....	121
4.1.3	Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und anthropometrischen oder klinisch-chemischen Einflussfaktoren bei Vollblutstimulation.....	127
4.2	Leukozytenstimulation	132
4.2.1	Vergleich der Gruppen nach Leukozytenstimulation.....	132
4.2.2	Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und anthropometrischen oder klinisch-chemischen Einflussfaktoren bei Leukozytenstimulation.....	135
4.2.3	Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion nach Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum.....	139
4.3	Limitationen	140
4.4	Schlussfolgerungen	142
5	Literaturverzeichnis	145

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AK	Antikörper
BG	<i>background</i> -Probe (ohne Stimulation)
BMI	<i>body-mass-index</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zellen	B-Lymphozyten
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
ConPep	Control Peptid
CV-Kal.K.	Koeffizient der Variabilität der Kalibrationskurven
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
DDZ	Deutsches Diabetes-Zentrum
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>enzyme linked immuno spot</i>
Eppi-Gefäß	Mikroreaktionsgefäß
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GADA	Glutamatdecarboxylase-Auto-Antikörper
h	Stunden
HbA1c	glykiertes Hämoglobin A1
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSP60	Hitzeschockprotein 60
IA-2A	Protein-Thyrosinphosphatase-IA-2-Auto-Antikörper
IAA	Insulin-Auto-Antikörper
ICA	Inselzell-Auto-Antikörper
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-1RI	Interleukin-1 Rezeptor Typ 1
Inter-CV	<i>inter-assay</i> -Variabilität
Intra-CV	<i>intra-assay</i> -Variabilität
IP10	<i>interferon gamma inducible protein 10</i>
kDa	kiloDalton
LADA	<i>latent autoimmune diabetes in adults</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LOD	<i>limit of detection</i>
LOQ	<i>limit of quantitation</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MIP-1α	<i>macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>

mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
NCEP ATP III	<i>National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOD	<i>non-obese diabetes</i>
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
p277	Peptid p277
PBS0	Probe ohne Stimulation nach 0h
PBS24	Probe ohne Stimulation nach 24h
PHA	Phytohaemagglutinin
PI	Phorbol-Myristate-Acetat/Ionomycin
pIA-2	Peptid IA-2
PMA	Phorbol-Myristate-Acetat
RA	Rezeptorantagonist
RANTES	<i>regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RI	Rezeptor Typ 1
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SI	Stimulationsindex
SST-Vacutainer	<i>serum separation tube vacutainer</i>
T1D	Typ 1 Diabetes
T2D	Typ 2 Diabetes
TH-1	T-Helferzell Typ 1
TH-2	T-Helferzell Typ 2
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T-Zellen	T-Lymphozyten
U/min	Umdrehung/Minute
xg	x-fache Erdbeschleunigung
ZnT8A	Zink-Transporter-8-Auto-Antikörper

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Komponenten des Immunsystems	12
Tabelle 2:	Übersicht über die untersuchten Zytokine hinsichtlich der Einteilung zu einer Gruppe, der produzierenden Zellen und der Rezeptoren	17
Tabelle 3:	Übersicht über die untersuchten Zytokine hinsichtlich ihrer Wirkung und einer Assoziation zur Diabeteserkrankung	19
Tabelle 4:	Auswahlkriterien für das Probandenkollektiv der Vollblutstimulation	31
Tabelle 5:	Übersicht über die Stimulantien der SST-Vacutainer bei der Vollblutstimulation	32
Tabelle 6:	Auswahlkriterien für das Probandenkollektiv der Leukozytenstimulation.....	33
Tabelle 7:	Übersicht über die Stimulantien beim ELISPOT-Verfahren der Zellüberstände.....	34
Tabelle 8:	Konzentrationsbestimmung der <i>capture</i> -Antikörper-Lösung.....	49
Tabelle 9:	Auswertungsparameter der Messungen	61
Tabelle 10:	Anzahl der Messwerte außerhalb des festgelegten Konzentrationsbereichs.....	62
Tabelle 11:	Übersicht über ausgewertete Zytokine und die angewandte Methodik	63
Tabelle 12:	Charakteristika des Probandenkollektivs der Vollblutstimulation.....	70
Tabelle 13:	Charakteristika des Probandenkollektivs der Leukozytenstimulation	72
Tabelle 14:	Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die Gesamtgruppe.....	74
Tabelle 15:	Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die Typ 1 Diabetiker.....	76
Tabelle 16:	Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die LADA Diabetiker.....	77
Tabelle 17:	Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die Typ 2 Diabetiker.....	77
Tabelle 18:	Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die Kontrollprobanden.....	78
Tabelle 19:	Übersicht über den nicht adjustierten Vergleich der Gruppen bei Vollblutstimulation (Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8).....	81
Tabelle 20:	Übersicht über den nicht adjustierten Vergleich der Gruppen bei Vollblutstimulation (Zytokine TNF- α , IP10, RANTES)	82
Tabelle 21:	Übersicht über den adjustierten Vergleich der Gruppen bei Vollblutstimulation	85

Tabelle 22:	Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker bei Vollblutstimulation (anthropometrische Einflussfaktoren).....	91
Tabelle 23:	Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker bei Vollblutstimulation (klinisch-chemische Einflussfaktoren).....	91
Tabelle 24:	Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Typ 2 Diabetiker bei Vollblutstimulation (anthropometrische Einflussfaktoren).....	92
Tabelle 25:	Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Typ 2 Diabetiker bei Vollblutstimulation (klinisch-chemische Einflussfaktoren).....	92
Tabelle 26:	Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Kontrollprobanden bei Vollblutstimulation (anthropometrische Einflussfaktoren).....	93
Tabelle 27:	Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Kontrollprobanden bei Vollblutstimulation (klinisch-chemische Einflussfaktoren).....	93
Tabelle 28:	Übersicht über die Untersuchung auf Regression bei Vollblutstimulation	96
Tabelle 29:	Übersicht über den nicht adjustierten Vergleich der Gruppen bei Leukozytenstimulation (MCP-1, IP10, RANTES)	101
Tabelle 30:	Übersicht über den nicht adjustierten Vergleich der Gruppen bei Leukozytenstimulation (IL-1RI, IL-5, IL-6, TNF- α).....	102
Tabelle 31:	Übersicht über den adjustierten Vergleich der Gruppen bei Leukozytenstimulation.....	103
Tabelle 32:	Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation bei Leukozytenstimulation (anthropometrische Einflussfaktoren).....	106
Tabelle 33:	Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation bei Leukozytenstimulation (klinisch-chemische Einflussfaktoren).....	106
Tabelle 34:	Übersicht über die Untersuchung auf Regression bei Leukozytenstimulation	109
Tabelle 35:	Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation zwischen der Zytokinsekretion bei Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum	112
Tabelle 36:	Übersicht über die Untersuchung auf Regression zwischen der Zytokinsekretion bei Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum	114

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Funktionsprinzip des <i>multiplex-bead-array-assay</i> -Verfahrens.....	46
Abb.2:	Belegungsplan der Messplatte	53
Abb.3:	Kalibrationskurve und <i>5-parameter-logistic-function</i> für IL-1 β (Vollblutstimulation; Messplatte 4)	56
Abb.4:	Übersicht über den paarweisen Vergleich der Stimulationen für die Gesamtgruppe bei Vollblutstimulation.....	75
Abb.5:	Übersicht über den nicht adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen bei Vollblutstimulation	83
Abb.6:	Übersicht über den adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem anthropometrischen Modell bei Vollblutstimulation	86
Abb.7:	Übersicht über den adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem klinisch-chemischen Modell bei Vollblutstimulation (Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8)	87
Abb.8:	Übersicht über den adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem klinisch-chemischen Modell bei Vollblutstimulation (Zytokine TNF- α , RANTES)	88
Abb.9:	Übersicht über den nicht adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen bei Leukozytenstimulation.....	104
Abb.10:	Übersicht über den adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem klinisch-chemischen Modell bei Leukozytenstimulation	104

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel "Antigen-stimulierte Zytokinsekretion bei Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA" untersucht die Antigen-stimulierte Zytokinausschüttung *in vitro* und vergleicht verschiedene Diabetesformen.

1.2 Diabetes mellitus

1.2.1 Definition des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus stellt eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen dar, welche durch eine chronische Hyperglykämie aufgrund einer defizitären Insulinversorgung charakterisiert werden [1]. Ursächlich liegen eine verminderte oder erloschene Insulinsekretion, eine reduzierte Insulinwirkung im Sinne einer Insulinresistenz oder eine Kombination beider Zustände vor [1;2]. Infolge der chronischen Hyperglykämie resultieren Strukturschädigungen und Funktionsstörungen an unterschiedlichen Organen, wobei insbesondere die Augen, Nieren, Nerven und Gefäße zu nennen sind [1].

1.2.2 Einteilung des Diabetes mellitus

Eine Einteilung der Diabeteserkrankungen ist hinsichtlich einer Klassifikation in mehreren Ausführungen möglich. Geschichtlich gesehen wird eine Orientierung von einer Einteilung auf Basis der pharmakologischen Behandlungsmethodik durch die *National Diabetes Data Group* im Jahre 1979 in Richtung einer Einteilung auf Grundlage der ätiologischen Gesichtspunkte durch die *American Diabetes Association (ADA)* und *World Health Organisation* im Jahre 1997 erkennbar [1]. Die der späteren Einteilungsmethodik entsprechenden Formen Typ 1 Diabetes und Typ 2 Diabetes wurden ursprünglich als juveniler oder Insulin-abhängiger und adulter oder Insulin-unabhängiger Diabetes Typ deklariert. Es folgte eine Abwendung von diesen Einteilungen nach Alter oder notwendiger Pharmakotherapie vor dem Hintergrund, dass nicht jeder Typ 1 Diabetiker ein juveniles Lebensalter aufweist und dass auch Typ 2 Diabetiker häufig einer Insulinsubstitution bedürfen [3;4]. Im Nachfolgenden ist die aktuell gültige Klassifikation nach der Ätiologie in abgeänderter Form dargestellt.

Klassifikation nach der Ätiologie (ADA 1997) [abgeänderte Form nach [4]]

I Typ 1 Diabetes

- a) immunologisch
- b) idiopathisch

II Typ 2 Diabetes

III andere Diabetesformen

- a) genetische Defekte der β -Zellfunktion
- b) genetische Defekte der Insulinwirkung
- c) Erkrankungen des exokrinen Pankreas
- d) Endokrinopathien
- e) medikamentös-induziert
- f) infektiös-bedingt
- g) seltene immunologisch bedingte Formen
- h) genetische Syndrome, die gelegentlich mit Diabetes assoziiert sind

IV Gestationsdiabetes

Die dargestellte Klassifikation nach der Ätiologie unterscheidet hinsichtlich einer Gruppeneinteilung zwischen einem Typ 1 Diabetes, einem Typ 2 Diabetes, einem Gestationsdiabetes und den zu einer Gruppe zusammengefassten anderen Diabetesformen [4].

Der Typ 1 Diabetes zeichnet sich durch eine Zerstörung der β -Zellen des Pankreas mit einem nachfolgenden absoluten Insulinmangel aus, wobei zwischen einer immunologischen und einer idiopathischen Form unterschieden wird [3]. Der immunologischen Form des Typ 1 Diabetes ist eine Unterform mit der Bezeichnung LADA zugeordnet [5;6]. Die Bezeichnung LADA steht als Abkürzung für *latent autoimmune diabetes in adults* (LADA) und umschreibt eine Erkrankungsform, die ätiologisch dem Typ 1 Diabetes zuzuordnen ist, allerdings klinisch mit einem späteren Manifestationszeitpunkt im Erwachsenenalter und einem sich relativ langsam ausbildenden Insulinmangel mehr Gemeinsamkeiten mit dem Typ 2 Diabetes aufweist [5;7]. Die Diagnose des LADA erfolgt auf der Grundlage von drei Kriterien, welche sowohl das Erwachsenenalter bei Diagnosestellung, die Anwesenheit von Typ 1 Diabetes-assoziierten Auto-Antikörpern als auch die erfolgreiche antihyperglykämische Therapie ohne Insulin für 3 bis 6 Monate nach Diagnose umfassen [7;8]. Die beiden letztgenannten Aspekte stellen jeweils eine Abgrenzung zum Typ 2 Diabetes beziehungsweise Typ 1 Diabetes dar. Ferner zeigt der LADA als Abgrenzung zum Typ 2 Diabetes eine Assoziation mit bestimmten *human leukocyte antigen* (HLA)-Merkmalen und Typ 1 Diabetes-assoziierten Auto-Antikörpern, eine reduzierte Insulinsekretion und eine geringere Prävalenz des metabolischen Syndroms [7].

Der Typ 2 Diabetes zeichnet sich durch eine Kombination von verminderter Insulinsekretion und reduzierter Insulinwirkung im Sinne einer Insulinresistenz mit einem nachfolgenden relativen Insulinmangel aus [3].

Des Weiteren ist der Gestationsdiabetes als eine erstmalig während einer Schwangerschaft auftretende beziehungsweise diagnostizierte Kohlenhydratintoleranz definiert [9].

Die Gruppe der anderen Formen der Diabeteserkrankung stellt eine Zusammenfassung von weiteren seltenen Ursachen des Diabetes mellitus dar [1;4].

1.2.3 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Die Epidemiologie des Diabetes mellitus zeigt hinsichtlich der Entwicklung, der topographischen Häufigkeitsverteilung und der Anteile der verschiedenen Erkrankungsformen an der Gesamtanzahl an Diabeteserkrankungen mehrere erwähnenswerte Aspekte auf.

Im Jahr 2011 wurde die Anzahl an Diabetes erkrankten Personen im Alter zwischen 20 und 79 Jahren weltweit auf 366 Millionen geschätzt, wobei davon ausgegangen wird, dass jene Zahl zum Jahre 2030 auf 552 Millionen ansteigen wird [10]. In diesem Zeitraum wird der Anstieg der Prävalenz mit geschätzten 69% in den Entwicklungsländern um ein Vielfaches höher liegen als in den Industrienationen mit geschätzten 20% [11]. In Deutschland sind im Jahr 2013 sechs Millionen Menschen mit Diabetes diagnostiziert, wobei mit Rücksicht auf eine sich zum Teil schleichend entwickelnde Symptomatik eine hohe Dunkelziffer vermutet werden darf [12].

Die topographische Verteilung der Prävalenz der Diabeteserkrankung zeigt sowohl auf globaler als auch auf nationaler Ebene eine heterogene Verteilung. Laut dem von der *International Diabetes Federation* herausgegebenen Update 2012 der fünften Edition des Diabetes Atlas zeigte die weltweite Prävalenz im Durchschnitt einen Wert von 8,3% auf, wobei die Rate nicht diagnostizierter Fälle weltweit durchschnittlich bei circa 50% liegt [13]. In Anbetracht einer Prävalenz von 10,5% in Nord-Amerika, 9,2% in Süd- und Zentral-Amerika, 6,7% in Europa, 10,9% im mittleren Osten und Nord-Afrika, 4,3% in Afrika, 8,7% im Südosten und Asien und 8,0% in der westlichen Pazifikregion zeigt sich eine erhebliche Variabilität bezüglich der globalen Verbreitung. In Deutschland zeigen sich bundesweit regionale Unterschiede bei der Prävalenz der Typ 1 und Typ 2 Diabeteserkrankung [12]. Während für die Altersgruppe zwischen 45 und 75 Jahren die Region Halle für die Diabeteserkrankung einen Anteil von 12% an der Bevölkerung aufzeigt, beträgt der Anteil an der Bevölkerung für die Region Augsburg nur 5,8%, infolgedessen das Vorhandensein eines Nord-Süd-Gefälles impliziert wird.

Der Anteil der unterschiedlichen Erkrankungsformen an der Gesamtzahl an Diabeteserkrankungen variiert in einem erheblichen Maße. Der Anteil des Typ 1 Diabetes beträgt bis zu 10% und der Anteil des Typ 2 Diabetes etwa 90%, während die weiteren Formen eine untergeordnete Rolle einnehmen [4;14].

1.2.4 Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus

Die verschiedenen oben dargestellten Formen des Diabetes mellitus unterscheiden sich hinsichtlich ihrer zugrunde liegenden Ätiologie und Pathogenese erheblich, wobei als gemeinsames Merkmal eine defizitäre Insulinversorgung mit nachfolgend resultierender Hyperglykämie zu nennen ist [1]. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit untersuchten Formen des Diabetes mellitus werden schwerpunktmäßig der Typ 1 Diabetes, der LADA sowie der Typ 2 Diabetes besprochen.

Der Typ 1 Diabetes zeigt eine für diese Form der Diabeteserkrankung charakteristische Zerstörung der β -Zellen des endokrinen Pankreas und einen nachfolgenden absoluten Insulinmangel [14;15]. Es werden beim Typ 1 Diabetes ein Typ 1a, bei dem die β -Zell-Zerstörung auf Grundlage einer immunologischen Reaktion stattfindet, und ein Typ 1b unterschieden, bei dem keine Ursache für die β -Zell-Zerstörung ermittelt werden kann, weshalb jener auch als idiopathisch umschrieben wird [16].

Es wird angenommen, dass für die Entstehung des Typ 1 Diabetes sowohl eine durch genetische Faktoren beeinflusste Empfänglichkeit als auch eine Einwirkung von Umweltfaktoren als Auslöser eine Rolle spielen [17]. Es wurden zwei Chromosomenregionen gefunden, die mit der Typ 1 Diabeteserkrankung assoziiert sind, im Einzelnen Gene innerhalb der HLA-Region auf dem Chromosom 6p21.3 und die Insulingenregion auf Chromosom 11p15.5 [18]. Die Gene der angesprochenen HLA-Region codieren Komponenten des *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-2-Proteinkomplexes, wobei beim Menschen drei Haupttypen von MHC-Klasse-2-Molekülen bekannt sind, im Einzelnen HLA-DP, HLA-DR und HLA-DQ [19]. Die HLA-Haplotypen HLA-DR3 und HLA-DR4 sowie bestimmte HLA-DQ Formen sollen mit einem hohen Risiko für eine Erkrankung und der HLA-Haplotyp HLA-DR2 mit einer gewissen Protektion einhergehen, wobei insgesamt die Protektionsfaktoren gegenüber den Risikofaktoren eine Dominanz aufweisen [15]. Bei einem Erkrankungsbeginn in der frühen Kindheit wird eine Assoziation mit HLA-DR3/4 beobachtet, während sich bei einem Erkrankungsbeginn in der späteren Kindheit und im Erwachsenenalter eine Assoziation mit HLA-DR3 zeigt [2]. Des Weiteren ist die Rate der Konkordanz bei der Typ 1 Diabetes-

erkrankung bei identischen Zwillingen höher als bei nicht identischen Zwillingen [20]. Es zeigt sich, dass bei einem erkrankten Geschwisterteil das Risiko an Typ 1 Diabetes zu erkranken bei HLA-identischen Geschwistern circa 18% und bei HLA-haploidentischen Geschwistern circa 6% beträgt, während bei HLA-verschiedenen Geschwistern kaum ein erhöhtes Risiko festgestellt werden kann [4]. Bezüglich des Vorhandenseins von Umweltfaktoren als Auslöser für die Entstehung der Erkrankung werden zahlreiche Möglichkeiten diskutiert, unter anderem eine Infektion mit Enteroviren oder die Aufnahme von bestimmten Nahrungsmitteln oder bestimmten Toxinen [14;17].

Die Entstehung beziehungsweise Entwicklung des Typ 1 Diabetes erfolgt auf Grundlage einer Zerstörung der β -Zellen innerhalb der Inseln des endokrinen Pankreas [17]. Dabei wird die Modellvorstellung vertreten, dass eine pathologische Reaktion des Immunsystems auf zellulärer und humoraler Ebene die Grundlage für die β -Zell-Zerstörung darstellt [21]. Neben einer Entzündungsreaktion in den Inseln durch Infiltration mit mononuklearen Immunzellen werden gegen Antigene der β -Zellen gerichtete Auto-Antikörper gebildet. Die nachweisbaren Auto-Antikörper, im Einzelnen Inselzell-Auto-Antikörper (ICA), Insulin-Auto-Antikörper (IAA), Glutamatdecarboxylase-Auto-Antikörper (GADA), Protein-Thyrosinphosphatase-IA-2-Auto-Antikörper (IA-2A) und Zink-Transporter-8-Auto-Antikörper (ZnT8A), zeigen eine Assoziation mit der Wahrscheinlichkeit für ein Auftreten der Erkrankung und dem Ausmaß ihrer Progression, scheinen aber keine aktive Rolle in den pathogenetischen Mechanismen innezuhaben [14;22-24]. Bei einem Erkrankungsbeginn in der frühen Kindheit können mit einer hohen Frequenz IAA und IA-2A nachgewiesen werden, während bei einem späteren Erkrankungsbeginn in der späten Kindheit und dem Erwachsenenalter vermehrt ICA und GADA nachgewiesen werden [2]. Infolge der kontinuierlichen β -Zell-Zerstörung nimmt die Kapazität zur suffizienten Insulinsekretion ab, wobei davon ausgegangen wird, dass bei einer vorliegenden Zerstörung von etwa 80-90% der β -Zellen des Pankreas ein Anstieg der Blutzuckerwerte einsetzt [4;14;25].

Es wird angenommen, dass der LADA als Unterform des Typ1 Diabetes grundlegend die gleichen Mechanismen bezüglich der Ätiologie und Pathogenese aufweist [5].

Der Typ 2 Diabetes zeichnet sich durch eine Kombination von verminderter Insulinsekretion und erhöhter Insulinresistenz mit einem nachfolgenden relativen Insulinmangel aus [3]. Ursächlich kann vor diesem Hintergrund die Entwicklung auf ein Überangebot an Nährstoffen und einer inadäquaten Reaktion sowohl der β -Zellen des Pankreas und als auch der Fettzellen zurückgeführt werden [26].

Es wird angenommen, dass unterschiedliche die Empfänglichkeit beeinflussende Gene mit

gewissen Umweltfaktoren interagieren und nachfolgend die Entstehungswahrscheinlichkeit in einem Individuum mitbestimmen. Es wurden mehr als 40 Genloci gefunden, die eine Assoziation mit der Erkrankung aufweisen, wobei die überwiegende Anzahl mit einer gestörten β -Zellfunktion beziehungsweise Insulinsekretion und die geringere Anzahl mit einer gestörten Insulinwirkung verbunden sind. Die Wahrscheinlichkeit an Typ 2 Diabetes zu erkranken beträgt bei Kindern eines an Typ 2 Diabetes erkrankten Elternteils bis zu 50%, während das Risiko bei identischen Zwillingen einen Wert von 100% aufweist [4]. In Bezug auf eine mitwirkende Rolle von Umweltfaktoren konnte in unterschiedlichen Studien ein Zusammenhang zwischen dem Einwirken eines Umweltfaktors und dem Auftreten des Typ 2 Diabetes aufgezeigt werden [27;28].

Die Entstehung beziehungsweise Entwicklung des Typ 2 Diabetes erfolgt vor dem Hintergrund, dass bei Personen mit einer gewissen Prädisposition eine Aufrechterhaltung der kompensatorischen β -Zell-Antwort als Reaktion auf eine Nährstoffübersättigung und Reduktion der Insulinwirkung nicht möglich ist [26]. Zu den Kompensationsmechanismen gehören neben der Expansion der β -Zell-Masse eine gesteigerte Insulinbiosynthese und eine verstärkte Nahrungsangebot-gesteuerte Insulinsekretion. Pathogenetisch findet dabei die Modellvorstellung Zuspruch, dass es nach einer gewissen Zeit der Kompensation zu einer Dekompensation in Form einer Dysfunktion und weiterführend eines Untergangs der β -Zellen kommt. Der initiale Untergang von nur wenigen β -Zellen führt zu einer vermehrten Belastung und anschließendem Untergang der übrigen β -Zellen. Im Hinblick auf Kompensationsvorgänge scheinen vor allem die individuellen Eigenschaften des Fettgewebes und die Lokalisation der Nährstoffspeicherung im Fettgewebe eine entscheidende Rolle zu spielen [29]. In Abhängigkeit von den individuellen Eigenschaften des Fettgewebes kommt es ab einer bestimmten Übersättigung des Fettgewebes mit Nährstoffen in Form von Fettsäuren zu Entzündungsvorgängen und der Ausschüttung von bestimmten Zytokinen wie MCP-1 und TNF- α [30]. Letzteres bewirkt über die Steigerung der Lipolyse im Fettgewebe mit nachfolgendem Anstieg der freien Fettsäuren im Blut eine Induktion der Insulinresistenz beziehungsweise Reduktion der Insulinwirkung am Skelettmuskelgewebe. In diesem Zusammenhang hat sich gezeigt, dass die Einlagerung von Nährstoffen im viszeralen Fettgewebe im Vergleich zu einer Einlagerung im subkutanem Fettgewebe zu einer gesteigerten Insulinresistenz führt [29]. Die Ausbildung einer Insulinresistenz wird dabei als eine Art Schutzmechanismus interpretiert, der die betroffenen Organe vor einer Überfettung schützen soll [26]. Beim Typ 2 Diabetes zeigt sich in mehreren Gesichtspunkten eine Störung des Fettgewebes, indem vermehrt eine Einlagerung von Nährstoffen ins viszerale Fettgewebe stattfindet, die Insulin-vermittelte Lipolyseunterdrückung reduziert ist und vermehrt inflammatorische Zytokine freigesetzt werden. Während

die Einlagerung von Fett in Leber und Skelettmuskulatur zu einer Steigerung der Insulinresistenz führt, bewirkt die Einlagerung von Fett in die β -Zellen eine Verminderung der Insulinsekretion und Dysfunktion der β -Zellen [31]. Die beschriebenen Vorgänge führen nachfolgend zu einer metabolischen Stressreaktion und Organschädigung, unter anderem der Leber und Skelettmuskulatur [26].

Die weiteren pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen des Typ 1 Diabetes, des LADA und des Typ 2 Diabetes sind auf eine defizitäre Insulinversorgung zurückzuführen [1;32]. Entscheidend für die Entwicklung und das quantitative Ausmaß dieser Vorgänge ist die Diskrepanz zwischen der zur Verfügung stehenden und zur adäquaten metabolischen Regulation benötigten Menge an Insulin [33].

Das Peptidhormon Insulin besteht aus einer α -Kette mit 21 Aminosäuren und einer β -Kette mit 30 Aminosäuren und wird in den β -Zellen der Langerhans-Inseln des endokrinen Pankreas gebildet [33]. Die physiologische Wirkung von Insulin ist vielfältig und spielt sowohl auf der Ebene der einzelnen Zelle als auch für die Regulation des Gesamtorganismus eine wichtige Rolle, wobei die Wirkung auf das Fettgewebe, die Skelett- und Herzmuskulatur sowie auf die Leber aufgrund ihrer Masse und Stoffwechselbedeutung im Vordergrund steht. Insgesamt bedarf die Wirkung des Insulins auf den Kohlenhydratstoffwechsel höhere Konzentrationen an Insulin als vergleichsweise auf den Fett- und Proteinstoffwechsel, weshalb bei einem vorliegenden Insulinmangel die Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels im Vordergrund stehen [32]. Der für die Diabeteserkrankung charakteristische Insulinmangel führt zu einer verminderten Aufnahme von Nährstoffen wie Glukose, Aminosäuren, Fettsäuren und Elektrolyte vor allem in die Zellen der Skelettmuskulatur und des Fettgewebes. Des Weiteren führt der Insulinmangel zu einer gesteigerten Glykogenolyse in der Skelettmuskulatur, einer gesteigerten Lipolyse im Fettgewebe und einer enthemmten Glukoneogenese in der Leber. Es resultiert ein Konzentrationsanstieg von Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren im Blut. Die infolge der Hyperglykämie auftretende Glukosurie mit osmotischer Diurese führt zu einem Verlust von Flüssigkeit und Elektrolyten, während eine übermäßig hohe Konzentration an freien Fettsäuren im Blut in Verbindung mit einem starkem Insulinmangel zu einer Bildung von Ketonkörpern in der Leber führt, infolgedessen sich eine metabolische Azidose entwickeln kann [32;33]. Während beim absoluten Insulinmangel eine Enthemmung der Lipolyse mit nachfolgender Bildung von Ketonkörpern einsetzt, verhindert beim relativen Insulinmangel eine verbleibende Mengen an Insulin das Auftreten dieser Vorgänge [4]. Eine intrazelluläre Dehydratation, eine Elektrolytverschiebung zwischen dem intrazellulären und extrazellulären Raum und eine durch extrazellulären Flüssigkeitsverlust be-

dingte Minderperfusion stellen dabei die Basis für organische Funktionsstörungen dar [33]. Im Erkrankungsverlauf kommt es zu Folgeschäden an Gewebestrukturen beziehungsweise Organen, wobei unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen vorliegen und die Auswirkungen der Hyperglykämie und Hyperlipidämie im Vordergrund stehen [32;34]. Insgesamt scheint die pathogenetische Grundlage für die Entstehung diabetischer Komplikationen nicht vollständig geklärt zu sein.

1.2.5 Klinik des Diabetes mellitus

Im Hinblick auf die anthropometrischen und klinischen Merkmale der Erkrankten sowie der Progredienz und dem Ausprägungsgrad der klinischen Symptomatik werden Unterschiede zwischen den hier dargestellten Formen der Diabeteserkrankung, im Einzelnen Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA, erkennbar.

Der Typ 1 Diabetes manifestiert sich vorwiegend im Kindes- und Jugendalter, zeigt zumeist eine rasch fortschreitende Entwicklung zur klinisch manifesten Form und wird unter Umständen anhand der klinischen Symptomatik des diabetischen Komas sichtbar [4]. Im Gegensatz dazu weisen der Typ 2 Diabetes und der LADA vorwiegend eine Manifestation im Erwachsenenalter auf. Gemeinsam zeigt sich oft eine langsam progrediente Entwicklung der klinischen Symptomatik, weshalb beide Formen oft anhand der Veränderungen von klinisch-chemischen Parametern festgestellt werden. Während beim Typ 1 Diabetes in der Regel ein Normalgewicht beobachtet werden kann, zeichnen sich der Typ 2 Diabetes und der LADA in den meisten Fällen durch das Vorliegen von Übergewicht aus [4;8;35]. Des Weiteren zeigt sich bei beiden letztgenannten Formen eine Assoziation mit dem Auftreten des sogenannten metabolischen Syndroms, wobei beim Typ 2 Diabetes ein größeres Ausmaß beobachtet wird [35]. Bezüglich des Vorliegens eines metabolischen Syndroms wurden mehrere Definitionen auf Basis bestimmter Kriterien entwickelt [36]. Nachfolgend ist die *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III* (NCEP AT III) Definition dargestellt.

Im Rahmen der klinischen Symptomatik können neben unspezifischen Allgemeinsymptomen wie eine verminderte Leistungsfähigkeit und Müdigkeit für die Erkrankung charakteristische Symptome wie Polyurie, Polydipsie und ein Gewichtsverlust beobachtet werden [1;4]. Die Häufigkeit des Auftretens jener Symptome ist beim Typ 1 Diabetes hoch, während beim Typ 2 Diabetes und beim LADA oft keine Symptomatik registriert werden kann [37]. Außerdem können Symptome wie nächtliche Wadenkrämpfe und Sehstörungen auftreten [4].

Definition des metabolischen Syndroms (NCEP ATP III Definition)[übernommen aus [36]]

Blutglukose nüchtern	≥ 100 mg/dl
Blutdruck	$\geq 130/85$ mmHg
Triglyceride	≥ 150 mg/dl
HDL	< 40 mg/dl (männlich) und < 50 mg/dl (weiblich)
Hüftumfang	> 102 cm (männlich) und > 88 cm (weiblich)

(Diagnose eines metabolischen Syndroms, wenn ≥ 3 Kriterien erfüllt sind)

Eine Dekompensation beziehungsweise schwerste Verlaufsform innerhalb der klinischen Symptomatik zeigt sich in der Manifestation des diabetischen Komas, welches sich unter anderem mit einem Auftreten von Bewusstseinsstörungen und Zeichen der Exsikkose manifestiert [4]. Für den Typ 1 Diabetes ist das ketoazidotische Koma mit Blutzuckerwerten über 350mg/dl und der Ausbildung einer metabolischen Azidose charakteristisch, während für den Typ 2 Diabetes das hyperosmolare Koma mit Blutzuckerwerten über 600mg/dl ohne Ausbildung einer metabolischen Azidose kennzeichnend ist. Es zeigen sich klinisch drei unterschiedliche Verlaufsformen, indem bei der kardiovaskulären Form ein Volumenmangel, bei der renalen Form ein akutes Nierenversagen und bei der pseudoperitonitischen Form des ketoazidotischen Komats gastrointestinale Symptome und peritoneale Reizerscheinungen im Vordergrund stehen.

Im Rahmen der Erkrankung können sich unterschiedliche Folgeerkrankungen entwickeln, welchen vor dem Hintergrund der weiteren Morbidität und Mortalität eine besondere Bedeutung zukommt [4]. Die sich entwickelnde Angiopathie wird generell in eine Diabetes-unspezifische Makroangiopathie und Diabetes-spezifische Mikroangiopathie eingeteilt. Während die Makroangiopathie vornehmlich die großen arteriellen Gefäße betrifft und sich klinisch als koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit und arterielle Verschlusskrankheit der Hirnarterien manifestiert, tritt die Mikroangiopathie klinisch als Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie in Erscheinung. Des Weiteren sind in dieser Hinsicht die diabetische Kardiomyopathie, eine Resistenzminderung mit Neigung zu bakteriellen Infektionen, Störungen des Fettstoffwechsels und eine Steatohepatose zu nennen.

1.2.6 Diagnostik des Diabetes mellitus

Die Diagnostik der hier dargestellten Formen der Diabeteserkrankung, im Einzelnen Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA, erfolgt unter Anwendung mehrerer Untersuchungs-

verfahren, wobei die quantitative Bestimmung der Blutglukose und des Anteils an glykiertem Hämoglobin A1 (HbA1c) am Gesamthämoglobin im Vordergrund stehen [4;37]. Dabei stützt sich die Diagnose auf nachfolgend beschriebene Kriterien, wobei bereits die Erfüllung eines Kriteriums zur Feststellung einer Diabeteserkrankung ausreicht.

Kriterien zur Diagnose eines Diabetes mellitus [modifiziert nach [1;4;37]]

- HbA1c $\geq 6,5$ %
- Nüchtern-Blutglukose ≥ 126 mg/dl
- OGTT-2h-Blutglukose ≥ 200 mg/dl
- Gelegenheits-Blutglukose ≥ 200 mg/dl in Kombination mit Symptomen des Diabetes

(die Grenzwerte gelten jeweils für die Bestimmung im venösen Plasma; Nüchternheit definiert als unterbliebene Nahrungsaufnahme für 8h; Symptome des Diabetes: Polydipsie, Polyurie und unerklärter Gewichtsverlust; OGTT=oraler Glukosetoleranztest, Blutglukosebestimmung 2h nach oraler Aufnahme von 75g Glukose; Bestätigung der Ergebnisse der Blutglukosebestimmung mittels zweiter Messung an einem nachfolgenden Tag; Diagnose eines Diabetes mellitus bei Erfüllung eines Kriteriums)

Es wird zwischen einem Stadium ohne Hinweis auf eine vorliegende Diabeteserkrankung, einem Stadium mit abnormer Nüchternblutglukose beziehungsweise beeinträchtigter Glukosetoleranz sowie einem Stadium mit vorliegender Diabeteserkrankung unterschieden [4]. Während für letzteres Stadium die oben beschriebenen Grenzwerte gelten, ist das Stadium mit abnormer Nüchternblutglukose beziehungsweise beeinträchtigter Glukosetoleranz durch den Bereich 100 bis 125mg/dl für die Nüchtern-Blutglukose respektive 140 bis 199mg/dl für den Wert des oralen Glukosetoleranztests (OGTT) nach 2h festgelegt.

1.2.7 Therapie des Diabetes mellitus

Die Therapie der hier dargestellten Formen der Diabeteserkrankung, im Einzelnen Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA, setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Mit Rücksicht auf die unterschiedlichen pathogenetischen Grundlagen der einzelnen Formen der Diabeteserkrankung lassen sich Unterschiede hinsichtlich der Anwendung beziehungsweise Gewichtung der einzelnen Komponenten erkennen. Die Therapiemaßnahmen werden mit dem Ziel angewendet, durch eine Aufrechterhaltung einer normoglykämischen Stoffwechsellage sowohl eine Dekompensation zu verhindern als auch das Auftreten diabetischer Spätkomplikationen zu verzögern beziehungsweise zu vermeiden.

Die Therapie des Typ 1 Diabetes umfasst die Komponenten Pharmakotherapie, Ernährungsberatung, Schulung und psychosoziale Betreuung [38]. Bezüglich einer Pharmakotherapie ist beim Typ 1 Diabetes aufgrund des absoluten Insulinmangels eine Indikation zur Insulintherapie gegeben [4]. Als Zielwert wird ein HbA1c-Wert von unter 7,5% angestrebt, wobei grundlegend hinsichtlich der quantitativen Ausrichtung der Insulinsubstitution ein Kompromiss zwischen dem Risiko für Hypoglykämien und einer Risikoreduktion für das Auftreten diabetischer Folgekomplikationen gefunden werden muss [38]. Es finden unterschiedliche Formen der Insulintherapie Anwendung, indem zwischen einer intensivierten und einer konventionellen Insulintherapie unterschieden wird [4]. Während bei der intensivierten Insulintherapie mit einem adaptiven Verabreichungsschema eine Anpassung der Insulingabe an die Mahlzeiten erfolgt, zeichnet sich die konventionelle Insulintherapie mit einem starren Verabreichungsschema durch eine Anpassung der Mahlzeiten an die Insulingabe aus. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer sogenannten Insulinpumpentherapie, bei der eine kontinuierliche subkutane Insulininfusion stattfindet. Im Rahmen der Ernährungsberatung und Schulung soll zum einen die Hypoglykämiegefahr vermindert und zum anderen eine optimale Abstimmung zwischen der Nahrungsaufnahme und Insulinsubstitution ermöglicht werden, wobei der korrekten Einschätzung des Kohlenhydratgehaltes der Nahrung eine entscheidende Rolle zukommt [38].

Die Therapie des Typ 2 Diabetes umfasst die Komponenten Schulung, Ernährungsberatung, Steigerung der körperlichen Aktivität und Pharmakotherapie [39]. Als Zielsetzung für die quantitative Ausrichtung der einzelnen Komponenten werden Zielgrößen für verschiedene Parameter angegeben. Es sollte ein Blutglukose-Wert nüchtern unter 125mg/dl und bis 2h nach Nahrungsaufnahme unter 199mg/dl, ein HbA1c-Wert zwischen 6,5 bis 7,5%, ein LDL-Cholesterin-Wert unter 100mg/dl und eine Blutdruckeinstellung von systolisch unter 140mmHg respektive diastolisch um 80mmHg angestrebt werden. Zusätzlich kommt der Körpergewichtsreduktion eine besondere Bedeutung zu, da 80% der Typ 2 Diabetiker ein Übergewicht aufweisen [4]. Als Ziele werden bei einem *body-mass-index* (BMI) zwischen 27 bis 35 eine Gewichtsabnahme von 5% und bei einem Wert über 35 eine Gewichtsabnahme von 10% formuliert [39]. Bei der Therapie des Typ 2 Diabetes erfolgt eine Orientierung an einem Stufenschema, indem bei ausbleibendem Erfolg beziehungsweise Verfehlen der Zielwerte jeweils Maßnahmen der nachfolgenden Stufe Anwendung finden. Die erste Stufe stellt die sogenannte Basistherapie dar, welche die Grundlage für die weiteren Stufen darstellt und neben Schulungsmaßnahmen und einer Ernährungsberatung ferner eine Steigerung der körperlichen Aktivität umfasst. Die zweite Stufe beinhaltet eine einfache Pharmakotherapie,

wobei das Medikament Metformin die erste Wahl darstellt und nur bei Unverträglichkeit von Metformin andere Medikamente wie Sulfonylharnstoffe, Gliptine, Glinide, Glukosidasehemmer, Glitazone oder Insulinpräparate verwendet werden. Die dritte Stufe umfasst eine zweifache Pharmakotherapie, indem eine Kombination der oben aufgeführten Medikamente eingesetzt wird. Die vierte Stufe beinhaltet die Möglichkeiten sowohl einer zusätzlich zu den oralen Antidiabetika durchgeführten Insulintherapie als auch die Anwendung einer konventionellen oder intensivierten Insulintherapie [4;39].

1.3 Immunsystem

1.3.1 Grundlagen

Das Immunsystem des Menschen stellt ein komplexes System aus Immunorganen, Immunzellen und Mediatoren dar und spielt eine zentrale Rolle beim Schutz des Organismus vor zum Teil pathogenen Fremdstrukturen sowie der Erhaltung seiner Integrität [33;40]. Beim Aufbau kann zwischen unspezifischen und spezifischen sowie zellulären und humoralen Komponenten unterschieden werden [40].

In der nachfolgend dargestellten Tabelle (Tabelle 1) wird eine schematische Übersicht über die einzelnen Komponenten gegeben.

Tabelle 1: Komponenten des Immunsystems [modifiziert nach [33;40]]

	unspezifisch	spezifisch
zellulär	Granulozyten Monozyten/Makrophagen dendritische Zellen natürliche Killerzellen	T-Lymphozyten B-Lymphozyten
humoral	Komplementsystem unspezifische Resistenzfaktoren	Antikörper

Die auch als angeboren umschriebene unspezifische Komponente des Immunsystems wird auf zellulärer Ebene von Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und auf humoraler Ebene vom Komplementsystem und unspezifischen Resistenzfaktoren vertreten [40]. Der Anteil an der Gesamtzahl an Leukozyten beträgt für die Granulozyten etwa 60% und für die Monozyten etwa 4-8% [32].

Bei den Granulozyten kann zwischen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Zellen unterschieden werden. Die im Blut zirkulierenden Monozyten differenzieren sich im Gewebe zu Makrophagen und bilden zusammen mit den dendritischen Zellen als spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen das sogenannte mononukleäre phagozytotische System [32;40]. Die Granulozyten und die Zellen des mononukleären phagozytotischen Systems besitzen zum Zweck der Eliminierung pathogener Krankheitserreger sowohl die Fähigkeit zur Phagozytose als auch die Fähigkeit zur Sekretion zytotoxischer Substanzen [32]. Die NK-Zellen zerstören Zielzellen ohne Beteiligung von MHC-Molekülen über die Induktion einer Apoptose [32].

Das Komplementsystem wird von kaskadenartig aktivierten Proteinen gebildet und wirkt über eine Zerstörung der Membran pathogener Erreger sowie über eine Aktivierung von Immunzellen. Die Gruppe der unspezifischen Resistenzfaktoren umfasst Effektormoleküle wie reaktive Sauerstoffspezies, proteolytische Enzyme und toxisch-wirkende Substanzen [33].

Die auch als erworben umschriebene spezifische Komponente des Immunsystems wird auf zellulärer Ebene von Lymphozyten und auf humoraler Ebene von Antikörpern vertreten [40]. Der Anteil an der Gesamtzahl an Leukozyten beträgt für die Lymphozyten insgesamt etwa 25-40%, wobei zwischen B-Lymphozyten (B-Zellen) mit einem Anteil von etwa 15%, T-Lymphozyten (T-Zellen) mit einem Anteil zwischen 70 und 80% und sogenannten Nullzellen unterschieden wird [32].

Bei den T-Zellen kann wiederum zwischen CD4-positiven T-Zellen und CD8-positiven T-Zellen differenziert werden. Bei den CD4-positiven T-Helferzellen, die durch Antigen-präsentierende Zellen aktiviert werden, können T-Helferzellen vom Typ 1 (TH-1 Zellen) mit vorwiegend zellulärem inflammatorischem Effekt, T-Helferzellen vom Typ 2 (TH-2 Zellen) mit vorwiegend humoralem anti-inflammatorischem Effekt und T-Helferzellen vom Typ 0 unterschieden werden. Die Typen 1 und 2 stellen hinsichtlich des Spektrums der verschiedenen Differenzierungstypen die am weitesten voneinander entfernten Pole auf einer Achse dar. Bei den CD8-positiven T-Zellen zeigt sich eine Differenzierung in zytotoxische T-Killerzellen und regulatorische T-Suppressor-Zellen [33;40].

Die B-Zellen bilden im Verlauf eines Reifungsprozesses einen membrangebundenen B-Zell-Rezeptor mit einer bestimmten Spezifität für eine pathogene Struktur aus [41]. Bei einer Aktivierung der Zellen nach Antigenkontakt kommt es zu einer Sekretion von mit dem Rezeptor identischen löslichen Immunoglobulinen in Form von Antikörpern. Nachfolgend zeigt ein Teil der für die pathogene Struktur spezifischen B-Zellen eine Differenzierung zu Plasmazellen, welche sich im Knochenmark ansiedeln und für das Antigen-spezifische Antikörper sezernieren [32].

Die im menschlichen Organismus vorkommenden Antikörper stellen Immunglobuline dar und werden von aktivierten B-Zellen gebildet. Die Funktion der Antikörper umfasst neben einer Neutralisierung von pathogenen Zellstrukturen sowohl eine Aktivierung des Komplementsystems als auch eine Unterstützung der Phagozytose von Zellstrukturen durch Opsonierung.

Die Steuerung des Immunsystems beziehungsweise die Immunantwort ist das Ergebnis von Zell-Zell-Interaktionen, die sowohl über Rezeptorkontakte als auch Immunmediatoren zustande kommt [40].

Hierbei werden hinsichtlich der Reaktionsmechanismen Unterschiede zwischen der unspezifischen und der spezifischen Komponente erkennbar. Die unspezifische Komponente zeigt eine unmittelbare Reaktion mit unspezifischer Ausrichtung auf pathogene Einflüsse und es findet kein Lernvorgang statt [41]. Die Spezifität der Rezeptoren für die Erkennung und Bindung fremder Strukturen ist genetisch festgelegt und bei allen Zellen eines Typs in gleicher Form vorhanden [42]. Im Kontrast dazu zeigt die spezifische Komponente eine verzögerte Reaktion mit spezifischer Ausrichtung auf pathogene Strukturen und zeichnet sich durch eine Lernfähigkeit mit nachfolgender Optimierung der Mechanismen aus [41]. Die Spezifität der Rezeptoren ist durch Neuordnung multipler Genelemente mit nachfolgender klonaler Selektion variabel veränderbar, weswegen die Zellen eines Typs diverse unterschiedliche Spezifitäten aufweisen können [42]. Es zeigt sich eine vielfältige Verknüpfung zwischen den einzelnen Komponenten, indem unter anderem die unspezifische Komponente eine Grundlage für die Initiierung der spezifischen Komponente darstellt und die spezifische Komponente zum Teil die einzelnen Vertreter der unspezifischen Komponente als ausführendes Organ verwendet [41].

Eine bedeutende Rolle für die Funktion des Immunsystems spielen die MHC-Moleküle, welche in Form eines rund 100 Gene umfassenden Genkomplexes auf Chromosom 6 kodiert sind [41]. Es wird unterschieden zwischen MHC-Klasse-I-Molekülen mit den beim Menschen wichtigen kodierenden *Genloci* HLA-A, HLA-B und HLA-C und MHC-Klasse-II-Molekülen mit den beim Menschen wichtigen kodierenden *Genloci* HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ. Die MHC-Klasse-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen, während die MHC-Klasse-II-Moleküle nur auf Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen nachweisbar sind. Die MHC-Klasse-I-Moleküle dienen der Präsentation von intrazellulären Strukturen und werden durch CD8-positive T-Zellen erkannt [40;41]. Die MHC-Klasse-II-Moleküle dienen der Präsentation von überwiegend extrazellulären Strukturen und werden durch CD4-positive T-Zellen erkannt [32;40].

Zudem sind für die Funktion des Immunsystems eine Toleranzentwicklung und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses bedeutsam [32;41]. Diese Toleranzentwicklung wird gegenüber körpereigenen Strukturen aufgebaut und verhindert autoreaktive Reaktionen [41]. Von grundlegender Bedeutung ist dabei die Fähigkeit, zwischen eigenen und fremden Strukturen zu unterscheiden [40]. Die Toleranz wird zentral durch eine Eliminierung autoreaktiver Zellen und peripher durch eine Aktivitätsunterdrückung autoreaktiver Zellen ermöglicht [41]. Das immunologische Gedächtnis wird im Verlauf einer Infektion gebildet, indem sich eine bestimmte Anzahl aktiver Immunzellen zu langlebenden Gedächtniszellen entwickeln [32]. Bei einem erneuten Kontakt mit der pathogenen Struktur stellen jene Gedächtniszellen die Basis für eine beschleunigte Reaktion dar.

Insgesamt wird die Funktion des Immunsystems durch eine komplexe Verknüpfung der verschiedenen Komponenten in Form eines sich unterstützenden Zusammenspiels ermöglicht.

1.3.2 Zytokine

Die Bezeichnung "Zytokine" stellt einen Oberbegriff dar, der zahlreiche Faktoren zusammenfasst, die im Rahmen eines komplexen Netzwerkes eine Schlüsselrolle in der Regulation des Immunsystems übernehmen [40;43]. Die Zytokine üben eine vermittelnde Funktion zwischen den Immunzellen einerseits und Immunzellen und Zielzellen andererseits aus und steuern die Aktivierung und Differenzierung von Zellen. Dabei aktivieren Zytokine als interzelluläre Botenstoffe in nahezu allen Zellen des menschlichen Organismus intrazelluläre Signalwege, wenn auch ihre regulierende Wirkung auf verschiedene Typen von Leukozyten am bekanntesten ist [44].

Die unter der Bezeichnung "Zytokine" zusammengefassten Faktoren weisen bezüglich struktureller und funktioneller Gesichtspunkte gemeinsame Merkmale auf [33].

Im Hinblick auf ihre chemische Struktur stellen sie Polypeptide mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 25 kDa dar und werden ohne Speicherung unmittelbar nach der Synthese sezerniert.

Eine Synthese von Zytokinen kann in den meisten Zellen des menschlichen Organismus durchgeführt werden, erfolgt jedoch vorwiegend in den Zellen des Immunsystems [33;43;45]. Die Sekretion von Zytokinen kann sowohl kontinuierlich als auch diskontinuierlich induktiv erfolgen [40]. Die Entfaltung ihrer Wirkung erfolgt über spezifische Rezeptoren in einem pico- bis nanomolaren Konzentrationsbereich und die Wirkung kann sowohl autokrin als auch parakrin sowie endokrin systemisch erfolgen.

Die Zytokine zeigen über die Aktivierung von Signalkaskaden ein breites Spektrum an Mechanismen der Zellsteuerung, welches neben einer Veränderung der Genexpression und Stoffwechselaktivität sowohl eine Veränderung der Proliferation als auch eine Steuerung der Migration und Apoptose von Zellen umfasst [33]. Es zeigt sich sowohl ein Pleiotropismus, indem ein Zytokin in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Wirkungen hervorrufen kann, als auch eine Redundanz, indem unterschiedliche Zytokine die gleiche Wirkung vermitteln können. Die Wirkung von Zytokinen kann unter physiologischen Bedingungen durch drei Gruppen von Inhibitoren spezifisch vermindert beziehungsweise unterbunden werden, im Einzelnen sind hier gegen das Zytokin gerichtete Antikörper, Zytokin-Rezeptorantagonisten sowie lösliche Zytokinrezeptoren zu nennen [46].

Für eine Einteilung der Zytokine in einzelne Gruppen finden sich in der Literatur mehrere voneinander divergierende Konzepte [33;40;47;48]. Unter anderem wird zwischen den Interleukinen (IL), den Interferonen (IFN), den Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), den Chemokinen, den Kolonie-stimulierenden-Faktoren und den nicht einer Gruppe zugewiesenen Zytokinen unterschieden [47]. Die Chemokine werden anhand des Vorhandenseins einer weiteren Aminosäure zwischen zwei N-terminal lokalisierten Cystein Aminosäuren in zwei Klassen unterteilt [33]. Dabei wird die Klasse der sogenannten CC-Chemokine ohne weitere Aminosäure von der Klasse der sogenannten CXC-Chemokine mit einer weiteren Aminosäure abgegrenzt. Des Weiteren können sogenannte α -Chemokine wie IL-8 und *interferon gamma inducible protein 10* (IP10), welche vermehrt chemotaktisch auf Granulozyten und Lymphozyten wirken, und sogenannte β -Chemokine wie *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), *macrophage inflammatory protein 1 alpha* (MIP-1 α) und *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES), welche vermehrt chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen wirken, unterschieden werden [49-51]. Darüber hinaus werden von Lymphozyten produzierte Zytokine als Lymphokine und von Monozyten produzierte Zytokine als Monokine bezeichnet [49].

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 2) ist eine Übersicht für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytokine hinsichtlich der Einteilung zu einer Gruppe, der produzierenden Zellen und der Rezeptoren dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird die Ligand-bindende Untereinheit des Interleukin-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1RI) in der Tabelle sowie in den nachfolgenden Ausführungen als Zytokin aufgeführt, wobei es sich hinsichtlich der zugrunde liegenden Systematik im engeren Sinne nicht um ein Zytokin handelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration der Ligand-bindenden Untereinheit des Interleukin-1 Rezeptor Typ 1 bestimmt.

Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten Zytokine hinsichtlich der Einteilung zu einer Gruppe, der produzierenden Zellen und der Rezeptoren [modifiziert nach [40;47;48;52-54]]

Zytokin	Gruppe	Produzierende Zelle	Rezeptor
IL-1α	Interleukin	Makrophagen/Epithelzellen/Endothelzellen/B-Zellen/ Fibroblasten	CD121a CD121b
IL-1β	Interleukin	Makrophagen/Epithelzellen	CD121a CD121b
IL-1RA	Interleukin	Monozyten/Makrophagen/neutrophile Granulozyten/Hepato- zyten	CD121a
IL-1RI*	-	(Ligand-bindende Untereinheit des IL-1-Rezeptor Typ 1: Bindung von IL-1 α /IL-1 β /IL-1RA; exprimiert auf T-Zellen /Fibroblasten)	-
IL-2	Interleukin	T-Zellen	CD25 CD122 CD132
IL-4	Interleukin	T-Zellen/Mastzellen	CD124 CD132
IL-5	Interleukin	T-Zellen/Mastzellen	CD125
IL-6	Interleukin	T-Zellen/Makrophagen/Endothelzellen/Monozyten	CD126 CD130
IL-10	Interleukin	T-Zellen/Makrophagen/Monozyten	IL-10R CFR2-4
IL-17	Interleukin	T-Zellen/NK-Zellen	CD217
TNF-α	Tumor- Nekrose- Faktor	Makrophagen/NK-Zellen/T-Zellen/B-Zellen/ Monozyten/neutrophile Granulozyten/Epithelzellen	p55 p75 CD120a CD120b
IFN-γ	Interferon	T-Zellen/NK-Zellen/B-Zellen	CD119 IFNGR2
IL-8 (CXCL8)	Chemokin	Makrophagen/Monozyten/Endothelzellen/Fibroblasten/ Keratinocyten	CXCR1 CXCR2
IP10 (CXCL10)	Chemokin	T-Zellen/Monozyten/Endothelzellen/Fibroblasten/ Keratinocyten	CXCR3
MCP-1 (CCL2)	Chemokin	Makrophagen/Monozyten/Fibroblasten/Keratinocyten	CCR2
MIP-1α (CCL3)	Chemokin	T-Zellen/Monozyten/Mastzellen/Fibroblasten	CCR1 CCR5
RANTES (CCL5)	Chemokin	T-Zellen/Monozyten/Endothelzellen/Thrombozyten	CCR1 CCR3 CCR5

Abkürzungen: IL=Interleukin; RA=Rezeptorantagonist; RI=Rezeptor Typ 1; TNF- α =Tumor-Nekrose-Faktor alpha; IFN- γ =Interferon gamma; IP10=*interferon gamma inducible protein 10*; MCP-1=*monocyte chemoattractant protein 1*; MIP-1 α =*macrophage inflammatory protein 1 alpha*; RANTES=*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*; CXCL=CXC-Chemokin-Ligand; CCL=CC-Chemokin-Ligand; NK=natürliche Killerzellen; T/B-Zellen=T/B-Lymphozyten; * mit Berücksichtigung der dargestellten Systematik kein Zytokin, zum Zwecke der Übersichtlichkeit aufgeführt

IL-1RI zeigt eine dreiteiligen Aufbau mit einem extrazellulären Ligand-bindenden Anteil mit 319 Aminosäuren, einem transmembranen Anteil mit 20 Aminosäuren sowie einem intrazellulären Anteil mit 213 Aminosäuren [55;56].

Eine Expression kann auf T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, Keratino-

zyten und Hepatozyten nachgewiesen sowie eine Bindungsfähigkeit für die Liganden IL-1 α , IL-1 β und Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1RA) aufgezeigt werden [48;53;57]. Darüber hinaus wurden in verschiedenen Untersuchungen lösliche Formen des Interleukin-1 Rezeptors sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen in Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Synovialflüssigkeit nachgewiesen [58;59]. Die löslichen Rezeptoren entstehen infolge proteolytischer Vorgänge und stellen strukturell jeweils den extrazellulären Anteil des Rezeptors dar [58]. Der lösliche Interleukin-1 Rezeptor Typ 1 bindet mit abnehmender Affinität die Liganden IL-1RA, IL-1 α und IL-1 β [59]. Es wird angenommen, dass die löslichen Rezeptoren als sogenannte Puffer fungieren und die Interleukin-1 Wirkung sowohl von der Konzentration der Interleukine IL-1 α , IL-1 β und IL-1RA als auch von der Konzentration der membrangebundenen sowie der löslichen Rezeptoren beeinflusst wird [58;59]. Ferner weist eine Untersuchung darauf hin, dass die löslichen Rezeptoren auch an Zellen binden und als Liganden fungieren können [60].

Des Weiteren können unter funktionellen Gesichtspunkten sogenannte TH-1 Zellen und TH-2 Zellen Zytokine sowie pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine differenziert werden [61;62]. Eine Zuteilung erfolgt dabei in Abhängigkeit davon, welcher T-Helferzell Typ das jeweilige Zytokin produziert beziehungsweise vermehrt produziert und welche Wirkung das jeweilige Zytokin vermehrt aufweist. Eine Differenzierung auf Grundlage oben genannter Kriterien ist dabei nicht immer eindeutig möglich und in Abhängigkeit der konsultierten Literatur zeigen sich diesbezüglich Differenzen [63;64].

Die Zytokine IL-2 und IFN- γ werden zu den TH-1 Zellen Zytokinen gezählt, wohingegen die Zytokine IL-4 und IL-10 den TH-2 Zellen Zytokinen zugeordnet werden [64-66]. Während in dieser Hinsicht das Zytokin IL-6 beiden T-Helferzell Typen zugeteilt wird, kann beim Zytokin TNF- α im Vergleich beider T-Helferzell Typen eine vermehrte Produktion bei den TH-1 Zellen und eine verminderte Produktion bei den TH-2 Zellen beobachtet werden [64;65]. Bei einer Fokussierung auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytokine werden IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, MIP-1 α , IP10 und RANTES den pro-inflammatorischen Zytokinen sowie IL-1RA, IL-4, IL-5 und IL-10 den anti-inflammatorischen Zytokinen zugeordnet [67-71].

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 3) ist eine Übersicht für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytokine hinsichtlich ihrer Wirkung und einer möglicherweise bestehenden Assoziation zur Diabeteserkrankung dargestellt, wobei nicht in allen Fällen eine eindeutige Aussage möglich ist. Beispielsweise werden bei einzelnen Zytokinen in Abhängigkeit der konsultierten Literatur gegensätzliche Wirkungen beschrieben.

Tabelle 3: Übersicht über die untersuchten Zytokine hinsichtlich ihrer Wirkung und einer Assoziation zur Diabeteserkrankung [modifiziert nach [40;47;48;50;52]]

Zytokin	Wirkung	Assoziation mit Diabeteserkrankung
IL-1α	Aktivierung und Proliferation von T-Zellen/Makrophagen; Fieberinduktion; Aktivierung der Prostaglandinsynthese	β -Zell-zytotoxisch [45;72] Blut-[c] \uparrow bei T1D [73]
IL-1β	Aktivierung und Proliferation von T-Zellen/Makrophagen; Fieberinduktion; Aktivierung der Prostaglandinsynthese	β -Zell-zytotoxisch [45;57;72;74;75] Blut-[c] \uparrow bei T1D [76] Insulinitis bei T2D [77]
IL-1RA	Antagonist der IL-1 Funktion	β -Zell-protektiv [57;74;75;78] Expression \downarrow im Pankreas bei T2D [45]
IL-1RI*	löslicher Rezeptorbestandteil (Antagonist der IL-1 Funktion; IL-1 α / β /RA Bindung)	-
IL-2	Proliferation von T-Zellen	Gewebe[c] \downarrow β -Zell-protective/ \uparrow β -Zell-destruktive Wirkung bei T1D [Mausmodell] [79-81] Blut-[c] \uparrow bei T1D [73]
IL-4	Aktivierung und Proliferation von B-Zellen; Hemmung der TH-1 Zellen; Differenzierung der TH-2 Zellen; Suppression der IFN- γ -Sekretion	Protektion vor T1D [Mausmodell] [82-86] Blut-[c] \uparrow bei T1D [73]
IL-5	Proliferation und Differenzierung von eosinophilen Granulozyten	Blut-[c] \uparrow bei T1D [73]
IL-6	Proliferation und Differenzierung von T-Zellen/B-Zellen; Stimulation der Sekretion von Akute-Phase-Proteinen	Insulinitis/Manifestationsverzögerung bei T1D [Mausmodell] [87] Blut-[c] \uparrow bei T2D [88;89]
IL-10	Differenzierung von B-Zellen; Inhibition der Makrophagenfunktion; Suppression der IFN- γ -Sekretion	Gewebe[c] \downarrow β -Zell-protective/ \uparrow β -Zell-destruktive Wirkung bei T1D [Mausmodell] [90] Blut-[c] \uparrow bei T1D [73]
IL-17	Induktion der Zytokinproduktion in Fibroblasten/Epithelzellen/Endothelzellen	β -Zell-Zerstörung/Insulinitis bei T1D [Mausmodell] [91;92]
TNF-α	Regulation und Proliferation von T-Zellen/B-Zellen; Aktivierung von Makrophagen/Granulozyten/Endothelzellen	β -Zell-zytotoxisch [72;75] Blut-[c] \uparrow bei T1D/T2D [88;89;93] Insulinresistenz bei T2D [94]
IFN-γ	Aktivierung von Makrophagen/Granulozyten/T-Zellen/NK-Zellen; Hemmung der TH-2 Zellen; Stimulation der MHC-Expression	β -Zell-zytotoxisch [95;96] Protektion vor T1D [Mausmodell] [97] β -Zell-Zerstörung [Mausmodell] [98]
IL-8 (CXCL8)	Chemotaxie von T-Zellen/Granulozyten/Endothelzellen	Blut-[c] \uparrow bei T1D/T2D [88;99] metabolische Dysregulation bei T1D [100]
IP10 (CXCL10)	Chemotaxie von T-Zellen/NK-Zellen/Endothelzellen	β -Zell-Zerstörung [Mausmodell] [101] β -Zellfunktionsstörung [102]
MCP-1 (CCL2)	Chemotaxie von T-Zellen/NK-Zellen/Granulozyten/Monozyten	β -Zell-Zerstörung [Mausmodell] [103] Blut-[c] \uparrow bei T2D [104]
MIP-1α (CCL3)	Chemotaxie von T-Zellen/NK-Zellen/Granulozyten/Makrophagen/Monozyten	Blut-[c] \uparrow bei T1D [73]
RANTES (CCL5)	Chemotaxie von T-Zellen/NK-Zellen/Granulozyten/Makrophagen/Monozyten	β -Zell-Zerstörung [Mausmodell] [105;106] Blut-[c] \uparrow bei T1D/T2D [73;104]

Abkürzungen: IL=Interleukin; RA=Rezeptorantagonist; RI=Rezeptor Typ 1; TNF- α =Tumor-Nekrose-Faktor alpha; IFN- γ =Interferon gamma; IP10=*interferon gamma inducible protein 10*; MCP-1=*monocyte chemoattractant protein 1*; MIP-1 α =*macrophage inflammatory protein 1 alpha*; RANTES=*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*; CXCL=CXC-Chemokin-Ligand; CCL=CC-Chemokin-Ligand; T1D=Diabetes Typ 1; T2D=Diabetes Typ 2; T/B-Zellen=T/B-Lymphozyten; NK=natürliche Killerzellen; TH-1/2-Zellen=T-Helferzell Typ 1/2; * mit Berücksichtigung der dargestellten Systematik kein Zytokin, zum Zwecke der Übersichtlichkeit aufgeführt

1.3.3 Antigene und Mitogene

Unter der Bezeichnung "Antigen" werden Substanzen zusammengefasst, die spezifisch mit den einzelnen Komponenten des Immunsystems reagieren [33]. Die Bezeichnung "Mitogen" umschreibt Substanzen, die unspezifisch eine Zellproliferation stimulieren.

Die im Rahmen einer quantitativen Zytokinbestimmung in Vollblutproben respektive Zellüberständen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen sind vorangehend im Vollblut suspendiert beziehungsweise isoliert mit verschiedenen Antigenen und Mitogenen stimuliert worden. Die Stimulation im Vollblut erfolgte mit den Mitogenen Phytohaemagglutinin und Lipopolysaccharid und den Antigenen Glutamatdecarboxylase und Peptid p277 sowie dem sogenannten Control Peptid. Die Stimulation der isolierten Zellen erfolgte mit den kombinierten Mitogenen Phorbol-Myristate-Acetat/Ionomycin und den Antigenen Hitzeschockprotein 60, Peptid p277, Glutamatdecarboxylase und Peptid IA-2. Im Nachfolgenden soll eine Übersicht über die Struktur und Wirkung der verwendeten Antigene und Mitogene gegeben werden.

Phytohaemagglutinin

Phytohaemagglutinin ist ein Extrakt aus der Pflanze "Phaseolus vulgaris" und stellt eine Mischung aus verschiedenen Proteinen dar [107;108]. Phytohaemagglutinin ist ein Lektin und zeigt strukturell den Aufbau eines aus zwei verschiedenen Untereinheiten, im Einzelnen Polypeptid PHA-E und Polypeptid PHA-L, zusammengesetzten Tetramers [109]. Die Untereinheit PHA-E zeigt vorwiegend eine Agglutination von Erythrozyten, während die Untereinheit PHA-L vorwiegend eine Stimulation von Lymphozyten bewirkt [110]. Mit der Bezeichnung "Lektin" wird eine Gruppe von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen oder Glykoproteinen zusammengefasst, die eine Fähigkeit zur Agglutination von Zellen und zur Präzipitation von Kohlenhydrat-Konjugaten aufweisen [111].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Phytohaemagglutinin, nachfolgend als PHA bezeichnet, als Mitogen wegen seiner stimulatorischen Wirkung auf Immunzellen eingesetzt.

Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharide stellen einen wichtigen Vertreter von Endotoxinen gram-negativer Bakterien dar [33]. Der Aufbau der Lipopolysaccharide zeigt drei unterschiedliche Bestandteile, wobei zwischen den einzelnen Bakterienspezies Unterschiede bestehen [112]. Neben dem als

Lipid A bezeichneten Bestandteil, der einen Lipidanteil mit Glukosamin-Molekülen darstellt, bestehen zwei weitere Bestandteile in Form eines Kerns aus Oligosacchariden und eine als O-Antigen bezeichnete Komponente, welche von repetitiven Saccharideinheiten gebildet wird. Lipopolysaccharide werden im Blut an ein sogenanntes LPS-Bindungsprotein gebunden und gelangen auf diese Weise zum membrangebundenen CD14-Oberflächenmolekül von Makrophagen [113]. Der Komplex aus Lipopolysaccharid und LPS-Bindungsprotein wird auf den Toll-like-Rezeptor 4 transferiert und es erfolgt eine Aktivierung mit nachfolgendem Ablauf von Signalkaskaden. Infolge der Aktivierung zeigen die Zellen eine Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IFN- γ [33].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Lipopolysaccharid, nachfolgend als LPS bezeichnet, als Mitogen wegen seiner stimulatorischen Wirkung auf Immunzellen eingesetzt.

Glutamatdecarboxylase

Das Enzym Glutamatdecarboxylase wandelt Glutamat in γ -Aminobutyrat um und spielt damit eine wesentliche Rolle in der Synthese des inhibitorisch wirkenden Neurotransmitters GABA aus Glutamat [33]. Es sind zwei Isoformen der Glutamatdecarboxylase bekannt, GAD65 und GAD67 [114]. Die mit GAD65 bezeichnete Form zeigt ein Molekulargewicht von 65kDa und einen Aufbau mit 585 Aminosäuren, während die als GAD67 bezeichnete Form durch ein Molekulargewicht von 67kDa und einen Aufbau mit 594 Aminosäuren charakterisiert ist. Das GAD 1 Gen befindet sich auf Chromosom 2 und codiert für die GAD67 Form, welche im Zentralnervensystem exprimiert wird [115]. Das GAD 2 Gen befindet sich auf Chromosom 10 und codiert für die GAD65 Form, welche sowohl im Zentralnervensystem als auch in β -Zellen des Pankreas vorzufinden ist. Die β -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas weisen hohe Konzentrationen an GABA und Glutamatdecarboxylase auf [116]. Vor diesem Hintergrund ist die Funktion von GABA bislang ungeklärt, wobei die Vorstellung in Richtung einer regulierenden Wirkung von GABA auf die Insulinbiosynthese und Insulinsekretion in der Literatur Zuspruch findet [117]. Die bei Diabetes Typ 1 häufig nachweisbaren Auto-Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase sind gegen die in den β -Zellen des Pankreas exprimierte GAD65 Form der Glutamatdecarboxylase gerichtet [117;118].

In der vorliegenden Arbeit werden im Labor hergestellte Bestandteile der Glutamatdecarboxylase, nachfolgend als GAD bezeichnet, als Antigen vor dem Hintergrund eingesetzt, dass die mit Diabetes Typ 1 assoziierten Auto-Antikörper unter anderem gegen die GAD65 Form der Glutamatdecarboxylase gerichtet sind [117;119]. Sowohl bei der Stimulation der Zellen im Vollblut als auch bei der Stimulation der isolierten Zellen kamen jeweils drei Peptidfrag-

mente des GAD65 Moleküls zur Anwendung, im Folgenden Peptidfragment 4,7 mit insgesamt 23 Aminosäuren von den Positionen 270 bis 292, Peptidfragment 4,11 mit insgesamt 22 Aminosäuren von den Positionen 554 bis 575 und Peptidfragment 3,1 mit insgesamt 18 Aminosäuren von den Positionen 335 bis 352.

Peptid p277

Das Peptid p277 ist ein Peptidfragment des Hitzeschockprotein 60 und ist aus 24 Aminosäuren aufgebaut, welche beim Gesamtmolekül die Positionen 437 bis 460 einnehmen [120;121]. Das Peptid p277 wird an MHC-Klasse-II-Moleküle der Antigen-präsentierenden Zellen gebunden und in der Form als Antigen vom T-Zell-Rezeptor erkannt [121]. Hinsichtlich der Wirkung von Peptid p277 im menschlichen Organismus geht die Vorstellung einer immunmodulierenden Fähigkeit bei Typ 1 Diabetes in die Richtung, dass sowohl eine Herunterregulation der Effektormechanismen der TH-1 Zellen als auch eine Verschiebung der Zytokinsekretion zu den Zytokinen der TH-2 Zellen induziert werden [122]. Während im Mausmodell durch die Gabe von Peptid p277 eine Progression der β -Zell-Zerstörung im Untersuchungszeitraum unterbunden werden konnte, zeigte sich bei Probanden mit Typ 1 Diabetes infolge der Gabe von Peptid p277 kurzfristig eine Erhaltung der Insulinsekretion [120;123;124]. Im Serum von an Typ 1 Diabetes erkrankten Probanden wurde eine hohe Konzentration von Antikörpern gefunden, die gegen ein Epitop im Bereich der Aminosäuren 435 bis 454 des Hitzeschockprotein 60 gerichtet sind, welches mit einer großen Ausdehnung eine Überlappung mit dem Peptid p277 Bereich zeigt [125].

In der vorliegenden Arbeit wird im Labor hergestelltes Peptid p277, nachfolgend als p277 bezeichnet, als Antigen auf der Grundlage eingesetzt, dass in Untersuchungen ein immunmodulatorischer Effekt von Peptid p277 auf T-Zellen bei Typ 1 Diabetes aufgezeigt werden konnte [124].

Control Peptid

Das Control Peptid weist im Vergleich zum Peptid p277 eine identische Anzahl an Aminosäuren auf, besitzt allerdings keine spezifische stimulative Wirkung auf Immunzellen.

In der vorliegenden Arbeit wird das Control Peptid, nachfolgend als ConPep abgekürzt, vor dem Hintergrund eingesetzt, zwischen einer spezifischen und nicht spezifischen stimulativen Wirkung des Peptids p277 unterscheiden zu können.

Phorbol-Myristate-Acetat/Ionomycin

Die Substanzen Ionomycin und Phorbol-Myristate-Acetat (PMA) werden als Kombination zur T-Zell-Rezeptor-unabhängigen Stimulation von T-Zellen in Form einer gesteigerten Aktivierung und Proliferation eingesetzt [126]. Die Wirkung basiert dabei auf einer Aktivierung von intrazellulären Effektormolekülen und einer Steigerung des Calcium-Einstroms in die Zellen. In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Kombination beider Substanzen auf T-Helferzellen einen stimulatorischen Effekt in Form einer vermehrten Zellproliferation und gesteigerten Zytokinsekretion ausübt [127]. Ferner konnte bei einer Untersuchung von T-Zellen im Mausmodell beobachtet werden, dass die Anwendung einer Kombination aus "Phorbol-Myristate-Acetat" und "Ionomycin" zu einer gesteigerten Zytokinsekretion führt und einen mitogenen Effekt induziert [128].

In der vorliegenden Arbeit wird eine Kombination von "Phorbol-Myristate-Acetat" und "Ionomycin", nachfolgend als PI bezeichnet, als Mitogen aufgrund seiner stimulatorischen Wirkung auf Immunzellen eingesetzt [129;130].

Hitzeschockprotein 60

Das Hitzeschockprotein 60 ist ein Bestandteil des intrazellulären Chaperone-Systems und weist ein Molekulargewicht von 60kDa auf [120;131]. Die als "Chaperone" bezeichneten Moleküle spielen eine wichtige Rolle hinsichtlich der korrekten Ausbildung der räumlichen Struktur von Proteinen [132]. Neben einer Unterstützung des als "Faltung" umschriebenen Prozesses zur Ausbildung der räumlichen Struktur von Proteinen verhindern sie eine inkorrekte Faltung und eine nachfolgend zu Funktionsstörungen führende Aggregation von Proteinen. Das Hitzeschockprotein 60 zeichnet sich dabei vorwiegend durch eine Unterstützung der Faltung von Proteinen aus. Es ist vorwiegend intrazellulär in Mitochondrien lokalisiert, wird aber auch unter normalen Zuständen nach extrazellulär abgegeben [133]. Infolge einer Einwirkung von Stressfaktoren in Form von Temperaturerhöhungen, UV-Licht oder einer Infektion kann die intrazelluläre Synthese an Hitzeschockproteinen gesteigert werden [134]. Extrazellulär vorliegendes Hitzeschockprotein 60 fungiert als ein Verbindungsglied zwischen Immunzellen und körpereigenen Geweben [131]. In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das Hitzeschockprotein 60 als Antigen von Zellen des Immunsystems erkannt wird und eine vermehrte Zytokinsekretion induziert [135]. Dabei stellt das Hitzeschockprotein 60 sowohl für den T-Zell-Rezeptor als auch den B-Zell-Rezeptor ein Antigen dar und kann in Abhängigkeit der vorliegenden Konzentration, seiner Herkunft und der umgebenden Zellen

sowohl eine pro-inflammatorische Wirkung als auch eine anti-inflammatorische Wirkung aufzeigen [131].

In der vorliegenden Arbeit wird das Hitzeschockprotein 60, nachfolgend als HSP60 bezeichnet, als Antigen mit Rücksicht darauf eingesetzt, dass in Untersuchungen ein stimulatorischer Effekt auf Zellen des Immunsystems aufgezeigt werden konnte [136].

Peptid pIA-2

Das Peptid pIA-2 besteht aus zwei Peptidfragmenten, die hinsichtlich des strukturellen Aufbaus zwei Regionen des Tyrosin Phosphatase-like IA-2 Proteins entsprechen. Das Tyrosin Phosphatase-like IA-2 Protein wird auch als Insulinoma-assoziiertes Protein und Inselzell-Antigen 512 bezeichnet [137-139]. Das Tyrosin Phosphatase-like IA-2 Protein zeigt einen Aufbau aus insgesamt 979 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ungefähr 105kDa, wobei sich ein extrazellulärer Anteil, ein transmembraner Anteil und ein intrazellulärer Anteil unterscheiden lassen [140]. Der intrazelluläre Anteil zeigt eine Ähnlichkeit zur katalytischen Region von sogenannten Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Für das Protein kodierende mRNA wird vermehrt nur in Geweben des Zentralnervensystems und in Pankreasinseln vorgefunden, weshalb angenommen wird, dass eine auf die beiden oben genannten Gewebe beschränkte Expression vorliegt. Die kodierende Region für das Tyrosin Phosphatase-like IA-2 Protein liegt auf dem Chromosom 2 [141]. In Anbetracht der transmembranen Struktur und des Expressionsmusters scheint das IA-2 Protein eine Rolle bei der Modulation von endokrinen Signalen in den Inselzellen zu spielen [142]. Im Hinblick auf die Funktion des Tyrosin Phosphatase-like IA-2 Proteins konnte in einer Untersuchung gezeigt werden, dass eine Überexpression des Proteins zu einer vermehrten Insulinsekretion und eine Ausschaltung des Proteins zu einer verminderten Anzahl Insulin-enthaltender Vesikel in den β -Zellen führt, weshalb dem Protein eine wichtige Rolle in der Regulation der Insulinsekretion und der Vesikelanzahl zugesprochen wird [143]. In einer Untersuchung an Probenmaterial von Typ 1 Diabetikern konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität der gegen Bestandteile des Proteins IA-2 gerichteten Auto-Antikörper auf eine Region begrenzt ist, welche von den Aminosäuren zwischen den Positionen 601 bis 979 gebildet wird [144]. Dieses Gebiet stellt die zytoplasmatische Komponente des Proteins dar, wobei als Epitope die Regionen zwischen den Aminosäuren 605 bis 620, 605 bis 682, 777 bis 937 und 687 bis 979 aufgezeigt wurden. In einer weiteren Untersuchung wurde bei Typ 1 Diabetikern die Reaktivität von T-Zellen auf das IA-2 Antigen untersucht [137]. Auf Grundlage der Verwendung zweier Peptidfragmente mit jeweils 20 Aminosäuren von den Positionen 831 bis 850 beziehungsweise 841 bis 860

konnte im Bereich der überschneidenden Anteile eine für die Reaktivität der T-Zellen verantwortliche Region des IA-2 Proteins identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit werden im Labor hergestellte Bestandteile des IA-2 Proteins, nachfolgend als pIA-2 bezeichnet, als Antigen vor dem Hintergrund eingesetzt, dass in Untersuchungen bei Typ 1 Diabetikern eine Reaktivität von T-Zellen auf Fragmente des IA-2-Proteins beobachtet werden konnte [137]. Bei der Stimulation der isolierten Zellen kamen insgesamt zwei Bestandteile des Peptids zur Anwendung, im Einzelnen ein Peptidfragment mit insgesamt 20 Aminosäuren von den Positionen 831 bis 850 und ein Peptidfragment mit insgesamt 20 Aminosäuren von den Positionen 841 bis 860.

1.3.4 Immunologie des Diabetes mellitus

In der vorliegenden Arbeit wird hinsichtlich der zugrunde liegenden Ätiologie und Pathogenese der Diabeteserkrankung ein Fokus auf die immunologischen Vorgänge im Rahmen der Erkrankungen gelegt. Es wird dazu die Antigen-stimulierte Zytokinsekretion von Zellen des Immunsystems bei verschiedenen Typen der Diabeteserkrankung untersucht, im Einzelnen der Typ 1 Diabetes in seiner klassischen Form und der LADA-Form sowie der Typ 2 Diabetes. Bei beiden Formen der Diabeteserkrankung, Typ 1 Diabetes und Typ 2 Diabetes, kann dem Immunsystem respektive immunologischen Reaktionen eine mitwirkende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zugeschrieben werden, wenn auch mit einer unterschiedlichen Gewichtung [77;145-149].

Typ 1 Diabetes

Die Entwicklung des Typ 1 Diabetes zeichnet sich bezüglich ätiologischer und pathogenetischer Gesichtspunkte durch eine immunologische oder idiopathische β -Zell-Zerstörung mit nachfolgendem absoluten Insulinmangel aus, bei der hinsichtlich der zugrunde liegenden Ursache eine Interaktion zwischen prädisponierenden genetischen Faktoren und Umweltfaktoren angenommen wird [14;15].

Für die Rolle des Immunsystems bei der Typ 1 Diabeteserkrankung wird angenommen, dass infolge des Einwirkens von Umweltfaktoren bei Vorliegen einer genetisch determinierten Prädisposition eine initiale Schädigung von β -Zellen auftritt und nachfolgend β -Zell-spezifische Antigene das Immunsystem aktivieren [150]. Die Aktivierung von T-Zellen mit einhergehender Zytokinsekretion führt über eine Aktivierung weiterer Immunzellen zu einer Entzün-

dungsreaktion mit Zerstörung der β -Zellen und Infiltration der Inseln. Eine abnorme Aktivität beziehungsweise Reaktivität von T-Zellen des Immunsystems führt dabei sowohl zu einem inflammatorischen Geschehen innerhalb der Inseln als auch zu einer Produktion von Antikörpern, welche als Auto-Antikörper gegen Epitope der Antigene der β -Zellen gerichtet sind [14]. Ein Hinweis auf eine direkte Beteiligung der Auto-Antikörper in der Pathogenese der Erkrankung konnte bisher allerdings nicht aufgezeigt werden und darüber hinaus konnte eine Entwicklung des Typ 1 Diabetes bei einem an Agammaglobulinämie erkrankten Patienten ohne eine Beteiligung von Auto-Antikörpern beobachtet werden [16;151].

Grundlegend bestehen zwei unterschiedliche Modellvorstellungen hinsichtlich der β -Zell-Zerstörung beim Typ 1 Diabetes im Hinblick auf eine Beteiligung des Immunsystems. Das eine Modell geht davon aus, dass unter Beteiligung von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen eine Zerstörung der β -Zellen in Form einer Nekrose oder einer Apoptose stattfindet, wobei der letztgenannte Mechanismus vorwiegend zum Tragen kommt [21]. Das andere Modell geht davon aus, dass eine β -Zell-Zerstörung in Form einer Nekrose oder Apoptose infolge einer durch CD4-positive T-Helferzellen mittels Zytokinsekretion induzierten Entzündungsreaktion in den Inselzellen verursacht wird [150]. Morphologisch setzen sich die bei der als Insulitis umschriebenen Entzündungsreaktion in den Pankreasinseln vorgefundenen Zellinfiltrate vorwiegend aus CD8- und CD4-positiven T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen zusammen, wobei die CD8-positiven T-Zellen eine prädominante Stellung einnehmen [152]. Die Inselzellen zeigen im Rahmen der entzündlichen Reaktion eine erhöhte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und von Fas [152;153]. Wichtig erscheint vor diesem Hintergrund die Beobachtung zu sein, dass bei der Untersuchung von Pankreasbiopsien von an Typ 1 Diabetes erkrankten Patienten in allen Fällen eine Reduktion der β -Zell-Masse aber nur in einem Teil der Fälle eine Insulitis aufzeigt werden konnte. Diese Beobachtung veranschaulicht, dass ein β -Zell-Untergang grundsätzlich auch ohne Insulitis auftreten kann.

In Bezug auf die Dynamik des Entzündungsprozesses wird die Vorstellung vertreten, dass nach einer initialen Schädigung der β -Zellen mit gleichzeitigem Auftreten der Auto-Antikörper eine Progression der destruktiven Vorgänge infolge der Wirkung einer aggressiveren Art von T-Zellen und Verschiebung der Immunantwort in Richtung einer pro-inflammatorischen Reaktion stattfindet [16]. Dabei spielen sowohl die der Spezifität der T-Zell-Reaktivität zugrunde liegenden Epitope als auch verschiedene Umgebungsfaktoren in Form von Zytokinen eine Rolle, indem letztere die funktionelle Ausrichtung der T-Zellen und damit die qualitative Ausprägung der Immunantwort mitbestimmen [17]. Verschiedene Untersuchungen am Mausmodell unterstützen die Vorstellung hinsichtlich einer Beeinflussung der Zerstörungsreaktion durch Antigene und Zytokine und bestätigen die Annahme, dass sowohl

CD8-positive T-Zellen als auch CD4-positive T-Zellen am destruktiven Prozess beteiligt sind beziehungsweise eine Rolle übernehmen [137;154-157].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Beteiligung des Immunsystems innerhalb der Pathogenese des Typ 1 Diabetes als gesichert gilt, wobei Unklarheiten in Bezug auf die Entstehung autoimmun-reaktiver Zellen und die zur β -Zell-Zerstörung führenden Mechanismen bestehen.

Typ 2 Diabetes

Die Entwicklung des Typ 2 Diabetes zeichnet sich vor dem Hintergrund ätiologischer und pathogenetischer Gesichtspunkte durch eine defizitäre Insulinsekretion und herabgesetzte Insulinwirkung mit nachfolgendem relativen Insulinmangel aus, wobei eine Übersättigung des Organismus mit Nährstoffen und eine inadäquate Reaktion sowohl der β -Zellen als auch der Adipozyten als ursächlich gelten [26;30;158]. Die Reaktion der jeweiligen Zellen wird ferner durch prädisponierende genetische Faktoren und Umweltfaktoren beeinflusst.

In Bezug auf die Rolle des Immunsystems bei der Typ 2 Diabeteserkrankung wird angenommen, dass ein andauerndes Überangebot an Nährstoffen bei vorliegender Prädisposition zu einer Entzündungsreaktion im Fettgewebe mit nachfolgender Veränderung der metabolischen Regulationsvorgänge führt [30]. Dabei kommt es in Abhängigkeit von den individuellen Eigenschaften der Adipozyten ab einer bestimmten Übersättigung mit Nährstoffen zu Entzündungsvorgängen und der Ausschüttung von bestimmten Zytokinen wie MCP-1 und TNF- α . Eine gesteigerte Sekretion von MCP-1 durch die Adipozyten führt nachfolgend zu einer Infiltration von Makrophagen ins Fettgewebe mit anschließender Entzündungsreaktion. Eine Sekretion von Zytokinen wie TNF- α durch Makrophagen und Adipozyten führt dabei zu einer Funktionsstörung des Fettgewebes mit gesteigerter Lipolyse und verminderter Triglyceridsynthese, infolgedessen die Konzentration an freien Fettsäuren im Blut ansteigt und nachfolgend eine Steigerung der Insulinresistenz am Skelettmuskel induziert wird. Untersuchungen sowohl am Mausmodell als auch am Menschen unterstützen die Vorstellung hinsichtlich einer Konzentrationssteigerung an inflammatorischen Zytokinen im Fettgewebe und einer damit einhergehenden Funktionsstörung des Fettgewebes [159-164].

Eine Fragestellung hinsichtlich der Beteiligung des Immunsystems besteht darin, ob eine im Rahmen der Typ 2 Diabeteserkrankung beobachtete sogenannte subklinische Inflammation eine Konsequenz der Erkrankung darstellt oder aber einen Beitrag zur Erkrankung leistet [147;165]. Vor diesem Hintergrund werden grundsätzlich zwei unterschiedliche Modellvor-

stellungen vertreten [147]. Beide Modellvorstellungen gehen von einer vorliegenden genetischen Prädisposition und Interaktion von Umweltfaktoren aus und zeigen eine Fokussierung auf zwei Hauptangriffspunkte, im Einzelnen das Vorhandensein einer Insulinresistenz und einer Funktionsstörung der β -Zellen. Das metabolische Modell geht von einer direkten Beeinflussung dieser zwei Angriffspunkte durch metabolische Faktoren aus. Im Gegensatz dazu basiert das immunologische Modell auf der Annahme, dass die Beeinflussung der Angriffspunkte über eine Veränderung von inflammatorischen Mediatoren vermittelt wird. Eine Adipositas führt demnach nur zu einer Entwicklung der Insulinresistenz und nachfolgend der Typ 2 Diabeteserkrankung, wenn eine Infiltration von Makrophagen ins Fettgewebe erfolgt. Die im Rahmen der Typ 2 Diabeteserkrankung beobachtete subklinische Inflammation gilt generell als nicht spezifische Folgewirkung von metabolischem Stress. Allerdings wäre es denkbar, dass eine bei Typ 2 Diabetes beobachtete chronische Inflammation durch Antigene verursacht wird und durch das Fehlen beziehungsweise nicht ausreichende Wirken von anti-inflammatorischen Regelkreisen eine Chronifizierung auftritt. Als Antigene kämen in diesem Zusammenhang von gestressten Zellen exprimierte und von zerstörten Zellen freigesetzte Strukturen in Frage. Es zeigten sich bei Patienten mit Typ 2 Diabetes inflammatorische Vorgänge in den Inseln, charakterisiert durch das Vorhandensein von Immunzellen und pro-inflammatorischen Zytokinen, und eine damit einhergehende β -Zell-Zerstörung [166].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Beteiligung des Immunsystems innerhalb der Pathogenese des Typ 2 Diabetes als gesichert gilt, wobei die Frage nicht eindeutig geklärt ist, inwiefern eine vorliegende Inflammation als auslösende Ursache oder als Folge der Entwicklung der Erkrankung anzusehen ist.

1.4 Untersuchungsansatz

Da bei allen untersuchten Erkrankungsformen der Diabeteserkrankung ätiopathogenetisch bestimmten Antigenen eine mitwirkende Rolle zugeschrieben wird und Zytokine eine Schlüsselrolle in der Regulation des Immunsystems einnehmen, soll in der vorliegenden Arbeit die Antigen-stimulierte Zytokinsekretion von Immunzellen *in vitro* untersucht werden [17;43;147;167-170]. Dafür werden sowohl eine Vollblutstimulation beziehungsweise eine Stimulation von Immunzellen im Vollblut als auch eine Leukozytenstimulation beziehungsweise eine Stimulation von isolierten Immunzellen im Nährmedium untersucht.

Als Untersuchungsmaterial werden in dieser Arbeit peripher im Blut zirkulierende Immunzellen verwendet, welche im Gegensatz zu den Immunzellen innerhalb der Pankreasinseln über eine venöse Blutabnahme leicht und routinemäßig zugänglich sind [171]. Zur Verfügung

standen zum einen Vollblutproben für die Untersuchung der Vollblutstimulation und zum anderen Zellüberstände von *enzyme linked immuno spot* (ELISPOT)-Ansätzen für die Untersuchung der Leukozytenstimulation.

Bei den Vollblutproben erfolgte die Stimulation mit verschiedenen Antigenen und Mitogenen im Vollblut und die Zytokinkonzentration wird im Zentrifugat bestimmt. Bei den Zellüberständen erfolgte die Stimulation der isolierten Immunzellen, unter anderem T-Zellen, B-Zellen und Monozyten, mit verschiedenen Antigenen und Mitogenen im Rahmen des ELISPOT-Verfahrens und die Zytokinkonzentration wird im Zellüberstand bestimmt [172].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Mit der hier vorliegenden Arbeit "Antigen-stimulierte Zytokinsekretion bei Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA" sollte die Zytokinsekretion in Antigen-stimuliertem Vollblut und im ELISPOT-Zellüberstand untersucht sowie Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA verglichen werden. Folgende Fragestellungen wurden formuliert:

Vollblutstimulation

- 1) Gibt es bei einer 24stündigen Stimulation von Zellen im Vollblut mit bestimmten Antigenen eine Antigen-reaktive Antwort in Form einer Zytokinausschüttung?
- 2) Gibt es bei einer 24stündigen Stimulation von Zellen im Vollblut mit bestimmten Antigenen ein Unterschied zwischen Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA bezüglich Antigen-reaktiver Antworten in Form einer Zytokinausschüttung und ist eine Abhängigkeit von verschiedenen Einflussfaktoren sichtbar?

Leukozytenstimulation

- 1) Gibt es bei Zellüberständen von ELISPOT-Ansätzen ein Unterschied zwischen den oben genannten Gruppen bezüglich Antigen-reaktiver Antworten in Form einer Zytokinausschüttung und ist eine Abhängigkeit von verschiedenen Einflussfaktoren sichtbar?
- 2) Kann eine Assoziation zwischen der Anzahl sezernierender Zellen im ELISPOT und den Zytokinkonzentrationen der Zellüberstände beobachtet werden?
- 3) Kann eine Assoziation zwischen den Zytokinkonzentrationen im Serum und den Zytokinkonzentrationen der Zellüberstände beobachtet werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Untersuchungsmaterial wurde im Rahmen der Teilnahme an der sogenannten "Action-LADA" Studie am Deutschen Diabetes-Zentrum (DDZ) zusammengestellt [7;8].

Bei der "Action-LADA" Studie handelt es sich um eine internationale multizentrische Studie zur immunologischen Charakterisierung des LADA im Vergleich zum Typ 1 Diabetes und Typ 2 Diabetes sowie gesunden Kontrollprobanden. Eine Untersuchung der zellulären und humoralen Immunantwort von LADA Diabetikern erfolgt dabei unter anderem hinsichtlich einer spezifischen Immunreaktion in Form einer Kurzzeitstimulation mit Diabetes-assoziierten Antigenen und in Bezug auf eine systemische Immunreaktion in Form der Bestimmung von Zytokinkonzentrationen im Serum. Zusätzlich werden Auto-Antikörper bestimmt. Als Ziele wurden eine bessere Unterscheidung des LADA vom Typ 2 Diabetes sowie die Ermittlung von zellspezifischen Ursachen für die langsamere Progression des LADA gegenüber der klassischen Form des Typ 1 Diabetes formuliert.

Die jeweiligen Probandenkollektive für die Vollblutstimulation und Leukozytenstimulation stellten zwei Teilkollektive der oben genannten Studie dar und entsprachen jeweils zum Teil den Probandenkollektiven zweier vorangehender Untersuchungen [173;174].

Die "Action-LADA" Studie beziehungsweise die hier vorliegenden Ausführungen wurden von der Ethikkommission der Heinrich Heine Universität Düsseldorf genehmigt (Nummer des Ethikvotums 2279).

Im Nachfolgenden soll eine Übersicht über die jeweilige Zusammenstellung des Probenmaterials beziehungsweise der Probandenkollektive gegeben und die im Vorfeld dieser Arbeit im Rahmen der oben genannten vorangehenden Studien durchgeführten Verarbeitungsschritte dargestellt werden.

Untersuchungsmaterial für die Vollblutstimulation

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte in einem Zeitraum von August bis Dezember 2006 in der Ambulanz des DDZ und in umliegenden allgemeinmedizinischen und internistischen

Praxen. Die der Auswahl zugrunde liegenden Einschluss- und Ausschlusskriterien sind nachfolgend in einer Tabelle aufgeführt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Auswahlkriterien für das Probandenkollektiv der Vollblutstimulation

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Patientenkollektiv (n=33)	
<ul style="list-style-type: none"> - Alter: 18-70 Jahre - Ethnie: Kaukasier - schriftliche Einwilligung zur Teilnahme - anamnestisch bekannte Diabetes-erkrankung - Diabeteserkrankungsdauer seit Diagnose $\leq 5,5$ Jahre 	<ul style="list-style-type: none"> - akute und chronische Infekte - Schwangerschaft - Leukozytose - systemische Immunsuppressiva-Einnahme - konsumierende Erkrankung
Kontrollkollektiv (n=16)	
<ul style="list-style-type: none"> - Alter: 18-70 Jahre - Ethnie: Kaukasier - schriftliche Einwilligung zur Teilnahme - <u>keine</u> anamnestisch bekannte Diabetes-erkrankung 	<ul style="list-style-type: none"> - akute und chronische Infekte - Schwangerschaft - Leukozytose - systemische Immunsuppressiva-Einnahme - konsumierende Erkrankung

Das Kollektiv für die Vollblutstimulation setzte sich aus 6 Typ 1 Diabetikern, 22 Typ 2 Diabetikern, 5 Typ LADA Diabetikern und 16 Kontrollpersonen zusammen.

Den Probanden wurden venöse Blutproben entnommen und anthropometrische Daten wie Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, BMI, Taillen- und Hüftumfang ermittelt.

Für die Durchführung der Vollblutstimulation wurden den nüchternen Probanden zwischen 07:00 und 10:00 Uhr morgens mittels Venenpunktion und unter Verwendung des *Vacutainer*-Systems Blutproben abgenommen. Nüchternheit war so definiert, dass der Proband seit 12h außer Wasser keine Nahrung zu sich genommen hatte. Bei außerhalb abgenommenen Proben wurde darauf geachtet, dass jene bei Raumtemperatur (RT) innerhalb 1h im DDZ eingetroffen waren und weiterverarbeitet wurden. Bei Nichteinhaltung dieser Voraussetzungen wurden die Proben verworfen.

Insgesamt wurden für die Untersuchung pro Proband 2 Serum-Röhrchen mit jeweils 8,5ml Blut und 1 Lithium-Heparin-Röhrchen mit 9ml Blut abgenommen und bei RT innerhalb 1h nach Abnahme weiterverarbeitet.

Die Serum-Röhrchen wurden zentrifugiert (10min bei 999xg) und anschließend weiter analysiert. Es erfolgte sowohl eine Untersuchung verschiedener klinisch-chemischer Parameter als auch eine Bestimmung der Auto-Antikörper.

Das Lithium-Heparin-Röhrchen wurde nach der Abnahme sechsmalig geschwenkt und der Inhalt anschließend in Mengen von je 1ml auf 7 *serum separation tube vacutainer* (SST-Vacu-

tainer) verteilt. Die SST-*Vacutainer* waren vorher mit den Stimulantien PHA, LPS, GAD, p277 oder ConPep und PBS-Puffer 0,2M (PBS) oder nur mit PBS bestückt und zur Identifikation mit den Zahlen 1 bis 7 durchnummeriert worden (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht über die Stimulantien der SST-*Vacutainer* bei der Vollblutstimulation

Nr.	Stimulation	Stimulusmenge	Stimuluskonzentration	Inkubation
1	PBS	0µg	0µg/ml	0h
2	PBS	0µg	0µg/ml	24h
3	PHA	1µg	1µg/ml	24h
4	LPS	0,1µg	0,1µg/ml	24h
5	GAD	10µg	10µg/ml	24h
6	p277	10µg	10µg/ml	24h
7	ConPep	10µg	10µg/ml	24h

GAD beinhaltet Peptide des GAD65-Moleküls
 - GAD 4,7 23 Aminosäuren Positionen 270 bis 292
 - GAD 4,11 22 Aminosäuren Positionen 554 bis 575
 - GAD 3,1 18 Aminosäuren Positionen 335 bis 352

Beschriftung PBS=Probe ohne Stimulation

Die SST-*Vacutainer* beinhalten neben Silica-Partikel als Gerinnungs-aktivierende Faktoren ein Polyestergerel, welches während des Zentrifugationsvorgangs den Serumüberstand von den korpuskulären Blutbestandteilen trennt. Der Serumüberstand sammelt sich bei der Zentrifugation oberhalb und die korpuskulären Bestandteile unterhalb des Polyestergerels.

Die 7 SST-*Vacutainer* wurden nach der Befüllung für 20min bei RT aufrecht gelagert. Der SST-*Vacutainer* mit der Nummer 1 (PBS0) wurde sofort zentrifugiert (20min bei 2000xg) und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Die SST-*Vacutainer* mit den Nummern 2-7 (PBS24,PHA,LPS,GAD,p277,ConPep) wurden vorerst für 24h bei 37°C inkubiert und nachfolgend zentrifugiert (20 min bei 2000xg) und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in diesen Vollblutproben mit dem *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren.

Untersuchungsmaterial für die Leukozytenstimulation

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte in einem Zeitraum von 2004 bis 2006 sowohl in der Ambulanz des DDZ als auch in umliegenden allgemeinmedizinischen und internistischen Praxen. Die der Auswahl zugrunde liegenden Einschluss- und Ausschlusskriterien sind nachfolgend in einer Tabelle aufgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Auswahlkriterien für das Probandenkollektiv der Leukozytenstimulation

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Patientenkollektiv (n=103)	
<ul style="list-style-type: none"> - Alter: 30-70 Jahre - schriftliche Einwilligung zur Teilnahme - anamnestisch bekannte Diabetes-erkrankung - Diabeteserkrankungsdauer seit Diagnose ≤10 Jahre 	<ul style="list-style-type: none"> - akute Erkrankung - Schwangerschaft - systemische Immunsuppressiva-Einnahme - konsumierende Erkrankung - Nierenerkrankung (Kreatinin>1,4mg/dl /Proteinurie)
Kontrollkollektiv (n=13)	
<ul style="list-style-type: none"> - Alter: 30-70 Jahre - schriftliche Einwilligung zur Teilnahme - <u>keine</u> anamnestisch bekannte Diabetes-erkrankung 	<ul style="list-style-type: none"> - akute Erkrankung - Schwangerschaft - systemische Immunsuppressiva-Einnahme - konsumierende Erkrankung - Nierenerkrankung (Kreatinin>1,4mg/dl /Proteinurie)

Das Kollektiv für die Leukozytenstimulation setzte sich aus 32 Typ 1 Diabetikern, 49 Typ 2 Diabetikern, 22 Typ LADA Diabetikern und 13 Kontrollpersonen zusammen.

Den Probanden wurden venöse Blutproben entnommen und anthropometrische Daten wie Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, BMI, Taillen- und Hüftumfang ermittelt.

Für die Durchführung der Leukozytenstimulation wurde den nüchternen Probanden morgens mittels Venenpunktion und unter Verwendung eines *Vacutainer*-Systems Blutproben abgenommen, wobei Nüchternheit als eine für 12h unterbliebene Nahrungsaufnahme mit einer Ausnahme von Wasser definiert wurde. Bei außerhalb abgenommenen Proben wurde darauf geachtet, dass jene bei RT innerhalb 1h im DDZ eingetroffen waren und weiterverarbeitet wurden. Bei Nichteinhaltung dieser Voraussetzungen wurden die Proben verworfen.

Es wurden insgesamt pro Proband 2 Serum-Röhrchen mit jeweils 8,5ml Blut und 8 Kalium-EDTA-Röhrchen mit jeweils 9ml Blut abgenommen und innerhalb 1h nach Abnahme bei RT gemäß Protokoll weiterverarbeitet [174].

Die Serumröhrchen wurden nach der Abnahme zentrifugiert (10min bei 999xg) und danach bei -20°C gelagert. Es erfolgte eine Bestimmung mehrerer klinisch-chemischer Parameter und der Auto-Antikörper. Die Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum erfolgte für IL-1RA, IL-6 und TNF- α mittels eines *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) und für IL-8, IL-18 und MCP-1 mittels eines *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens.

Die Kalium-EDTA-Röhrchen wurden unmittelbar nach der Abnahme sechsmalig geschwenkt und nachfolgend für einen Zeitraum von 24h bei RT gelagert. Danach schloss sich die Weiterverarbeitung in Form eines ELISPOT-Verfahrens an, bei dem eine Quantifizierung der Zytokinsekretion anhand der Anzahl an *spots* beziehungsweise Anzahl sezernierender Zellen er-

folgt [174;175]. In einem ersten Schritt wurden die Immunzellen isoliert und anschließend mit einer Anzahl von 3,5 Millionen Zellen pro Einheit in einer Stimulationsplatte mit den Stimulanzien PI, HSP60, p277, GAD oder pIA-2 und Nährmedium oder als sogenannte *background*-Probe (BG) nur mit Nährmedium inkubiert (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht über die Stimulantien beim ELISPOT-Verfahren der Zellüberstände

Beschriftung	Stimulus	Stimulusmenge beim ELISPOT
BG	-	-
PI	PMA/Ionomycin	100pg
HSP60	HSP60	5ng
p277	p277	100ng
GAD	GAD	10ng
pIA-2	pIA-2	100ng
GAD beinhaltet Peptide des GAD65-Moleküls		pIA-2 beinhaltet Peptide des IA-2-Moleküls
- GAD 4,7	23 Aminosäuren Positionen 270 bis 292	- 20 Aminosäuren Positionen 831 bis 850
- GAD 4,11	22 Aminosäuren Positionen 554 bis 575	- 20 Aminosäuren Positionen 841 bis 860
- GAD 3,1	18 Aminosäuren Positionen 335 bis 352	Beschriftung BG=Probe ohne Stimulation

Nach einer Inkubationszeit von 40h erfolgte die Trennung der Immunzellen von den Überständen mittels Zentrifugation. Während die Immunzellen im weiteren ELISPOT-Verfahren eine Anwendung fanden, wurden die Zellüberstände in vorher beschriftete Gefäße transferiert und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in diesen Zellüberstandproben mit dem *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren.

2.1.2 Geräte und Pipetten

Gefrierschrank	-20°C	Liebherr GS3183 Comfort, Liebherr, Bulle, CH
	-80°C	Forma 90S ULT Freezer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
		Heraeus HERAfreeze, Heraeus, Hanau, BRD
Kühlschrank	+4°C	Zanker K2F180, Elektrolux, Nürnberg, BRD
Eismaschine		Scotsman 80 AF, Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Wasseraufbereitungs-Anlage		MilliQ Anlage, Millipore, Molsheim, FR
Ultraschall-Bad		VWR Ultrasonic Cleaner, VWR International, Darmstadt, BRD

Waage	Analytic A200S, Sartorius, Göttingen, BRD
Wirbelmixer	Cenco #34524-200, Cenco Instrumenten B.V., Breda, NL
	VF2 Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, BRD
Absaug-Anlage	QIAVAG 96 vacuum manifold #19504 + Vacuum Regulator #19530, Qiagen, Hilden, BRD
	Millipore Vacuum Pump XF54 23050, Merck Millipore, Billerica, USA
Zentrifuge	Beckman Allegra 21R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA
	Eppendorf Zentrifuge 5810, Eppendorf, Hamburg, BRD
Magnetrührer	IKAMAG RET 205975, IKA Labortechnik, Staufen, BRD
Zeitnehmer	Standuhr, Junghans, Schramberg, BRD
Schüttler	Easia Shaker DSG 304M/4, Medgenix Diagnostics, Ratingen, BRD
	Heidolph Titramax 100, Heidolph, Chemnitz, BRD
Neubauer-Zählkammer	Neubauer Zählkammer Blaubrand #718605, Brand, Wertheim, BRD
pH-Meter	pH-Meter 761 Calimatic, Knick, Berlin, BRD
ELISA-Gerät	Multiskan Ascent 96/384 #5111-8300, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LUMINEX-Gerät	Bio-Plex 100 suspension array system, BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Messpipetten	Messpipetten Glas DURAN, Duran Group, Wertheim, BRD
	- 1 ml #2434511
	- 5 ml #2434523
	- 10 ml #2434529
	- 25 ml #2434534
Dosierpipetten	Eppendorf Multipette plus, Eppendorf, Hamburg, BRD
	- Multipette plus #4981.000.019

Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg, BRD

1-Kanal

- 10 - 100µl #3111.000.149

- 10 - 1000µl #3111.000.165

- 20 - 200µl #3111.000.157

8-Kanal

- 10 - 100µl #3114.000.131

- 30 - 300µl #3114.000.158

Eppendorf Easypet, Eppendorf, Hamburg, BRD

- Easypet #4421.000.013

Gilson Pipetman, Gilson, Middleton, USA

- P2 0,2 - 2µl #F144801

- P10 1 - 10µl #F144802

- P20 2 - 20µl #F123600

- P5000 1000 - 5000µl #F123603

2.1.3 Gefäße

Aqua destillata Kanister

10000ml Kanister, Kautex, Bonn, BRD

Messzylinder

Messzylinder Glas, Schott, Mainz, BRD

(2000ml, 1000ml, 100ml, 50ml, 10ml)

Messbecher

Messbecher Glas, Schott, Mainz, BRD

(1000ml, 100ml, 50ml)

Glas-Flaschen

Glas-Flaschen, Schott, Mainz, BRD

(1000ml, 500ml, 100ml)

Reservoir

Reservoir V-Form 50ml, Corning Incorporated

Costar, Corning, USA

Reservoir V-Form 60ml, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, USA

Röhrchen-Gefäße

Cellstar 50ml tube, Greiner Bio-One, Kremsmünster,

A

Amber-Röhrchen

Amber Tubes 1,5 ml #710.006, Biozym, Hessisch

Oldendorf, BRD

Rotilabo-Cryoboxen

Rotilabo Cryoboxen, Peter Oehmen GmbH, Essen,

BRD

Mikroreaktionsgefäße	SafeSeal Gefäße 1,5ml #2000.3490, Sarstedt, Nümbrecht, BRD Multiply Gefäße 0,2ml #2000.3493, Sarstedt, Nümbrecht, BRD SafeLock 1,5 ml #0030.120.086, Eppendorf, Hamburg, BRD
<i>Work-Rack</i>	Work-Rack #739.602, Biozym, Hessisch Oldendorf, BRD

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Handschuhe	Gentle Skin, Meditrade, Kiefersfelden, BRD
Desinfektionsmittel	Bacillol AF 1000ml, Bode Chemie, Hamburg, BRD
LUMINEX-Messplatte	Millipore MABVN1250, Merck Millipore, Billerica, USA
Pipetten-Spitzen	Tip One Tips, USA Scientific, Ocala, USA - 0,1 - 10µl #S1111-3000 - 2 - 20µl #S1111-4000 - 1 - 200µl #S1111-1000 - 1 - 300µl #S1111-8000 - 101 - 1000µl #S1111-2020 Eppendorf Pipettenspitze, Eppendorf, Hamburg, BRD - 100 - 5000µl #0030.000.978 Eppendorf Combitips Biopur, Eppendorf, Hamburg, BRD - 0,1ml #0030.069.404 - 0,5ml #0030.069.420 - 1ml #0030.069.439 - 2,5ml #0030.069.447 - 5ml #0030.069.455 - 10ml #0030.069.463
<i>VIVASPIN</i> -Behälter	Vivaspin 500 10kDa 2,2ml #VS101, Sartorius, Göttingen, BRD
Sterilfilter	Sterilfilter Nalgene 0,2µm, Beyer, Düsseldorf, BRD

ELISA-Messplatte	Falcon Mikrotest 96 #353072, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Alufolie	Alufolie toppits, Cofresco, Minden, BRD

2.1.5 Reagenzien

Natriumchlorid	NaCl, Merck, Darmstadt, BRD
Kaliumchlorid	KCl, Merck, Darmstadt, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, Merck, Darmstadt, BRD
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ , Merck, Darmstadt, BRD
Natronlauge	NaOH, Merck, Darmstadt, BRD
Salzsäure	HCl, Merck, Darmstadt, BRD
<i>Diluent</i> RD-5-5	RD-5-5 Diluent #895485, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:254463)
<i>Diluent</i> RD-6-39	RD-6-39 Diluent #895824, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:257820)
<i>Diluent</i> HPE	HPE Dilution Buffer #M1940 (5x konzentriert), Sanquin, Amsterdam, NL (LOT:8000097439/8000074161/8000093775)
Tween 20	Tween 20 #817072, Merck, Darmstadt, BRD
<i>Wash</i> Puffer	RD WA126 wash buffer #895126 (25x konzentriert) , RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT 252419)
BSA	Roth Albumin Fraktion V #8076.2, Roth, Karlsruhe, BRD (Charge:29679755)
BCA-Kit	Pierce BCA-Protein-Kit #23227, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (LOT:JG125020)
EDC-Reagent	EDC-Reagent #161462, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
NHS-Reagent	NHS-Reagent #56485, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Streptavidin-R-PE	SA-PE Streptavidin-R-PE #922721, Qiagen, Hilden, BRD (LOT:130175610)
Natriumazid	NaN ₃ #K503, Roth, Karlsruhe, BRD

2.1.6 Lösungen

PBS-Puffer 0,2M	Phosphat <i>Buffered Saline</i> 0,2M 1000ml
	- NaCl 8g
	- KCl 0,2g
	- Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,4g
	- KH ₂ PO ₄ 0,2g
	- <i>aqua destillata</i> ad 1000ml
	Lösung wird mit NaOH/NaCl auf pH=6,8 titriert
HPE-Diluent-Lösung	HPE-Diluent Gebrauchslösung (1x konzentriert)
	- HPE-Diluent (5x[c]) 60ml
	- <i>aqua destillata</i> 240ml
Wash Puffer-Lösung	Wash Puffer Gebrauchslösung (1x konzentriert)
	- wash Puffer (25x[c]) 80ml
	- <i>aqua destillata</i> 1920ml
Activation-Puffer	0,1M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 250ml pH=6,1
	- Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 4,45g
	- <i>aqua destillata</i> ad 250ml
	Lösung wird mit HCl auf pH=6,1 titriert
Storage-Puffer	PBS 0,2M mit 100% BSA/0,1% Natriumazid
	- BSA 200mg
	- NaN ₃ 0,2mg
	- PBS 0,2M ad 200ml
Wash Puffer mit Tween	PBS 0,2M mit 0,25% Tween 20
	- Tween 20 250µl
	- PBS 0,2M ad 100ml
NHS-Reagent-Lösung	NHS-Reagent-Lösung zur Anwendung bei der <i>bead-</i> Kopplung [c=50mg/ml]
	- NHS 10mg
	- <i>activation</i> -Puffer 200µl
EDC-Reagent-Lösung	EDC-Reagent-Lösung zur Anwendung bei der <i>bead-</i> Kopplung [c=50mg/ml]
	- EDC 10mg
	- <i>activation</i> -Puffer 200µl

2.1.7 Rekombinante Proteine

IL-1 α	IL-1alpha #200-LA, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:AC1607091)
IL-1 β	IL-1beta #130-093-897, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD (LOT:5080908054)
IL-1RA	IL-1RA #130-093-900, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD (LOT:5080908056)
IL-1RI	IL-1RI #269-1R, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:NF0508021)
IL-2	IL-2 #130-093-901, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD (LOT:5080908057)
IL-4	IL-4 #204-IL, RnD Systems, Minneapolis, USA (von AG Herder übernommen)
IL-5	IL-5 #130-093-926, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD (LOT:5080908058)
IL-6	IL-6 #130-093-928, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD (LOT:5080908126)
IL-8	IL-8 #130-093-942, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD (LOT:5080908061)
IL-10	IL-10 #130-093-947, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD (LOT:5080908062)
IL-17	IL-17 #317-IL, RnD Systems, Minneapolis, USA (von AG Herder übernommen)
TNF- α	TNFalpha #130-094-022, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD (LOT:5080908064)
IFN- γ	IFNgamma #130-093-880, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD (LOT:5080908053)
MCP-1	MCP-1 #279-MC, RnD Systems, Minneapolis, USA (von AG Herder übernommen)
MIP-1 α	MIP-1alpha #270-LD, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:CG1207121)
IP10	IP10 #266-IP, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:KJ0708071)
RANTES	RANTES #278-RN, RnD Systems, Minneapolis, USA

(LOT:DO1407101)

- Lösung in PBS mit 0,5% BSA (IL-1 β und IL-2: mit 1% BSA); eingestellte [c]=5000pg/ μ l;
Lagerung bei -80°C

2.1.8 Capture-Antikörper

IL-1 α	IL-1alpha #MAB200 Clone 4414, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:GX14)
IL-1 β	IL-1beta #MAB601 Clone 2805, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:GY30)
IL-1RA	IL-1RA #MAB280 Clone 10309, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:GZ12)
IL-1RI	IL-1RI #MAB269 Clone 35730, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:ZC09)
IL-2	IL-2 #MAB602 Clone 5355, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:HA21)
IL-4	IL-4 #MAB604 Clone 3010, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:HC15)
IL-5	IL-5 #MAB405 CloneTRFK5, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:AHM04)
IL-6	IL-6 Pelikine Kit #M191602, Sanquin, Amsterdam, NL (LOT:8000086089)
IL-8	IL-8 #MAB208 Clone 6217, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:ASJ22)
IL-10	IL-10 Pelikine Kit #M191000, Sanquin, Amsterdam, NL (LOT:8000086537)
IL-17	IL-17 MAB317 Clone 41809, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:ABL02)
TNF- α	TNFalpha #MAB610 Clone 28401, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:AVR11)
IFN- γ	IFNgamma #551221 Clone NIB42, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA (von AG Herder übernommen)
MCP-1	MCP-1 #MAB679 Clone 23007, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:JU12)

MIP-1 α	MIP-1alpha #MAB670 Clone 14215, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:HJ06)
IP10	IP10 #MAB266 Clone 33036, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:ADN02)
RANTES	RANTES #MAB678 Clone 21418, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:JA09)

- Lösung in PBS; eingestellte [c]=1 μ g/ μ l; Kopplung an *bead*-Körper; Lagerung bei 4°C

2.1.9 *Bead*-Körper

IL-1 α	IL-1alpha COOH Bead #171-506-050, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-1 β	IL-1beta COOH Bead #171-506-046, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-1RA	IL-1RA COOH Bead #171-506-011, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-1RI	IL-1RI COOH Bead #171-506-063, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-2	IL-2 COOH Bead #171-506-013, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-4	IL-4 COOH Bead #171-506-056, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-5	IL-5 COOH Bead #171-506-024, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-6	IL-6 COOH Bead #171-506-031, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-8	IL-8 COOH Bead #171-506-042, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-10	IL-10 COOH Bead #171-506-037, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IL-17	IL-17 COOH Bead #171-506-058, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
TNF- α	TNFalpha COOH Bead #171-506-040, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)

IFN- γ	IFNgamma COOH Bead #171-506-021, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
MCP-1	MCP-1 COOH Bead #171-506-033, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
MIP-1 α	MIP-1alpha COOH Bead #171-506-026, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
IP10	IP10 COOH Bead #171-506-061, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)
RANTES	RANTES COOH Bead #171-506-028, BIO RAD Laboratories, Hercules, USA (LOT:9704472)

- Lösung in *storage* Puffer; eingestellte [c]= $2,5 \times 10^6$ beads/ml; Lagerung bei 4°C

2.1.10 Detection-Antikörper

IL-1 α	IL-1alpha #BAF200, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:ZH04)
IL-1 β	IL-1beta #BAF201, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:UB15)
IL-1RA	IL-1RA #BAF280, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:XK06)
IL-1RI	IL-1RI #BAF269, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:AUA03)
IL-2	IL-2 #BAF202, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:TH16)
IL-4	IL-4 #BAF204, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:SU07)
IL-5	IL-5 #BAM6051, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:DKS03)
IL-6	IL-6 #BAF206, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:SV17)
IL-8	IL-8 #BAF208, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:UM11)
IL-10	IL-10 Pelikine Kit #191004, Sanquin, Amsterdam, NL (LOT:8000086538/8000067758/8000107391)

IL-17	IL-17 BAF317, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:ACB05)
TNF- α	TNFalpha #BAF210, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:ST19)
IFN- γ	IFNgamma #554550, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA (LOT:05736)
MCP-1	MCP-1 #BAF279, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:AKY06)
MIP-1 α	MIP-1alpha #BAF270, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:UU08)
IP10	IP10 #BAF266, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:AAP06)
RANTES	RANTES #BAF278, RnD Systems, Minneapolis, USA (LOT:VC06)

- Lösung in PBS mit 0,5% BSA; eingestellte [c]=50 μ g/ml; Lagerung bei -20°C

2.2 Methoden

2.2.1 Beschreibung des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens

In beiden Versuchsansätzen, Vollblutstimulation und Leukozytenstimulation, erfolgte die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen mit dem *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren.

Bei der Vollblutstimulation erfolgte die Stimulation der Immunzellen im Vollblut und die Zytokinkonzentrationen wurden im Zentrifugat gemessen. Bei der Leukozytenstimulation erfolgte die Stimulation der isolierten Immunzellen im ELISPOT-Verfahren und die Zytokinkonzentrationen wurden im Zellüberstand gemessen.

***Multiplex-bead-array-assay*-Verfahren**

Das *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren stellt eine Form von multiplen Immunadsorptionsverfahren dar, welche dadurch charakterisiert werden, dass Substrate mittels immunologischen Reaktionen durch Antikörper gebunden werden und es möglich ist, in einem Messvorgang gleichzeitig multiple Analysen vorzunehmen. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren wird auf der Plattform des Luminex 100 MBAA Systems mit XMAP-Technologie

durchgeführt, welches von der Firma Luminex, Austin, USA, entwickelt und von der Firma BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA in Lizenz als Bio-Plex Suspension Array System vertrieben wird.

Die Grundlage für die Funktion des Verfahrens wird hauptsächlich von zwei Komponenten gebildet, wodurch das Verfahren als Kombination zweier etablierter Messmethoden angesehen werden kann, dem ELISA-Verfahren und der Durchflußzytometrie.

Zum einen wird die zu analysierende Substanz mittels *capture*-Antikörpern an *bead*-Körper genannte Kügelchen gebunden, welches im Hinblick auf die Bindung des Analyten der Funktionsweise des ELISA-Verfahrens entspricht.

Die *bead*-Körper sind rundliche Polyesterol-Körper von 5,6µm Durchmesser, welche unter Verwendung von COOH-Gruppen als Anbindungsstellen mit verschiedenen Molekülen wie Antikörper bestückt werden können und frei im Medium beweglich sind. Zur Unterscheidung der einzelnen *bead*-Körper wird die sogenannte XMAP-Technologie eingesetzt, bei der die *bead*-Körper mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen aus dem roten und infraroten Spektralbereich markiert werden. Durch Variation der Anteile beider Farbstoffe an der Zusammensetzung ist es möglich, bis zu 100 Gruppen von *bead*-Körpern zu unterscheiden, wobei eine Lichtexposition außerhalb des Messvorgangs zur Erhaltung der korrekten Funktionsweise vermieden werden sollte [176;177]. Da jeweils eine Gruppe von *bead*-Körpern mit einer bestimmten Sorte von *capture*-Antikörpern bestückt werden kann, ist es möglich, bis zu 100 Substanzen gleichzeitig in einem Messvorgang zu untersuchen. Nachfolgend bindet ein *detection*-Antikörper an die nachzuweisende Substanz, an den wiederum ein dritter Antikörper mittels kovalenter Bindung zwischen Biotin und Avidin ansetzt. Dieser dritte Antikörper trägt einen Fluoreszenzfarbstoff namens R-Phycoerythrin, welcher später bei der Messung zur Fluoreszenz angeregt wird. Die kombinierte Registrierung von *bead*-Körper-Gruppe und Fluoreszenzintensität ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung einer gebundenen Substanz. Jede *bead*-Körper-Gruppe stellt somit einen eigenen immunologischen Untersuchungsansatz für die Bestimmung eines Zytokins dar [178].

Zum anderen wird das zu untersuchende Medium aspiriert und der Funktionsweise der Durchflußzytometrie entsprechend in einer Durchflussskammer auf Basis von Oberflächenmarkierungen analysiert.

Flussbedingt ordnen sich die *bead*-Körper linienförmig hintereinander an und werden mittels zweier Lasersysteme untersucht (siehe Abb.1). Ein Laser mit einer Wellenlänge von 635nm dient der Identifikation der einzelnen *bead*-Körper-Gruppen. Dazu werden die zwei Farbstoffe der *bead*-Körper zur Fluoreszenz angeregt und mittels zweier Detektoren wird anhand des Fluoreszenzverhaltens die jeweilige *bead*-Körper-Gruppe bestimmt. Der zweite Laser mit

einer Wellenlänge von 532nm dient in Kombination mit einem Detektor der Quantifizierung der Menge an gebundenem dritten Antikörper [179]. Der Fluoreszenzfarbstoff des dritten Antikörpers wird zur Fluoreszenz angeregt und die Intensität wird registriert. Die Stärke des gemessenen Signals korreliert direkt mit der Menge an gebundenem dritten Antikörper, welche wiederum direkt mit der Menge an gebundenem *detection*-Antikörper und somit nachzuweisender Substanz korreliert. Voraussetzung für die Gültigkeit der Annahmen ist allerdings, dass durch mehrmalige Waschvorgänge nicht gebundenes Material vollständig entfernt wird. Da die Menge an gebundener Substanz von deren Konzentration im untersuchten Medium direkt abhängt, kann die Substanzkonzentration im Medium unter Verwendung von standardisierten Proben mit definierter Konzentration berechnet werden.

Die Zusammenstellung der einzelnen Komponenten wurde hinsichtlich der korrekten Funktionsweise im Vorfeld untersucht beziehungsweise angepasst und während der Durchführung nicht verändert, da von einem erheblichen Einfluss jener auf die Messergebnisse berichtet wird [177].

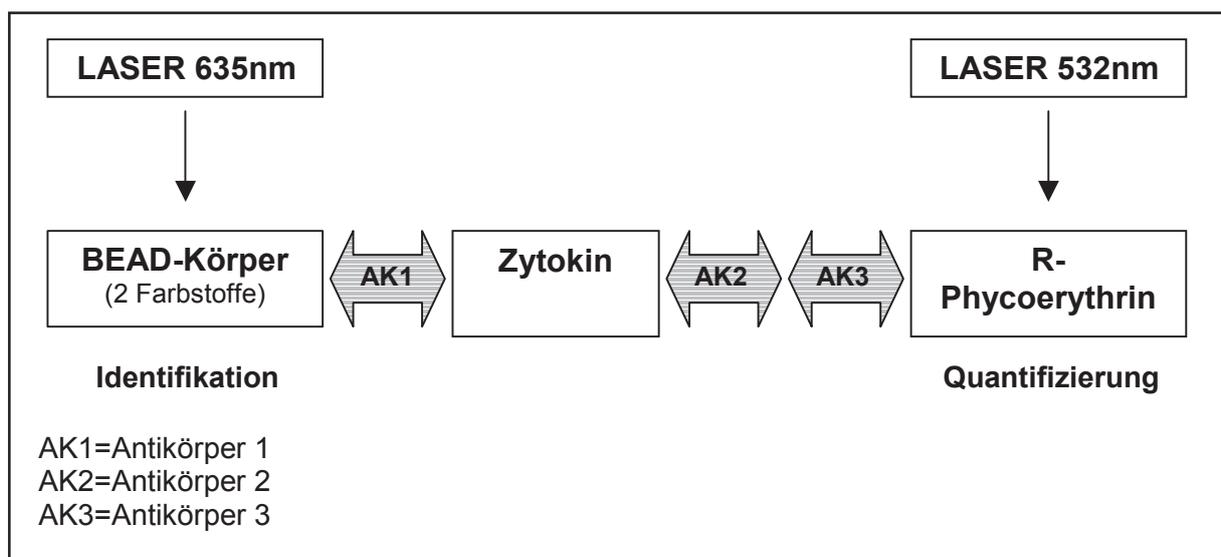


Abb.1: Funktionsprinzip des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens

Im Vergleich zwischen dem verwendeten *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren und dem ELISA-Verfahren bestehen mehrere Unterschiede bezüglich der Funktionsweise [178].

Beim *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren ist die Ligand-bindende Substanz in Form des *capture*-Antikörpers nicht fest an der Grundplatte gebunden, sondern an *bead*-Körper gekoppelt frei im Medium beweglich. Des Weiteren erfolgt die Quantifizierung der nachzuweisenden Substanz statt mit einer enzymatisch bedingten Farbreaktion mittels einer auf Fluoreszenz basierten Farbreaktion. Und in einem Versuchsansatz können bis zu 100 verschiedene Substanzen gleichzeitig untersucht werden.

Im Vergleich zum ELISA-Verfahren bestehen mehrere nachfolgend angeführte Vorteile:

- sowohl die aufgrund der Verwendung von *bead*-Körpern bedingte Reaktionsflächenvergrößerung als auch die Beweglichkeit des *capture*-Antikörpers führen zu einem breiteren messbaren Konzentrationsbereich des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens, infolgedessen die Möglichkeit eines Nachweises geringerer Substratmengen besteht [179];
- in einem Messvorgang können bis zu 100 verschiedene Substrate gleichzeitig pro Versuchsansatz in Form einer Messplatte bestimmt werden. Somit ist es möglich, ganze Zytokinmuster beziehungsweise Konstellationen von Zytokinen darzustellen;
- durch die Berechnung der Signalstärke anhand des Mittelwertes von multiplen Einheiten einer *bead*-Gruppe ergibt sich eine höhere Genauigkeit des Verfahrens [177];
- es ergibt sich ein geringerer Zeitaufwand, der beim *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren mit einer Durchführungsdauer von einem Tag im Vergleich zum ELISA-Verfahren mit einer Durchführungsdauer von drei Tagen einen höheren Probendurchsatz pro Zeiteinheit ermöglicht.

Nachteilig wirkt sich der Umstand der gemeinsamen Messung mehrerer Substanzen in einem Versuchsansatz in der Hinsicht aus, dass zum einen die Komplexität von Kreuzreaktionen gesteigert wird und zum anderen es nur erschwert möglich beziehungsweise teils unmöglich ist, für alle nachzuweisenden Substanzen gleichzeitig die optimalen Bedingungen zu finden [176]. Der letztgenannte Gesichtspunkt hatte auch in dieser Arbeit zur Konsequenz, dass die Konzentrationsbestimmung einiger Zytokine sowohl bei der Vollblutstimulation als auch bei der Leukozytenstimulation nicht möglich war und somit die entsprechenden Zytokine nicht ausgewertet werden konnten.

Unter dem Gesichtspunkt der Vergleichbarkeit beider Verfahren in Bezug auf die Messergebnisse bei der Bestimmung von Zytokinkonzentrationen wird insgesamt von einer guten Übereinstimmung in Form hoher Korrelationskoeffizienten berichtet [180].

2.2.2 Protokoll zum Kopplungsverfahren der *bead*-Körper mit *capture*-Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Durchführung der Messungen mit dem *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren *bead*-Körper verwendet, die in einem separaten Verfahren über einen Zeitraum von 3 Tagen mit entsprechenden *capture*-Antikörpern bestückt wurden. Anstelle der Verwendung eines fertigen Sets zur Bestimmung der Zytokinkonzentration, welches

bereits mit *capture*-Antikörpern beladene *bead*-Körper beinhaltet, wurden hier die *bead*-Körper und *capture*-Antikörper separat erworben. Die einzelnen Zwischenschritte des nachfolgend beschriebenen Kopplungsvorgangs wurden für jedes Zytokin separat durchgeführt und somit jeweils eigene Behältnisse verwendet.

Der erste Tag beinhaltete den Lösungsvorgang des *capture*-Antikörpers und nach Durchführung mehrerer Konzentrierungs- und Waschvorgängen die Bestimmung der Lösungskonzentration unter Verwendung eines optischen Messverfahrens.

Die einzelnen *capture*-Antikörper wurden in Form eines Trockenpulvers mit Gewichtsangabe angeliefert und nachfolgend mit PBS als Diluent mit einer Zielkonzentration von 500µg/500µl gelöst. Die *capture*-Antikörper für die Zytokine IL-6, IL-10 und Interferon-γ waren von den Bearbeitungsschritten des ersten Tages ausgenommen, da jene entweder als Fertiglösung mit bekannter Konzentration angeliefert oder im letzteren Fall bereits fertig gelöst von einer anderen Arbeitsgruppe übernommen wurden.

Nach der Lösung der *capture*-Antikörper folgte ein Schritt zur Konzentrierung mittels *Viva-spin*-Konzentrator. Nach dem Anfeuchten des Konzentrators mit 500µl PBS und nachfolgender Zentrifugation (10min bei 10000xg), nach der das Filtrat verworfen wurde, schloss sich die Befüllung mit 500µl *capture*-Antikörper-Lösung an. Es wurde wiederum zentrifugiert (10min bei 10000xg) und das Filtrat verworfen. Danach wurde das Konzentrat gewaschen, indem mit 3x Wiederholung jeweils 500µl PBS eingefüllt, zentrifugiert (10min bei 10000xg) und das Filtrat verworfen wurde. Anschließend wurde der konzentrierte und gewaschene *capture*-Antikörper in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppi-Gefäß) transferiert, der Konzentrator mit 50µl PBS nachgewaschen und das Gesamtvolumen im Eppi-Gefäß mit PBS auf 200µl eingestellt.

Mittels eines Fertikits zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Pierce BCA-Kit) und einem Photometer zur optischen Farbintensitätsmessung in Lösungen (Multiskan Ascent 96/384) wurden die Konzentrationen der hergestellten *capture*-Antikörper/PBS-Lösungen bestimmt. Dazu wurden die zu untersuchenden Lösungen in einem Verhältnis von 1:5 mit PBS verdünnt und mit einer Albumin-Stammlösung wurde eine Standardkurve in Duplikaten hergestellt, die in acht Verdünnungsschritten insgesamt einen Konzentrationsbereich von 1200 µg/ml bis 50 µg/ml umfasste. Sowohl die Standardlösungen als auch die zu untersuchenden Lösungen wurden jeweils mit 10µl pro Messplattenkompartiment, auch *well* genannt, aufgetragen. Die jeweilige Verdünnung wurde bei der späteren Berechnung berücksichtigt. Nach Hinzugabe von 200 µl Mischlösung, die aus einer 50:1 Mischung der Komponenten A und B des Fertikits zur Bestimmung der Proteinkonzentration bestand, erfolgte eine Inkubation für

30min bei 37 °C. Anschließend erfolgte unter Verwendung des Photometers die Messung der Farbintensitäten bei einer Wellenlänge von 550nm und nachfolgend die Berechnung der Konzentrationen.

Anhand der gewonnenen Information ließ sich mittels Hinzugabe von PBS eine *capture*-Antikörper/PBS-Lösung mit einer Konzentration von 50µg/50µl herstellen. In der nachfolgenden Tabelle sind die gemessenen Konzentrationen, die berechnete Lösungsmenge mit 50µg *capture*-Antikörper und die hinzugegebene Menge an PBS zur Herstellung einer Gebrauchslösung mit 50µg/50µl *capture*-Antikörper dargestellt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Konzentrationsbestimmung der *capture*-Antikörper-Lösung

Zytokin	Konzentration (µg/ml)	50µg = x µl	+ x µl PBS 0,2M
IL-1α	2548,65	19,62	30,38
IL-1β	4695,78	10,65	39,35
IL-1RA	3327,83	15,02	34,98
IL-1RI	2403,35	20,80	29,20
IL-2	2353,97	21,24	28,76
IL-4	4767,01	10,50	39,50
IL-5	3696,76	13,53	36,47
IL-6	-	30,00	20,00
IL-8	2067,18	24,18	25,82
IL-10	-	30,00	20,00
IL-17	2668,30	18,74	31,26
TNF-α	2416,65	20,68	29,32
IFN-γ	-	21,00	29,00
MCP-1	2571,44	19,44	30,56
MIP-1α	3124,13	16,00	34,00
IP10	2559,57	19,53	30,47
RANTES	2692,52	18,57	31,43

Konzentrationsbestimmung der *capture*-Antikörper-Lösung: angegeben ist für jedes Zytokin die gemessene Konzentration der *capture*-Antikörper-Lösung (Konzentration (µg/ml)), die berechnete Lösungsmenge mit 50µg *capture*-Antikörper (50µg= x µl) und die hinzugegebene Menge an PBS um eine fertige Gebrauchslösung mit 50µg *capture*-Antikörper/50µl Lösung herzustellen (+ x µl PBS 0,2M); IL-6, IL-10, IFN-γ mit bekannter [c]

Der zweite Tag umfasste die Vorbereitung der *bead*-Körper und den eigentlichen Kopplungsvorgang zwischen *capture*-Antikörper und *bead*-Körper.

Die *bead*-Körper wurden als Stocklösung mit einer Konzentration von $1,25 \times 10^7$ *beads*/ml in lichtundurchlässigen Behältnissen geliefert. Zuerst wurden die Behältnisse mit *bead*-Körper-Stocklösung für 2min in ein Ultraschallbad gelegt und anschließend für 30s auf dem Wirbelmixer gehalten. Hiernach wurden 250µl *bead*-Körper-Lösung in ein Eppi-Gefäß gegeben,

welches für 10min in Dunkelheit abgestellt wurde. Es folgte mit 3x Wiederholung ein Schritt zur Konzentrierung der Lösung, indem jeweils zentrifugiert (2min bei 12000xg) und 50µl Flüssigkeitsüberschuss entfernt wurde. Anschließend wurden 80µl *activation*-Puffer, 10µl NHS-Reagent-Lösung mit einer Konzentration von 50mg NHS-Reagent/ml *activation*-Puffer und 10µl EDC-Reagent-Lösung mit einer Konzentration von 50mg EDC-Reagent/ml *activation*-Puffer hinzugegeben, wobei nach jeder Hinzugabe das Eppi-Gefäß jeweils für 10s auf dem Wirbelmixer gehalten wurde. Die Eppi-Gefäße wurden in Dunkelheit für 20min auf dem Schüttler bei 750 U/min gelagert. Es folgte wiederum mit 3x Wiederholung ein Schritt zur Konzentrierung der Lösung, indem jeweils zentrifugiert (2min bei 12000xg) und 50µl Flüssigkeitsüberschuss entfernt wurde. Nach Hinzugabe von 200µl PBS wurden die Eppi-Gefäße für 2min in ein Ultraschallbad gelegt und für 30s auf dem Wirbelmixer gehalten. Danach schloss sich der eigentliche Kopplungsvorgang an, indem jeweils 50µl *capture*-Antikörper-Lösung zu der Lösung in den Eppi-Gefäßen hinzugefügt wurde und die Eppi-Gefäße in Dunkelheit für 24h bei 4°C auf dem Schüttler bei 750 U/min gelagert wurden.

Der dritte Tag setzte sich aus mehreren Waschvorgängen und der Adjustierung der Lösungen auf eine bestimmte *bead*-Körper-Anzahl pro Volumen zusammen.

Nach der 24h andauernden Lagerung erfolgte mit 3x Wiederholung ein Schritt zur Konzentrierung der Lösung, indem jeweils zentrifugiert (2min bei 12000xg) und 50µl Flüssigkeitsüberschuss entfernt wurde. Es schloss sich die Hinzugabe von jeweils 250µl Waschpuffer (PBS mit 0,25% Tween) und nach einem Zeitintervall von 30s auf dem Wirbelmixer eine Lagerung in Dunkelheit für 1h bei RT auf dem Schüttler bei 750 U/min an. Nach einer Zentrifugation (2min 12000xg) mit Verwerfen des Flüssigkeitsüberschusses wurde erneut 250µl Waschpuffer hinzugegeben, woraufhin erneut zentrifugiert (2min 12000xg) und der Flüssigkeitsüberschuss verworfen wurde. Nach Hinzugabe von 250µl *storage*-Puffer und einer Lagerung im Ultraschallbad für 2min erfolgte eine Inkubation für 30min bei RT in Dunkelheit. Es schloss sich eine Zentrifugation (2min bei 12000xg) mit Verwerfen des Flüssigkeitsüberschusses an, woraufhin erneut 250µl *storage*-Puffer hinzugegeben wurde. Nach Zentrifugieren (2min bei 12000xg) und Verwerfen des Flüssigkeitsüberschusses wurde 1000µl *storage*-Puffer als Lösung zur endgültigen Lagerung hinzugefügt. Darauffolgend wurde die *bead*-Körper-Anzahl pro Volumeneinheit der einzelnen Lösungen unter Verwendung einer Neubauer-Kammer und eines Mikroskops ermittelt und mittels Hinzugabe oder Entfernung von Flüssigkeit durch Zentrifugation auf circa $2,5 \times 10^6$ *bead*-Körper/ml adjustiert.

Der erfolgreiche Kopplungsvorgang und somit die korrekte Funktionsweise der mit *capture*-Antikörper gekoppelten *bead*-Körper wurde in Form einer Testmessung überprüft. Die La-

gerung der fertigen *bead*-Körper-Lösungen bis zur Verwendung erfolgte in nicht transparenten Gefäßen bei 4°C.

2.2.3 Protokoll zur Messung mit dem *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren

Das *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren wurde sowohl bei den Proben der Vollblutstimulation als auch bei den Proben der Leukozytenstimulation für die quantitative Bestimmung der Zytokinkonzentration verwendet.

Grundlegend waren für beide Arten von Proben die durchgeführten Arbeitsschritte und benutzten Materialkomponenten gleich, wobei für die Verdünnung der Proben, der Standardlösungen und der Kontrollen bei der Messung der Proben der Vollblutstimulation der Diluent RD-6-39 und bei der Messung der Proben der Leukozytenstimulation der Diluent RD-5-5 verwendet wurde. Für die Lösungen der *bead*-Körper, der *detection*-Antikörper und des Streptavidins wurde der Diluent HPE verwendet.

Die nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte erfolgten an einem einzelnen Tag. Grundsätzlich wurden immer die Konzentrationen von 17 Zytokinen bestimmt, im Einzelnen von IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, MIP-1 α , IP10 und RANTES. Sowohl die rekombinanten Proteine für die Standardlösungen als auch die *bead*-Körper und *detection*-Antikörper mussten für jeden Zytokintyp spezifisch verwendet werden, weshalb von jeder Komponente 17 verschiedene Sorten beziehungsweise bei den *bead*-Körpern Gruppen Benutzung fanden.

Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils auf einer speziellen 96-*well*-Platte, bei der aufgrund einer perforierten Bodenstruktur die Möglichkeit einer Flüssigkeitsabsaugung mittels Vakuum gegeben ist.

Ausgehend von einer maximalen Konzentration von 5000pg/ml wurden zur Erstellung der Standardkurven jeweils 11 Verdünnungsstufen mit einer 3:1 Verdünnung in Duplikaten aufgetragen, sowie zusätzlich ein Duplikat mit nur Diluent als Leerprobe. Außerdem wurden jeweils drei Kontrollen in Duplikaten aufgetragen, wobei jene 1:4 verdünnt wurden. Auf jeder Messplatte wurden jeweils 66 Proben in einfacher Auftragung mit einer 1:4 Verdünnung analysiert. Insgesamt umfasste die Versuchsdurchführung mehrere Inkubationsphasen, währenddessen die Messplatte mit Alufolie vor einem Lichteinfluss geschützt wurde.

Am Anfang wurden die Aliquots der Standardlösungen, die Kontrollen, Proben und Diluenten auf Eis sowie die *bead*-Körper bei einer Temperatur von 4°C in Dunkelheit gelagert.

Die Erstellung der Standardreihe mit 11 Auftragungspunkten in doppelter Auftragung mit 1:3 Verdünnung erfolgte auf Eis gelagert, indem in einem ersten Schritt jeweils 1 μ l Stammlösung

jedes der 17 Zytokine mit einer Konzentration von 5000pg/ μ l, insgesamt also 17 μ l, zu 983 μ l Diluent RD-5-5/-6-39 gegeben wurden, wobei der Inhalt der Aliquots mit den Stammlösungen vor Entnahme für 5s auf dem Wirbelmixer durchmischt wurde. Diese zuerst hergestellte Lösung mit einer Konzentration von 5000pg/ml diente als Ausgangspunkt für die Herstellung der weiteren Verdünnungspunkte, indem jeweils 70 μ l der zuletzt hergestellten Verdünnung zu 140 μ l Diluent RD-5-5/-6-39 in einem neuen Gefäß gegeben wurde. Vor jedem Schritt war eine Durchmischung der Lösung für 5s auf dem Wirbelmixer obligat. Nachfolgend entstand eine Standardreihe mit 11 Auftragungspunkten in 1:3 Verdünnung, die einen Konzentrationsbereich von 5000pg/ml bis 0,08pg/ml umfasste. Der letzte Auftragungspunkt stellte die Leerprobe da und beinhaltete nur Diluent RD-5-5/-6-39.

Die Herstellung der *bead*-Körper-Lösung basierte auf die Vorgaben, dass pro Zytokin in jedem *well* etwa 1000 *bead*-Körper vorhanden sind, was pro Zytokin eine Menge von 0,4 μ l *bead*-Körper-Lösung pro *well* entspricht, und dass pro *well* 50 μ l Volumen aufgetragen wird. Bei der Berechnung der benötigten Gesamtmenge wurde die *well*-Anzahl auf die Zahl 110 festgesetzt, da bedingt durch die verwendete Pipettiertechnik die aufzutragende Lösung nicht restlos verwendet werden konnte. Es wurden jeweils 44 μ l *bead*-Körper-Lösung jedes Zytokins zu insgesamt 4752 μ l Diluent HPE hinzugegeben, wobei vor Entnahme die Behälter mit den *bead*-Körpern für 5s auf dem Wirbelmixer gehalten wurden.

Die Kontrollen wurden für 5s auf dem Wirbelmixer gehalten und anschließend mit einem Volumen von 12,5 μ l mit 37,5 μ l Diluent RD-5-5/-6-39 vermischt, welches einer Verdünnung von 1:4 und einem Gesamtvolumen von 50 μ l pro *well* entsprach.

Vor Auftragung der einzelnen Lösungen auf die Messplatte wurde jene mit 100 μ l Diluent HPE pro *well* mit anschließender Absaugung angefeuchtet. Die Auftragung der einzelnen Lösungen war vorher in einem Belegungsschema festgelegt worden, welches nachfolgend in einer Abbildung dargestellt ist (Abb.2).

Es wurden jeweils 50 μ l pro *well* Standardlösung und Kontrolllösung in den ersten 30 *wells* aufgetragen. Für die Auftragung der Proben in den übrigen 66 *wells* wurde zuerst pro *well* 37,5 μ l Diluent RD-5-5/-6-39 vorgelegt. Die einzelnen Proben wurden für 5s auf dem Wirbelmixer gehalten und sofort danach mit einem Volumen von 12,5 μ l auf die Messplatte aufgetragen. Zusammen mit den bereits vorgelegten 37,5 μ l Diluent RD-5-5/-6-39 pro *well* ergab sich eine 1:4 Verdünnung mit einem Gesamtvolumen von 50 μ l pro *well*.

Daraufhin erfolgte die Hinzugabe der *bead*-Körper, indem die *bead*-Körper-Lösung für 30s auf dem Wirbelmixer gehalten und anschließend mit einem Volumen von 50 μ l Lösung pro *well* aufgetragen wurde. Die Messplatte wurde in Alufolie verpackt und für 120min bei RT auf dem Schüttler bei 750 U/min gelagert.

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S5	S9	C1	P3	P11	P19	P27	P35	P43	P51	P59
B	S1	S5	S9	C1	P4	P12	P20	P28	P36	P44	P52	P60
C	S2	S6	S10	C2	P5	P13	P21	P29	P37	P45	P53	P61
D	S2	S6	S10	C2	P6	P14	P22	P30	P38	P46	P54	P62
E	S3	S7	S11	C3	P7	P15	P23	P31	P39	P47	P55	P63
F	S3	S7	S11	C3	P8	P16	P24	P32	P40	P48	P56	P64
G	S4	S8	B	P1	P9	P17	P25	P33	P41	P49	P57	P65
H	S4	S8	B	P2	P10	P18	P26	P34	P42	P50	P58	P66

- S1-S11 und B: Standardreihe mit 1:3 Verdünnungsschritten und Leerprobe

- S1 [c]= 5000,00pg/ml	- S7 [c]= 6,80pg/ml
- S2 [c]= 1666,66pg/ml	- S8 [c]= 2,28pg/ml
- S3 [c]= 555,50pg/ml	- S9 [c]= 0,76pg/ml
- S4 [c]= 185,20pg/ml	- S10 [c]= 0,25pg/ml
- S5 [c]= 61,70pg/ml	- S11 [c]= 0,08pg/ml
- S6 [c]= 20,50pg/ml	- B [c]= 0pg/ml

- C1 - C3 : Kontrollen mit einer 1:4 Verdünnung
- P1 - P66: Proben mit einer 1:4 Verdünnung

Abb.2: Belegungsplan der Messplatte

Während der Lagerung der Messplatte wurde die *detection*-Antikörper-Lösung vorbereitet. Für die Berechnung wurde festgesetzt, dass pro *well* 50µl Lösung aufgetragen werden und die Verdünnung des *detection*-Antikörpers insgesamt 1:200 mit dem Diluenten HPE betragen soll. Es wurde jeweils 27,5µl *detection*-Antikörper-Lösung jedes der 17 Zytokine zu insgesamt 5032,5µl Diluent HPE gegeben und die Gesamtlösung für 5s auf dem Wirbelmixer gehalten. Die Flüssigkeiten in der Messplatte wurden nach der Lagerung abgesaugt und es schloss sich ein 2x Waschvorgang an, indem jeweils 150 µl Waschpuffer pro *well* appliziert und anschließend abgesaugt wurde. Daraufhin wurde 50µl *detection*-Antikörper-Lösung pro *well* aufgetragen. Anschließend wurde die Messplatte in Alufolie verpackt und für 60min bei RT auf dem Schüttler bei 750 U/min gelagert.

Während der Lagerung wurde die Streptavidin-Lösung vorbereitet, wobei hier für jedes Zytokin das gleiche Streptavidin verwendet wurde, da hier die Bindung unspezifisch für den Zytokintyp erfolgt. Der Berechnung zur Herstellung der Lösung lagen die Vorgaben zugrunde, dass pro *well* 50µl Lösung aufgetragen werden und insgesamt eine Verdünnung von 1:250 realisiert werden soll. Das Streptavidin-Behältnis wurde für 5s auf dem Wirbelmixer gehalten und insgesamt 22µl Streptavidin zu 5478µl Diluent HPE hinzugefügt. Nach der Lagerung wurde die Flüssigkeit in der Messplatte abgesaugt und die Messplatte gewaschen, indem 150µl Waschpuffer pro *well* aufgetragen und anschließend abgesaugt wurde, wobei der Waschvorgang insgesamt 2x ausgeführt wurde. Danach wurden 50µl Streptavidin-Lösung pro

well aufgetragen und die Messplatte in Alufolie eingepackt für 30min bei RT auf dem Schüttler bei 750 U/min gelagert.

Nach 30min auf dem Schüttler wurde wiederum die Flüssigkeit in der Messplatte abgesaugt und es schloss sich ein Waschvorgang in 2x Ausführung an, indem 150µl Waschlösung pro *well* aufgetragen und anschließend abgesaugt wurde. Um für den Messvorgang ein ausreichendes Messvolumen bereitzustellen, wurde pro *well* 100µl Diluent HPE aufgetragen und danach die Messplatte in Alufolie verpackt für 2min bei RT auf dem Schüttler bei 750 U/min gelagert.

Es schloss sich die Messung zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in den *wells* der Messplatte in Form des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens an.

2.2.4 Kalkulation der Messwerte

Bei der Anwendung des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in den einzelnen Proben erfolgte die Berechnung der Messergebnisse auf Grundlage zweier Komponenten.

Zum einen wurde anhand der bekannten Konzentration und der detektierten Signalintensität von Standardlösungen eine Beziehung zwischen Konzentration und Signalintensität aufgestellt, wobei bezüglich der eingestellten Konzentration der Standardlösungen eine gleichmäßige Verteilung über einen bestimmten Messbereich vorgenommen wurde.

Zum anderen wurde unter Verwendung dieser Informationen eine mathematische Funktion ermittelt, welche nachfolgend die Berechnung der unbekannt Konzentration der untersuchten Lösungen anhand der detektierten Signalintensität ermöglicht. Dabei wurde bei jeder Messung in Form einer Messplatte für jedes untersuchte Zytokin eine eigene mathematische Funktion beziehungsweise Kalibrationskurve ermittelt. Nachfolgend wurde bei der Grundauswertung der Messwerte in Form der Überprüfung verschiedener Kriterien die Voraussetzung dafür erfüllt, die Messdaten obgleich multipler Messvorgänge mit jeweils eigenen Kalibrationskurven als eine Kohorte zusammenzufassen beziehungsweise auszuwerten.

Für die Berechnung der Messwerte wurde vorausgesetzt, dass die detektierte Signalintensität in Form der durch die Einwirkung von Laserstrahlung einer bestimmten Wellenlänge hervorgerufenen Fluoreszenzintensität mit der Anzahl an gebundenen Streptavidineinheiten korreliert. Die Menge an gebundenem Streptavidin ist abhängig von der Anzahl an gebundenen *detection*-Antikörpern und die Anzahl an gebundenen *detection*-Antikörpern steht wiederum in einem Zusammenhang mit der Menge an gebundener nachzuweisender Substanz. Des Weiteren besteht eine Beziehung zwischen der Anzahl an gebundenen Einheiten der nachzu-

weisenden Substanz und der Gesamtzahl an gelösten Einheiten in der analysierten Probe. Mehrmalige Waschvorgänge in wiederholter Ausführung zur Entfernung nicht gebundenen Materials bildeten die Grundlage für diese Überlegungen.

Bei Gültigkeit dieser Annahmen war es möglich, jeder analysierten Probe anhand ihrer Signalintensität eine bestimmte Konzentration zuzuordnen. Von allen gemessenen Signalintensitäten der Messplatte wurde die Intensität der Leerproben jeweils subtrahiert, da jene keinen Analyten beinhalteten und ein vorhandenes Signal auf Interferenzen zurückgeführt wurde.

Anhand der 11 Wertepaare der Standardreihe mit bekannten Konzentrationen und den dazugehörigen detektierten Signalintensitäten wurden einzelne Punkte einer Kalibrationskurve erstellt, indem die Signalintensität gegen die Konzentration aufgetragen wurde. Unter Verwendung eines Regressionsverfahrens wurde ein Modell in Form einer mathematischen Funktion ermittelt, welches den Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalintensität unter Berücksichtigung der vorgegebenen 11 Wertepaare möglichst genau beschrieb.

Bei den vorliegenden Messungen mit dem *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren zeigten die Kalibrationskurven bei logarithmierten Werten für die Konzentration auf dem x-Achsenabschnitt eine sigmoidale Form, weshalb bezüglich der Auswahl einer mathematischen Funktion zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Signalintensität und Konzentration ein nicht lineares Modell ausgewählt wurde. Die empfohlene und hier angewandte Methode zur Anpassung des Modells an die vorgegebenen Daten stellen zum einen die sogenannte *4-parameter-logistic-function* und zum anderen die sogenannte *5-parameter-logistic-function* dar [181-183]. Die *5-parameter-logistic-function* zeichnet sich dadurch aus, dass bei ihr im Gegensatz zur *4-parameter-logistic-function* eine Asymmetrie der Datenanordnung berücksichtigt wird [181;184]. Beispielhaft ist für das Zytokin IL-1 β für eine Messplatte innerhalb der Messreihe für die Vollblutstimulation die Kalibrationskurve mit dazugehöriger *5-parameter-logistic-function* dargestellt (siehe Abb.3).

Verglichen mit der Anwendung eines linearen Regressionsverfahrens weist das hier angewandte nicht lineare Regressionsverfahren einen breiteren Konzentrationsbereich für die Kalkulation unbekannter Probenkonzentrationen auf. Bei Messverfahren mit multiplen untersuchten Analyten wird vom Gerätehersteller die Verwendung jener Methode empfohlen, da sie aufgrund des breiteren Konzentrationsbereichs eine Analyse mehrerer Substanzen in einem Messansatz mit einer einheitlichen Standardkurvenverdünnung ermöglicht [182].

Anhand der Kalibrationskurve wurden für die einzelnen Probenlösungen anhand ihrer Signalintensität jeweils Konzentrationen berechnet. Die mathematische Funktion deckte nur einen bestimmten Signalintensitätsbereich und somit Konzentrationsbereich ab, außerhalb dessen

eine Kalkulation der Funktion und somit eine Berechnung der Konzentration anhand der Signalintensität nicht möglich war. Dies führte dazu, dass bei den Messungsvorgängen sogenannte *out-of-range*-Werte angezeigt wurden, die entweder oberhalb oder unterhalb des messbaren beziehungsweise kalkulierbaren Bereichs lagen.

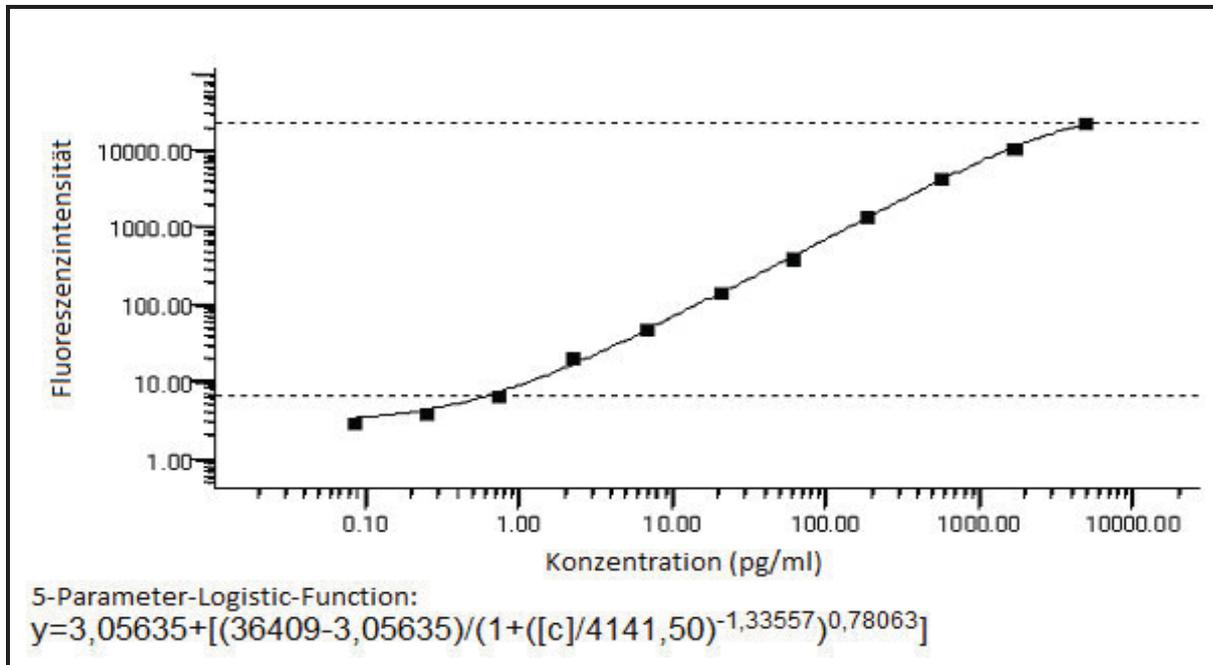


Abb.3: Kalibrationskurve und 5-Parameter-Logistic-Funktion für IL-1 β (Vollblutstimulation; Messplatte 4)

2.2.5 Fehlerkontrolle der Messergebnisse

Bei der Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in Proben unter Verwendung des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens können verschiedene Arten von Fehlern auftreten, welche aufgrund der Verwendung von multiplen Antikörperkombinationen im Vergleich zum ELISA-Verfahren vermehrt auftreten [183]. Als Folge können neben falsch-positiven und falsch-negativen auch inkonsistente Ergebnisse resultieren.

Grundsätzlich können methodisch unterschiedliche Ansätze zur Fehlerkontrolle unterschieden werden. Zum einen wird die Fehlervermeidung angestrebt und zum anderen erfolgt eine Quantifizierung vorhandener beziehungsweise nicht abstellbarer Fehler und nachfolgend eine Korrektur der Ergebnisse.

Falsch-positive Ergebnisse entstehen im vorliegenden Versuchsaufbau beziehungsweise in der hier angewandten Nachweismethode dadurch, dass neben der nachzuweisenden Substanz andere Substanzen oder Vorgänge ein detektierbares Signal hervorrufen beziehungsweise verstärken.

Zum einen stellt das Phänomen der Verdunstung ein Problem da, wodurch die Konzentration der Substanz fälschlicherweise erhöht wird. Um diese zu vermindern, wurde die Messplatte zwischen den einzelnen Durchführungsschritten mit einem Deckel verschlossen.

Zum anderen stellen in den Proben vorkommende heterophile Antikörper ein Problem dar, welche physiologisch in Humansen vorliegen können und durch die Verwendung multipler Antikörperkombinationen vermehrt zu fehlerhaften Ergebnissen führen können [185;186]. Aufgrund ihrer multivalenten unspezifischen Bindungseigenschaften können sie bei der vorliegenden Versuchsanordnung durch direkte Verbindung von *capture*-Antikörper und *detection*-Antikörper ohne Mitwirken des Analyten ein detektierbares Signal hervorrufen beziehungsweise die zu analysierende Substanz sozusagen simulieren [187]. Es wurden zahlreiche Maßnahmen angewendet, um diese unspezifischen Bindungsvorgänge zu vermeiden oder zumindest zu reduzieren.

In diesem Kontext wird dem jeweils verwendeten Diluenten eine wichtige Aufgabe zugeschrieben, indem er neben einer Minimierung von störenden Einflüssen und einer Optimierung des Detektionsvorgangs zusätzlich die physiologische Zusammensetzung der analysierten Probe in den Lösungen der Standardreihe imitieren soll [188]. Diese Eigenschaft stellt die Basis für eine optimale Signaldetektion und spätere Interpolation der unbekanntenen Werte dar. Durch eine bestimmte Zusammensetzung der Diluenten mit einer Mischung verschiedener Proteinstrukturen sollen die zu unspezifischen Bindungen führenden Komponenten der untersuchten Lösungen beziehungsweise ihre Effekte eliminiert werden [186]. Es wurden jeweils fertige Diluenten verwendet, die bezüglich dieses Aspektes vom Hersteller optimiert und getestet wurden.

Statt einer Verminderung von möglichen Störeffekten hatte die Anwendung von sogenannten Leerkontrollen die Quantifizierung jener zum Ziel, infolgedessen diese bei der Kalkulation berücksichtigt werden konnten. Allerdings gilt es hierbei zu beachten, dass eine Berücksichtigung der durch die Probenbestandteile hervorgerufenen Störeffekte nicht möglich ist, da die Leerkontrollen keine Probenbestandteile beinhalteten.

Falsch-negative Ergebnisse entstehen dadurch, dass trotz Vorhandensein der nachzuweisenden Substanz verschiedene Umstände zu einem Erlöschen oder einer Verminderung des detektierbaren Signals führen.

Neben der Möglichkeiten einer zu kurzen Inkubationszeit oder einer zu geringen Menge an benötigten Komponenten spielt eine gestörte Bindung auf Basis von Strukturveränderungen der Substanzen durch mechanische und thermische Einwirkung eine Rolle. Auf Basis der Überlegung, dass im Gegensatz zur Langzeitlagerung der Proben und Komponenten bei

Minustemperaturen wiederholte Auftauprozesse zu Strukturveränderungen führen, wurde darauf geachtet, dass die Proben insgesamt nur einmal aufgetaut wurden und die wiederholt benötigten Komponenten wie rekombinante Proteine in vorbereitete Verbrauchseinheiten aufgeteilt vorlagen. Des Weiteren wurde der Empfehlung gefolgt, die Proben nicht länger als 5s auf dem Wirbelmixer zu halten und jene während der Bearbeitung auf Eis zu lagern [189]. Zur Vermeidung beziehungsweise Verminderung der beschriebenen Vorgänge wurde der Versuchsaufbau in mehreren Vorversuchen sowohl bezüglich der Inkubationszeit als auch der Menge und Handhabung der Komponenten überprüft.

Inkonsistente Ergebnisse können unter anderem durch ungenaue Pipettiervorgänge und wechselnde Eigenschaften der verwendeten Komponenten hervorgerufen werden, wobei mögliche Pipettierfehler besonders im Bereich niedriger Konzentrationen zu einer stärkeren Variation führen.

Zur Vermeidung wurden in der vorliegenden Arbeit nur geeichte Pipetten verwendet und der korrekte Vorgang des Pipettierens wurde vor Beginn der Messungen angelehrt. Darüber hinaus wurde versucht, mit Komponenten jeweils einer Charge zu arbeiten, welches allerdings in der vorliegenden Arbeit bedingt durch bestimmte Packungseinheiten von Seiten der Hersteller nicht immer möglich war.

Die Anwendung der Kontrollen diente dem Zweck der Erkennung von Fehlern oder Abweichungen bei den zahlreichen Messvorgängen, indem immer die vorher in Verbrauchseinheiten aliquotierte gleiche Probe jeweils auf jeder Messplatte aufgetragen wurde, wodurch eine Variation zwischen den einzelnen Messplatten aufgezeigt beziehungsweise quantifiziert werden konnte.

2.2.6 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten umfasste sowohl die anthropometrischen und klinisch-chemischen Parameter der einzelnen Probanden, im Folgenden als Basisdaten zusammengefasst, als auch die Messwerte des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens, nachfolgend als Messdaten umschrieben. Zusätzlich standen Daten aus dem ELISPOT-Verfahren und der Serum-Zytokinbestimmung zur Verfügung, im Folgenden als Elispot-Daten beziehungsweise Serumdaten umschrieben. Die Auswertung der Daten erfolgte in mehreren Schritten, wobei die unter Verwendung des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens ermittelten Messdaten zunächst einer Grundausswertung unterzogen wurden.

Grundauswertung der Messdaten des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens

Die Grundauswertung der Messdaten aus dem *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren erfolgte in mehreren Schritten. Sie sollte auf Basis verschiedener Parameter eine bestimmte Güte des Messverfahrens gewährleisten und bildete nachfolgend die Grundlage für die Vorgehensweise, die Messdaten mehrerer Verfahrensanwendungen in Form der einzelnen Messplatten als eine gemeinsame Datenmenge auszuwerten.

Limit-of-detection

Das sogenannte *limit-of-detection* (LOD), auch *instrumental-detection-limit* genannt, stellt die untere Grenze des Konzentrationsbereichs dar, in dem limitiert durch die zugrunde liegende Methodik des Messverfahrens eine Konzentrationsbestimmung technisch umsetzbar ist [190]. Es repräsentiert die geringste Konzentration an nachzuweisender Substanz, die verlässlich anhand der Signalintensität von einer Leerprobe unterschieden werden kann.

Zur Bestimmung des *limit-of-detection* einer Messplatte wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten der doppelt aufgetragenen Leerproben mit dem dazugehörigen zweifachen Wert der Standardabweichung addiert und anschließend anhand der Standardreihe diejenige Konzentration ermittelt, die eine dementsprechende Fluoreszenzintensität aufwies. Dabei wurde jeweils für jede Messreihe, Vollblutstimulation oder Leukozytenstimulation, jedes Zytokin und jede Messplatte getrennt ein Wert berechnet und darauffolgend für jede Messreihe und jedes Zytokin getrennt der Median aller Messplatten gebildet. Messwerte unterhalb des *limit-of-detection*, maschinell auch als *below out-of-range*-Werte angegeben, wurden mit dem halben Wert des *limit-of-detection* ersetzt. Die maschinell auch als *above out-of-range*-Werte angegebenen Messwerte oberhalb des Konzentrationsbereichs, in dem limitiert durch die zugrunde liegende Methodik des Messverfahrens eine Konzentrationsbestimmung technisch umsetzbar ist, wurden durch den anderthalbfachen Betrag des größten Wertes aller Platten einer Stimulation ersetzt.

Limit-of-quantitation

Das sogenannte *limit-of-quantitation* (LOQ), auch *methodical-detection-limit* genannt, stellt die untere Grenze des Konzentrationsbereichs dar, indem für die Konzentrationsbestimmung die Einhaltung bestimmter Gütekriterien gewährleistet ist [190]. Die Festlegung geschieht auf Basis einer subjektiven Erwägung des Untersuchers, welche Maße der Gütekriterien tolerabel

sind beziehungsweise welche Grenzen bezüglich dieser eingehalten werden sollen. Das *limit-of-quantitation* kann dabei einen gleichgroßen oder größeren Wert als das *limit-of-detection* aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Festlegung des *limit-of-quantitation* der Koeffizient der Variabilität für verschiedene Parameter ermittelt. Der Koeffizient der Variabilität wurde in Prozent berechnet, in dem der Quotient aus der absoluten Standardabweichung und dem Mittelwert mit dem Faktor 100 multipliziert wurde. Die Berechnungen der nachfolgend genannten Parameter wurden für jedes Zytokin einzeln und für die beiden Messreihen separat durchgeführt. Zu beachten ist, dass für die Berechnung der oben genannten Parameter nur Messwerte verwendet wurden, die innerhalb des zur Auswertung ausgewählten Konzentrationsbereichs lagen und somit als repräsentativ für diesen galten.

Der Koeffizient der Variabilität der Kalibrationskurven (CV-Kal.K.) wurde ermittelt, indem für jeden Konzentrationspunkt der Standardreihe einzeln der Koeffizient der Variabilität zwischen den Kalibrationskurven der Messplatten berechnet wurde. Nachfolgend wurde für jedes Zytokin einzeln der maximale Wert ermittelt.

Die *intra-assay*-Variabilität (Intra-CV) wurde bestimmt, indem jeweils der Koeffizient der Variabilität der beiden berechneten Konzentrationen der doppelt aufgetragenen Standardreihenpunkte auf einer Messplatte ermittelt wurde, wobei von allen verwendeten Standardreihenpunkten ein Mittelwert für jede Messplatte gebildet wurde. Nachfolgend wurde für jedes Zytokin einzeln der Mittelwert und die Standardabweichung aller Messplatten gebildet.

Die *inter-assay* -Variabilität (Inter-CV) wurde bestimmt, indem der Koeffizient der Variabilität für die auf allen Messplatten gemessenen Konzentrationen einer Kontrolle berechnet wurde. Nachfolgend wurde für jedes Zytokin einzeln der Mittelwert mit der Standardabweichung aller einbezogenen Kontrollen berechnet. Abhängig von der Festlegung des *limit-of-quantitation* und damit der Größe des auswertbaren Konzentrationsbereichs variierten die oben genannten Parameter. Bei einigen Zytokinen war es aufgrund zu großer Abweichungen nicht möglich, einen Konzentrationsbereich mit entsprechenden Kriterien festzulegen, weshalb keine weitere Auswertung dieser Zytokine erfolgte. Alle Werte unterhalb des *limit-of-quantitation* wurden mit dem halben Wert des *limit-of-quantitation* ersetzt.

Zur Übersicht sind für jedes Zytokin in der nachfolgenden Tabelle das berechnete *limit-of-detection*, das festgesetzte *limit-of-quantitation* sowie die dazugehörigen Parameter wie die Abweichungen zwischen den Kalibrationskurven der Messplatten, die *intra-assay*-Variabilität und die *inter-assay*-Variabilität dargestellt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Auswertungsparameter der Messungen

Zytokin	LOD (pg/ml)	LOQ (pg/ml)	CV-Kal.K. (%)	Intra-CV (%)	Inter-CV (%)
Vollblutstimulation					
IL-1 α	7,50	61,73	15,8	7,3 \pm 5,4	#
IL-1 β	0,25	20,58	18,6	6,6 \pm 4,5	8,0 \pm 0
IL-1RA	24,90	61,73	17,4	11,6 \pm 4,4	#
IL-1RI	3,65	6,86	19,2	7,7 \pm 3,7	69,3 \pm 6,1
IL-2	39,30	-	-	-	-
IL-4	0,65	-	-	-	-
IL-5	28,30	-	-	-	-
IL-6	2,70	61,73	16,5	11,0 \pm 5,4	18,9 \pm 12,9
IL-8	0,34	61,73	14,9	8,2 \pm 5,9	36,6 \pm 0
IL-10	1,50	6,86	16,4	9,0 \pm 4,4	#
IL-17	0,10	20,58	16,7	7,5 \pm 4,4	#
TNF- α	0,10	2,29	23,1	11,3 \pm 4,0	21,2 \pm 21,1
IFN- γ	10,75	-	-	-	-
MCP-1	6,40	-	-	-	-
MIP-1 α	94,40	-	-	-	-
IP10	0,65	20,58	13,5	5,8 \pm 4,4	11,5 \pm 9,0
RANTES	9,80	20,58	20,0	7,8 \pm 4,3	8,1 \pm 0,4
Leukozytenstimulation					
IL-1 α	0,20	20,58	12,4	5,0 \pm 1,9	#
IL-1 β	7,60	20,58	25,9	9,0 \pm 3,8	#
IL-1RA	2,60	20,58	23,5	12,1 \pm 3,2	#
IL-1RI	1,45	2,29	22,2	9,2 \pm 3,9	32,0 \pm 0
IL-2	17,50	-	-	-	-
IL-4	11,80	20,58	10,8	7,8 \pm 3,1	#
IL-5	22,85	61,73	20,1	12,2 \pm 5,8	23,3 \pm 0
IL-6	0,80	61,73	18,0	10,7 \pm 4,0	19,2 \pm 0
IL-8	0,45	-	-	-	-
IL-10	2,15	20,58	13,9	7,8 \pm 3,6	#
IL-17	0,65	20,58	12,4	4,7 \pm 2,8	15,1 \pm 0
TNF- α	0,40	2,29	20,7	9,4 \pm 3,2	18,4 \pm 0
IFN- γ	10,85	-	-	-	-
MCP-1	0,60	61,73	7,3	7,5 \pm 4,6	16,3 \pm 2,8
MIP-1 α	13,85	-	-	-	-
IP10	1,50	20,58	11,1	7,8 \pm 3,0	10,0 \pm 3,8
RANTES	0,50	20,58	7,2	4,5 \pm 2,3	16,0 \pm 7,8
LOD= <i>limit-of-detection</i> ; LOQ= <i>limit-of-quantitation</i> ; CV-Kal.K.=Koeffizient der Variabilität der Kalibrationskurven (maximaler Wert); Intra-CV= <i>intra-assay</i> Koeffizient der Variabilität (Mittelwert \pm St.Abw. aller Messplatten); Inter-CV= <i>inter-assay</i> Koeffizient der Variabilität (Mittelwert \pm St.Abw. aller Kontrollen); - Wert nicht berechnet; # Wert nicht berechenbar					

Nachfolgend wurde der Anteil der Messwerte, die auf Basis des *limit-of-quantitation* nicht im auswertbaren Konzentrationsbereich lagen, an der Gesamtanzahl von Messwerten bestimmt. Dies betraf nur die Messwerte der Stimulationsproben, im Einzelnen bei der Vollblutstimulation PHA, LPS, GAD, p277 und ConPep und bei der Leukozytenstimulation PI, HSP60, p277, GAD und pIA-2.

Zur Übersicht ist für jedes Zytokin in der nachfolgenden Tabelle die Anzahl an Messwerten außerhalb des ausgewählten Konzentrationsbereichs dargestellt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Anzahl der Messwerte außerhalb des festgelegten Konzentrationsbereichs

Vollblutstimulation					
Zytokin	PHA	LPS	GAD	p277	ConPep
IL-1 α	-	-	-	-	-
IL-1 β	4,0	2,0	14,3	10,2	10,2
IL-1RA	-	-	-	-	-
IL-1RI	2,0	2,0	0,0	2,0	0,0
IL-2	-	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-
IL-5	-	-	-	-	-
IL-6	4,0	2,0	12,2	8,2	4,0
IL-8	2,0	4,0	0,0	2,0	0,0
IL-10	-	-	-	-	-
IL-17	-	-	-	-	-
TNF- α	4,0	2,0	18,4	14,3	18,4
IFN- γ	-	-	-	-	-
MCP-1	-	-	-	-	-
MIP-1 α	-	-	-	-	-
IP10	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
RANTES	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Leukozytenstimulation					
Zytokin	PI	HSP60	p277	GAD	pIA-2
IL-1 α	-	-	-	-	-
IL-1 β	-	-	-	-	-
IL-1RA	-	-	-	-	-
IL-1RI	2,6	31,9	37,9	37,0	32,8
IL-2	-	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-
IL-5	10,0	50,9	62,1	65,5	60,3
IL-6	6,0	76,7	78,4	70,0	85,3
IL-8	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-	-
IL-17	37,0	100	100	100	100
TNF- α	4,3	69,8	72,4	69,0	79,3
IFN- γ	-	-	-	-	-
MCP-1	1,7	23,3	22,4	23,3	17,2
MIP-1 α	-	-	-	-	-
IP10	1,7	1,7	0,0	0,0	3,4
RANTES	2,6	0,9	0,0	0,0	0,0
Anzahl der Messwerte außerhalb des festgelegten Konzentrationsbereichs (Prozent)					

Hinsichtlich der Größe des Anteils an außerhalb des auswertbaren Konzentrationsbereichs liegenden Messwerten wurde festgelegt, dass bei einem Anteil bis 30% die Messwerte quantitativ metrisch auf einer Kardinalskala und bei einem Anteil über 30% die Messwerte quali-

tativ kategorial auf einer Ordinalskala in Form von Klassen ausgewertet werden. Bei einem Anteil bis 50% wurde der Median als Klassengrenze verwendet, während bei einem Anteil über 50% ein Quotient mit dem Betrag 1 als Klassengrenze Anwendung fand. Messwerte unterhalb oder gleich der Klassengrenze wurden der unteren Klasse, Messwerte oberhalb der Klassengrenze der oberen Klasse zugewiesen, wobei die Einteilung in Klassen erst nach der unten beschriebenen Modifikation der Daten erfolgte. Zytokine mit einem zu großen Anteil an nicht im auswertbaren Bereich liegenden Messwerten wurden keiner weiteren Auswertung unterzogen.

Modifikation der Messdaten

Die Messdaten wurden einer Modifikation unterzogen, indem jeweils ein sogenannter Stimulationsindex in Form eines Quotienten gebildet wurde. Auf Grundlage des berechneten Stimulationsindex war es nachfolgend möglich, jeweils den Nettoeffekt der 24stündigen Stimulation oder 24stündigen Lagerung ohne Stimulation darzustellen.

Bei der Vollblutstimulation wurden jeweils für jeden Probanden die Messwerte der Stimulationsproben durch den Messwert der PBS24-Probe dividiert und der Messwert der PBS24-Probe durch den Messwert der PBS0-Probe dividiert.

Bei der Leukozytenstimulation wurden für jeden Probanden die Messwerte der Stimulationsproben durch den Messwert der BG-Probe dividiert.

Bei fehlendem Wert für die PBS24-Probe oder PBS0-Probe bei der Vollblutstimulation oder BG-Probe bei der Leukozytenstimulation erfolgte ein Ausschluss aller Messwerte jenes Probanden.

In der nachfolgenden Tabelle sind jeweils die ausgewerteten Zytokine mit der angewandten Methodik angegeben (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht über ausgewertete Zytokine und die angewandte Methodik

Vollblutstimulation	Leukozytenstimulation
Auswertung als metrische Variable	Auswertung als metrische Variable
IL-1 β	MCP-1
IL-6	IP10
IL-8	RANTES
TNF- α	Auswertung als kategoriale Variable
IP10	IL-1RI
RANTES	IL-5
	IL-6
	TNF- α

Infolge der Grundausswertung konnte festgelegt werden, dass bei der Vollblutstimulation die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IP10 und RANTES als metrische Variablen auf einem stetigen Kardinalskalenniveau ausgewertet werden. Hierbei betrug der Intra-CV-Wert im Mittel 8,5% und der Inter-CV-Wert im Mittel 17,4%, wobei der Koeffizient der Variabilität der Kalibrationskurven maximal 23,1% betrug.

Bei der Leukozytenstimulation wurden die Zytokine MCP-1, IP10 und RANTES als metrische Variablen auf einem stetigen Kardinalskalenniveau ausgewertet. Hierbei betrug der Intra-CV-Wert im Mittel 6,6% und der Inter-CV-Wert im Mittel 14,1%, wobei der CV-Kal.K. maximal 11,1% betrug. Zusätzlich erfolgte die Auswertung der Zytokine IL-1RI, IL-5, IL-6 und TNF- α auf einem diskreten Ordinalskalenniveau, indem bei IL-1RI der Median und bei den Zytokinen IL-5, IL-6 und TNF- α der Quotient-Wert mit einem Betrag von 1 als Klassengrenze verwendet wurden. Der Intra-CV-Wert betrug im Mittel 10,4% und der Inter-CV-Wert im Mittel 23,2%, wobei der Koeffizient der Variabilität der Kalibrationskurven maximal 22,2% betrug.

Statistische Auswertung

Nachdem die Grundausswertung der Messdaten mit dem Resultat, welche Zytokine unter der Gültigkeit bestimmter Kriterien weiterführend ausgewertet werden können, abgeschlossen war, erfolgte die weitere Auswertung aller vorhandenen Daten. Die vorhandenen Daten konnten jeweils anhand der Gruppenzugehörigkeit der Probanden, welche als Bestandteil der Basisdaten vorlagen, in vier Gruppen aufgeteilt werden.

Verteilungsuntersuchung

Zuerst wurden alle verfügbaren Daten hinsichtlich ihrer Verteilung untersucht, wobei neben teststatistischen Verfahren in Form des *Shapiro-Wilk*-Tests auf Normalverteilung zusätzlich graphische Hilfsmittel in Form von Histogrammen und *Q-Q*-Plots benutzt wurden.

Eine Datenmenge wurde nur dann als normalverteilt angesehen, wenn neben dem Ergebnis des Tests auf Normalverteilung auch die Darstellungen der optischen Verfahren eine Normalverteilung anzeigten beziehungsweise nahelegten. Die überwiegende Anzahl an Daten zeigte keine Normalverteilung, weshalb bei der Beschreibung und der Untersuchung auf Unterschiede und Zusammenhänge der Daten statistische Verfahren gewählt wurden, die keine Normalverteilung voraussetzen.

Datenbeschreibung

Die Beschreibung der Daten erfolgte bei den Basisdaten in Form von Median und Quartil bei metrischen Daten und Häufigkeiten bei kategorialen Daten. Die Messdaten wurden unter Verwendung von Median und Interquartilbereich bei metrischen Daten und Häufigkeiten bei kategorialen Daten beschrieben.

Datenuntersuchung

Die Untersuchung der Daten umfasste neben einer Untersuchung auf Unterschiede eine Anwendung von Korrelationsverfahren und Regressionsverfahren zur Untersuchung auf Zusammenhänge in Form von Assoziationen beziehungsweise Abhängigkeiten. Das Signifikanzlevel wurde mit einem Wert von $\alpha=0,05$ festgelegt.

Bei der Vollblutstimulation wurde ein Stimulationsvergleich für alle Gruppen zusammen und für jede Gruppe getrennt sowie ein Gruppenvergleich für jeweils jedes Zytokin und jede Stimulation einzeln angewendet, während bei der Leukozytenstimulation ein Gruppenvergleich für jeweils jedes Zytokin und jede Stimulation einzeln durchgeführt wurde. Sowohl bei den Basisdaten als auch den Messdaten wurden die Gruppen- und Stimulationsvergleiche auf signifikante Unterschiede untersucht.

Bei den Basisdaten wurde bei metrischen Daten der *Kruskal-Wallis*-Test und bei kategorialen Daten der *Freeman-Halton*-Test verwendet. Die Untersuchung der Messdaten umfasste bei den Stimulationsvergleichen der Vollblutstimulation den *Kruskal-Wallis*-Test als Globaltest und bei signifikantem Ergebnis nachfolgend den *Dunn-Post*-Test zum paarweisen Vergleich jeweils zweier Stimulationen. Bei den Gruppenvergleichen der Messdaten wurde bei metrischen Daten neben dem *Kruskal-Wallis*-Test als Globaltest der *Mann-Whitney*-Test für paarweise Vergleiche jeweils zweier Gruppen und bei kategorialen Daten neben dem *Freeman-Halton*-Test als Globaltest der *Fisher-Exact*-Test für paarweise Vergleiche jeweils zweier Gruppen angewendet.

Nachfolgend wurden die Daten vor Anwendung der Korrelationsverfahren und Regressionsverfahren vorangehend modifiziert und anschließend möglicherweise vorhandene Ausreißer entfernt. Bei den Basisdaten wurden die Werte für Triglyceride und C-Peptid logarithmiert, während bei den Messdaten alle als metrische Variablen verwendeten Daten logarithmiert wurden.

Die Identifikation und Entfernung von Ausreißern aus den Daten erfolgte anhand der Regel, dass Werte außerhalb des Bereichs von 1.Quartil minus 1,5-facher Interquartilbereich bis 3.Quartil plus 1,5-facher Interquartilbereich als Ausreißer angesehen und entfernt werden. Diese Methodik der Ausreißeridentifizierung wurde verwendet, da sie zum einen eine objektive Standardisierung zur Ausreißerentfernung darstellt und die große Menge an Daten eine graphische Darstellung zur Identifizierung wesentlich erschwerte. Bei den Basisdaten erfolgte eine Entfernung von Ausreißern nur bei der Anwendung der Korrelationsverfahren, weil bei der Anwendung der Regressionsverfahren jene nur als Prediktoren beziehungsweise unabhängige Variablen und nicht als Kriterium beziehungsweise abhängige Variablen verwendet wurden.

Korrelationsuntersuchung

Die Untersuchung der Daten auf Korrelation wurde jeweils für jede Gruppe getrennt durchgeführt. Bei der Vollblutstimulation wurden die Gruppen der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker aufgrund ihrer geringen Probandenanzahl zu einer Gruppe zusammengefügt.

Bei der Vollblutstimulation wurde auf Korrelationen zwischen den Basisdaten und Messdaten untersucht, während bei der Leukozytenstimulation auf Korrelationen zwischen den Basisdaten und Messdaten sowie zwischen den Messdaten und Serumdaten untersucht wurde.

Die Untersuchung auf Korrelationen zwischen den Messdaten und Elispot-Daten wurde nicht durchgeführt, da die entsprechenden Zytokine im Rahmen der Grundausswertung als nicht auswertbar galten und somit nachfolgend nicht ausgewertet werden konnten.

Als Maß für den monotonen Zusammenhang wurde bei der Untersuchung metrischer Daten als auch metrischer und kategorial-ordinaler Daten der *Spearman*-Korrelationskoeffizient mit dazugehörigem p-Wert berechnet, welcher auch bei der Untersuchung metrischer und kategorial-nominaler Daten anstelle der punktbiserialen Korrelation Anwendung fand. Angegeben wird jeweils der Korrelationskoeffizient mit entsprechenden p-Wert. Bei der Untersuchung auf Korrelation zwischen kategorial-ordinalen Daten und kategorial-nominalen Daten wurde der *Fisher-Exact*-Test auf Assoziation angewendet. Angegeben wird jeweils der p-Wert.

Regressionsuntersuchung

Die Regressionsuntersuchung kann hinsichtlich der Anwendungsziele von Regressionsverfahren grundlegend in zwei Komponenten unterteilt werden.

Zum einen sollten die vorher durchgeführten Untersuchungen auf Unterschiede zwischen den

Gruppen in Form zweier Modelle für verschiedene Parameter adjustiert werden. Dabei wurde die Gruppenzugehörigkeit in Form von Dummy-Variablen kodiert.

Beim sogenannten anthropometrischen Modell wurde für die Parameter Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI adjustiert, beim sogenannten klinisch-chemischen Modell für die Parameter Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde auf die Vorgehensweise einer schrittweisen Adjustierung verzichtet. Bei signifikantem globalen Gruppenunterschied erfolgten jeweils paarweise Vergleiche unter Anwendung des *Tukey-Kramer-Post-Hoc-Test* mit einer dem jeweiligen Modell entsprechenden Adjustierung. Angegeben werden jeweils die p-Werte der Typ-3 Effekte.

Zum anderen sollte bei signifikantem Ergebnis der Untersuchung auf Korrelationen eine Quantifizierung des Zusammenhangs zwischen den Variablen erfolgen und weiterführend bei signifikantem Regressionskoeffizienten jener für bestimmte Parameter jeweils adjustiert werden. Die Quantifizierung der Zusammenhänge erfolgte schrittweise, wobei aufgrund der großen Menge an Daten nur für jeweils einen einzelnen Parameter wie Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, BMI, Blutglukose, HbA1c, Triglyceride oder C-Peptid adjustiert wurde. Angegeben werden bei metrischer abhängiger Variable der β -Regressionskoeffizient mit entsprechendem p-Wert des *t*-Tests und bei kategorialer abhängiger Variable der *Logit*-Regressionskoeffizient mit entsprechendem p-Wert des *Wald*-Tests.

In Abhängigkeit vom Skalenniveau der abhängigen Variable fanden entweder simple oder multiple lineare Regressionsmodelle bei metrischen Variablen oder logistische Regressionsmodelle bei kategorialen Variablen Anwendung. Bei den angewandten logistischen Regressionsmodellen handelt sich um verallgemeinerte lineare Regressionsmodelle, die anstelle einer Normalverteilung eine Binomialverteilung und als Verknüpfungsfunktion eine *Logit*-Funktion verwenden [191].

Bei den simplen oder multiplen linearen Regressionsmodellen folgte der Berechnung ein diagnostischer Prozess zur Überprüfung bestimmter Voraussetzungen für die korrekte Verwendung und somit Gültigkeitsannahme der angewandten Modelle. Die Untersuchung der Residuen auf Normalverteilung erfolgte teststatistisch in Form des *Shapiro-Wilk*-Tests, während die Untersuchung auf Homoskedastizität graphisch mittels eines Residuen-Plots erfolgte. Abweichungen von diesen Voraussetzungen sind separat gekennzeichnet.

Bei der Verwendung des logistischen Regressionsmodells zur Quantifizierung des Zusammenhangs sowohl zwischen den Messdaten und Basisdaten als auch zwischen den Messdaten und Serumdaten konnte in wenigen Fällen infolge einer kompletten oder quasi-kompletten Datenseparation keine einzigartige Lösung des *Maximum-Likelihood*-Verfahrens ermittelt werden. In diesen Fällen sind die berechneten Werte gekennzeichnet.

Für die Auswertung wurden die Bio-Plex-Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), Microsoft Excel, Microsoft Word (beide Microsoft, Seattle, USA), GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) und SAS 9.1 mit Enterprise Guide 4 (SAS Institute, Cary, USA) verwendet. Eine beratende Unterstützung bei der Datenauswertung erfolgte durch Herr Dr. Strassburger vom Institut für Biometrie und Epidemiologie.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden mit zwei Untersuchungsverfahren die Antigen-stimulierte Zytokinsekretion untersucht und Typ 1 Diabetiker, Typ 2 Diabetiker, LADA Diabetiker sowie Kontrollprobanden verglichen. Für die Vollblutstimulation und die Leukozytenstimulation wurden verschiedene Fragestellungen formuliert.

Im Rahmen der Vollblutstimulation sollte untersucht werden, inwiefern bei einer 24stündigen Stimulation von Zellen im Vollblut mit bestimmten Mitogenen und Antigenen eine Antigen-reaktive Antwort in Form einer Zytokinausschüttung beobachtet und diesbezüglich zwischen den Gruppen ein Unterschied aufgezeigt werden kann. Darüber hinaus sollte eine Assoziation beziehungsweise Abhängigkeit zwischen den Messwerten und bestimmten anthropometrischen und klinisch-chemischen Einflussfaktoren überprüft werden.

Im Rahmen der Leukozytenstimulation wurden die oben genannten Gruppen auf Unterschiede hin untersucht und nachfolgend eine Untersuchung auf Zusammenhänge in Form einer Assoziation beziehungsweise Abhängigkeit zwischen den Messwerten und bestimmten anthropometrischen und klinisch-chemischen Einflussfaktoren durchgeführt. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwiefern eine Assoziation beziehungsweise Abhängigkeit zwischen den gemessenen Zytokinkonzentrationen in den Zellüberständen und der Anzahl Zytokin-sezernierender Zellen im ELISPOT respektive zwischen den gemessenen Zytokinkonzentrationen in den Zellüberständen und den Zytokinkonzentrationen im Serum besteht.

Bedingt durch den Umstand, dass bestimmte Zytokine nicht ausgewertet werden konnten, wurde eine Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen den gemessenen Zytokinkonzentrationen der Zellüberstände und der Anzahl Zytokin-sezernierender Zellen im ELISPOT nicht ausgeführt.

3.1 Charakterisierung der Probandenkollektive

Für die Untersuchung der Vollblutstimulation und der Leukozytenstimulation wurden jeweils eigene Probandenkollektive zusammengestellt.

3.1.1 Probandenkollektiv der Vollblutstimulation

Für die Durchführung der Vollblutstimulation wurden insgesamt 49 Probanden in die Untersuchung eingeschlossen, wobei sich die Gesamtzahl aus 6 Typ 1 Diabetiker, 22 Typ 2 Diabetiker, 5 LADA Diabetiker und 16 Kontrollprobanden zusammensetzte. In der nachfolgen-

den Tabelle soll eine Übersicht über das Probandenkollektiv der Vollblutstimulation gegeben werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Charakteristika des Probandenkollektivs der Vollblutstimulation

Status	T1D	LADA	T2D	Kontrollen	p-Wert
Anzahl	6	5	22	16	-
Geschlecht (m/f)	2/4	3/2	11/11	6/10	0,7525
Alter (Jahre)	42,74 (37,11-47,70)	44,25 (43,56-48,50)	48,22 (45,35-57,55)	49,99 (40,21-53,06)	0,1969
Diabetesdauer (Monate)	13,83 (8,86-19,26)	16,46 (7,76-17,70)	12,55 (9,80-27,30)	-	0,9680
BMI (kg/m ²)	24,77 (20,76-26,29)	26,54 (26,50-31,25)	31,37 (27,88-36,74)	24,69 (22,90-26,83)	<0,0001
Körpergewicht (kg)	76,5 (65,0-88,0)	86,0 (82,0-106,0)	98,2 (81,0-112,0)	69,5 (66,5-73,5)	<0,0001
Körpergröße (cm)	176,0 (172,0-182,0)	180,0 (172,0-183,0)	177,0 (165,0-183,0)	168,0 (163,0-175,5)	0,2422
Taillenumfang (cm)	83,0 (69,0-89,0)	96,0 (89,0-108,0)	106,5 (96,5-120,0)	79,5 (74,5-93,0)	<0,0001
Hüftumfang (cm)	101,0 (97,0-109,0)	102,0 (101,0-111,0)	109,5 (103,0-123,0)	98,5 (93,5-105,5)	0,0157
Blutglukose (mg/dl)	111,5 (107,0-116,0)	105,0 (104,0-155,0)	134,5 (121,0-171,0)	96,5 (91,5-102,0)	0,0002
HbA1c (%)	6,3 (5,9-7,5)	6,3 (5,7-7,8)	6,6 (6,0-7,4)	5,5 (5,4-5,8)	0,0002
Triglyceride (mg/dl)	69,0 (56,0-134,0)	59,0 (53,0-184,0)	209,5 (134,0-285,0)	80,5 (64,5-140,0)	0,0011
Cholesterin (mg/dl)	184,5 (183,0-192,0)	186,0 (184,0-195,0)	214,5 (188,0-230,0)	193,0 (176,5-221,0)	0,1678
HDL (mg/dl)	67,0 (41,0-74,0)	54,0 (54,0-77,0)	47,5 (40,0-63,0)	57,5 (54,0-69,0)	0,1202
LDL (mg/dl)	125,5 (109,0-135,0)	109,0 (108,0-140,0)	140,5 (107,0-161,0)	127,0 (109,5-148,0)	0,6840
C-Peptid (ng/ml)	0,95 (0,69-1,60)	1,07 (0,62-1,80)	3,75 (2,60-6,00)	1,95 (1,30-2,45)	<0,0001

Werte angegeben als Median (1.Quartil-3.Quartil) oder Häufigkeit; p-Werte stellvertretend für Gruppenvergleich: metrische Daten mit *Kruskal-Wallis*-Test, kategoriale Daten mit *Freeman-Halton*-Test; Status: T1D=Typ 1 Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, Kontrollen=Kontrollprobanden; Geschlecht: m=männlich / f=weiblich

Die Gruppen wurden statistisch auf Unterschiede hin untersucht, indem bei metrischen Daten der *Kruskal-Wallis*-Test und bei kategorialen Daten der *Freeman-Halton*-Test angewendet wurde.

Bei den anthropometrischen Parametern wie BMI, Körpergewicht, Taillenumfang und Hüftumfang sowie bei den klinisch-chemischen Parametern wie Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Gruppe der Typ 2 Diabetiker wies bezüglich oben genannter Parameter im Vergleich zu den übrigen Gruppen erhöhte Werte auf. Im Hinblick auf die Geschlechterverteilung und den Parametern wie Alter, Diabetesdauer, Cholesterin, Lipoprotein HDL und Lipoprotein LDL konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen aufgezeigt werden.

3.1.2 Probandenkollektiv der Leukozytenstimulation

Für die Durchführung der Leukozytenstimulation wurden insgesamt 116 Probanden in die Untersuchung eingeschlossen, wobei sich die Gesamtzahl aus 32 Typ 1 Diabetiker, 49 Typ 2 Diabetiker, 22 LADA Diabetiker und 13 Kontrollprobanden zusammensetzte. In der nachfolgenden Tabelle ist eine Übersicht über das Probandenkollektiv der Leukozytenstimulation dargestellt (Tabelle 13).

Die Gruppen wurden statistisch auf Unterschiede hin untersucht, indem bei metrischen Daten der *Kruskal-Wallis*-Test und bei kategorialen Daten der *Freeman-Halton*-Test Anwendung fand.

Bei den anthropometrischen Parametern wie Geschlechterverteilung, BMI, Körpergewicht, Körpergröße sowie Taillenumfang ließ sich ein Unterschied zwischen den Gruppen aufzeigen, während im Hinblick auf Alter, Diabetesdauer und Hüftumfang kein Unterschied zwischen den Gruppen sichtbar wurde. Der Unterschied bei der Verteilung der Geschlechter zeigte sich in der Form, dass bei den Gruppen der Typ 1 Diabetiker und der Typ 2 Diabetiker der Anteil am männlichen Geschlecht im Vergleich zu den Gruppen der LADA Diabetiker und der Kontrollprobanden überwiegt. Darüber hinaus zeigte die Gruppe der Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu den anderen Gruppen jeweils höhere Werte für BMI, Körpergewicht und Taillenumfang, während die Gruppe der Typ 1 Diabetiker höhere Werte für die Körpergröße aufwies.

Bei den klinisch-chemischen Parametern wie Blutglukose, HbA1c, Triglyceride, Lipoprotein HDL und C-Peptid konnte ein Unterschied zwischen den Gruppen aufgezeigt werden, wohingegen bei den Parametern wie Cholesterin und Lipoprotein LDL kein Unterschied zwischen den Gruppen sichtbar wurde. Die Gruppe der Typ 2 Diabetiker zeichnete sich im Vergleich

durch höhere Werte für Triglyceride und C-Peptid aus, während die Gruppe der Typ 1 Diabetiker höhere Werte für Blutglukose und HbA1c aufwies. Darüber hinaus zeigte die Gruppe der LADA-Diabetiker im Vergleich höhere Werte für das Lipoprotein HDL.

Tabelle 13: Charakteristika des Probandenkollektivs der Leukozytenstimulation

Status	T1D	LADA	T2D	Kontrollen	p-Wert
Anzahl	32	22	49	13	-
Geschlecht (m/f)	23/9	6/16	35/14	4/9	0,0003
Alter (Jahre)	44,48 (38,63-50,93)	48,39 (41,92-58,70)	48,94 (41,95-60,41)	49,01 (42,04-54,85)	0,2096
Diabetesdauer (Jahre)	0,87 (0,11-1,96)	1,84 (0,38-2,95)	1,01 (0,12-2,55)	-	0,2284
BMI (kg/m ²)	24,45 (22,18-28,24)	26,66 (24,68-32,14)	30,25 (25,93-32,16)	22,24 (20,02-24,65)	<0,0001
Körpergewicht (kg)	78,9 (70,3-90,7)	81,5 (70,0-87,5)	90,0 (79,0-100,0)	68,0 (55,0-70,0)	0,0002
Körpergröße (cm)	177,0 (172,0-184,0)	165,5 (162,0-178,0)	175,0 (167,0-180,0)	166,0 (160,0-182,0)	0,0085
Taillenumfang (cm)	92,0 (81,0-103,0)	98,5 (89,0-103,0)	103,0 (94,0-112,0)	81,0 (72,5-94,0)	0,0013
Hüftumfang (cm)	106,0 (96,0-110,0)	103,5 (101,0-118,0)	107,0 (101,0-115,0)	100,5 (90,5-107,0)	0,1396
Blutglukose (mg/dl)	130,0 (98,0-150,0)	127,0 (110,0-170,0)	123,0 (105,0-157,0)	84,0 (78,5-99,0)	0,0004
HbA1c (%)	7,20 (4,75-9,40)	6,70 (5,50-8,70)	6,50 (5,20-8,20)	3,65 (3,45-3,85)	<0,0001
Triglyceride (mg/dl)	100,0 (78,0-167,0)	119,5 (80,0-145,0)	168,0 (94,0-234,5)	112,0 (66,0-165,0)	0,0232
Cholesterin (mg/dl)	197,0 (159,0-220,0)	201,5 (187,0-243,0)	190,5 (179,5-219,0)	195,0 (186,0-218,0)	0,5279
HDL (mg/dl)	38,1 (27,0-48,3)	39,4 (30,2-47,3)	27,1 (22,8-33,9)	33,7 (28,0-46,5)	0,0062
LDL (mg/dl)	127,8 (105,2-160,8)	150,7 (121,4-173,1)	127,6 (112,0-153,4)	138,3 (127,0-165,3)	0,4632
C-Peptid (ng/ml)	1,35 (0,91-1,90)	1,40 (0,90-2,90)	2,50 (1,50-3,35)	1,80 (1,40-2,70)	0,0144

Werte angegeben als Median (1.Quartil-3.Quartil) oder Häufigkeit; p-Werte stellvertretend für Gruppenvergleich: metrische Daten mit *Kruskal-Wallis*-Test, kategoriale Daten mit *Freeman-Halton*-Test; Status: T1D=Typ 1 Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, Kontrollen=Kontrollprobanden; Geschlecht: m=männlich / f=weiblich

3.2. Ergebnisse der Vollblutstimulation

3.2.1 Zytokinkonzentration nach Stimulation von Vollblut

Im Rahmen der Vollblutstimulation sollte die Fragestellung untersucht werden, inwiefern bei einer 24stündigen Stimulation von Zellen im Vollblut mit bestimmten Antigenen eine Antigen-reaktive Antwort in Form einer Zytokinausschüttung beobachtet werden kann.

Es wurden dafür sogenannte Stimulationsindizes gebildet, indem bei jedem Probanden für jedes Zytokin und jede Stimulation einzeln der Quotient von der Zytokinkonzentration mit Stimulation nach 24h und der Zytokinkonzentration ohne Stimulation nach 24h berechnet wurde.

Die Stimulationsindizes der einzelnen Stimulationen wurden miteinander verglichen, indem beim Vergleich aller Stimulationen ein Stimulationseffekt beziehungsweise Hemmungseffekt anhand einer Veränderung des Quotienten um einen Betrag größer 0,5 vom Wert 1 als relevant betrachtet wurde.

Dabei wurden die vier Gruppen in einem ersten Schritt als Gesamtgruppe zusammengefasst betrachtet. Eine statistische Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Stimulationen erfolgte zum einen unter Anwendung des *Kruskal-Wallis*-Tests zum Vergleich aller Stimulationen und zum anderen unter Anwendung des *Dunn-Post*-Tests zum paarweisen Vergleich jeweils zweier Stimulationen. In einem weiteren Schritt wurden die vier Gruppen getrennt voneinander betrachtet, im Einzelnen Typ 1 Diabetiker, LADA Diabetiker, Typ 2 Diabetiker und Kontrollprobanden. Eine statistische Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Stimulationen erfolgte für die einzelnen Gruppen unter Anwendung des *Kruskal-Wallis*-Tests zum Vergleich aller Stimulationen.

Für die Gesamtgruppe ist in einer nachfolgenden Tabelle zur Übersicht für jedes Zytokin und für jede Stimulation getrennt der Median der Stimulationsindizes mit dem Interquartilbereich und die p-Werte der Teststatistik für die Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Stimulationen dargestellt (Tabelle 14). Des Weiteren erfolgt in einer Abbildung für die Gesamtgruppe für jedes Zytokin separat eine graphische Darstellung der Stimulationsindizes der einzelnen Stimulationen mit den p-Werten der Teststatistik für die Untersuchung auf Unterschiede zwischen jeweils zwei Stimulationen (Abb.4).

Für die einzelnen Gruppen sind in nachfolgenden Tabellen zur Übersicht für jedes Zytokin und für jede Stimulation getrennt der Median der Stimulationsindizes mit dem Interquartilbereich und die p-Werte der Teststatistik für die Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Stimulationen dargestellt (Tabellen 15,16,17,18).

Gesamtgruppe

Die Gesamtgruppe wies beim Vergleich der Stimulationen anhand der Mediane der Stimulationsindizes bei allen Zytokinen Unterschiede auf (siehe Tabelle 14; Abb.4).

Die Stimulation mit LPS zeigte bei allen Zytokinen mit Ausnahme von RANTES einen erhöhten und jeweils im Vergleich zu den übrigen Stimulationen den höchsten Median auf, wobei im Vergleich insbesondere bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, TNF- α und IP10 vielfach erhöhte Mediane angezeigt wurden. Die Stimulation mit PHA wies bei den Zytokinen TNF- α und IP10 stärker erhöhte Mediane auf.

Bei den für jedes Zytokin einzeln durchgeführten Vergleichen jeweils zweier Stimulationen waren unterschiedliche Ergebnisse feststellbar. Bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α zeigten sich jeweils Unterschiede zwischen der Stimulation mit LPS mit einem höheren Median und den Stimulationen mit PHA, GAD, p277 und dem ConPep. Beim Zytokin IL-8 lag zusätzlich ein weiterer Unterschied zwischen der Stimulation mit dem ConPep mit einem höheren Median und der Stimulation mit GAD vor. Beim Zytokin IP10 waren Unterschiede sowohl zwischen der Stimulation mit LPS und den Stimulationen mit GAD, p277 und dem ConPep als auch zwischen der Stimulation mit PHA und den Stimulationen mit GAD, p277 und dem ConPep erkennbar, wobei die Stimulationen mit LPS und PHA im Vergleich jeweils einen höheren Median aufwiesen. Zusätzlich konnte ein Unterschied zwischen der Stimulation mit GAD mit einem höheren Median und der Stimulation mit dem ConPep mit einem geringeren Median beobachtet werden. Im Hinblick auf das Zytokin RANTES war kein Unterschied feststellbar.

Tabelle 14: Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die Gesamtgruppe

Zytokin	PHA	LPS	GAD	p277	ConPep	p-Wert
IL-1 β	0,98 (1,89)	68,05 (194,78)	0,73 (0,76)	0,99 (1,34)	1,00 (1,33)	<0,0001
IL-6	1,00 (2,06)	132,67 (372,45)	1,00 (1,40)	0,99 (1,76)	1,34 (1,58)	<0,0001
IL-8	0,94 (0,86)	2,89 (6,78)	0,85 (0,44)	0,99 (0,40)	1,02 (0,46)	<0,0001
TNF- α	1,63 (5,12)	366,75 (697,64)	1,01 (2,26)	1,13 (1,70)	1,00 (1,21)	<0,0001
IP10	8,04 (27,42)	26,18 (43,37)	1,35 (0,67)	0,97 (0,32)	0,99 (0,28)	<0,0001
RANTES	1,02 (0,09)	1,03 (0,12)	1,02 (0,08)	1,01 (0,07)	1,00 (0,04)	0,0393

Werte angegeben als Median (Interquartilbereich) der Stimulationsindizes [Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; p-Wert stellvertretend für Gruppenvergleich mit *Kruskal-Wallis*-Test; Gesamtgruppe n=49

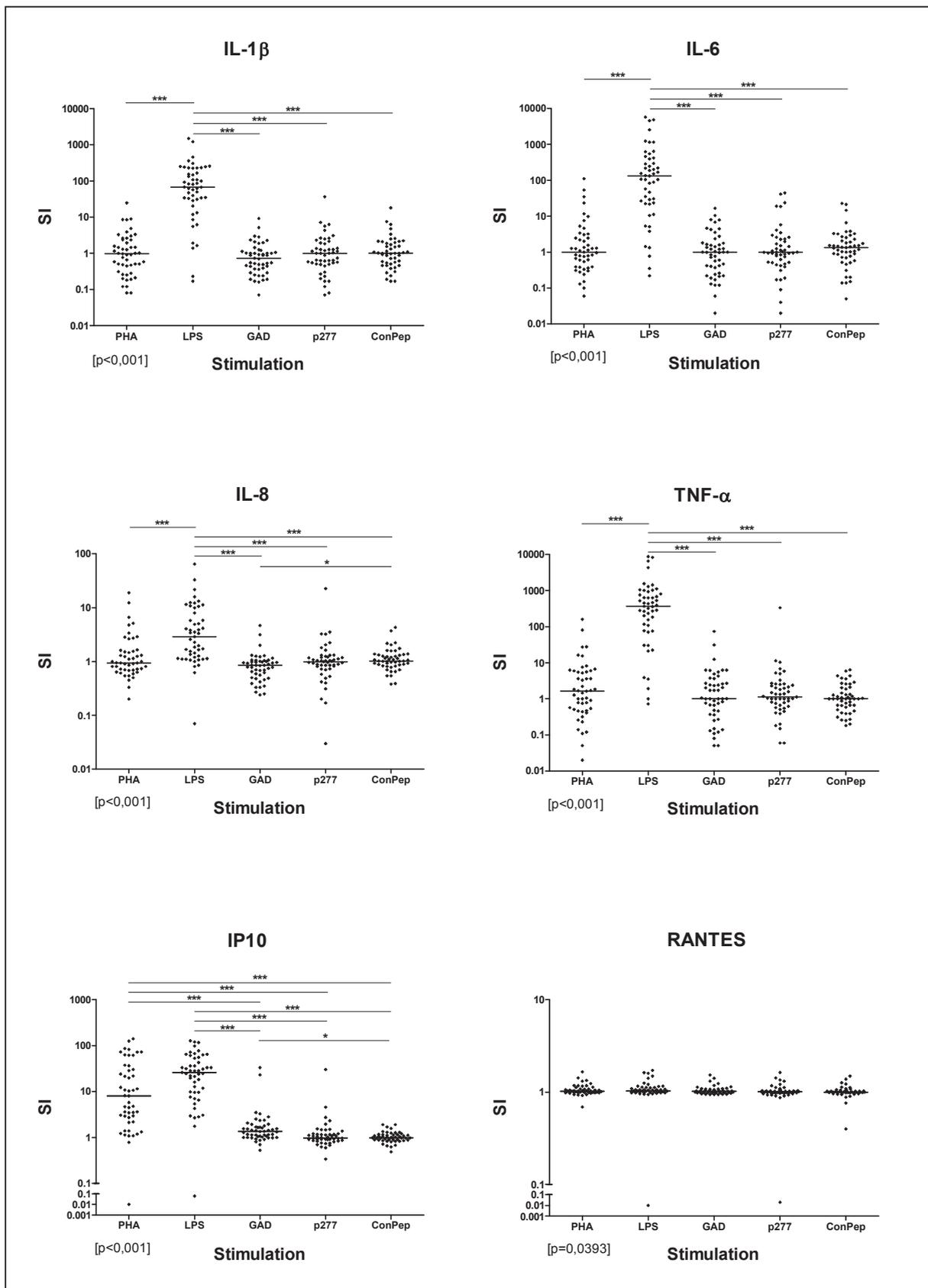


Abb.4: Übersicht über den paarweisen Vergleich der Stimulationen für die Gesamtgruppe bei Vollblutstimulation

SI: Stimulationsindex [Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; dargestellt sind individuelle Stimulationsindizes und der Median; [p-Wert] p-Wert *Kruskal-Wallis*-Test (globaler Vergleich der Stimulationen); *Post-Dunn*-Test *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ (multipler paarweiser Vergleich jeweils zweier Stimulationen)

Typ 1 Diabetiker

Für die Gruppe der Typ 1 Diabetiker zeigte sich mit einer Ausnahme des Zytokins RANTES bei allen Zytokinen anhand der Mediane der Stimulationsindizes ein Unterschied zwischen den Stimulationen (siehe Tabelle 15).

Die Stimulation mit LPS wies bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IP10 einen erhöhten Median und jeweils den höchsten Median im Vergleich zu den übrigen Stimulationen auf, wobei bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, TNF- α und IP10 vielfach erhöhte Mediane festgestellt werden konnten. Die Stimulation mit PHA zeigte beim Zytokin IP10 einen stärker erhöhten Median. Die Stimulation mit p277 wies bei den Zytokinen IL-1 β und TNF- α erhöhte Mediane auf, während bei der Stimulation mit dem ConPep beim Zytokin IL-1 β ein erhöhter Median beobachtet werden konnte.

Tabelle 15: Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die Typ 1 Diabetiker

Zytokin	PHA	LPS	GAD	p277	ConPep	p-Wert
IL-1β	1,16 (3,09)	83,75 (57,86)	0,77 (0,82)	1,89 (1,25)	1,87 (1,51)	0,0055
IL-6	1,49 (2,21)	32,88 (65,67)	0,56 (0,67)	0,97 (0,35)	0,89 (0,82)	0,0053
IL-8	0,88 (0,93)	1,54 (2,14)	0,57 (0,45)	1,03 (0,30)	0,95 (0,44)	0,0165
TNF-α	0,52 (5,23)	278,01 (291,24)	1,30 (1,38)	1,53 (1,62)	0,62 (0,61)	0,0051
IP10	4,00 (4,63)	17,02 (15,04)	1,03 (0,21)	0,98 (0,19)	0,90 (0,17)	0,0016
RANTES	1,05 (0,11)	1,07 (0,08)	1,04 (0,07)	1,01 (0,03)	1,00 (0,06)	0,3381

Werte angegeben als Median (Interquartilbereich) der Stimulationsindizes [Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; p-Wert stellvertretend für Gruppenvergleich mit *Kruskal-Wallis*-Test; Typ 1 Diabetiker n=6

LADA Diabetiker

Für die Gruppe der LADA Diabetiker zeigte sich beim Zytokin IP10 anhand der Mediane der Stimulationsindizes ein Unterschied zwischen den Stimulationen (siehe Tabelle 16).

Die Stimulation mit LPS wies beim Zytokin IP10 einen erhöhten Median und jeweils den höchsten Median im Vergleich zu den übrigen Stimulationen auf. Des Weiteren zeigten die Stimulationen mit PHA und GAD jeweils einen erhöhten Median, wobei die Stimulation mit PHA eine stärkere Erhöhung aufwies.

Tabelle 16: Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die LADA Diabetiker

Zytokin	PHA	LPS	GAD	p277	ConPep	p-Wert
IL-1 β	0,26 (1,25)	31,19 (53,67)	0,92 (0,44)	0,99 (0,57)	1,05 (1,33)	0,0592
IL-6	0,61 (0,55)	46,68 (82,88)	1,81 (6,24)	0,95 (0,92)	1,30 (2,51)	0,0705
IL-8	1,00 (0,70)	2,89 (0,95)	0,93 (2,75)	0,70 (1,76)	0,54 (1,84)	0,3174
TNF- α	1,27 (2,58)	452,98 (1042,35)	6,14 (3,92)	3,31 (4,68)	2,10 (1,30)	0,1059
IP10	2,98 (8,10)	19,77 (49,06)	1,79 (1,27)	1,21 (0,34)	1,21 (0,21)	0,0051
RANTES	1,01 (0,01)	1,01 (0,05)	1,01 (0,05)	1,01 (0,04)	1,00 (0,01)	0,9741

Werte angegeben als Median (Interquartilbereich) der Stimulationsindizes [Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; p-Wert stellvertretend für Gruppenvergleich mit *Kruskal-Wallis*-Test; LADA Diabetiker n=5

Typ 2 Diabetiker

Für die Gruppe der Typ 2 Diabetiker zeigte sich mit einer Ausnahme des Zytokins RANTES bei allen Zytokinen anhand der Mediane der Stimulationsindizes ein Unterschied zwischen den Stimulationen (siehe Tabelle 17).

Die Stimulation mit LPS wies bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IP10 einen erhöhten Median und jeweils den höchsten Median im Vergleich zu den übrigen Stimulationen auf. Des Weiteren zeigte die Stimulation mit PHA bei den Zytokinen TNF- α und IP10 stärker erhöhte Mediane, bei letztgenanntem um ein Vielfaches.

Tabelle 17: Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die Typ 2 Diabetiker

Zytokin	PHA	LPS	GAD	p277	ConPep	p-Wert
IL-1 β	0,84 (2,08)	64,79 (208,09)	0,59 (0,76)	0,87 (1,11)	1,00 (1,46)	<0,0001
IL-6	0,98 (2,07)	219,54 (466,67)	1,00 (2,16)	1,01 (2,13)	1,37 (1,54)	<0,0001
IL-8	0,94 (0,86)	3,03 (6,88)	0,84 (0,29)	0,90 (0,39)	1,10 (0,46)	<0,0001
TNF- α	1,56 (4,88)	411,46 (772,43)	1,03 (2,12)	1,07 (1,20)	1,02 (1,19)	<0,0001
IP10	16,13 (34,79)	29,65 (45,45)	1,34 (0,47)	1,04 (0,32)	0,98 (0,23)	<0,0001
RANTES	0,99 (0,04)	1,02 (0,06)	1,00 (0,06)	0,98 (0,04)	0,99 (0,04)	0,1561

Werte angegeben als Median (Interquartilbereich) der Stimulationsindizes [Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; p-Wert stellvertretend für Gruppenvergleich mit *Kruskal-Wallis*-Test; Typ 2 Diabetiker n=22

Kontrollprobanden

Für die Gruppe der Kontrollprobanden zeigte sich mit einer Ausnahme des Zytokins RANTES bei allen Zytokinen anhand der Mediane der Stimulationsindizes ein Unterschied zwischen den Stimulationen (siehe Tabelle 18).

Die Stimulation mit LPS wies bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IP10 einen erhöhten Median und jeweils den höchsten Median im Vergleich zu den übrigen Stimulationen auf, wobei bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, TNF- α und IP10 eine stärkere Erhöhung beobachtet werden konnte. Die Stimulation mit PHA zeigte bei den Zytokinen TNF- α und IP10 erhöhte Mediane auf, bei letztgenanntem in einem stärkeren Ausmaß.

Tabelle 18: Übersicht über den Stimulationsvergleich bei Vollblutstimulation für die Kontrollprobanden

Zytokin	PHA	LPS	GAD	p277	ConPep	p-Wert
IL-1β	0,99 (1,60)	140,29 (208,03)	0,88 (0,85)	0,64 (0,73)	0,93 (0,68)	<0,0001
IL-6	1,20 (3,73)	120,07 (333,60)	0,99 (1,13)	0,94 (1,92)	1,44 (1,50)	<0,0001
IL-8	0,95 (1,45)	4,17 (10,26)	0,97 (0,48)	1,03 (0,36)	1,01 (0,40)	0,0019
TNF-α	1,77 (6,86)	412,85 (881,51)	1,00 (3,54)	1,01 (2,00)	1,00 (0,80)	<0,0001
IP10	6,37 (53,41)	30,11 (58,68)	1,41 (0,99)	0,92 (0,34)	1,06 (0,35)	<0,0001
RANTES	1,14 (0,23)	1,14 (0,40)	1,04 (0,12)	1,04 (0,18)	1,00 (0,12)	0,0712

Werte angegeben als Median (Interquartilbereich) der Stimulationsindizes [Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; p-Wert stellvertretend für Gruppenvergleich mit *Kruskal-Wallis*-Test; Kontrollprobanden n=16

Zusammenfassend zeigte sich für die Gesamtgruppe, dass bezüglich eines Stimulationseffektes bei allen untersuchten Zytokinen außer RANTES ein Unterschied zwischen den Stimulationen festgestellt werden konnte.

Die Stimulation mit LPS bewirkte bei allen Zytokinen außer RANTES und die Stimulation mit PHA beim Zytokin IP10 in Relation zu den weiteren Stimulationen eine stärkere Zytokinausschüttung. Zusätzlich konnte bei den Zytokinen IL-8 und IP10 ein Unterschied zwischen der Stimulation mit GAD und der Stimulation mit ConPep festgestellt werden, indem letztgenannte beim Zytokin IL-8 eine höhere Zytokinausschüttung und beim Zytokin IP10 eine geringere Zytokinausschüttung bewirkte.

Für die einzelnen Gruppen zeigte sich insgesamt ein der Gesamtgruppe ähnliches Bild, wobei abweichend beim Zytokin RANTES kein Unterschied zwischen den Stimulationen und bei

der Gruppe der LADA Diabetiker nur beim Zytokin IP10 ein Unterschied zwischen den Stimulationen festgestellt werden konnte.

Die Stimulation mit LPS zeigte bei der Gruppe der LADA Diabetiker beim Zytokin IP10 und bei den Gruppen der Typ 1 Diabetiker, Typ 2 Diabetiker und Kontrollprobanden bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IP10 einen stimulatorischen Effekt. Die Stimulation mit PHA wies bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker und der Gruppe der LADA Diabetiker einen stimulatorischen Effekt beim Zytokin IP10 auf, bei den übrigen Gruppen zusätzlich beim Zytokin TNF- α . Die Stimulationen mit GAD zeigte bei der Gruppe der LADA Diabetiker beim Zytokin IP10 einen stimulatorischen Effekt. Die Stimulation mit p277 zeigte bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker sowohl beim Zytokin IL-1 β als auch beim Zytokin TNF- α einen stimulatorischen Effekt. Des Weiteren konnte bei der Stimulation mit dem ConPep bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker beim Zytokin IL-1 β ein stimulatorischer Effekt aufgezeigt werden.

3.2.2 Vergleich der Gruppen nach Vollblutstimulation

Im Rahmen der Vollblutstimulation sollte die Fragestellung untersucht werden, inwiefern bei einer 24stündigen Stimulation von Zellen im Vollblut mit bestimmten Antigenen ein Unterschied zwischen den oben genannten Gruppen bezüglich einer Antigen-reaktiven Antwort in Form einer Zytokinausschüttung beobachtet werden kann.

Es wurden bei jedem Probanden für jedes Zytokin und jede Stimulation jeweils Stimulationsindizes in Form von Quotienten gebildet. Für die Stimulationen mit LPS, PHA, GAD, p277 und ConPep wurde der Quotient von der Zytokinkonzentration mit Stimulation nach 24h und der Zytokinkonzentration ohne Stimulation nach 24h berechnet. Für den PBS24-Wert als Maß für die Ruhesekretion wurde der Quotient von der Zytokinkonzentration ohne Stimulation nach 24h und der Zytokinkonzentration ohne Stimulation nach 0h bei Versuchsbeginn berechnet.

Die Gruppen wurden im Folgenden unter Anwendung eines nicht adjustierten Modells und zweier adjustierter Modelle statistisch auf Unterschiede untersucht.

Im Rahmen des unadjustierten Modells erfolgte eine Untersuchung auf Unterschiede in Form des *Kruskal-Wallis*-Tests zum Vergleich aller vier Gruppen und bei signifikantem Ergebnis nachfolgend anhand des *Mann-Whitney*-Tests zum paarweisen Vergleich jeweils zweier Gruppen.

Im Rahmen der beiden adjustierten Modelle erfolgte eine Untersuchung auf Unterschiede unter Anwendung eines multiplen linearen Regressionsverfahrens zum Vergleich aller vier

Gruppen und bei signifikantem Ergebnis nachfolgend anhand des *Tukey-Kramer-Post-Hoc*-Tests zum paarweisen Vergleich jeweils zweier Gruppen. Als adjustierte Modelle fungierten zum einen das sogenannte anthropometrische Modell, bei dem eine Adjustierung für die Einflussfaktoren Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI vorgenommen wurde, und zum anderen das sogenannte klinisch-chemische Modell, bei dem eine Adjustierung für die Einflussfaktoren Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid vorgenommen wurde.

In zwei nachfolgenden Tabellen sind die berechneten Mediane der Stimulationsindizes dargestellt. Zusätzlich ist in der letzten Spalte der p-Wert für den nicht adjustierten Vergleich aller vier Gruppen angegeben (Tabellen 19,20). In einer Abbildung werden die Ergebnisse des nicht adjustierten paarweisen Vergleichs jeweils zweier Gruppen dargestellt (Abb.5). Des Weiteren werden tabellarisch die Ergebnisse des adjustierten Vergleichs aller vier Gruppen in Form der zwei beschriebenen Modelle mit der Anzahl der jeweils in die Berechnung einbezogenen Probanden angegeben (Tabelle 21). In nachfolgenden Abbildungen erfolgt eine Darstellung der Ergebnisse des adjustierten paarweisen Vergleichs jeweils zweier Gruppen (Abb.6,7,8).

Gruppenvergleich ohne Adjustierung

Bei der Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Gruppen bei der Antigen-stimulierten Zytokinausschüttung in Form des nicht adjustierten Modells zeigten sich bei den Zytokinen IL-1 β und RANTES Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Tabellen 19,20; Abb.5).

Beim Zytokin IL-1 β wiesen die Gruppe der Typ 1 Diabetiker und die Gruppe der LADA Diabetiker im Vergleich zur Gruppe der Kontrollprobanden hinsichtlich des PBS24 Wertes jeweils einen höheren Median auf.

Im Hinblick auf das Zytokin RANTES konnte beim PBS24 Wert ein Unterschied zwischen der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit einem höheren Median und der Gruppe der Kontrollprobanden mit einem niedrigeren Median festgestellt werden. Ferner zeigte sich sowohl bei der Stimulation mit PHA als auch bei der Stimulation mit LPS ein Unterschied zwischen der Gruppe der Kontrollprobanden mit einem höheren Median und der Gruppe der LADA Diabetiker beziehungsweise der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit jeweils einem geringeren Median. Des Weiteren wurde sowohl bei der Stimulation mit GAD als auch bei der Stimulation mit p277 jeweils ein Unterschied zwischen der Gruppe der Kontrollprobanden mit einem jeweils höheren Median und der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit einem jeweils geringeren Median sichtbar.

Tabelle 19: Übersicht über den nicht adjustierten Vergleich der Gruppen bei Vollblutstimulation (Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8)

Stimulation	T1D	LADA	T2D	Kontrollen	p-Wert
IL-1β					
PBS24	21,26 (7,13)	20,48 (7,14)	13,80 (19,00)	8,23 (7,06)	0,0374
PHA	1,16 (3,09)	0,26 (1,25)	0,84 (2,08)	0,99 (1,60)	0,6716
LPS	83,75 (57,86)	31,19 (53,67)	64,79 (208,09)	140,29 (208,03)	0,3088
GAD	0,77 (0,82)	0,92 (0,44)	0,59 (0,76)	0,88 (0,85)	0,7932
p277	1,89 (1,25)	0,99 (0,57)	0,87 (1,11)	0,64 (0,73)	0,5431
ConPep	1,87 (1,51)	1,05 (1,33)	1,00 (1,46)	0,93 (0,68)	0,7625
IL-6					
PBS24	137,02 (219,70)	52,84 (98,04)	22,68 (32,89)	11,17 (32,38)	0,0707
PHA	1,49 (2,21)	0,61 (0,55)	0,98 (2,07)	1,20 (3,73)	0,4302
LPS	32,88 (65,67)	46,68 (82,88)	219,54 (466,67)	120,07 (333,60)	0,2917
GAD	0,56 (0,67)	1,81 (6,24)	1,00 (2,16)	0,99 (1,13)	0,6727
p277	0,97 (0,35)	0,95 (0,92)	1,01 (2,13)	0,94 (1,92)	0,9664
ConPep	0,89 (0,82)	1,30 (2,51)	1,37 (1,54)	1,44 (1,50)	0,5194
IL-8					
PBS24	250,79 (228,12)	62,78 (41,31)	77,99 (329,16)	43,40 (157,09)	0,2676
PHA	0,88 (0,93)	1,00 (0,70)	0,94 (0,86)	0,95 (1,45)	0,9494
LPS	1,54 (2,14)	2,89 (0,95)	3,03 (6,88)	4,17 (10,26)	0,8056
GAD	0,57 (0,45)	0,93 (2,75)	0,84 (0,29)	0,97 (0,48)	0,2408
p277	1,03 (0,30)	0,70 (1,76)	0,90 (0,39)	1,03 (0,36)	0,7552
ConPep	0,95 (0,44)	0,54 (1,84)	1,10 (0,46)	1,01 (0,40)	0,7772

Werte angegeben als Median (Interquartilbereich) der Stimulationsindizes [PBS24: Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 0h; PHA,LPS,GAD,p277,ConPep: Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; p-Wert stellvertretend für Gruppenvergleich mit *Kruskal-Wallis*-Test (unadjustiertes Modell); T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen= Kontrollprobanden

Tabelle 20: Übersicht über den nicht adjustierten Vergleich der Gruppen bei Vollblutstimulation (Zytokine TNF- α , IP10, RANTES)

Stimulation	T1D	LADA	T2D	Kontrollen	p-Wert
TNF-α					
PBS24	9,34 (8,12)	1,57 (0,51)	1,20 (4,87)	1,84 (5,76)	0,2161
PHA	0,52 (5,23)	1,27 (2,58)	1,56 (4,88)	1,77 (6,86)	0,6596
LPS	278,01 (291,24)	452,98 (1042,35)	411,46 (772,43)	412,85 (881,51)	0,8239
GAD	1,30 (1,38)	6,14 (3,92)	1,03 (2,12)	1,00 (3,54)	0,4994
p277	1,53 (1,62)	3,31 (4,68)	1,07 (1,20)	1,01 (2,00)	0,4876
ConPep	0,62 (0,61)	2,10 (1,30)	1,02 (1,19)	1,00 (0,80)	0,1948
IP10					
PBS24	2,09 (15,72)	1,48 (1,08)	1,38 (3,67)	1,81 (4,57)	0,8568
PHA	4,00 (4,63)	2,98 (8,10)	16,13 (34,79)	6,37 (53,41)	0,4782
LPS	17,02 (15,04)	19,77 (49,06)	29,65 (45,45)	30,11 (58,68)	0,4251
GAD	1,03 (0,21)	1,79 (1,27)	1,34 (0,47)	1,41 (0,99)	0,1712
p277	0,98 (0,19)	1,21 (0,34)	1,04 (0,32)	0,92 (0,34)	0,2829
ConPep	0,90 (0,17)	1,21 (0,21)	0,98 (0,23)	1,06 (0,35)	0,3594
RANTES					
PBS24	0,93 (0,12)	0,93 (0,06)	0,97 (0,06)	0,85 (0,26)	0,0059
PHA	1,05 (0,11)	1,01 (0,01)	0,99 (0,04)	1,14 (0,23)	0,0033
LPS	1,07 (0,08)	1,01 (0,05)	1,02 (0,06)	1,14 (0,40)	0,0082
GAD	1,04 (0,07)	1,01 (0,05)	1,00 (0,06)	1,04 (0,12)	0,0412
p277	1,01 (0,03)	1,01 (0,04)	0,98 (0,04)	1,04 (0,18)	0,0233
ConPep	1,00 (0,06)	1,00 (0,01)	0,99 (0,04)	1,00 (0,12)	0,9025

Werte angegeben als Median (Interquartilbereich) der Stimulationsindizes [PBS24: Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 0h; PHA,LPS,GAD,p277,ConPep: Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; p-Wert stellvertretend für Gruppenvergleich mit *Kruskal-Wallis*-Test (unadjustiertes Modell); T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen= Kontrollprobanden

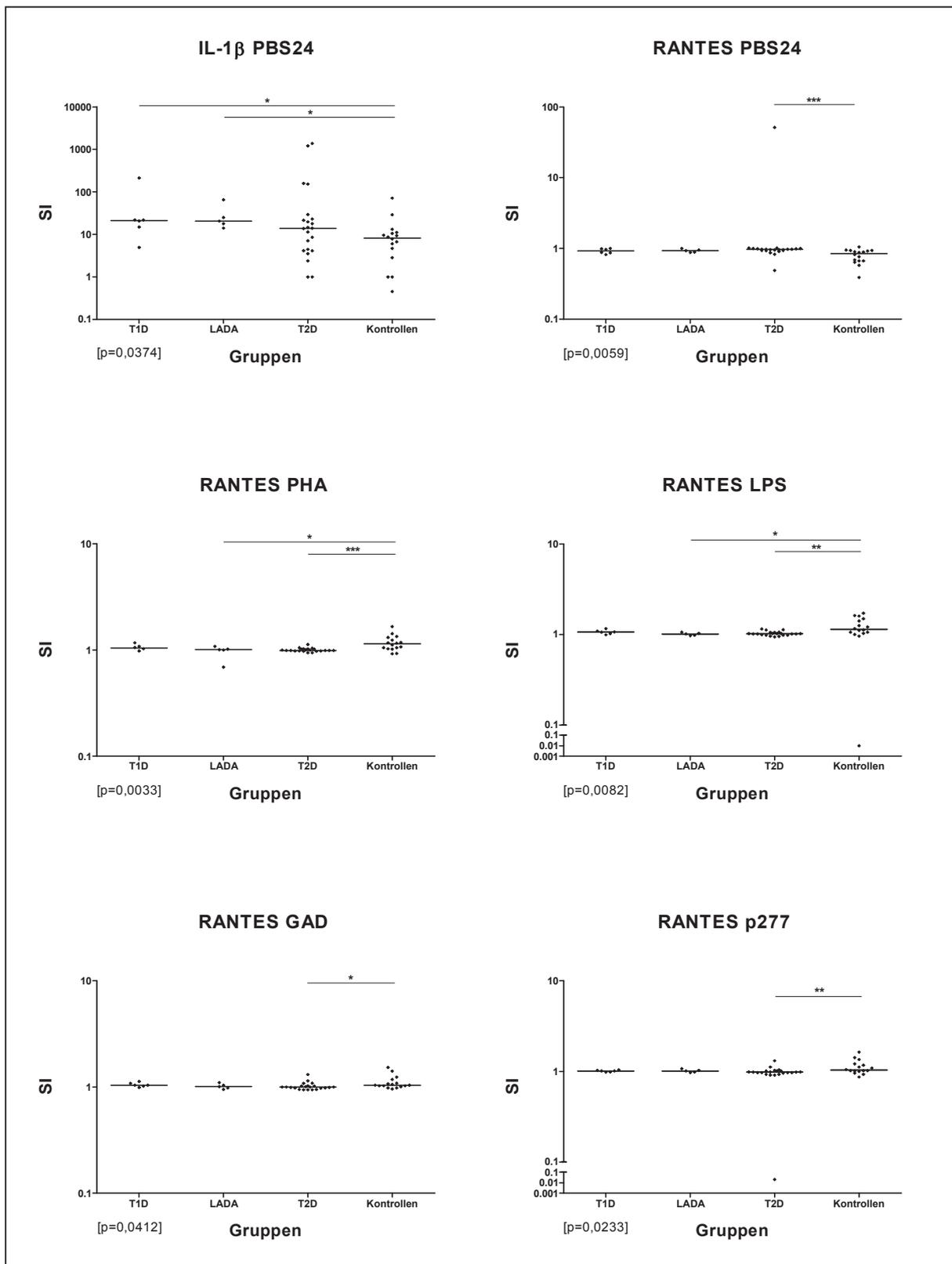


Abb.5: Übersicht über den nicht adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen bei Vollblutstimulation

SI: Stimulationsindex [PBS24: Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 0h; PHA,LPS,GAD,p277: Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; dargestellt sind individuelle Stimulationsindizes und der Median; [p-Wert] p-Wert *Kruskal-Wallis*-Test (globaler Vergleich der Gruppen); *Mann-Whitney*-Test *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 (multipler paarweiser Vergleich jeweils zweier Gruppen); T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen=Kontrollprobanden

Gruppenvergleich mit Adjustierung

Bei der Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Antigen-stimulierten Zytokinausschüttung in Form der zwei adjustierten Modelle, im Einzelnen das anthropometrische Modell und das klinisch-chemische Modell, zeigten sich in Abhängigkeit vom angewandten Modell in unterschiedlichem Maße Unterschiede zwischen den Gruppen.

Anthropometrisches Modell

Beim anthropometrischen Modell zeigten sich Unterschiede beim Zytokin IL-6 in Hinsicht auf den PBS24-Wert, beim Zytokin IL-8 für die Stimulation mit GAD und beim Zytokin RANTES für die Stimulation mit LPS (siehe Tabelle 21; Abb.6).

Im Hinblick auf den PBS24-Wert beim Zytokin IL-6 stellte sich ein Unterschied zwischen der Gruppe der Typ 1 Diabetiker mit einem höheren Median und der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit einem geringeren Median dar.

Beim Zytokin RANTES zeigte sich für die Stimulation mit LPS ein Unterschied zwischen der Gruppe der Kontrollprobanden mit einem höheren Median und der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit einem geringeren Median.

Die Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Gruppen im Rahmen der Anwendung des paarweisen Vergleichs jeweils zweier Gruppen ließ beim Zytokin IL-8 für die Stimulation mit GAD kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennen.

Klinisch-chemisches Modell

Beim klinisch-chemischen Modell stellten sich beim Zytokin IL-1 β für den PBS24-Wert, beim Zytokin IL-6 sowohl für den PBS24-Wert als auch für die Stimulation mit LPS, beim Zytokin IL-8 für die Stimulation mit p277, beim Zytokin TNF- α für den PBS24-Wert und beim Zytokin RANTES für den PBS24-Wert sowie für die Stimulationen mit PHA und LPS Unterschiede zwischen den Gruppen dar (siehe Tabelle 21; Abb.7,8).

Beim Zytokin IL-1 β zeigte sich beim PBS24-Wert ein Unterschied zwischen der Gruppe der LADA Diabetiker mit einem höheren Median und der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit einem geringeren Median.

Für den PBS24-Wert beim Zytokin IL-6 wurden Unterschiede zwischen der Gruppe der Typ 1 Diabetiker mit jeweils einem höheren Median und der Gruppe der Typ 2 Diabetiker beziehungsweise der Gruppe der Kontrollprobanden mit einem geringeren Median sichtbar.

Tabelle 21: Übersicht über den adjustierten Vergleich der Gruppen bei Vollblutstimulation

Zytokin und Stimulation		Adjustiertes Modell 1						Adjustiertes Modell 2					
		Anzahl n					p-Wert	Anzahl n					p-Wert
		G	1	2	3	4		G	1	2	3	4	
IL-1 β	PBS24	45	5	20	5	15	0,4371	44	5	20	4	15	0,0260
	PHA	49	6	22	5	16	0,7330	48	6	22	4	16	0,1774
	LPS	46	6	21	4	15	0,6066	45	6	21	3	15	0,1143
	GAD	48	6	22	4	16	0,8817	47	6	22	3	16	0,6949
	p277	47	6	20	5	16	0,5639	46	6	20	4	16	0,4107
	ConPep	48	6	21	5	16	0,7468	47	6	21	4	16	0,5402
IL-6	PBS24	46	6	20	5	15	0,0163	45	6	20	4	15	<0,0001
	PHA	46	5	21	5	15	0,7589	45	5	21	4	15	0,3965
	LPS	48	6	22	5	15	0,2466	47	6	22	4	15	0,0107*
	GAD	48	6	21	5	16	0,4344	47	6	21	4	16	0,8140
	p277	44	6	18	5	15	0,9430	43	6	18	4	15	0,9214
	ConPep	45	6	18	5	16	0,3973	44	6	18	4	16	0,7875
IL-8	PBS24	49	6	22	5	16	0,2340	48	6	22	4	16	0,1288
	PHA	44	5	20	4	15	0,8904	43	5	20	3	15	0,7514
	LPS	49	6	22	5	16	0,7464	48	6	22	4	16	0,2754*
	GAD	47	6	22	3	16	0,0351	47	6	22	3	16	0,0849
	p277	38	5	17	2	14	0,0808	38	5	17	2	14	0,0377
	ConPep	45	6	22	2	15	0,6835	45	6	22	2	15	0,8531
TNF- α	PBS24	47	6	21	5	15	0,3063	46	6	21	4	15	0,0239
	PHA	49	6	22	5	16	0,4154	48	6	22	4	16	0,0877
	LPS	44	6	19	4	15	0,4978	43	6	19	3	15	0,0586
	GAD	48	6	22	4	16	0,2562	47	6	22	3	16	0,3927
	p277	46	6	19	5	16	0,2193	45	6	19	4	16	0,5253
	ConPep	49	6	22	5	16	0,1926	48	6	22	4	16	0,2093
IP10	PBS24	48	6	22	5	15	0,4799	47	6	22	4	15	0,4811*
	PHA	48	5	22	5	16	0,2095	47	5	22	4	16	0,3450
	LPS	48	6	22	5	15	0,1876*	47	6	22	4	15	0,2958*
	GAD	47	6	22	4	15	0,5517	46	6	22	3	15	0,5772
	p277	42	6	17	4	15	0,5517	42	6	17	4	15	0,5339
	ConPep	46	6	21	5	14	0,1586	45	6	21	4	14	0,2290
RANTES	PBS24	41	6	20	5	10	0,3055	40	6	20	4	10	0,0475
	PHA	42	5	22	4	11	0,2834	41	5	22	3	11	0,0278
	LPS	43	6	22	5	10	0,0296	42	6	22	4	10	0,0093
	GAD	46	6	21	5	14	0,0697*	45	6	21	4	14	0,0680
	p277	42	6	20	5	11	0,5548	41	6	20	4	11	0,1885
	ConPep	39	6	20	4	9	0,7205	38	6	20	3	9	0,3365

Angegeben ist jeweils die Anzahl der in die Modellberechnung einbezogenen Probanden insgesamt (G) und für die einzelnen Gruppen (1=Typ 1 Diabetiker; 2=Typ 2 Diabetiker; 3=LADA Diabetiker; 4=Kontrollprobanden) sowie der p-Wert des Gruppenvergleichs mit einem multiplen linearen Regressionsmodell [Adjustiertes Modell 1 (anthropometrisches Modell): Adjustierung für Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI; Adjustiertes Modell 2 (klinisch-chemisches Modell): Adjustierung für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid]; Residuen auf Normalverteilung untersucht (*Shapiro-Wilk-Test*), *Residuen teststatistisch nicht normalverteilt

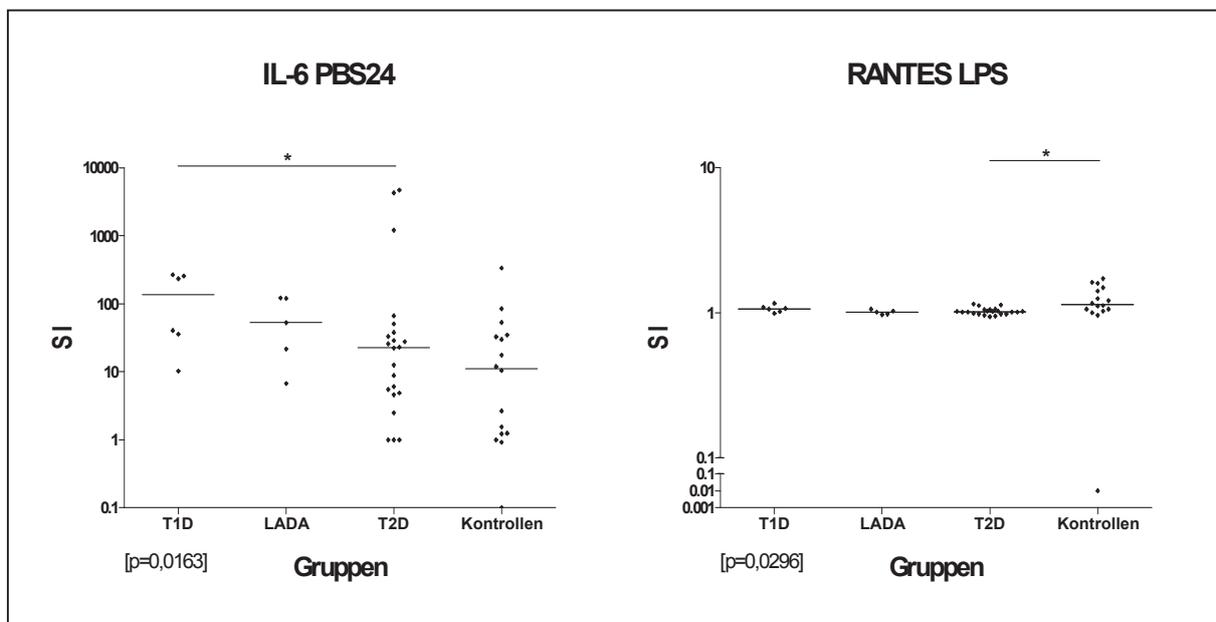


Abb.6: Übersicht über den adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem anthropometrischen Modell bei Vollblutstimulation

SI: Stimulationsindex [PBS24: Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 0h; LPS: Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; dargestellt sind individuelle Stimulationsindizes und der Median; [p-Wert]=p-Wert Adjustiertes Modell 1 (anthropometrisches Modell): multiples lineares Regressionsmodell mit Adjustierung für Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI; *Tukey-Kramer-Post-Hoc-Test* mit Adjustierung für Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$; T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen=Kontrollprobanden

Des Weiteren zeigte sich ein Unterschied zwischen der Gruppe der LADA Diabetiker mit einem höheren Median und der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit einem im Vergleich geringeren Median. Für die Stimulation mit LPS beim Zytokin IL-6 konnten Unterschiede zwischen der Gruppe der Typ 2 Diabetiker und der Gruppe der Typ 1 Diabetiker beziehungsweise der Gruppe der LADA Diabetiker festgestellt werden, wobei die Gruppe der Typ 2 Diabetiker jeweils im Vergleich einen höheren Median aufwies.

Beim Zytokin IL-8 zeigten sich für die Stimulation mit p277 Unterschiede sowohl zwischen der Gruppe der Typ 1 Diabetiker mit einem höheren Median und der Gruppe der LADA Diabetiker mit einem im Vergleich geringeren Median als auch zwischen der Gruppe der Kontrollprobanden mit einem höheren Median und der Gruppe der LADA Diabetiker mit einem im Vergleich geringeren Median.

Hinsichtlich des PBS24-Wertes beim Zytokin TNF- α konnte ein Unterschied zwischen der Gruppe der Typ 1 Diabetiker mit einem höheren Median und der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit einem im Vergleich geringeren Median beobachtet werden.

Beim Zytokin RANTES zeigte sich für den PBS24-Wert und die Stimulation mit PHA ein Unterschied zwischen den Gruppen der Typ 2 Diabetiker und der Kontrollprobanden, wobei die Gruppe der Typ 2 Diabetiker im Hinblick auf den PBS24-Wert einen höheren Median und

die Gruppe der Kontrollprobanden für die Stimulation mit PHA einen höheren Median aufwies. Für die Stimulation mit LPS wurden Unterschiede zwischen der Gruppe der Kontrollprobanden mit einem höheren Median und der Gruppe der Typ 2 Diabetiker beziehungsweise der Gruppe der LADA Diabetiker mit jeweils einem im Vergleich geringeren Median sichtbar.

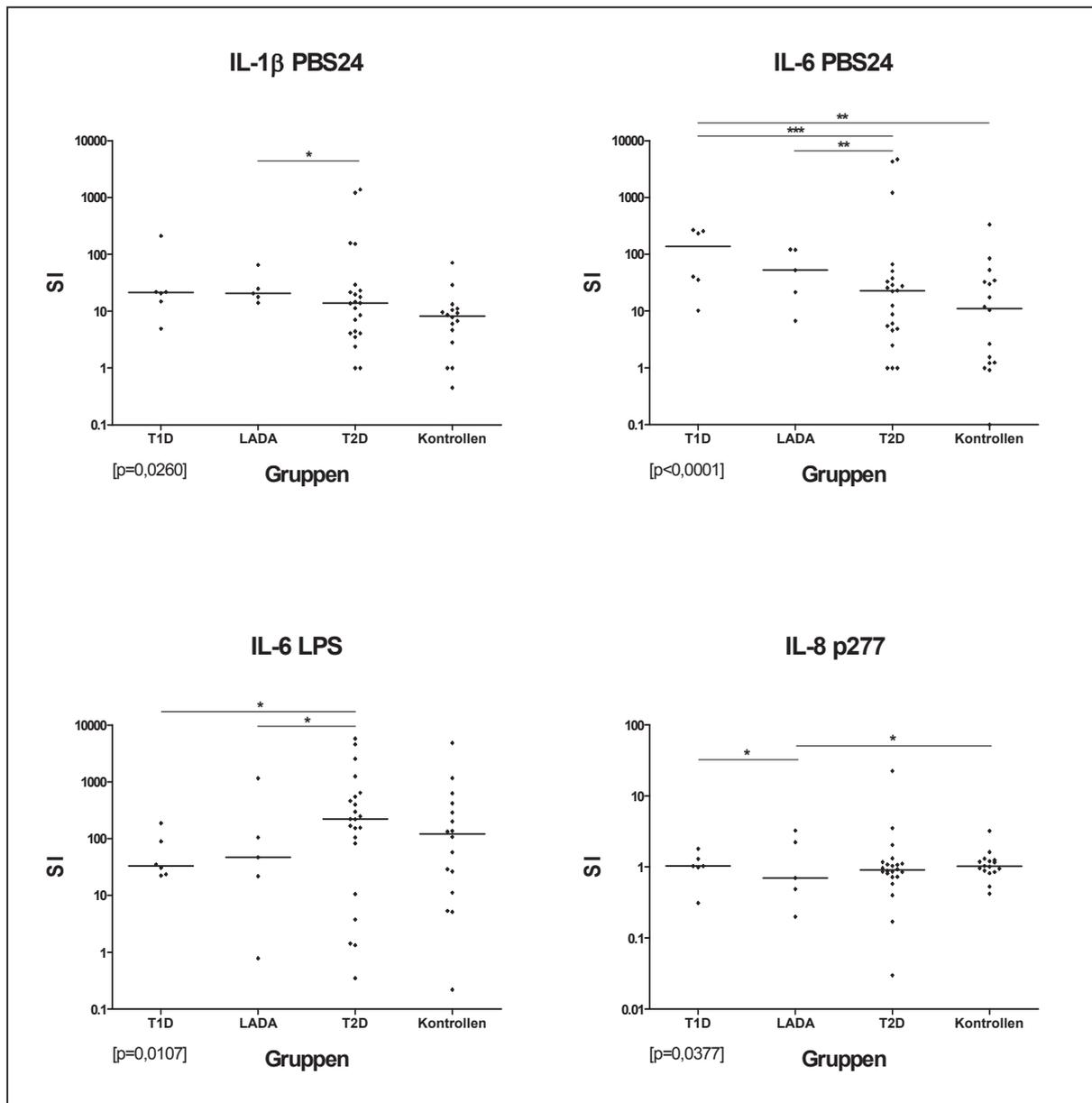


Abb.7: Übersicht über den adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem klinisch-chemischen Modell bei Vollblutstimulation (Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8)

SI: Stimulationsindex [PBS24: Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 0h; LPS,p277: Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; dargestellt sind individuelle Stimulationsindizes und der Median; [p-Wert]=p-Wert Adjustiertes Modell 2 (klinisch-chemisches Modell): multiples lineares Regressionsmodell mit Adjustierung für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid; *Tukey-Kramer-Post-Hoc-Test* mit Adjustierung für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$; T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA= LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen= Kontrollprobanden

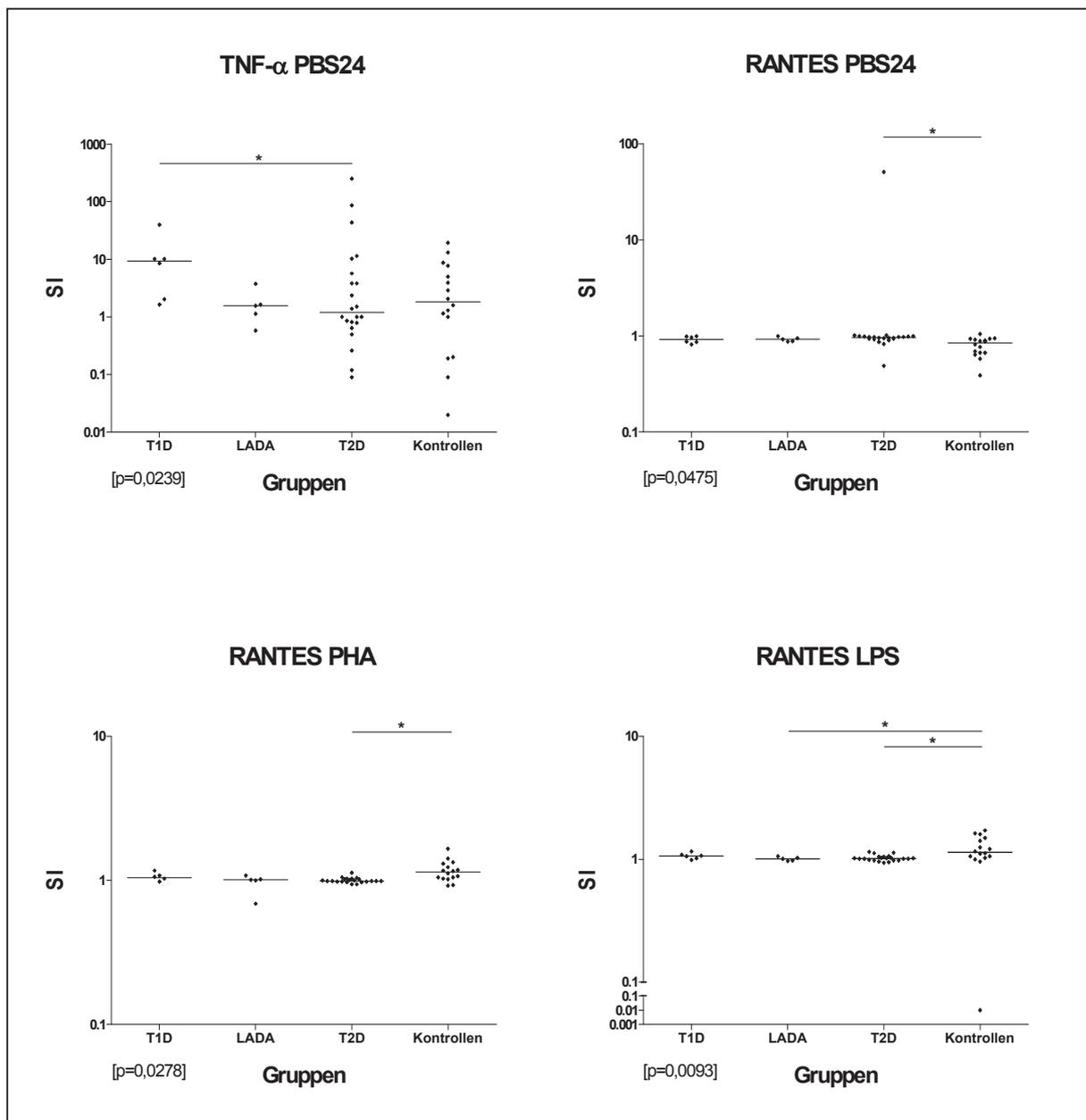


Abb.8: Übersicht über den adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem klinisch-chemischen Modell bei Vollblutstimulation (Zytokine TNF- α , RANTES)

SI: Stimulationsindex [PBS24: Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 0h; PHA,LPS: Zytokin-[c] mit Stimulation nach 24h/Zytokin-[c] ohne Stimulation nach 24h]; dargestellt sind individuelle Stimulationsindizes und der Median; [p-Wert]=p-Wert Adjustiertes Modell 2 (klinisch-chemisches Modell): multiples lineares Regressionsmodell mit Adjustierung für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid; *Tukey-Kramer-Post-Hoc-Test* mit Adjustierung für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid *= $p<0,05$, **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$; T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA= LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen= Kontrollprobanden

Zusammenfassend wurden beim Gruppenvergleich ohne Adjustierung für die Typ 1 Diabetiker und die LADA Diabetiker beim Zytokin IL-1 β im Vergleich zu den Kontrollprobanden für den PBS24-Wert jeweils erhöhte Mediane angezeigt. Beim Zytokin RANTES wurde für die Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu den Kontrollprobanden für den PBS24-Wert ein erhöhter Median angezeigt. Des Weiteren wurden beim Zytokin RANTES bei den Kontrollprobanden für die Stimulationen mit PHA, LPS, GAD sowie p277 im Vergleich zu den Typ 2

Diabetikern respektive für die Stimulationen mit PHA und LPS im Vergleich zu den LADA Diabetikern erhöhte Mediane sichtbar.

Unter Berücksichtigung des Gruppenvergleichs unter Anwendung des anthropometrischen Modells wiesen die Typ 1 Diabetiker beim Zytokin IL-6 für den PBS24-Wert im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern einen erhöhten Median und die Kontrollprobanden beim Zytokin RANTES für die Stimulation mit LPS im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern einen erhöhten Median auf.

Der Gruppenvergleich unter Anwendung des klinisch-chemischen Modells zeigte für den PBS24-Wert erhöhte Mediane bei den Zytokinen IL-1 β und IL-6 für die LADA Diabetiker im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern, darüber hinaus beim Zytokin IL-6 für die Typ 1 Diabetiker einen erhöhten Median im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern und Kontrollprobanden. Des Weiteren wiesen beim Zytokin IL-6 für die Stimulation mit LPS die Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern und den LADA Diabetikern erhöhte Mediane auf. Beim Zytokin IL-8 wurden für die Stimulation mit p277 höhere Mediane für die Typ 1 Diabetiker und Kontrollprobanden im Vergleich zu den LADA Diabetikern sichtbar, während beim Zytokin TNF- α für den PBS24 Wert die Typ 1 Diabetiker im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern einen höheren Median aufzeigten. Ferner wurden beim Zytokin RANTES für den PBS24-Wert bei den Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu den Kontrollprobanden, für die Stimulation mit PHA bei den Kontrollprobanden im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern sowie für die Stimulation mit LPS bei den Kontrollprobanden im Vergleich zu den LADA Diabetikern und Typ 2 Diabetikern jeweils erhöhte Mediane beobachtet.

3.2.3 Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und anthropometrischen oder klinisch-chemischen Einflussfaktoren bei Vollblutstimulation

Im Rahmen der Vollblutstimulation sollte die Fragestellung untersucht werden, inwiefern bei einer 24stündigen Stimulation von Zellen im Vollblut mit bestimmten Antigenen ein Zusammenhang zwischen der Antigen-reaktiven Antwort in Form einer Zytokinausschüttung und bestimmten anthropometrischen und klinisch-chemischen Einflussfaktoren festgestellt werden kann.

Nachfolgend wurde die Untersuchung auf Zusammenhänge entsprechend einer Assoziation in Form einer Korrelationsuntersuchung beziehungsweise entsprechend einer Abhängigkeit in Form einer Regressionsuntersuchung durchgeführt.

Es wurden bei jedem Probanden für jedes Zytokin und jede Stimulation jeweils Stimulationsindizes in Form von Quotienten gebildet. Für die Stimulationen mit LPS, PHA, GAD, p277

und ConPep wurde der Quotient von der Zytokinkonzentration mit Stimulation nach 24h und der Zytokinkonzentration ohne Stimulation nach 24h berechnet. Für den PBS24-Wert als Maß für die Ruhesekretion wurde der Quotient von der Zytokinkonzentration ohne Stimulation nach 24h und der Zytokinkonzentration ohne Stimulation nach 0h bei Versuchsbeginn berechnet.

Unter Berücksichtigung der geringen Anzahl an Probanden in den Gruppen der Typ 1 Diabetiker und der LADA Diabetiker wurden die beiden Gruppen zusammengefügt.

Untersuchung auf Assoziationen

Eine Untersuchung auf Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren erfolgte in Form einer Korrelationsanalyse anhand der Berechnung des *Spearman*-Korrelationskoeffizienten mit entsprechendem p-Wert. In Analogie zu den für die Adjustierung des Gruppenvergleichs angewandten Modellen stellten zum einen die anthropometrischen Parameter wie Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI sowie zum anderen die klinisch-chemischen Parameter wie Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid jeweils die in die Untersuchung einbezogenen Einflussfaktoren dar.

Eine Untersuchung auf Assoziationen wurde nur bei den Kombinationen von Zytokin und Stimulation beziehungsweise PBS24-Wert durchgeführt, bei denen ein Unterschied zwischen den Gruppen aufgezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.2).

In den nachfolgenden Tabellen wird eine Übersicht über die Ergebnisse der Korrelationsuntersuchung dargestellt, indem für jede Gruppe getrennt die berechneten Korrelationskoeffizienten mit dem entsprechenden p-Wert sowie die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden angegeben sind (Tabellen 22,23,24,25,26,27).

Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker

Bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker und der LADA Diabetiker wurden bei den Zytokinen IL-1 β und RANTES Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren sichtbar (siehe Tabellen 22,23).

Beim Zytokin IL-1 β zeigte sich beim PBS24-Wert ein positiver Korrelationskoeffizient für das Alter, während beim Zytokin RANTES bei der Stimulation mit PHA ein negativer Korrelationskoeffizient für das Alter beobachtet werden konnte. Des Weiteren wurden beim Zytokin RANTES bei der Stimulation mit LPS und GAD für das C-Peptid jeweils positive Korrelationskoeffizienten angezeigt.

Tabelle 22: Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker bei Vollblutstimulation (anthropometrische Einflussfaktoren)

Zytokin	Stimulation	Geschlecht	Alter	Diabetesdauer	BMI
IL-1 β	PBS24	0,11 (0,7970) [8]	0,71 (0,0465) [8]	0,43 (0,3374) [7]	0,14 (0,7358) [8]
IL-6	PBS24	- 0,17 (0,6105) [11]	0,47 (0,1420) [11]	0,42 (0,2291) [10]	0,20 (0,5554) [11]
IL-6	LPS	- 0,17 (0,6559) [9]	- 0,28 (0,4600) [9]	0,22 (0,5755) [9]	- 0,42 (0,2646) [9]
IL-8	GAD	- 0,10 (0,7740) [10]	- 0,18 (0,6272) [10]	- 0,03 (0,9322) [9]	- 0,41 (0,2443) [10]
IL-8	p277	- 0,40 (0,2177) [11]	0,14 (0,6893) [11]	- 0,48 (0,1615) [10]	- 0,50 (0,1173) [11]
TNF- α	PBS24	0,29 (0,3893) [11]	- 0,05 (0,8944) [11]	0,61 (0,0600) [10]	- 0,49 (0,1252) [11]
RANTES	PBS24	- 0,06 (0,8661) [11]	0,37 (0,2589) [11]	0,22 (0,5334) [10]	- 0,33 (0,3259) [11]
RANTES	PHA	0,09 (0,8153) [9]	- 0,67 (0,0499) [9]	- 0,57 (0,1390) [8]	- 0,43 (0,2440) [9]
RANTES	LPS	0,46 (0,1527) [11]	- 0,42 (0,2006) [11]	- 0,36 (0,3104) [10]	- 0,03 (0,9366) [11]
RANTES	GAD	0,52 (0,1014) [11]	- 0,07 (0,8317) [11]	- 0,15 (0,6761) [10]	- 0,05 (0,8944) [11]
RANTES	p277	0,00 (1,0000) [11]	- 0,07 (0,8317) [11]	- 0,22 (0,5334) [10]	0,05 (0,8944) [11]

Angegeben ist jeweils der *Spearman*-Korrelationskoeffizient mit dem p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []; Typ 1 und LADA Diabetiker n=11; Geschlecht (m=1/w=2)

Tabelle 23: Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker bei Vollblutstimulation (klinisch-chemische Einflussfaktoren)

Zytokin	Stimulation	Blutglukose	HbA1c	Triglyceride	C-Peptid
IL-1 β	PBS24	0,43 (0,2894) [8]	0,43 (0,2829) [8]	0,25 (0,5479) [8]	0,43 (0,3374) [7]
IL-6	PBS24	0,59 (0,0739) [10]	0,05 (0,8834) [11]	0,56 (0,0750) [11]	0,02 (0,9468) [10]
IL-6	LPS	- 0,07 (0,8665) [8]	0,28 (0,4700) [9]	0,03 (0,9489) [9]	- 0,63 (0,0909) [8]
IL-8	GAD	- 0,62 (0,0769) [9]	0,04 (0,9068) [10]	0,58 (0,0765) [10]	- 0,43 (0,2520) [9]
IL-8	p277	- 0,62 (0,0537) [10]	- 0,50 (0,1154) [11]	0,27 (0,4149) [11]	0,01 (0,9867) [10]
TNF- α	PBS24	0,15 (0,6761) [10]	0,37 (0,2629) [11]	0,00 (1,0000) [11]	- 0,55 (0,0972) [10]
RANTES	PBS24	- 0,49 (0,1497) [10]	- 0,20 (0,5628) [11]	0,18 (0,5909) [11]	- 0,57 (0,0844) [10]
RANTES	PHA	- 0,12 (0,7789) [8]	- 0,17 (0,6669) [9]	- 0,14 (0,7150) [9]	0,19 (0,6514) [8]
RANTES	LPS	- 0,04 (0,9074) [10]	- 0,27 (0,4231) [11]	- 0,16 (0,6388) [11]	0,64 (0,0443) [10]
RANTES	GAD	0,12 (0,7514) [10]	0,04 (0,9151) [11]	- 0,04 (0,9045) [11]	0,70 (0,0245) [10]
RANTES	p277	0,21 (0,5563) [10]	- 0,04 (0,9045) [11]	- 0,47 (0,1488) [11]	- 0,18 (0,6141) [10]

Angegeben ist jeweils der *Spearman*-Korrelationskoeffizient mit dem p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []; Typ 1 und LADA Diabetiker n=11

Tabelle 24: Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Typ 2 Diabetiker bei Vollblutstimulation (anthropometrische Einflussfaktoren)

Zytokin	Stimulation	Geschlecht	Alter	Diabetesdauer	BMI
IL-1 β	PBS24	0,01 (0,9710) [20]	- 0,23 (0,3306) [20]	0,17 (0,4989) [18]	0,03 (0,9098) [20]
IL-6	PBS24	0,10 (0,6946) [19]	- 0,02 (0,9431) [19]	- 0,13 (0,6316) [17]	0,12 (0,6108) [19]
IL-6	LPS	- 0,30 (0,2237) [18]	0,08 (0,7664) [18]	- 0,09 (0,7255) [17]	- 0,35 (0,1573) [18]
IL-8	GAD	0,24 (0,3180) [20]	- 0,18 (0,4465) [20]	- 0,39 (0,1083) [18]	- 0,21 (0,3765) [20]
IL-8	p277	0,52 (0,0279) [18]	0,35 (0,1521) [18]	0,22 (0,3949) [17]	- 0,11 (0,6627) [18]
TNF- α	PBS24	- 0,21 (0,3726) [21]	0,12 (0,6073) [21]	0,09 (0,7096) [19]	- 0,23 (0,3153) [21]
RANTES	PBS24	- 0,04 (0,8757) [19]	0,22 (0,3670) [19]	- 0,38 (0,1156) [18]	0,25 (0,3037) [19]
RANTES	PHA	0,09 (0,6838) [21]	- 0,17 (0,4714) [21]	0,12 (0,6265) [19]	- 0,05 (0,8230) [21]
RANTES	LPS	0,22 (0,3369) [21]	- 0,12 (0,6099) [21]	0,21 (0,3888) [19]	0,12 (0,6099) [21]
RANTES	GAD	0,22 (0,3561) [20]	- 0,09 (0,6958) [20]	0,55 (0,0156) [19]	0,08 (0,7336) [20]
RANTES	p277	0,04 (0,8743) [19]	- 0,09 (0,7157) [19]	0,40 (0,1006) [18]	0,01 (0,9602) [19]

Angegeben ist jeweils der *Spearman*-Korrelationskoeffizient mit dem p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []; Typ 2 Diabetiker n=22; Geschlecht (m=1/w=2)

Tabelle 25: Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Typ 2 Diabetiker bei Vollblutstimulation (klinisch-chemische Einflussfaktoren)

Zytokin	Stimulation	Blutglukose	HbA1c	Triglyceride	C-Peptid
IL-1 β	PBS24	0,20 (0,3921) [20]	0,28 (0,2577) [18]	0,56 (0,0108) [20]	0,18 (0,4470) [20]
IL-6	PBS24	- 0,05 (0,8526) [19]	0,36 (0,1602) [17]	0,77 (0,0001) [19]	- 0,00 (0,9857) [19]
IL-6	LPS	- 0,03 (0,8997) [18]	- 0,61 (0,0120) [16]	- 0,45 (0,0630) [18]	- 0,05 (0,8416) [18]
IL-8	GAD	- 0,21 (0,3695) [20]	0,03 (0,9027) [18]	0,32 (0,1852) [19]	0,17 (0,4807) [20]
IL-8	p277	0,41 (0,0931) [18]	0,41 (0,1130) [16]	0,28 (0,2774) [17]	- 0,38 (0,1232) [18]
TNF- α	PBS24	0,25 (0,2683) [21]	0,22 (0,3726) [19]	0,42 (0,0688) [20]	0,15 (0,5212) [21]
RANTES	PBS24	- 0,44 (0,0574) [19]	- 0,21 (0,4129) [18]	0,43 (0,0746) [18]	- 0,00 (0,9886) [19]
RANTES	PHA	0,20 (0,3814) [21]	0,28 (0,2365) [20]	- 0,01 (0,9749) [20]	- 0,05 (0,8380) [21]
RANTES	LPS	0,23 (0,3160) [21]	0,17 (0,4669) [20]	- 0,10 (0,6865) [20]	0,08 (0,7408) [21]
RANTES	GAD	0,29 (0,2219) [20]	0,29 (0,2251) [19]	0,05 (0,8529) [19]	0,09 (0,7118) [20]
RANTES	p277	0,33 (0,1641) [19]	0,11 (0,6737) [18]	0,06 (0,8103) [18]	- 0,03 (0,8892) [19]

Angegeben ist jeweils der *Spearman*-Korrelationskoeffizient mit dem p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []; Typ 2 Diabetiker n=22

Tabelle 26: Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Kontrollprobanden bei Vollblutstimulation (anthropometrische Einflussfaktoren)

Zytokin	Stimulation	Geschlecht	Alter	Diabetesdauer	BMI
IL-1 β	PBS24	- 0,02 (0,9499) [14]	- 0,27 (0,3494) [14]	- -	- 0,15 (0,6217) [13]
IL-6	PBS24	0,28 (0,2935) [16]	0,51 (0,0413) [16]	- -	0,40 (0,1358) [15]
IL-6	LPS	- 0,08 (0,7571) [16]	- 0,44 (0,0848) [16]	- -	- 0,05 (0,8695) [15]
IL-8	GAD	- 0,25 (0,3463) [16]	- 0,29 (0,2739) [16]	- -	- 0,48 (0,0687) [15]
IL-8	p277	- 0,50 (0,0678) [14]	- 0,18 (0,5325) [14]	- -	- 0,10 (0,7479) [13]
TNF- α	PBS24	- 0,28 (0,2935) [16]	0,10 (0,7044) [16]	- -	0,15 (0,5848) [15]
RANTES	PBS24	- 0,07 (0,8167) [15]	0,35 (0,1961) [15]	- -	0,18 (0,5426) [14]
RANTES	PHA	- 0,20 (0,4668) [16]	- 0,10 (0,7207) [16]	- -	- 0,45 (0,0895) [15]
RANTES	LPS	- 0,31 (0,2529) [15]	- 0,12 (0,6757) [15]	- -	- 0,38 (0,1799) [14]
RANTES	GAD	- 0,31 (0,2737) [14]	0,32 (0,2668) [14]	- -	- 0,16 (0,5905) [13]
RANTES	p277	- 0,10 (0,7277) [15]	- 0,06 (0,8199) [15]	- -	- 0,50 (0,0694) [14]

Angegeben ist jeweils der *Spearman*-Korrelationskoeffizient mit dem p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []; Kontrollprobanden n=16; Geschlecht (m=1/w=2)

Tabelle 27: Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation für die Gruppe der Kontrollprobanden bei Vollblutstimulation (klinisch-chemische Einflussfaktoren)

Zytokin	Stimulation	Blutglukose	HbA1c	Triglyceride	C-Peptid
IL-1 β	PBS24	0,11 (0,7223) [12]	- 0,27 (0,3475) [14]	0,05 (0,8752) [14]	- 0,01 (0,9644) [13]
IL-6	PBS24	0,25 (0,3892) [14]	0,11 (0,6773) [16]	0,67 (0,0047) [16]	0,33 (0,2282) [15]
IL-6	LPS	- 0,19 (0,5152) [14]	- 0,21 (0,4398) [16]	- 0,28 (0,2996) [16]	- 0,32 (0,2391) [15]
IL-8	GAD	0,26 (0,3679) [14]	0,19 (0,4704) [16]	- 0,06 (0,8286) [16]	0,58 (0,0235) [15]
IL-8	p277	0,06 (0,8364) [13]	- 0,48 (0,0800) [14]	- 0,03 (0,9228) [14]	- 0,10 (0,7304) [14]
TNF- α	PBS24	- 0,07 (0,8101) [14]	0,25 (0,3456) [16]	0,46 (0,0757) [16]	0,33 (0,2363) [15]
RANTES	PBS24	- 0,18 (0,5628) [13]	0,01 (0,9848) [15]	0,34 (0,2208) [15]	- 0,40 (0,1605) [14]
RANTES	PHA	0,19 (0,5252) [14]	0,07 (0,7889) [16]	- 0,24 (0,3769) [16]	0,43 (0,1054) [15]
RANTES	LPS	- 0,15 (0,6327) [13]	0,04 (0,8782) [15]	- 0,26 (0,3441) [15]	0,30 (0,3056) [14]
RANTES	GAD	0,25 (0,4257) [12]	0,35 (0,2205) [14]	- 0,07 (0,8052) [14]	0,04 (0,8934) [13]
RANTES	p277	0,27 (0,3703) [13]	0,18 (0,5259) [15]	- 0,38 (0,1594) [15]	0,21 (0,4680) [14]

Angegeben ist jeweils der *Spearman*-Korrelationskoeffizient mit dem p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []; Kontrollprobanden n=16

Typ 2 Diabetiker

Für die Gruppe der Typ 2 Diabetiker wurden bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8 und RANTES Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren angezeigt (siehe Tabellen 24,25).

Beim Zytokin IL-1 β zeigte sich beim PBS24-Wert ein positiver Korrelationskoeffizient für die Triglyceride. Beim Zytokin IL-6 zeigte sich einmal beim PBS24-Wert für die Triglyceride ein positiver Korrelationskoeffizient und zum anderen konnte bei der Stimulation mit LPS für das HbA1c ein negativer Korrelationskoeffizient festgestellt werden. Darüber hinaus konnte beim Zytokin IL-8 bei der Stimulation mit p277 ein positiver Korrelationskoeffizient für das weibliche Geschlecht beobachtet werden, während beim Zytokin RANTES bei der Stimulation mit GAD ein positiver Korrelationskoeffizient für die Diabetesdauer angezeigt wurde.

Kontrollprobanden

Die Gruppe der Kontrollprobanden zeigte Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren bei den Zytokinen IL-6 und IL-8 (siehe Tabellen 26,27).

Beim Zytokin IL-6 zeigte sich beim PBS24-Wert ein positiver Korrelationskoeffizient für das Alter und ein positiver Korrelationskoeffizient für die Triglyceride. Des Weiteren konnte beim Zytokin IL-8 bei der Stimulation mit GAD ein positiver Korrelationskoeffizient für das C-Peptid beobachtet werden.

Untersuchung auf Abhängigkeiten

Eine Untersuchung auf Abhängigkeiten zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren erfolgte in Form einer Regressionsanalyse unter Anwendung eines multiplen linearen Regressionsverfahrens, um die im Rahmen der Korrelationsanalyse festgestellten Assoziation zu quantifizieren beziehungsweise nachfolgend für bestimmte Einflussfaktoren zu adjustieren. Es wurde jeweils der Regressionskoeffizient mit dem entsprechenden p-Wert berechnet. In Übereinstimmung mit den für die Adjustierung des Gruppenvergleichs verwendeten Modellen stellten zum einen die anthropometrischen Parameter wie Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI sowie zum anderen die klinisch-chemischen Parameter wie Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid die zur Adjustierung ausgewählten Einflussfaktoren dar. Es wurde dabei jeweils selektiv für einen Einflussfaktor des entsprechenden Modells adjustiert.

Eine Untersuchung auf Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Faktoren wurde nur bei den Kombinationen aus Zytokin und Stimulation beziehungsweise PBS24-Wert durchgeführt, bei denen eine Assoziation mit einem Einflussfaktor beobachtet werden konnte.

In einer nachfolgenden Tabelle wird eine Übersicht über die Ergebnisse der Regressionsuntersuchung gegeben, indem sowohl die berechneten Regressionskoeffizienten mit dem entsprechenden p-Wert als auch die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden angegeben sind (Tabelle 28).

Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker

Bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker wurden das Zytokin IL-1 β mit dem PBS24-Wert und das Zytokin RANTES mit den Stimulationen PHA, LPS und GAD weiterführend untersucht (siehe Tabelle 28).

Für das Zytokin IL-1 β zeigte sich beim PBS24-Wert eine geringe positive Anhängigkeit vom Alter, welche bei einer jeweiligen Adjustierung für das Geschlecht und dem BMI nur sehr wenig variierte und bei einer Adjustierung für die Diabetesdauer nicht nachweisbar war.

Beim Zytokin RANTES stellte sich bei der Stimulation mit PHA eine geringe negative Abhängigkeit vom Alter dar. Bei der Adjustierung für die Einflussfaktoren Geschlecht und BMI zeigte sich keine Veränderung und bei der Adjustierung für die Diabetesdauer war keine Abhängigkeit nachweisbar. Bei der Stimulation mit LPS zeigte sich im Rahmen der Untersuchung keine Abhängigkeit vom C-Peptid. Bei einer Adjustierung für Triglyceride konnte eine geringe positive Abhängigkeit beobachtet werden. Bei der Stimulation mit GAD zeigte sich eine geringe positive Abhängigkeit vom C-Peptid, welche bei einer Adjustierung für die Einflussfaktoren Blutglukose, HbA1c und Triglyceride nur eine geringe Veränderung aufzeigte.

Typ 2 Diabetiker

Bei der Gruppe der Typ 2 Diabetiker wurden das Zytokin IL-1 β mit dem PBS24-Wert, das Zytokin IL-6 mit dem PBS24-Wert und der Stimulation LPS, das Zytokin IL-8 mit der Stimulation p277 sowie das Zytokin RANTES mit der Stimulation GAD weiterführend untersucht (siehe Tabelle 28).

Beim Zytokin IL-1 β zeigte sich beim PBS24-Wert eine positive Anhängigkeit von den Triglyceriden, welche bei einer Adjustierung für die Einflussgrößen Blutglukose und C-Peptid keine Veränderungen aufwies. Bei der Adjustierung für die Einflussgröße HbA1c war keine Abhängigkeit nachweisbar.

Tabelle 28: Übersicht über die Untersuchung auf Regression bei Vollblutstimulation

Kriterium	Prediktor	β -Koeffizient	(p-Wert)	[n]
Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker				
IL-1β PBS24	Alter	0,025	(0,0157)	[8]
	+Geschlecht	0,026	(0,0194)	[8]
	+Diabetesdauer	0,009	(0,0510)	[7]
	+BMI	0,031	(0,0137)	[8]
RANTES PHA	Alter	- 0,005	(0,0064)	[9]
	+Geschlecht	- 0,005	(0,0120)	[9]
	+Diabetesdauer	- 0,004	(0,0506)	[8]
	+BMI	- 0,005	(0,0302)	[9]
RANTES LPS	C-Peptid	0,052	(0,0937)	[10]
	+Blutglukose	0,061	(0,0671)	[9]
	+HbA1c	0,045	(0,1676)	[10]
	+Triglyceride	0,064	(0,0477)	[10]
RANTES GAD	C-Peptid	0,068	(0,0103)	[10]
	+Blutglukose	0,073	(0,0133)	[9]
	+HbA1c	0,064	(0,0236)*	[10]
	+Triglyceride	0,072	(0,0136)	[10]
Typ 2 Diabetiker				
IL-1β PBS24	Triglyceride	1,262	(0,0143)	[20]
	+Blutglukose	1,262	(0,0162)	[20]
	+HbA1c	1,005	(0,0991)	[18]
	+C-Peptid	1,268	(0,0210)	[20]
IL-6 PBS24	Triglyceride	1,867	(<0,0001)	[19]
	+Blutglukose	1,844	(<0,0001)	[19]
	+HbA1c	1,589	(0,0026)*	[17]
	+C-Peptid	1,916	(<0,0001)	[19]
IL-6 LPS	HbA1c	- 0,862	(0,0542)	[16]
	+Blutglukose	- 1,365	(0,0679)	[16]
	+Triglyceride	- 0,718	(0,1382)	[16]
	+C-Peptid	- 0,878	(0,0610)	[16]
IL-8 p277	Geschlecht	0,301	(0,0604)	[18]
	+Alter	0,281	(0,0968)	[18]
	+Diabetesdauer	0,295	(0,1097)	[17]
	+BMI	0,301	(0,0693)	[18]
RANTES GAD	Diabetesdauer	0,001	(0,2748)*	[19]
	+Geschlecht	0,002	(0,1196)	[19]
	+Alter	0,001	(0,2530)	[19]
	+BMI	0,001	(0,2847)*	[19]
Kontrollprobanden				
IL-6 PBS24	Alter	0,145	(0,0108)	[16]
	+Geschlecht	0,139	(0,0147)	[16]
	+Diabetesdauer	-	-	-
	+BMI	0,137	(0,0118)	[15]
IL-6 PBS24	Triglyceride	2,510	(0,0062)	[16]
	+Blutglukose	2,726	(0,0077)	[14]
	+HbA1c	2,756	(0,0068)	[16]
	+C-Peptid	2,522	(0,0168)	[15]
IL-8 GAD	C-Peptid	0,693	(0,0181)	[15]
	+Blutglukose	0,987	(0,0094)	[13]
	+HbA1c	0,805	(0,0121)	[15]
	+Triglyceride	0,756	(0,0229)	[15]

Angeben ist jeweils das Kriterium (=abhängige Variable) und der/die Prediktor/en (=unabhängige Variable) mit dem entsprechenden β -Koeffizient (=Regressionskoeffizient) mit dem p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []; Residuen auf Normalverteilung untersucht (*Shapiro-Wilk-Test*), *Residuen teststatistisch nicht normalverteilt; Adjustierung jeweils selektiv mit einem festen und einem zusätzlichen Prediktor (+); Geschlecht (m=1/w=2)

Das Zytokin IL-6 wies beim PBS24-Wert eine positive Abhängigkeit von den Triglyceriden auf, welche bei einer Adjustierung für die Einflussfaktoren Blutglukose und C-Peptid durch eine geringe Veränderung und bei einer Adjustierung für HbA1c durch eine Verringerung gekennzeichnet war. Bei der Stimulation mit LPS konnte im Rahmen der Untersuchung mit und ohne Adjustierung keine Abhängigkeit vom HbA1c nachgewiesen werden.

Beim Zytokin IL-8 zeigte sich bei der Stimulation mit p277 mit und ohne Adjustierung keine Abhängigkeit vom Geschlecht und beim Zytokin RANTES war bei der Stimulation mit GAD mit und ohne Adjustierung keine Abhängigkeit von der Diabetesdauer sichtbar.

Kontrollprobanden

Bei der Gruppe der Kontrollprobanden wurden die Zytokine IL-6 mit dem PBS24-Wert und IL-8 mit der Stimulation GAD weiterführend untersucht (siehe Tabelle 28).

Beim Zytokin IL-6 war beim PBS24-Wert eine positive Abhängigkeit vom Alter nachweisbar. Eine nachfolgende Adjustierung für die Einflussgrößen Geschlecht, Diabetesdauer und BMI zeigte keine Veränderung hinsichtlich des Ausmaßes der Abhängigkeit. Des Weiteren zeigte sich beim PBS24-Wert eine positive Abhängigkeit von den Triglyceriden, wobei im Rahmen einer Adjustierung für die Einflussfaktoren Blutglukose, HbA1c und C-Peptid in quantitativer Hinsicht im geringen Maße eine Steigerung erkennbar wurde.

Beim Zytokin IL-8 war bei der Stimulation mit GAD eine positive Abhängigkeit vom C-Peptid nachweisbar. Eine nachfolgende Adjustierung für die Einflussgrößen Geschlecht, Diabetesdauer und BMI zeigte nur geringe Veränderungen.

Zusammenfassend zeigten sich bei den verschiedenen Gruppen in einem unterschiedlichen Maße Assoziationen beziehungsweise Abhängigkeiten zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren.

Bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker wurde für das Zytokin IL-1 β beim PBS24-Wert eine positive Assoziation mit beziehungsweise eine geringe positive Abhängigkeit vom Alter sichtbar, wobei letztere bei einer Adjustierung für die Diabetesdauer nicht nachweisbar war. Für das Zytokin RANTES zeigte sich bei der Stimulation mit PHA eine negative Assoziation mit beziehungsweise eine geringe negative Abhängigkeit vom Alter, wobei letztere bei einer Adjustierung für die Diabetesdauer nicht nachweisbar war. Bei der Stimulationen mit LPS zeigte sich eine positive Assoziation mit dem C-Peptid. Bei der Stimulation mit GAD wurde eine positive Assoziation mit beziehungsweise eine geringe positive und unter Adjustierung bestehen bleibende Abhängigkeit vom C-Peptid aufgezeigt.

Bei der Gruppe der Typ 2 Diabetiker wurde für das Zytokin IL-1 β beim PBS24-Wert eine positive Assoziation mit beziehungsweise eine positive Abhängigkeit von den Triglyceriden sichtbar, wobei letztere bei einer Adjustierung für HbA1c nicht nachweisbar war. Für das Zytokin IL-6 zeigte sich beim PBS24-Wert eine positive Assoziation mit beziehungsweise eine positive und unter Adjustierung bestehen bleibende Abhängigkeit von den Triglyceriden. Für die Stimulation mit LPS wurde eine negative Assoziation mit HbA1c aufgezeigt. Des Weiteren zeigten sich positive Assoziationen für das Zytokin IL-8 zwischen der Stimulation mit p277 und dem weiblichen Geschlecht beziehungsweise für das Zytokin RANTES zwischen der Stimulation mit GAD und der Diabetesdauer.

Für die Gruppe der Kontrollprobanden wurde für das Zytokin IL-6 beim PBS24-Wert sowohl eine positive Assoziation mit beziehungsweise geringe positive Abhängigkeit vom Alter als auch eine positive Assoziation mit beziehungsweise positive Abhängigkeit von den Triglyceriden aufgezeigt, wobei die Abhängigkeiten unter Adjustierung nachweisbar blieben. Für das Zytokin IL-8 mit der Stimulation GAD konnte eine positive Assoziation mit beziehungsweise positive und unter Adjustierung bestehen bleibende Abhängigkeit vom Alter aufgezeigt werden.

3.3 Ergebnisse der Leukozytenstimulation

3.3.1 Vergleich der Gruppen nach Leukozytenstimulation

Im Rahmen der Leukozytenstimulation sollte die Fragestellung untersucht werden, inwiefern bei Zellüberständen von ELISPOT-Ansätzen ein Unterschied zwischen den oben genannten Gruppen bezüglich Antigen-reaktiver Antworten in Form einer Zytokinausschüttung beobachtet werden kann.

Es wurden bei jedem Probanden für jedes Zytokin und jede Stimulation jeweils Stimulationsindizes in Form von Quotienten gebildet. Für die Stimulationen mit PI, HSP60, p277, GAD und pIA-2 wurde der Quotient von der Zytokinkonzentration mit Stimulation und der Zytokinkonzentration ohne Stimulation berechnet.

Die Gruppen wurden für alle Zytokine mit einem nicht adjustierten Modell und bei einer Auswahl von Zytokinen unter Anwendung zweier adjustierter Modelle statistisch auf Unterschiede untersucht. In Abhängigkeit vom Skalenniveau wurden unterschiedliche Verfahren verwendet.

Die Zytokine MCP-1, IP10 und RANTES wurden nachfolgend als metrische Daten und die Zytokine IL-1RI, IL-5, IL-6 und TNF- α als kategoriale Daten in Form von Häufigkeiten

ausgewertet. Beim Zytokin IL-1RI wurde die Anzahl an Probanden mit einem Stimulationsindex größer dem Median in Relation zur Gesamtanzahl an Probanden und bei den Zytokinen IL-5, IL-6 und TNF- α die Anzahl an Probanden mit einem Stimulationsindex größer als die Zahl 1 in Relation zur Gesamtanzahl an Probanden angegeben.

Bei den metrischen Daten erfolgte die Untersuchung unter Anwendung eines nicht adjustierten Modells und zweier adjustierter Modelle.

Im Rahmen eines unadjustierten Modells erfolgte eine Untersuchung auf Unterschiede in Form des *Kruskal-Wallis*-Tests zum Vergleich aller vier Gruppen und bei signifikantem Ergebnis nachfolgend anhand des *Mann-Whitney*-Tests zum paarweisen Vergleich jeweils zweier Gruppen.

Im Rahmen der beiden adjustierten Modelle erfolgte eine Untersuchung auf Unterschiede unter Anwendung eines multiplen linearen Regressionsverfahrens zum Vergleich aller vier Gruppen und bei signifikantem Ergebnis nachfolgend anhand des *Tukey-Kramer-Post-Hoc*-Tests zum paarweisen Vergleich jeweils zweier Gruppen. Als adjustierte Modelle fungierten zum einen das sogenannte anthropometrische Modell, bei dem eine Adjustierung für die Einflussfaktoren Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI vorgenommen wurde, und zum anderen das sogenannte klinisch-chemische Modell, bei dem eine Adjustierung für die Einflussfaktoren Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid vorgenommen wurde.

Bei den kategorialen Daten erfolgte die Untersuchung für das Zytokin IL-1RI unter Anwendung eines nicht adjustierten Modells und zweier adjustierter Modelle und für die Zytokine IL-5, IL-6 und TNF- α unter Anwendung eines nicht adjustierten Modells.

Im Rahmen eines unadjustierten Modells erfolgte eine Untersuchung auf Unterschiede in Form des *Freeman-Halton*-Tests zum Vergleich aller vier Gruppen und bei signifikantem Ergebnis nachfolgend anhand des *Fisher-Exact*-Tests zum paarweisen Vergleich jeweils zweier Gruppen.

Im Rahmen der beiden adjustierten Modelle erfolgt eine Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Gruppen unter Anwendung eines logistischen Regressionsverfahrens. Als adjustierte Modelle fungierten zum einen das sogenannte anthropometrische Modell, bei dem eine Adjustierung für die Einflussfaktoren Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI vorgenommen wurde, und zum anderen das sogenannte klinisch-chemische Modell, bei dem eine Adjustierung für die Einflussfaktoren Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid vorgenommen wurde.

In zwei nachfolgenden Tabellen sind für die Zytokine MCP-1, IP10 und RANTES die ermittelten Mediane der berechneten Stimulationsindizes und für die Zytokine IL-1RI, IL-5, IL-6 und TNF- α die Anzahl an Probanden mit einem Stimulationsindex größer dem Median

beziehungsweise größer als die Zahl 1 in Relation zur Gesamtanzahl an Probanden sowie der entsprechende p-Wert des nicht adjustierten Vergleichs aller vier Gruppen angegeben (Tabellen 29,30). In einer Abbildung werden die Ergebnisse des nicht adjustierten Vergleichs jeweils zweier Gruppen dargestellt (Abb.9). Des Weiteren werden für die Zytokine MCP-1, IP10, RANTES und IL-1RI tabellarisch die Ergebnisse des adjustierten Vergleichs aller vier Gruppen in Form der zwei beschriebenen Modelle mit der Anzahl der jeweils in die Berechnung einbezogenen Probanden angegeben (Tabelle 31). In einer weiteren Abbildung erfolgt eine Darstellung der Ergebnisse des adjustierten paarweisen Vergleichs jeweils zweier Gruppen (Abb.10).

Gruppenvergleich ohne Adjustierung

Bei der Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Antigen-stimulierten Zytokinausschüttung in Form des nicht adjustierten Modells war beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit PI ein Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar (siehe Tabellen 29,30; Abb.9).

Es wurde ein Unterschied zwischen der Gruppe der LADA Diabetiker und der Gruppe der Typ 1 Diabetiker beziehungsweise Typ 2 Diabetiker sichtbar, indem die Gruppe der LADA Diabetiker jeweils einen im Vergleich geringeren Median aufzeigte.

Gruppenvergleich mit Adjustierung

Bei der Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Antigen-stimulierten Zytokinausschüttung in Form der zwei adjustierten Modelle zeigten sich in Abhängigkeit vom angewandten Modell Unterschiede zwischen den Gruppen.

Anthropometrisches Modell

Beim anthropometrischen Modell waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar (siehe Tabelle 31).

Klinisch-chemisches Modell

Beim klinisch-chemischen Modell wurden beim Zytokin MCP-1 für die Stimulationen mit PI und pIA-2 Unterschiede zwischen den Gruppen angezeigt (siehe Tabelle 31, Abb.10).

Tabelle 29: Übersicht über den nicht adjustierten Vergleich der Gruppen bei Leukozytenstimulation (Zytokine MCP-1, IP10, RANTES)

Stimulation	T1D	LADA	T2D	Kontrollen	p-Wert
MCP-1					
PI	6,47 (24,67)	1,12 (3,90)	7,56 (18,02)	5,70 (7,48)	0,0194
HSP60	1,00 (1,03)	0,66 (0,95)	1,05 (2,05)	0,88 (0,95)	0,0619
p277	1,16 (3,96)	0,95 (1,08)	1,00 (1,13)	0,91 (1,46)	0,0920
GAD	1,73 (5,01)	1,13 (4,10)	1,07 (1,83)	0,59 (1,97)	0,3094
pIA-2	2,87 (5,45)	1,17 (5,90)	2,60 (14,51)	2,27 (54,87)	0,1693
IP10					
PI	1,77 (2,82)	0,96 (1,78)	1,43 (1,60)	1,55 (2,19)	0,2452
HSP60	0,94 (0,27)	0,93 (0,18)	0,97 (0,25)	0,95 (0,16)	0,5415
p277	0,96 (0,23)	0,90 (0,18)	0,93 (0,27)	1,00 (0,13)	0,7752
GAD	1,02 (0,41)	0,98 (0,33)	1,09 (0,26)	1,04 (0,21)	0,6273
pIA-2	0,54 (0,57)	0,23 (0,65)	0,75 (0,69)	0,77 (0,28)	0,0731
RANTES					
PI	7,18 (7,40)	6,34 (3,03)	6,16 (8,32)	8,86 (10,32)	0,5091
HSP60	1,08 (0,49)	1,02 (0,62)	1,17 (0,28)	1,21 (0,42)	0,5160
p277	1,00 (0,52)	1,09 (0,68)	1,13 (0,55)	1,00 (0,35)	0,9614
GAD	1,01 (0,43)	1,10 (0,52)	1,01 (0,37)	0,82 (0,23)	0,2956
pIA-2	1,13 (0,59)	1,24 (0,74)	1,10 (0,60)	1,00 (0,33)	0,5000
Werte angegeben als Median (Interquartilbereich) der Stimulationsindizes [Zytokin-[c] mit Stimulation/Zytokin-[c] ohne Stimulation]; p-Wert stellvertretend für Gruppenvergleich mit <i>Kruskal-Wallis</i> -Test (unadjustiertes Modell); T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen=Kontrollprobanden					

Beim Zytokin MCP-1 wurde für die Stimulation mit PI ein Unterschied zwischen der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit einem höheren Median und der Gruppe der LADA Diabetiker mit einem geringeren Median sichtbar. Des Weiteren zeigte sich beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit pIA-2 ein Unterschied zwischen der Gruppe der Typ 2 Diabetiker mit einem höheren Median und der Gruppe der LADA Diabetiker mit einem geringeren Median.

Tabelle 30: Übersicht über den nicht adjustierten Vergleich der Gruppen bei Leukozytenstimulation (Zytokine IL-1RI, IL-5, IL-6, TNF- α)

Stimulation	T1D	LADA	T2D	Kontrollen	p-Wert
IL-1RI					
PI	22/32	11/22	19/48	6/13	0,0829
HSP60	15/32	12/22	21/48	5/13	0,8019
p277	10/32	10/22	18/48	6/13	0,6892
GAD	13/32	13/22	19/48	3/13	0,2098
pIA-2	11/32	12/22	22/48	3/13	0,2342
IL-5					
PI	28/32	22/22	44/49	13/13	0,2742
HSP60	11/32	6/22	17/49	5/13	0,9196
p277	8/32	7/22	12/49	1/13	0,4583
GAD	5/32	7/22	11/49	2/13	0,5320
pIA-2	6/32	7/22	13/49	5/13	0,5114
IL-6					
PI	29/32	19/22	44/48	13/13	0,6558
HSP60	7/32	3/22	13/48	3/13	0,6963
p277	9/32	3/22	8/48	4/13	0,3737
GAD	10/32	7/22	9/48	3/13	0,5182
pIA-2	2/32	2/22	10/48	2/13	0,2658
TNF-α					
PI	31/32	20/22	46/49	13/13	0,7689
HSP60	9/32	2/22	10/49	3/13	0,3851
p277	10/32	3/22	7/49	1/13	0,1863
GAD	10/32	6/22	10/49	3/13	0,7207
pIA-2	6/32	2/22	10/49	2/13	0,7282
<p>Werte angegeben als Häufigkeiten (IL-1RI: Anzahl Stimulationsindizes [Zytokin-[c] mit Stimulation / Zytokin-[c] ohne Stimulation] > Median / Gesamtanzahl; IL-5, IL-6, TNF-α: Anzahl Stimulationsindizes [Zytokin-[c] mit Stimulation/Zytokin-[c] ohne Stimulation] > 1 / Gesamtanzahl); p-Wert stellvertretend für Gruppenvergleich mit <i>Freeman-Halton</i>-Test (unadjustiertes Modell); T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen=Kontrollprobanden</p>					

Tabelle 31: Übersicht über den adjustierten Vergleich der Gruppen bei Leukozytenstimulation

Zytokin und Stimulation		Adjustiertes Modell 1					Adjustiertes Modell 2						
		Anzahl n					p-Wert	Anzahl n					p-Wert
		G	1	2	3	4		G	1	2	3	4	
MCP-1	PI	116	32	49	22	13	0,1143	109	31	47	21	10	0,0147
	HSP60	105	30	45	19	11	0,1010	100	29	44	18	9	0,1328
	p277	96	25	42	18	11	0,1864*	89	24	40	17	8	0,2734
	GAD	100	29	43	19	9	0,1024*	94	28	41	18	7	0,5138*
	pIA-2	114	32	49	21	12	0,2045	108	31	47	20	10	0,0323
IP10	PI	114	32	48	21	13	0,4411	107	31	46	20	10	0,2673
	HSP60	106	29	46	18	13	0,9930	99	28	44	17	10	0,9235
	p277	97	25	42	17	13	0,8335	91	25	40	16	10	0,9512
	GAD	105	27	45	21	12	0,8131	98	26	43	20	9	0,7976
	pIA-2	109	31	46	19	13	0,1668*	102	30	44	18	10	0,1863*
RANTES	PI	115	32	48	22	13	0,9201	108	31	47	20	10	0,6861*
	HSP60	111	30	48	20	13	0,6071	104	29	46	19	10	0,6819
	p277	112	31	47	21	13	0,8158	106	31	45	20	10	0,9831
	GAD	113	31	48	21	13	0,4446	107	31	46	20	10	0,5669
	pIA-2	113	32	48	21	12	0,9156	106	31	46	20	9	0,5157
IL-1RI	PI	115	32	48	22	13	0,0807	108	31	46	21	10	0,0853
	HSP60	115	32	48	22	13	0,8147	108	31	46	21	10	0,9000
	p277	115	32	48	22	13	0,7678	108	31	46	21	10	0,8073
	GAD	115	32	48	22	13	0,2464	108	31	46	21	10	0,2905
	pIA-2	115	32	48	22	13	0,1353	108	31	46	21	10	0,2562

Angegeben ist jeweils die Anzahl der in die Modellberechnung einbezogenen Probanden insgesamt (G) und für die einzelnen Gruppen (1=Typ 1 Diabetiker; 2=Typ 2 Diabetiker; 3=LADA Diabetiker; 4=Kontrollprobanden) sowie der p-Wert (Gruppenvergleich mit Regressionsmodell (MCP-1, IP10 und RANTES: multiples lineares Regressionsmodell [Adjustiertes Modell 1 (anthropometrisches Modell): Adjustierung für Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI; Adjustiertes Modell 2 (klinisch-chemisches Modell): Adjustierung für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid]; IL-1RI: logistisches Regressionsmodell [Adjustiertes Modell 1 (anthropometrisches Modell): Adjustierung für Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI; Adjustiertes Modell 2 (klinisch-chemisches Modell): Adjustierung für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid])); Residuen auf Normalverteilung untersucht (*Shapiro-Wilk-Test*), *Residuen teststatistisch nicht normalverteilt

Zusammenfassend wiesen beim Gruppenvergleich ohne Adjustierung die Typ 1 Diabetiker und die Typ 2 Diabetiker beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit PI jeweils einen höheren Median als die LADA Diabetiker auf.

Hinsichtlich des Gruppenvergleichs unter Anwendung des klinisch-chemischen Modells wiesen die Typ 2 Diabetiker beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit PI und pIA-2 im Vergleich zu den LADA Diabetikern jeweils einen höheren Median auf.

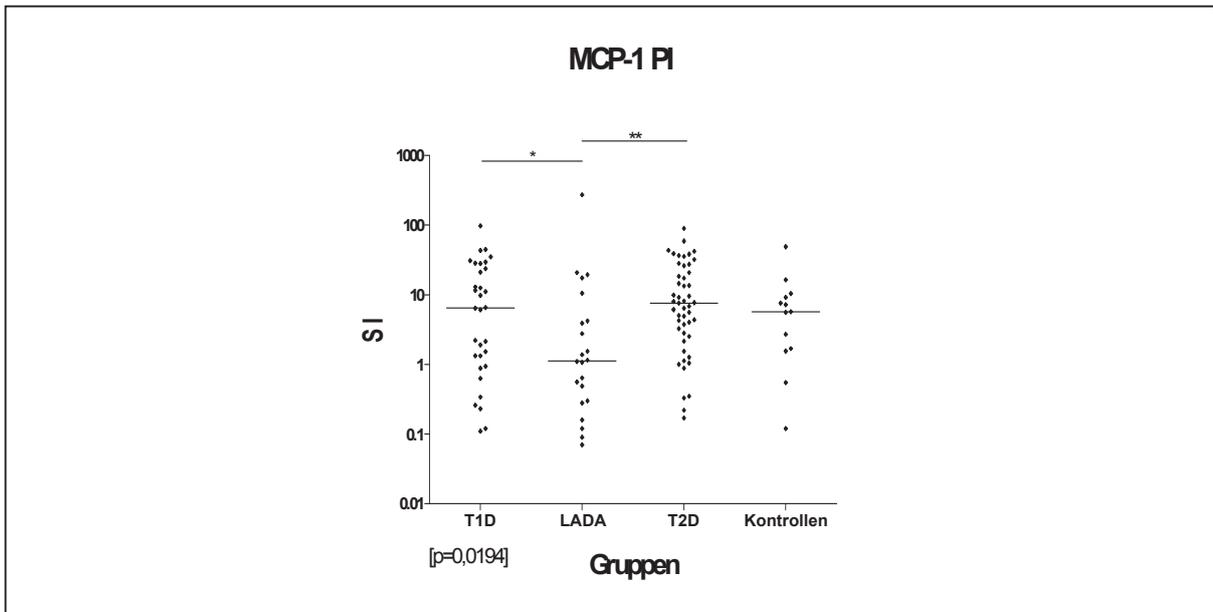


Abb.9: Übersicht über den nicht adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen bei Leukozytenstimulation

SI: Stimulationsindex [Zytokin-[c] mit Stimulation/Zytokin-[c] ohne Stimulation]; dargestellt sind individuelle Stimulationsindizes und der Median; [p-Wert] p-Wert *Kruskal-Wallis*-Test (globaler Vergleich der Gruppen); *Mann-Whitney*-Test *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 (multipler paarweiser Vergleich jeweils zweier Gruppen); T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen=Kontrollprobanden

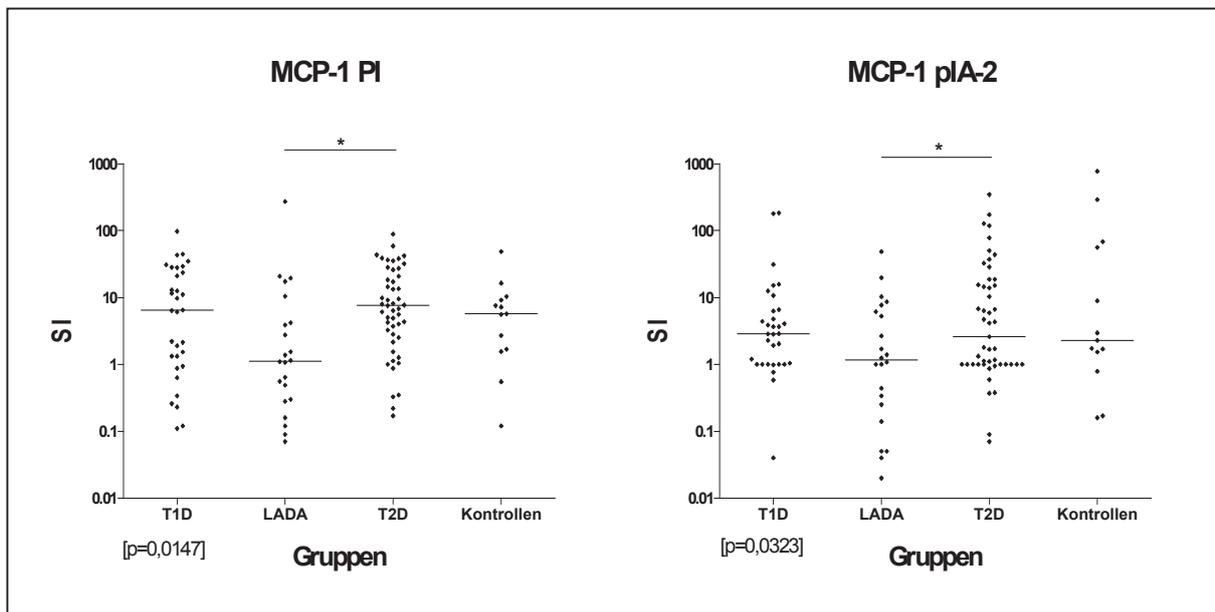


Abb.10: Übersicht über den adjustierten paarweisen Vergleich der Gruppen mit dem klinisch-chemischen Modell bei Leukozytenstimulation

SI: Stimulationsindex [Zytokin-[c] mit Stimulation/Zytokin-[c] ohne Stimulation]; dargestellt sind individuelle Stimulationsindizes und der Median; [p-Wert] p-Wert Adjustiertes Modell 2 (klinisch-chemisches Modell): multiples lineares Regressionsmodell mit Adjustierung für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid; *Tukey-Kramer-Post-Hoc*-Test mit Adjustierung für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001; T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen=Kontrollprobanden

3.3.2 Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und anthropometrischen oder klinisch-chemischen Einflussfaktoren bei Leukozytenstimulation

Im Rahmen der Leukozytenstimulation sollte die Fragestellung untersucht werden, inwiefern bei Zellüberständen von ELISPOT-Ansätzen ein Zusammenhang zwischen der Antigen-reaktiven Antwort in Form einer Zytokinausschüttung und verschiedenen Einflussfaktoren festgestellt werden kann.

Nachfolgend wurde die Untersuchung auf Zusammenhänge entsprechend einer Assoziation in Form einer Korrelationsuntersuchung beziehungsweise entsprechend einer Abhängigkeit in Form einer Regressionsuntersuchung durchgeführt.

Es wurden bei jedem Probanden für jedes Zytokin und jede Stimulation jeweils Stimulationsindizes in Form von Quotienten gebildet. Für die Stimulationen mit PI, HSP60, p277, GAD und pIA-2 wird der Quotient von der Zytokinkonzentration mit Stimulation und der Zytokinkonzentration ohne Stimulation berechnet. Bei den Zytokinen IL-1RI, IL-5, IL-6 und TNF- α erfolgte jeweils eine Einteilung der Stimulationsindizes anhand eines Zahlenwertes größer als der Median beziehungsweise 1 oder nicht in zwei Stimulationsindex-Klassen.

Untersuchung auf Assoziationen

Eine Untersuchung auf Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes bei den in Form von metrischen Daten ausgewerteten Zytokinen beziehungsweise der Stimulationsindex-Klasse bei den in Form von kategorialen Daten ausgewerteten Zytokinen und bestimmten Einflussfaktoren erfolgte in Form einer Korrelationsanalyse anhand der Berechnung des *Spearman*-Korrelationskoeffizienten mit entsprechendem p-Wert beziehungsweise anhand des *Fisher-Exact*-Test mit entsprechendem p-Wert. Zum einen stellten die anthropometrischen Parameter Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI sowie zum anderen die klinisch-chemischen Parameter Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid jeweils die in die Untersuchung einbezogenen Einflussfaktoren dar.

Eine Untersuchung auf Assoziation wurde nur bei den Kombinationen von Zytokin und Stimulation durchgeführt, bei denen ein Unterschied zwischen den Gruppen aufgezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.3.1).

In den nachfolgenden Tabellen wird eine Übersicht über die Ergebnisse der Korrelationsuntersuchung gegeben, indem die berechneten Korrelationskoeffizienten mit dem entsprechenden p-Wert sowie die Anzahl an in die Berechnung einbezogenen Probanden angegeben sind (Tabellen 32,33).

Tabelle 32: Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation bei Leukozytenstimulation (anthropometrische Einflussfaktoren)

Zytokin	Stimulation	Geschlecht	Alter	Diab.dauer	BMI
Typ 1 Diabetiker					
MCP-1	PI	- 0,18 (0,3123) [32]	- 0,12 (0,5239) [32]	0,48 (0,0075) [30]	0,25 (0,1941) [29]
MCP-1	pIA-2	- 0,06 (0,7653) [29]	0,23 (0,2308) [29]	0,00 (0,9867) [27]	0,18 (0,3630) [27]
LADA Diabetiker					
MCP-1	PI	- 0,65 (0,0016) [21]	0,14 (0,5594) [21]	- 0,12 (0,6178) [21]	- 0,10 (0,6818) [20]
MCP-1	pIA-2	- 0,32 (0,1441) [22]	- 0,08 (0,7378) [22]	- 0,00 (0,9940) [22]	- 0,00 (0,9866) [21]
Typ 2 Diabetiker					
MCP-1	PI	- 0,05 (0,7273) [49]	- 0,07 (0,6392) [49]	- 0,06 (0,6757) [49]	- 0,07 (0,6579) [48]
MCP-1	pIA-2	- 0,18 (0,2210) [49]	- 0,23 (0,1162) [49]	- 0,10 (0,5007) [49]	- 0,06 (0,6942) [48]
Kontrollprobanden					
MCP-1	PI	- 0,31 (0,3324) [12]	0,35 (0,2652) [12]	-	0,14 (0,6646) [12]
MCP-1	pIA-2	0,40 (0,1746) [13]	0,27 (0,3637) [13]	-	- 0,02 (0,9432) [13]
Angegeben ist jeweils der <i>Spearman</i> -Korrelationskoeffizient mit dem p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []; Diab.dauer=Diabetesdauer; Geschlecht (m=1/w=2)					

Tabelle 33: Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation bei Leukozytenstimulation (klinisch-chemische Einflussfaktoren)

Zytokin	Stimulation	Blutglukose	HbA1c	Triglyceride	C-Peptid
Typ 1 Diabetiker					
MCP-1	PI	- 0,05 (0,8030) [27]	- 0,41 (0,0210) [32]	0,13 (0,5013) [31]	- 0,05 (0,8096) [30]
MCP-1	pIA-2	- 0,29 (0,1642) [24]	0,06 (0,7424) [29]	0,08 (0,6882) [28]	0,12 (0,5364) [27]
LADA Diabetiker					
MCP-1	PI	0,49 (0,0231) [21]	0,57 (0,0088) [20]	0,00 (0,9866) [21]	- 0,13 (0,5625) [21]
MCP-1	pIA-2	0,53 (0,0113) [22]	- 0,09 (0,6936) [21]	0,26 (0,2453) [22]	0,00 (0,9960) [22]
Typ 2 Diabetiker					
MCP-1	PI	0,30 (0,0449) [46]	0,03 (0,8394) [47]	0,12 (0,4284) [48]	- 0,09 (0,5408) [48]
MCP-1	pIA-2	- 0,13 (0,3753) [46]	- 0,03 (0,8294) [47]	0,01 (0,9230) [48]	- 0,10 (0,4937) [48]
Kontrollprobanden					
MCP-1	PI	0,28 (0,4339) [10]	- 0,04 (0,9045) [11]	0,02 (0,9468) [10]	0,22 (0,5183) [11]
MCP-1	pIA-2	- 0,22 (0,5183) [11]	- 0,16 (0,6241) [12]	- 0,51 (0,1088) [11]	- 0,23 (0,4697) [12]
Angegeben ist jeweils der <i>Spearman</i> -Korrelationskoeffizient mit dem p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []					

Typ 1 Diabetiker

Bei den Typ 1 Diabetikern wurden beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit PI Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren sichtbar (siehe Tabellen 32,33).

Beim Zytokin MCP-1 zeigte sich für die Stimulation mit PI ein positiver Korrelationskoeffizient für die Diabetesdauer und ein negativer Korrelationskoeffizient für das HbA1c.

LADA Diabetiker

Bei den LADA Diabetikern wurden beim Zytokin MCP-1 für die Stimulationen mit PI und pIA-2 Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren sichtbar (siehe Tabellen 32,33).

Beim Zytokin MCP-1 konnte für die Stimulationen mit PI ein negativer Korrelationskoeffizient für das weibliche Geschlecht und jeweils positive Korrelationskoeffizienten für die Blutglukose und das HbA1c beobachtet werden. Ferner zeigte sich beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit pIA-2 ein positiver Korrelationskoeffizient für die Blutglukose.

Typ 2 Diabetiker

Die Gruppe der Typ 2 Diabetiker wies beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit PI eine Assoziation zwischen den Stimulationsindizes und einem bestimmten Einflussfaktor auf (siehe Tabellen 32,33).

Beim Zytokin MCP-1 zeigte sich für die Stimulation mit PI ein positiver Korrelationskoeffizient für die Blutglukose.

Kontrollprobanden

Bei der Gruppe der Kontrollprobanden wurden keine Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren sichtbar (siehe Tabellen 32,33).

Untersuchung auf Abhängigkeiten

Eine Untersuchung auf Abhängigkeiten zwischen den Stimulationsindizes bei den in Form von metrischen Daten ausgewerteten Zytokinen beziehungsweise der Stimulationsindex-

Klasse bei den in Form von kategorialen Daten ausgewerteten Zytokinen und bestimmten Einflussfaktoren erfolgte in Form einer Regressionsanalyse, um die im Rahmen der Korrelationsanalyse festgestellten Assoziation zu quantifizieren beziehungsweise nachfolgend für bestimmte Einflussfaktoren zu adjustieren. Bei den in Form von metrischen Daten ausgewerteten Zytokinen fand ein multiples lineares Regressionsverfahren und bei den in Form von kategorialen Daten ausgewerteten Zytokinen ein logistisches Regressionsverfahren Anwendung. Es wurde jeweils der β -Regressionskoeffizient beziehungsweise der LOGIT- Regressionskoeffizient mit dem entsprechenden p-Wert berechnet. In Analogie zu den für die Adjustierung des Gruppenvergleichs angewandten Modellen stellten zum einen die anthropometrischen Parameter wie Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI sowie zum anderen die klinisch-chemischen Parameter wie Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid die zur Adjustierung ausgewählten Einflussfaktoren dar, wobei jeweils selektiv für einen Einflussfaktor des entsprechenden Modells adjustiert wurde.

Die Untersuchung auf Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Faktoren wurde nur bei den Kombinationen aus Zytokin und Stimulation durchgeführt, bei denen eine Assoziation mit einem Einflussfaktor beobachtet werden konnte.

In einer Tabellen wird eine Übersicht über die Ergebnisse der Regressionsuntersuchung gegeben, indem die berechneten Regressionskoeffizienten mit dem entsprechenden p-Wert sowie die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden angegeben sind (Tabelle 34).

Typ 1 Diabetiker

Bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker wurde das Zytokin MCP-1 mit der Stimulationen PI weiterführend untersucht (siehe Tabelle 34).

Beim Zytokin MCP-1 zeigte sich für die Stimulation mit PI eine positive Anhängigkeit von der Diabetesdauer, welche bei einer jeweiligen Adjustierung für das Geschlecht, das Alter und den BMI nur gering variierte, und eine negative Anhängigkeit vom HbA1c, welche bei einer Adjustierung für das C-Peptid nicht nachweisbar war.

LADA Diabetiker

Bei der Gruppe der LADA Diabetiker wurden beim Zytokin MCP-1 die Stimulationen mit PI und pIA-2 weiterführend untersucht (siehe Tabelle 34).

Beim Zytokin MCP-1 konnte für die Stimulation mit PI eine negative und quantitativ stärkere Abhängigkeit vom weiblichen Geschlecht festgestellt werden, welche bei einer Adjustierung

für das Alter, die Diabetesdauer und dem BMI nur gering im Hinblick auf den quantitativen Zusammenhang variierte. Ferner konnte für die Stimulation mit PI eine quantitativ geringe positive Abhängigkeit von der Blutglukose beobachtet werden, welche bei einer Adjustierung für die Triglyceride und das C-Peptid quantitativ nur gering variierte und bei einer Adjustierung für das HbA1c nicht nachweisbar war. Für die Stimulation mit pIA-2 zeigte sich eine quantitativ geringe positive Abhängigkeit von der Blutglukose, welche bei einer Adjustierung für das HbA1c und das C-Peptid keine Veränderungen zeigte und bei einer Adjustierung für die Triglyceride nicht feststellbar war.

Tabelle 34: Übersicht über die Untersuchung auf Regression bei Leukozytenstimulation

Kriterium	Prediktor	β -Koeffizient	(p-Wert)	[n]
Typ 1 Diabetiker				
MCP-1 PI	Diabetesdauer	0,753	(0,0060)	[30]
	+Geschlecht	0,747	(0,0072)	[30]
	+Alter	0,753	(0,0069)	[30]
	+BMI	0,696	(0,0113)	[28]
MCP-1 PI	HbA1c	- 0,238	(0,0484)	[32]
	+Blutglukose	- 0,365	(0,0261)	[27]
	+Triglyceride	- 0,265	(0,0315)	[31]
	+C-Peptid	- 0,230	(0,0799)	[30]
LADA Diabetiker				
MCP-1 PI	Geschlecht	- 2,639	(0,0013)	[21]
	+Alter	- 2,852	(0,0009)	[21]
	+Diabetesdauer	- 2,698	(0,0017)	[21]
	+BMI	- 2,543	(0,0034)	[20]
MCP-1 PI	Blutglukose	0,016	(0,0416)	[21]
	+HbA1c	0,015	(0,0584)	[20]
	+Triglyceride	0,021	(0,0200)	[21]
	+C-Peptid	0,019	(0,0199)	[21]
MCP-1 PI	HbA1c	0,329	(0,1113)	[20]
	+Blutglukose	0,289	(0,1320)	[20]
	+Triglyceride	0,363	(0,0936)	[20]
	+C-Peptid	0,344	(0,1011)	[20]
MCP-1 pIA-2	Blutglukose	0,020	(0,0405)	[22]
	+HbA1c	0,020	(0,0281)	[21]
	+Triglyceride	0,021	(0,0554)	[22]
	+C-Peptid	0,021	(0,0381)	[22]
Typ 2 Diabetiker				
MCP-1 PI	Blutglukose	0,011	(0,1071)	[46]
	+HbA1c	0,011	(0,1976)	[44]
	+Triglyceride	0,010	(0,1644)	[45]
	+C-Peptid	0,013	(0,0893)*	[45]
Kontrollprobanden				
nicht durchgeführt				
Angeben ist jeweils das Kriterium (=abhängige Variable) und der/die Prediktor/en (=unabhängige Variable) mit dem entsprechenden β -Koeffizient (=Regressionskoeffizient) mit dem p-Wert () der multiplen linearen Regression und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden []; Residuen auf Normalverteilung untersucht (<i>Shapiro-Wilk-Test</i>), * Residuen teststatistisch nicht normalverteilt; Adjustierung jeweils selektiv mit einem festen und einem zusätzlichen Prediktor; Geschlecht (m=1/w=2)				

Typ 2 Diabetiker

Bei der Gruppe der Typ 2 Diabetiker wurde beim Zytokin MCP-1 die Stimulation mit PI weiterführend untersucht (siehe Tabelle 34).

Es wurden beim Zytokin MCP-1 die Stimulation mit PI keine Abhängigkeiten von Einflussfaktoren aufgezeigt.

Kontrollprobanden

Bei der Gruppe der Kontrollprobanden wurde keine Untersuchung auf Abhängigkeiten durchgeführt, da keine Assoziationen nachweisbar waren.

Zusammenfassend zeigten sich bei den verschiedenen Gruppen in einem unterschiedlichem Maße Assoziationen beziehungsweise Abhängigkeiten zwischen den Stimulationsindizes und bestimmten Einflussfaktoren.

Bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker wurde für das Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit PI sowohl eine positive Assoziation mit beziehungsweise Abhängigkeit von der Diabetesdauer als auch eine negative Assoziation mit beziehungsweise Abhängigkeit vom HbA1c sichtbar, wobei letztgenannte bei einer Adjustierung für das C-Peptid nicht nachweisbar war.

Bei der Gruppe der LADA Diabetiker zeigte sich beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit PI eine negative Assoziation mit dem weiblichen Geschlecht sowie jeweils eine positive Assoziation mit der Blutglukose und dem HbA1c. Weiter wurden eine negative Abhängigkeit vom weiblichen Geschlecht und eine positive Abhängigkeit von der Blutglukose angezeigt, wobei letztere bei einer Adjustierung für HbA1c nicht nachweisbar war. Für die Stimulation mit pIA-2 war eine positive Assoziation mit beziehungsweise Abhängigkeit von der Blutglukose sichtbar, wobei letztere bei einer Adjustierung für Triglyceride nicht nachweisbar war.

Bei der Gruppe der Typ 2 Diabetiker wurde für das Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit PI eine positive Assoziation mit der Blutglukose angezeigt.

3.3.3 Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion nach Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum

Im Rahmen der Leukozytenstimulation sollte die Fragestellung untersucht werden, inwiefern ein Zusammenhang entsprechend einer Assoziation beziehungsweise einer Abhängigkeit zwischen der Zytokinkonzentration in Zellüberständen von ELISPOT-Ansätzen infolge einer

Antigen-reaktiven Antwort in Form einer Zytokinausschüttung und der Zytokinkonzentration im Serum beobachtet werden kann.

Nachfolgend wurde die Untersuchung auf Zusammenhänge entsprechend einer Assoziation in Form einer Korrelationsuntersuchung beziehungsweise entsprechend einer Abhängigkeit in Form einer Regressionsuntersuchung durchgeführt.

Es wurden bei jedem Proband für jedes Zytokin und jede Stimulation jeweils Stimulationsindizes in Form von Quotienten gebildet. Für die Stimulationen mit PI, HSP60, p277, GAD und pIA-2 wurde der Quotient von der Zytokinkonzentration mit Stimulation und der Zytokinkonzentration ohne Stimulation berechnet. Bei den Zytokinen IL-6 und TNF- α erfolgte eine Einteilung der Stimulationsindizes anhand eines Zahlenwertes größer als 1 oder nicht in zwei Stimulationsindex-Klassen und anschließend die Auswertung in Form von kategorialen Daten.

Untersuchung auf Assoziationen

Eine Untersuchung auf Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes beim Zytokin MCP-1 beziehungsweise der Stimulationsindex-Klasse bei den Zytokinen IL-6 und TNF- α der Zellüberstände und der Zytokinkonzentrationen im Serum erfolgte in Form einer Korrelationsanalyse anhand der Berechnung des *Spearman*-Korrelationskoeffizienten mit entsprechendem p-Wert. Bei einzelnen Berechnungen des *Spearman*-Korrelationskoeffizienten für die kategorialen Daten konnte aufgrund einer bestimmten Datenverteilung kein Ergebnis ermittelt werden.

In einer nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Korrelationsuntersuchung dargestellt (Tabelle 35). Dabei werden die berechneten Korrelationskoeffizienten mit dem entsprechenden p-Wert sowie die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden angegeben.

Typ 1 Diabetiker

Bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker wurden im Rahmen der Korrelationsuntersuchung keine Assoziationen angezeigt (siehe Tabelle 35).

LADA Diabetiker

Bei der Gruppe der LADA Diabetiker wurden im Rahmen der Korrelationsuntersuchung keine Assoziationen angezeigt (siehe Tabelle 35).

Tabelle 35: Übersicht über die Untersuchung auf Korrelation zwischen der Zytokinsekretion bei Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum

Zellüberstand		Serumkonzentration			
		T1D	LADA	T2D	Kontrollen
Zytokin	Stimulation	MCP-1 Serumkonzentration			
MCP-1	PI	0,30 (0,1255) [27]	0,19 (0,4429) [18]	- 0,12 (0,4436) [46]	0,27 (0,4038) [12]
	HSP60	0,04 (0,8666) [23]	- 0,05 (0,8421) [18]	- 0,08 (0,5974) [44]	0,07 (0,8317) [11]
	p277	0,07 (0,7303) [24]	- 0,22 (0,3900) [18]	- 0,12 (0,4862) [38]	- 0,34 (0,3118) [11]
	GAD	0,35 (0,0838) [25]	- 0,44 (0,0761) [17]	- 0,35 (0,0283) [39]	- 0,28 (0,4250) [10]
	pIA-2	0,21 (0,3195) [24]	0,01 (0,9829) [19]	0,20 (0,1723) [46]	0,18 (0,5656) [13]
Zytokin	Stimulation	IL-6 Serumkonzentration			
IL-6	PI	0,00 (1,0000) [30]	- 0,04 (0,8723) [19]	- 0,17 (0,2704) [42]	- - [13]
	HSP60	0,01 (0,9597) [30]	0,11 (0,6550) [19]	0,00 (0,9769) [42]	- 0,17 (0,5764) [13]
	p277	- 0,04 (0,8193) [30]	0,14 (0,5649) [19]	0,01 (0,9719) [42]	- 0,20 (0,5108) [13]
	GAD	0,12 (0,5212) [30]	- 0,11 (0,6429) [19]	- 0,07 (0,6594) [42]	0,59 (0,0352) [13]
	pIA-2	- 0,05 (0,7767) [30]	- 0,03 (0,8987) [19]	0,02 (0,9077) [42]	0,11 (0,7105) [13]
Zytokin	Stimulation	TNF-α Serumkonzentration			
TNF-α	PI	- 0,25 (0,2115) [26]	0,17 (0,4645) [20]	0,25 (0,1146) [40]	- - [12]
	HSP60	- 0,11 (0,5931) [26]	- 0,35 (0,1339) [20]	- 0,01 (0,9722) [40]	- 0,31 (0,3324) [12]
	p277	0,06 (0,7735) [26]	0,15 (0,5398) [20]	- 0,22 (0,1820) [40]	0,04 (0,8928) [12]
	GAD	0,12 (0,5638) [26]	- 0,19 (0,4241) [20]	0,10 (0,5346) [40]	0,64 (0,0247) [12]
	pIA-2	- 0,13 (0,5336) [26]	- 0,03 (0,9037) [20]	- 0,05 (0,7400) [40]	0,22 (0,4954) [12]

Angegeben ist jeweils der *Spearman*-Korrelationskoeffizient mit dem entsprechenden p-Wert () und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden [] (Gesamtanzahl: Typ 1 Diabetiker n=32; LADA Diabetiker n=22; Typ 2 Diabetiker n=49; Kontrollprobanden n=13); T1D=Typ 1 Diabetiker, LADA=LADA Diabetiker, T2D=Typ 2 Diabetiker, Kontrollen=Kontrollprobanden; Korrelationsuntersuchung auf Assoziationen zwischen den Stimulationsindizes beim Zytokin MCP-1 beziehungsweise der Stimulationsindex-Klasse (Einteilung der Stimulationsindizes anhand eines Zahlenwertes größer als 1) bei den Zytokinen IL-6 und TNF-α mit den Stimulationen PI, HSP60, p277, GAD und pIA-2 der Zellüberstände (vertikale Anordnung) und den Serumkonzentrationen der Zytokine MCP-1, IL-6 und TNF-α bei den einzelnen Gruppen (horizontale Anordnung); " - " keine Berechnung möglich

Typ 2 Diabetiker

Bei der Gruppe der Typ 2 Diabetiker zeigte sich beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit GAD eine negative Assoziation zwischen den Stimulationsindizes der Zellüberstände und der Konzentration des Zytokins MCP-1 im Serum (siehe Tabelle 35).

Kontrollprobanden

Bei der Gruppe der Kontrollprobanden wurden bei den Zytokinen IL-6 und TNF- α für die Stimulation mit GAD jeweils eine positive Assoziation zwischen der Klasse mit Stimulationsindizes mit einem Zahlenwert größer als 1 und der Konzentration des Zytokins IL-6 beziehungsweise TNF- α im Serum sichtbar (siehe Tabelle 35).

Untersuchung auf Abhängigkeiten

Eine Untersuchung auf Abhängigkeiten zwischen den Stimulationsindizes beim Zytokin MCP-1 beziehungsweise der Stimulationsindex-Klasse bei den Zytokinen IL-6 und TNF- α der Zellüberstände und der Zytokinkonzentrationen im Serum erfolgte in Form einer Regressionsanalyse, um die im Rahmen der Korrelationsanalyse festgestellten Assoziation zu quantifizieren beziehungsweise nachfolgend für bestimmte Einflussfaktoren zu adjustieren.

Beim Zytokin MCP-1 fand ein multiples lineares Regressionsverfahren und bei den Zytokinen IL-6 und TNF- α ein logistisches Regressionsverfahren Anwendung. Es wurde der β -Regressionskoeffizient oder LOGIT-Regressionskoeffizient mit dem entsprechenden p-Wert berechnet. Bei einzelnen Berechnungen des logistischen Regressionsverfahrens konnte keine eindeutige Lösung ermittelt werden. Die Parameter Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI stellten die zur Adjustierung ausgewählten Einflussfaktoren dar, wobei jeweils selektiv für einen Einflussfaktor adjustiert wurde.

Die Untersuchung auf Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Faktoren wurde nur bei den Kombinationen aus Zytokin und Stimulation durchgeführt, bei denen im Rahmen der Korrelationsuntersuchung eine Assoziation beobachtet werden konnte.

In einer nachfolgenden Tabellen ist eine Übersicht über die Ergebnisse der Regressionsuntersuchung dargestellt (Tabelle 36). Es werden sowohl die berechneten Regressionskoeffizienten mit dem entsprechenden p-Wert angezeigt, beim Zytokin MCP-1 der β -Koeffizient und bei den Zytokinen IL-6 und TNF- α der LOGIT-Koeffizient, als auch die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden angegeben.

Tabelle 36: Übersicht über die Untersuchung auf Regression zwischen der Zytokinsekretion bei Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum

Kriterium	Prediktor	β-Koeffizient (p-Wert) [n]		
Typ 1 Diabetiker				
nicht durchgeführt				
LADA Diabetiker				
nicht durchgeführt				
Typ 2 Diabetiker				
Zellüberstand: Stimulationsindex MCP-1 GAD	Serum-Konzentration MCP-1	- 0,64	(0,0302)	[39]
	+Geschlecht	- 0,53	(0,0881)	[39]
	+Alter	- 0,64	(0,0316)	[39]
	+Diabetesdauer	- 0,67	(0,0245)	[39]
	+BMI	- 0,90	(0,0071)	[38]
Kontrollprobanden				
Zellüberstand: Stimulationsindex -Klasse IL-6 GAD	Serum-Konzentration IL-6	2,82	(0,0803)	[13]
	+Geschlecht	23,07	(0,5716)**	[13]
	+Alter	2,39	(0,1411)	[13]
	+Diabetesdauer	-	-	-
	+BMI	9,66	(0,6131)**	[13]
Zellüberstand: Stimulationsindex -Klasse TNF-α GAD	Serum-Konzentration TNF-α	6,86	(0,1282)	[12]
	+Geschlecht	111,30	(0,3532)**	[12]
	+Alter	5,88	(0,2009)	[12]
	+Diabetesdauer	-	-	-
	+BMI	15,91	(0,5796)**	[12]
<p>Angeben ist jeweils das Kriterium (=abhängige Variable) und der/die Prediktor/en (=unabhängige Variable) mit dem entsprechenden β-Koeffizient (=Regressionskoeffizient) [MCP-1] oder LOGIT-Koeffizient (=Regressionskoeffizient) [IL-6 und TNF-α] mit dem p-Wert () des multiplen linearen Regressionsverfahrens [MCP-1] oder logistischen Regressionsverfahrens [IL-6 und TNF-α] und die Anzahl in die Berechnung einbezogener Probanden [] (Gesamtanzahl: Typ 2 Diabetiker n=49; Kontrollprobanden n=13); Residuen auf Normalverteilung untersucht beim multiplen linearen Regressionsverfahren (<i>Shapiro-Wilk-Test</i>), * Residuen teststatistisch nicht normalverteilt beim multiplen linearen Regressionsverfahren; ** keine eindeutige Lösungsberechnung beim logistischen Regressionsverfahren möglich; "-" keine Berechnung durchgeführt; Adjustierung jeweils selektiv mit einem festen Prediktor und einem zusätzlichen Prediktor; Geschlecht (m=1/w=2)</p>				

Typ 1 Diabetiker

Bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker wurde keine Untersuchung auf Abhängigkeiten durchgeführt, da keine Assoziationen nachweisbar waren.

LADA Diabetiker

Bei der Gruppe der LADA Diabetiker wurde keine Untersuchung auf Abhängigkeiten durchgeführt, da keine Assoziationen nachweisbar waren.

Typ 2 Diabetiker

Bei der Gruppe der Typ 2 Diabetiker wurde das Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit GAD weiterführend untersucht (siehe Tabelle 36).

Beim Zytokin MCP-1 zeigte sich für die Stimulation mit GAD eine negative Abhängigkeit der Stimulationsindizes der Zellüberstände von der Zytokinkonzentration im Serum, welche bei einer Adjustierung für das Alter gleich blieb und bei einer Adjustierung für die Diabetesdauer und dem BMI einen steigenden Wert aufzeigte. Bei einer Adjustierung für das Geschlecht war keine Abhängigkeit mehr nachweisbar.

Kontrollprobanden

Bei der Gruppe der Kontrollprobanden wurden die Zytokine IL-6 und TNF- α für die Stimulation mit GAD weiterführend untersucht (siehe Tabelle 36).

Es wurden keine Abhängigkeiten der Stimulationsindex-Klasse der Zellüberstände von den Zytokinkonzentrationen im Serum angezeigt.

Zusammenfassend wurde bei der Gruppe der Typ 2 Diabetiker beim Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit GAD sowohl eine negative Assoziation mit beziehungsweise Abhängigkeit von der MCP-1 Serumkonzentration angezeigt, wobei die Abhängigkeit bei einer Adjustierung für das Geschlecht nicht nachweisbar war.

Für die Gruppe der Kontrollprobanden wurde bei den Zytokinen IL-6 und TNF- α für die Stimulation mit GAD eine positive Assoziation zwischen der Klasse mit Stimulationsindizes mit einem Zahlenwert größer als 1 und der IL-6 beziehungsweise TNF- α Serumkonzentration angezeigt.

4 Diskussion

Der Diabetes mellitus stellt eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen dar, die durch eine chronische Hyperglykämie auf Grundlage einer defizitären Insulinversorgung charakterisiert werden [1]. Die gesellschaftliche Tragweite des Diabetes mellitus, und damit das Interesse zur Erforschung der Ursachen, wird dabei an einer Zahl von geschätzt 366 Millionen Diabetikern weltweit im Jahre 2011 deutlich [10]. Gleichzeitig sind die pathologischen Vorgänge im Rahmen der verschiedenen Diabetesformen bisher nur teilweise bekannt.

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Formen des Diabetes mellitus, Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes und LADA als Unterform des Typ 1 Diabetes, wird ätiopathogenetisch immunologischen Vorgängen eine wichtige Rolle zugeschrieben [15;166].

Die immunvermittelte Form des Typ 1 Diabetes ist durch eine Reaktivität von T-Zellen gegen β -Zell-Strukturen charakterisiert und wird von der Ausbildung von Auto-Antikörpern begleitet [192]. Die zur β -Zell-Zerstörung führenden Prozesse sind von großem Interesse und eine Aufklärung der Mechanismen, die zu einer erhöhten autoreaktiven T-Zell-Reaktivität führen, wird für das Verständnis der Pathogenese als notwendig angesehen [193]. Bei der β -Zell-Zerstörung spielen sowohl die der Spezifität der T-Zell-Reaktivität zugrunde liegenden Epitope als auch von Immunzellen ausgeschüttete Zytokine eine Rolle [17;150]. T-Zell-Epitope werden nach einer initialen Schädigung der β -Zellen als β -Zell-spezifische Antigene für das Immunsystem erreichbar, wobei Zytokine neben der Aktivierung von weiteren Immunzellen auch die funktionelle Ausrichtung der T-Zellen und damit die qualitative Ausprägung der Immunantwort mitbestimmen.

Für den Typ 1 Diabetes stellt sich die Frage, wie es zu einem Toleranzverlust der Immunzellen und weiterführend zu einer nachfolgenden selektiven β -Zell-Zerstörung bei einer über die β -Zellen hinausgehenden Expression der als Antigene fungierenden Strukturen kommt [194]. Dementsprechend erscheint vor dem Hintergrund einer zellvermittelten β -Zell-Zerstörung die Erfassung einer zellulären Reaktivität auf bestimmte Antigene zielführender als die Bestimmung der Konzentration von Antikörpern im Serum [195]. Dabei ist zu beachten, dass autoreaktive T-Zellen nicht immer für den Typ 1 Diabetes spezifisch und die Ziel-Antigene der autoreaktiven T-Zellen nicht β -Zell-spezifisch sind, auch wenn sie, wie zum Beispiel Insulin, von den β -Zellen vornehmlich exprimiert werden [196]. Insgesamt stellt sich beim Typ 1 Diabetes die Frage, wie Immunzellen auf Stimulation mit bestimmten Antigenen oder Mitogenen reagieren.

Beim Typ 2 Diabetes geht häufig neben der Insulinresistenz und gestörten Insulinsekretion auch eine Entzündung des Fettgewebes in Form einer Entzündungsreaktion mit einer ver-

mehrten Sekretion von inflammatorischen Zytokinen einher [26;30;147]. Zusätzlich wird auch im Serum eine subklinische Inflammation mit einer systemischen Erhöhung von Zytokinen beobachtet [165]. Es ist vorstellbar, dass die chronische Inflammation durch von gestressten β -Zellen exprimierte und von zerstörten β -Zellen freigesetzte Antigene verursacht wird [147]. Des Weiteren werden für den beobachteten Untergang der β -Zellen in einer späten Phase der Erkrankung unter anderem entzündliche Reaktionen als ursächlich angesehen [26]. Somit stellt sich auch beim Typ 2 Diabetes die Frage, wie Immunzellen auf Stimulation mit bestimmten Antigenen oder Mitogenen reagieren.

Die vorliegende Arbeit fokussierte mit der Untersuchung der Antigen-stimulierten Zytokinsekretion von Immunzellen auf die zugrunde liegenden immunologischen Vorgänge. Zytokine nehmen eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Immunsystems ein und bestimmten Antigenen wird bei allen hier untersuchten Formen der Diabeteserkrankung eine mitwirkende Rolle zugeschrieben [17;43;147;167-170]. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Rolle bestimmter Antigene und Zytokine in der Pathogenese der Diabeteserkrankung könnten zu einem besseren Verständnis der *in vitro* stimulierten Immunantworten beim Menschen beitragen. Als Ausblick auf die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze auf Grundlage eines besseren Verständnisses könnten Tierversuche als richtungsweisend bewertet werden, in denen durch lösliche Antigene eine Toleranz bei autoreaktiven Zellen induziert werden konnte [197;198].

Die Untersuchung der Immunreaktion von Typ 1 Diabetikern, Typ 2 Diabetikern, LADA Diabetikern und Kontrollprobanden in dieser Arbeit erfolgte anhand zweier Ansätze. Im ersten Ansatz wurde die Zytokinkonzentration in Vollblutproben nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen und Mitogenen bestimmt. Im zweiten Ansatz wurde der Zytokingehalt von Zellüberständen aus ELISPOT-Ansätzen nach Leukozytenstimulation mit verschiedenen Antigenen und Mitogenen bestimmt. Während die Bedingungen bei der Vollblutstimulation den physiologischen Bedingungen relativ nahe kommen und damit dem komplexen Zusammenspiel verschiedener Zellen Rechnung getragen wird, erfolgte bei den ELISPOT-Ansätzen die Stimulation isolierter Leukozyten im Nährmedium. Die gleichzeitige Untersuchung von Patienten mit Typ 1 Diabetes, LADA Diabetes oder Typ 2 Diabetes und Kontrollprobanden ermöglichte zum einen den Vergleich der Zytokinsekretion nach Stimulation mit unterschiedlichen Antigenen und Mitogenen als auch den Vergleich zwischen den Diabetesgruppen und mit den Kontrollprobanden. Aufgrund der eher geringen Gruppengröße und den multiplen statistischen Tests sind die Ergebnisse als explorativ zu werten.

Für die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in den einzelnen Proben weist das *multiplex-bead-array-assay*-Verfahren als Vorteil im Vergleich zum ELISA-Verfahren einen breiteren

messbaren Konzentrationsbereich auf, infolgedessen jeweils kleinere Substratmengen mit großer Genauigkeit analysiert werden können [177;179]. Die gleichzeitige Messung multipler Substrate in einem Messvorgang führt im Vergleich zu einer ELISA-Messung der einzelnen Substrate zu einem verminderten experimentellen Arbeitsumfang [177]. Als Nachteil der gleichzeitigen Messung ergibt sich die Schwierigkeit, für alle Substrate die optimalen Bedingungen einzustellen, infolgedessen in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zytokine nicht ausgewertet werden konnten.

Im Zusammenhang mit der Auswertung der Messdaten mit multiplen Analysen muss berücksichtigt werden, dass sowohl bei der Untersuchung auf Gruppenunterschiede als auch bei der Untersuchung auf Zusammenhänge eine Adjustierung für verschiedene Einflussfaktoren vorgenommen wurde. Für die Untersuchung auf Zusammenhänge wurde neben einer Korrelationsuntersuchung zusätzlich eine Regressionsuntersuchung durchgeführt, bei der vorliegende Abhängigkeiten quantitativ dargestellt werden konnten.

Für die zweite formulierte Fragestellung im Rahmen der Leukozytenstimulation, ob eine Assoziation zwischen der Anzahl sezernierender Zellen im ELISPOT und den Zytokinkonzentrationen der Zellüberstände beobachtet werden kann, liegen keine Ergebnisse vor, weil die entsprechenden Zytokine nicht ausgewertet werden konnten.

4.1 Vollblutstimulation

4.1.1 Zytokinkonzentration nach Stimulation von Vollblut

Hinsichtlich der ersten Fragestellung, ob bei einer Stimulation mit bestimmten Antigenen im Vollblut eine Zytokinsekretion aufgezeigt werden kann, zeigte sich eine starke stimulatorische Wirkung nach Stimulation mit dem Mitogen LPS für die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IP10. Die Stimulation mit dem Mitogen PHA führte zu einer erhöhten Zytokinkonzentration von IP10, während die Stimulationen mit den Typ 1 Diabetes-assoziierten Antigenen GAD und p277 im Wesentlichen nicht zu einer messbaren stimulatorischen Wirkung führten.

Die aufgezeigte stimulatorische Wirkung von LPS entspricht der erwarteten Wirkung einer Positivkontrolle. In mehreren Studien konnte im Rahmen von Vollblutstimulationen ein stimulatorischer Effekt von LPS auf die Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α aufgezeigt werden [199-203]. In einer weiteren Studie zeigte sich ein stimulatorischer Effekt von LPS auf die Sekretion von IP10 [204].

Das Fehlen einer stimulatorischen Wirkung von PHA auf die Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α steht hingegen im Widerspruch zur erwarteten Wirkung einer Positivkontrolle sowie zu einer Untersuchung von Gabriel *et al.*, bei der im Rahmen einer Vollblutstimulation ein stimulatorischer Effekt von PHA auf die Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α beobachtet werden konnte [205]. Ursächlich für die ausbleibende stimulatorische Wirkung könnte eine zu geringe Stimulusmenge respektive eine zu kurze Stimulationszeit sein. In der Untersuchung von Gabriel *et al.* liegen allerdings bezüglich der Stimulationszeit mit 24h vergleichbare Bedingungen, bezüglich der Stimulusmenge jedoch mit einer Konzentration von 5 μ g/ml im Vergleich zu der hier verwendeten Konzentration von 0,1 μ g/ml abweichende Bedingungen vor. Eine nachweisbare stimulatorische Wirkung von PHA beim Zytokin IP10 spricht gegen eine verminderte Wirkung des PHA infolge eines Abbaus während der Stimulation, wobei Unterschiede zwischen den jeweiligen Zytokinen hinsichtlich der für eine stimulatorische Wirkung notwendigen Menge an Stimulus nicht ausgeschlossen werden können. Ein vorzeitiger Abbau der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α bei einer Stimulation mit PHA erscheint unwahrscheinlich, weil jene bei der Stimulation mit LPS nachgewiesen werden konnten.

In Analogie zur Stimulation mit PHA könnte die nicht nachweisbare stimulatorische Wirkung der Typ 1 Diabetes-assoziierten Antigene GAD und p277 bei allen Zytokinen mit einer zu geringen Menge an Stimulus oder einer zu kurzen Stimulationszeit erklärt werden. Dagegen kann sowohl eine nicht vorhandene Funktionsfähigkeit des Untersuchungsansatzes zum Beispiel in Form einer fehlenden Vitalität der Immunzellen während der Stimulation als auch ein vorzeitiger Abbau der sezernierten Zytokine anhand des positiven Nachweises einer Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS ausgeschlossen werden. Im Hinblick auf die Diabeteserkrankung scheint die nicht vorhandene stimulatorische Wirkung von GAD und p277 bemerkenswert. Die häufig mit dem immunvermittelten Typ 1 Diabetes assoziierten Auto-Antikörper sind unter anderem gegen das hier untersuchte Antigen GAD gerichtet und für das Antigen p277 konnte bei Typ 1 Diabetikern eine immunmodulierende Wirkung beobachtet werden, infolgedessen eine stimulatorische Wirkung zumindest bei den Typ 1 Diabetikern denkbar gewesen wäre [206-208]. Die hier nicht vorhandene stimulatorische Wirkung korrespondiert allerdings mit dem Umstand, dass keine Evidenz für eine aktive Rolle der häufig nachweisbaren Auto-Antikörper in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes vorliegt [14;16]. Grundlegend könnte entsprechend einer Veröffentlichung von Koniaras *et al.* die nicht vorhandene stimulatorische Wirkung von GAD und p277 darauf zurückgeführt werden, dass infolge einer *in vivo* stattgefundenen Aktivierung der Immunzellen mit den Peptiden nachfolgend *in vitro* eine Aktivierung der Immunzellen unterbunden wurde [209]. Als Mecha-

nismus wird dabei eine *in vitro* ablaufende Ausschaltung von Zellen mit stimulatorischer Funktion durch *in vivo* gebildete Killerzellen angesprochen. Die Möglichkeit einer Übertragung dieser Überlegungen auf die hier vorliegenden Beobachtungen in der Form, dass ein Kontakt der untersuchten Zellen mit den Antigenen GAD und p277 *in vivo* zu einem ausbleibenden Effekt *in vitro* führt, bleibt fraglich, auch wenn das Vorkommen der Antigene GAD und p277 als Fragment von HSP60 im menschlichen Körper diese Möglichkeit stützt [114;122;131;132;210]. Weiterführend sind die bei den Zytokinen IL-8 und IP10 angezeigten Unterschiede zwischen den Stimulationen mit GAD und ConPep quantitativ minimal ausgeprägt und scheinen nicht von klinischer Relevanz zu sein.

Bei der Betrachtung der einzelnen Gruppen müssen die geringe Probandenanzahl pro Gruppe sowie eine starke Streuung der Werte berücksichtigt und nachfolgend eine vereinzelt angezeigte stimulatorische Wirkung der Typ 1 Diabetes-assoziierten Antigene GAD und p277 nur bei den Gruppen der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker allgemein mit Vorsicht betrachtet werden. Zusätzlich muss eine stimulatorische Wirkung von p277 auf die Sekretion von IL-1 β bei den Typ 1 Diabetikern sowie auf die Sekretion von TNF- α bei den LADA Diabetikern mit Rücksicht auf eine gleichzeitig vorhandene stimulatorische Wirkung vom ConPep als unspezifisch eingeordnet werden, indem das ConPep bei gleicher Aminosäurezusammensetzung aber einer abweichenden Aminosäuresequenz offensichtlich eine vergleichbare Wirkung aufwies. Die aufgezeigte stimulatorische Wirkung von GAD auf die Sekretion von TNF- α , IL-6 und IP10 bei den LADA Diabetikern beziehungsweise von p277 auf die Sekretion von TNF- α bei den Typ 1 Diabetikern muss des Weiteren im Hinblick auf eine Untersuchung von Strom *et al.* kritisch betrachtet werden [174]. In der Untersuchung konnte kein Unterschied zwischen Typ 1 Diabetikern, Typ 2 Diabetikern, LADA Diabetikern sowie Kontrollprobanden hinsichtlich einer stimulatorischen Wirkung von p277 für die Sekretion von IFN- γ und IL-13 durch T-Zellen aufgezeigt werden. Darüber hinaus wurde im Gegensatz zu den hier vorliegenden Beobachtungen für Typ 2 Diabetiker und Kontrollprobanden eine im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern stärkere stimulatorische Wirkung von GAD für die Sekretion von IFN- γ durch T-Zellen festgestellt. Eine Übertragung dieser Beobachtungen auf die hier vorliegenden Ergebnisse sollte allerdings unter Berücksichtigung der unterschiedlichen angewandten Stimulationsmethoden, zum einen in der vorliegenden Untersuchung im Vollblut und zum anderen in der Untersuchung von Strom *et al.* im Rahmen des ELISPOT-Verfahrens, und der nur bedingten Vergleichbarkeit der verschiedenen Zytokine unter Vorsicht erfolgen.

Die auch für eine Stimulation mit den Mitogenen LPS und PHA formal nicht nachweisbare stimulatorische Wirkung beim Zytokin RANTES liegt in der vorliegenden Arbeit am ehesten

darin begründet, dass die überwiegende Anzahl an Vollblutproben bei Versuchsbeginn, also nach 0h, beziehungsweise ohne Stimulation nach 24h bereits sehr hohe Messwerte aufzeigten, infolgedessen eine möglicherweise vorhandene zusätzliche stimulatorische Wirkung nicht festgestellt werden konnte. Korrespondierend dazu zeigte sich in einer Untersuchung von Biancotto *et al.* eine vielfach erhöhte Zytokinkonzentration von RANTES im Serum im Vergleich zu den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IP10, wobei hinsichtlich der angewandten Messmethodik mit einer Probenverdünnung von 1 zu 4 vergleichbare Bedingungen vorliegen [211]. Auch in anderen Untersuchungen konnte eine hohe Zytokinkonzentration von RANTES im Serum im Vergleich zu IP10 und IL-8 beobachtet werden [212;213]. Eine daraus abgeleitete erhöhte Ruhesekretion der Immunzellen für RANTES könnte als Ursache für die im Vergleich zu den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α vielfach erhöhte Zytokinkonzentration von RANTES im Blutplasma in Frage kommen [73].

Funktionell werden die hier nach Vollblutstimulation mit LPS vermehrt sezernierten Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IP10 als pro-inflammatorische Zytokine eher der angeborenen Komponente des Immunsystems zugeordnet und werden unter anderem durch Makrophagen und Monozyten sezerniert, welche LPS als Immunzellen vornehmlich erkennen und nachfolgend die angeborene Komponente des Immunsystems aktivieren [70;113].

Im Hinblick auf den hier vorliegenden Untersuchungsansatz wird grundlegend angenommen, dass eine erhöhte Zytokinkonzentration im Untersuchungsmedium auf eine erhöhte Zytokinsekretion zurückgeführt werden kann und nicht durch eine Auflösung der Zellstruktur bedingt ist, da Zytokine nicht als fertiges Produkt in der Zelle gespeichert werden [33].

4.1.2 Vergleich der Gruppen nach Vollblutstimulation

Bei der zweiten Fragestellung wird thematisiert, ob nach Stimulation mit bestimmten Antigenen im Vollblut anhand der Zytokinsekretion ein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden kann. Es zeigten sich für die Ruhesekretion beziehungsweise für die Sekretion nach Stimulation insgesamt nur bei einer geringen Anzahl der Vergleiche bei einzelnen Zytokinen Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der Adjustierung für bestimmte Einflussfaktoren konnten Veränderungen bezüglich der teststatistisch angezeigten Unterschiede beobachtet werden, wobei keine Korrektur für multiples Testen angewendet wurde. Sowohl die in einzelnen Gruppen geringe Probandenanzahl als auch die teilweise erhöhte Streuung der Messwerte sollten darüber hinaus berücksichtigt werden. Die für das Zytokin RANTES angezeigten statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen waren quantitativ nur gering ausgeprägt.

Unter Berücksichtigung einer Adjustierung für verschiedene Einflussfaktoren wie Geschlecht, Alter, Diabetesdauer und BMI beziehungsweise Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid konnte bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6 und RANTES für die Diabetiker eine im Vergleich zu den Kontrollprobanden erhöhte Ruhesekretion beobachtet werden. Umgekehrt zeigte sich beim Zytokin RANTES für die Stimulationen mit PHA und LPS für die Diabetiker eine im Vergleich zu den Kontrollprobanden geringere Stimulationsantwort. Beim Zytokin IL-6 wiesen die Typ 2 Diabetiker eine im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern erhöhte Stimulationsantwort für LPS auf. Ferner konnte beim Zytokin TNF- α für die Typ 1 Diabetiker eine im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern erhöhte Ruhesekretion und beim Zytokin IL-8 für die LADA Diabetiker eine im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern und Kontrollprobanden geringere Stimulationsantwort auf p277 festgestellt werden.

Ruhesekretion und Einfluss von Adjustierung

Im Hinblick auf die Ruhesekretion konnte anhand der Mediane bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6 und RANTES für die Diabetiker eine im Vergleich zu den Kontrollprobanden erhöhte Sekretion von Zytokinen durch die Immunzellen beobachtet werden. Anhand der graphischen Darstellung der individuellen Stimulationsindizes und Mediane für die einzelnen Gruppen ließ sich bei den Zytokinen IL-1 β und IL-6 eine stufenförmige Abschwächung der Ruhesekretion von den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern über die Typ 2 Diabetiker zu den Kontrollprobanden erkennen.

Beim Zytokin IL-1 β zeigte sich im unadjustierten Vergleich der Mediane, dass Patienten mit Typ 1 Diabetes oder LADA in Ruhe im Vergleich zu Kontrollprobanden mehr IL-1 β ausschütten. Während bei einer Adjustierung für anthropometrische Einflussfaktoren kein Unterschied für IL-1 β zwischen den Gruppen angezeigt wurde, ergab die Adjustierung für klinisch-chemische Einflussfaktoren einen Unterschied zwischen den LADA Diabetikern mit einem im Vergleich höheren Median und den Typ 2 Diabetikern.

Beim Zytokin IL-6 wurde nur nach Adjustierung für bestimmte Einflussfaktoren ein Unterschied zwischen den Gruppen angezeigt. Nach einer Adjustierung für anthropometrische Einflussfaktoren wiesen Typ 1 Diabetiker einen höheren Median auf als Typ 2 Diabetiker. Nach einer Adjustierung für klinisch-chemische Einflussfaktoren wiesen Typ 1 Diabetiker einen höheren Median auf als Typ 2 Diabetiker und Kontrollprobanden, während die LADA Diabetiker einen höheren Median als Typ 2 Diabetiker aufzeigten.

Die bei den Diabetikern insgesamt angezeigte erhöhte Ruhesekretion von IL-1 β und IL-6 könnte auf eine gewisse Grundaktivierung des Immunsystems bei Diabetikern hinweisen.

Dies erscheint vor dem Hintergrund, dass pathogenetisch sowohl beim Typ 1 Diabetes als auch beim Typ 2 Diabetes dem Immunsystem eine aktive Rolle zugeschrieben wird, nicht unerwartet [45;146;214;215]. Beide Zytokine werden den pro-inflammatorischen Zytokinen zugeteilt, wobei für das Zytokin IL-1 β eine β -Zell-zytotoxische Wirkung und eine ursächliche Rolle für den Verlust der β -Zellen sowohl bei Typ 1 Diabetes als auch bei Typ 2 Diabetes beschrieben wird [45;57;70;72;74]. Auf eine vorliegende Grundaktivierung des Immunsystems bei Diabetikern weisen auch die Ergebnisse einer Untersuchung von Alexandraki *et al.* hin, indem bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu gesunden Probanden eine höhere Anzahl an IL-1 β und IL-6 sezernierenden Zellen nachgewiesen wurde [89]. Darüber hinaus könnte die erhöhte Ruhesekretion ursächlich für eine erhöhte Konzentration der Zytokine im Serum von Diabetikern sein. Während für das Zytokin IL-6 bei Typ 1 Diabetikern, LADA Diabetikern und Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Konzentrationen im Serum gemessen wurden, konnten beim Zytokin IL-1 β abhängig von der konsultierten Literatur zum einen für Typ 1 Diabetiker im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Konzentrationen im Serum nachgewiesen und zum anderen diesbezüglich kein Unterschied zwischen Typ 1 Diabetikern beziehungsweise Typ 2 Diabetikern und Kontrollprobanden aufgezeigt werden [76;89;165;216]. Die Abweichung zwischen den Aussagen der angeführten Untersuchungen könnte möglicherweise auf Unterschiede zwischen den Probanden zurückzuführen sein.

Während ein nicht nachweisbarer Unterschied zwischen den Typ 1 Diabetikern und den LADA Diabetikern mit einer vorhandenen immunologischen Ähnlichkeit erklärbar ist, erscheint die im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern verminderte Ruhesekretion der Typ 2 Diabetiker für die Zytokine IL-1 β und IL-6 im Hinblick auf nachfolgende Untersuchungsergebnisse unerwartet [5]. In der oben angesprochenen Untersuchung von Alexandraki *et al.* wiesen die Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern eine höhere Anzahl an IL-1 β und IL-6 sezernierenden Zellen in Ruhe sowie eine erhöhte Konzentration von IL-6 im Serum auf, wobei keine Adjustierung für die bei den Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern erhöhten Werte für Triglyceride erfolgte, eine Beeinflussung durch das Fettgewebe somit nicht ausgeschlossen werden kann [89]. Des Weiteren konnte von Pham *et al.* für Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern eine erhöhte Konzentration von IL-6 im Serum auch nach Adjustierung für Geschlecht, Alter, Diabetesdauer sowie BMI und von Ohno *et al.* für Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu Typ 1 Diabetikern eine erhöhte Ruhesekretion von IL-1 β und IL-6 durch isolierte Immunzellen über 24h aufgezeigt werden [165;217]. Die Möglichkeit einer Übertragung der Ergebnisse von isolierten Zellen auf Vollblutstimulation bleibt fraglich.

Unter Berücksichtigung, dass der subklinischen Inflammation eine mitwirkende Rolle in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes zugeschrieben wird, würde allgemein bei den Typ 2 Diabetikern eine zumindest den Typ 1 Diabetikern entsprechende respektive höhere Ruhesekretion den Erwartungen entsprechen, zumal auch das vermehrte Fettgewebe bei Typ 2 Diabetes zu erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinen führt [216;218]. Insbesondere im Hinblick auf die dem Zytokin IL-6 zugeschriebene Schlüsselrolle in der Entwicklung der Insulinresistenz, welche pathogenetisch neben der Funktionsstörung der β -Zellen als ursächlich für den Typ 2 Diabetes angesehen wird, würde bei den Typ 2 Diabetikern eine höhere Ruhesekretion von IL-6 den Erwartungen entsprechen [31;219].

Interessant erscheint darüber hinaus, dass der beim Zytokin IL-6 angezeigte Unterschied zwischen den Typ 1 Diabetikern und den Typ 2 Diabetikern für die Ruhesekretion mit einem im Vergleich bei den Typ 1 Diabetikern höheren Median nur nach einer Adjustierung für die anthropometrischen oder klinisch-chemischen Einflussfaktoren nachweisbar ist, wobei die Typ 2 Diabetiker unter anderem sowohl beim BMI als auch bei den Triglyceriden im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern jeweils erhöhte Werte aufwiesen. Unter der Annahme, dass erhöhte Werte für BMI und Triglyceride mit einer erhöhten Fettgewebsmasse korrespondieren, bestätigt sich der in der Literatur beschriebene Zusammenhang zwischen einer erhöhten Fettgewebsmasse und einer gesteigerten Sekretion von IL-6 [218]. Weiterführend können diese Ergebnisse dahingehend interpretiert werden, dass die Typ 1 Diabetiker eine über das Fettgewebe hinausgehende erhöhte Stimulierbarkeit für IL-6 aufweisen, welche als vermehrte Aktivierbarkeit der angeborenen Immunität verstanden werden kann.

Beim Zytokin RANTES wurde im unadjustierten Vergleich ein Unterschied zwischen den Typ 2 Diabetikern mit einem höheren Median und den Kontrollprobanden mit einem im Vergleich geringeren Median angegeben. Während bei einer Adjustierung für die anthropometrischen Einflussfaktoren kein Unterschied zwischen den Gruppen angezeigt wurde, konnte bei einer Adjustierung für die klinisch-chemischen Einflussfaktoren dieser Unterschied wiederum festgestellt werden.

Anhand der Mediane für RANTES ergab sich korrespondierend zu den Zytokinen IL-1 β und IL-6 eine erhöhte Ruhesekretion der Diabetiker im Vergleich zu den gesunden Probanden, wobei nur für die Typ 2 Diabetiker diesbezüglich ein statistisch signifikanter Unterschied angezeigt wurde. Insgesamt zeigten die einzelnen Diabetesgruppen ähnliche Werte und der Unterschied zu den Kontrollprobanden war quantitativ nur gering ausgeprägt. Auffällig war die im Vergleich zu den Diabetikern vermehrte Streuung der Messwerte bei den Kontrollprobanden, wobei diese bei Betrachtung der Abbildungen für die Ruhesekretion bei den Zytokinen IL-1 β und IL-6 der biologischen Variabilität zugeschrieben werden kann. Die im Ver-

gleich verminderte Streuung der Messwerte der Diabetiker ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei allen Gruppen der Diabetiker mehrere Messwerte außerhalb des Messbereichs lagen, diese mit einem angepassten Wert ersetzt wurden und somit nachfolgend die Streuung innerhalb der Gruppe vermindert wurde.

Auch beim Zytokin RANTES könnte eine erhöhte Ruhesekretion der Diabetiker auf eine Grundaktivierung des Immunsystems bei Diabetes hinweisen und ursächlich für eine erhöhte Konzentration von RANTES im Blut bei Diabetikern sein. Bei Typ 1 Diabetikern als auch bei Typ 2 Diabetikern konnten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Konzentrationen von RANTES im Blut nachgewiesen werden [73;104]. Im Hinblick auf seine Wirkung wird dem Zytokin RANTES unter anderem eine mitwirkende Rolle bei der Proliferation und Aktivierung von T-Zellen zugeschrieben [105].

Unter funktionellen Gesichtspunkten zeigt sich, dass die Zytokine IL-1 β , IL-6 und RANTES, bei denen eine im Vergleich zu den Kontrollprobanden erhöhte Ruhesekretion der Diabetiker nachweisbar war, funktionell eher der angeborenen Immunität zugeteilt werden [220;221]. Daraus lässt sich ableiten, dass die beobachtete Grundaktivierung des Immunsystems bei Diabetikern eher durch die angeborene Komponente vermittelt wird, wobei starke Verknüpfungen zwischen der angeborenen und erworbenen Komponente bestehen [222].

Stimulierte Zytokinsekretion und Einfluss von Adjustierung

Im Hinblick auf die Zytokinsekretion nach Stimulation zeigte sich anhand der Mediane beim Zytokin IL-6 bei den Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern eine erhöhte Stimulationsantwort auf LPS und beim Zytokin RANTES bei den Diabetikern im Vergleich zu den Kontrollprobanden eine geringere Stimulationsantwort auf LPS und PHA.

Beim Zytokin IL-6 wurde für die Stimulation mit LPS bei einer Adjustierung für klinisch-chemische Einflussfaktoren ein Unterschied zwischen den Typ 2 Diabetikern mit einem höheren Median und den Typ 1 Diabetikern beziehungsweise LADA Diabetikern mit jeweils einem im Vergleich geringeren Median angegeben.

Dieses Ergebnis steht einmal im Einklang und einmal im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Untersuchungen. Bei einer Stimulation von isolierten Immunzellen mit LPS über einen Zeitraum von 24h konnte für die Sekretion von IL-6 zum einen in der oben angeführten Untersuchung von Ohno *et al.* für Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu Typ 1 Diabetikern erhöhte Werte und zum anderen in einer Untersuchung von Foss-Freitas *et al.* für Typ 1 Diabetiker im Vergleich zu Typ 2 Diabetikern erhöhte Werte beobachtet werden [217;223]. Den

vorliegenden Ergebnissen entsprechend wiesen in der oben angeführten Untersuchung von Alexandraki *et al.* die Typ 2 Diabetiker nach Stimulation mit PMA über 24h im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern eine höhere Anzahl an IL-6 sezernierenden Zellen auf [89]. Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass in den angeführten Untersuchungen im Gegensatz zu der hier vorliegenden Stimulation von Zellen im Vollblut jeweils isolierte Zellen stimuliert wurden und bei letztgenannter Untersuchung mit PMA anstatt mit dem hier verwendeten LPS stimuliert wurde.

Beim Vergleich der Ergebnisse für die Ruhesekretion und die Stimulationsantwort auf LPS fällt auf, dass die Gruppen der Diabetiker jeweils entgegengesetzte Reaktionen aufzeigten, welches möglicherweise für ein Ungleichgewicht der Immunantwort *in vitro* spricht. Während die Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern eine höhere Ruhesekretion und eine geringere Stimulationsantwort aufwiesen, zeigten die Typ 2 Diabetiker eine geringere Ruhesekretion und eine höhere Stimulationsantwort. Angemerkt werden muss, dass diese Unterschiede unter einer Adjustierung für die klinisch-chemischen Einflussfaktoren festgestellt wurden und somit bestehende Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Werte für Blutglukose, HbA1c, Triglyceride und C-Peptid berücksichtigt wurden.

Es könnte ein Mechanismus der negativen Rückkopplung vorliegen, indem eine erhöhte Ruhesekretion nachfolgend eine Abschwächung der Stimulationsantwort bedingt.

Beim Zytokin RANTES konnte im unadjustierten Vergleich für die Stimulationen mit PHA und LPS ein Unterschied zwischen den Typ 2 Diabetikern beziehungsweise LADA Diabetikern mit einem jeweils geringeren Median als bei den Kontrollprobanden festgestellt werden. Bei einer Adjustierung für die anthropometrischen Einflussfaktoren wurde nur für die Stimulation mit LPS ein Unterschied zwischen den Typ 2 Diabetikern mit einem geringeren Median als bei den Kontrollprobanden angezeigt. Infolge einer Adjustierung für die klinisch-chemischen Einflussfaktoren wurden Unterschiede für die Stimulation mit PHA zwischen den Typ 2 Diabetikern mit einem geringeren Median als bei den Kontrollprobanden sowie für die Stimulation mit LPS zwischen den Typ 2 Diabetikern beziehungsweise LADA Diabetikern mit jeweils einem geringeren Median als bei den Kontrollprobanden angezeigt.

Sowohl bei der Stimulation mit PHA als auch bei der Stimulation mit LPS wiesen die Diabetiker eine geringere Stimulationsantwort mit RANTES im Vergleich zu den Kontrollprobanden auf, wobei die Unterschiede quantitativ allerdings nur gering ausgeprägt waren und nur der angezeigte Unterschied zwischen den Typ 2 Diabetikern mit einem höheren Median und den Kontrollprobanden mit einem im Vergleich geringeren Median für die Stimulation mit LPS bei einer Adjustierung konstant angezeigt wurde. Die auch bei den Stimulationen mit

PHA und LPS sichtbare erhöhte Streuung der Messwerte bei den Kontrollprobanden im Vergleich zu den Diabetikern kann am ehesten darauf zurückgeführt werden, dass bei allen Gruppen der Diabetiker mehrere Messwerte außerhalb des Messbereichs lagen, diese mit einem angepassten Wert ersetzt wurden und somit die Streuung innerhalb der Gruppe vermindert wurde. Die verminderte Stimulationsantwort der Diabetiker für PHA und LPS könnte durch die erhöhte Ruhesekretion in Form einer negativen Rückkopplung bedingt sein und Ausdruck einer verminderten Reaktionsfähigkeit des Immunsystems auf einen additionalen Stimulationsreiz bei vorliegender Diabeteserkrankung hinweisen. Diese Annahme kann für die Ruhesekretion und die Stimulationsantwort auf LPS anhand der dargestellten Mediane auch auf die Zytokine IL-1 β und IL-8 übertragen werden, mit Ausnahme der oben dargestellten erhöhten Stimulationsantwort bei den Typ 2 Diabetikern auch auf das Zytokin IL-6, allerdings teststatistisch nur für das Zytokin RANTES über die angezeigten Unterschiede hinausgehend formuliert werden.

In klinischer Hinsicht könnte eine verminderte Reaktionsfähigkeit des Immunsystems bei der Diabeteserkrankung ursächlich respektive mitwirkend bei der im Rahmen einer Diabeteserkrankung oft beobachteten Infektanfälligkeit sein [4].

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die untersuchten Gruppen in der Ruhesekretion unterscheiden können, und hierbei die Diabetiker bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6 und RANTES eine erhöhte Zytokinsekretion aufweisen. Des Weiteren können aber auch Unterschiede in der stimulierten Zytokinsekretion aufgezeigt werden, indem sowohl beim Zytokin IL-6 für die Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu den Typ 1 und LADA Diabetikern eine stärkere als auch beim Zytokin RANTES für die Diabetiker im Vergleich zu den Kontrollprobanden eine verminderte Stimulierbarkeit vorzuliegen scheint. Ob das damit gezeigte Ungleichgewicht der Zytokinantwort ursächlich für die Diabeteserkrankung oder Diabetesform ist, kann anhand des hier gewählten Untersuchungsansatzes nicht abschließend geklärt werden, da die Ergebnisse assoziiert aber vermutlich nicht kausal einzuordnen sind.

4.1.3 Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und anthropometrischen oder klinisch-chemischen Einflussfaktoren bei Vollblutstimulation

Hinsichtlich der zweiten Fragestellung sollte zusätzlich untersucht werden, ob ein Zusammenhang beziehungsweise eine Abhängigkeit zwischen der Zytokinsekretion bei Vollblutstimulation und bestimmten anthropometrischen sowie klinisch-chemischen Einflussfaktoren besteht.

Es konnten nur in einer geringen Anzahl bei den einzelnen Gruppen Zusammenhänge in Form von Abhängigkeiten zwischen der Zytokinsekretion und bestimmten Einflussfaktoren beobachtet und darüber hinaus keine alle Gruppen umfassenden Gesetzmäßigkeiten festgestellt werden.

Die explorative und multiple Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und bestimmten anthropometrischen und klinisch-chemischen Einflussfaktoren erfolgte dabei für die Ruhesekretion beziehungsweise die Stimulationsantwort eines Zytokins, bei der vorangehend Gruppenunterschiede aufgezeigt werden konnten. Insgesamt wurden teststatistisch bei 264 Korrelationsuntersuchungen 12 Assoziationen und nachfolgend bei 12 Regressionsuntersuchungen 8 Abhängigkeiten festgestellt, wobei 5 dieser Abhängigkeiten auch bei einer Adjustierung für jeweils verschiedene Einflussfaktoren bestehen blieben. Von Bedeutung ist dabei, dass die Korrelationsuntersuchung anhand der Berechnung des *Spearman*-Korrelationskoeffizienten monotone Assoziationen überprüft, während die nachfolgende Regressionsuntersuchung im Rahmen der angewandten linearen Regressionsmodelle nur lineare Abhängigkeiten überprüft [224]. Aufgrund der geringen Probandenanzahl wurden die Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker in einer Gruppe zusammengefasst.

Bei den anthropometrischen Einflussfaktoren zeigte sich bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker für die Ruhesekretion von IL-1 β eine positive Abhängigkeit vom Alter und für die Stimulationsantwort mit RANTES für PHA eine negative Abhängigkeit vom Alter, welche beide allerdings nach der Adjustierung für die Diabetesdauer nicht mehr nachweisbar waren. Bei den Kontrollprobanden konnte für die Ruhesekretion von IL-6 eine positive und bei Adjustierung bestehende Abhängigkeit vom Alter festgestellt werden. Bei den klinisch-chemischen Einflussfaktoren zeigte sich bei den Typ 2 Diabetikern und Kontrollprobanden für die Ruhesekretion von IL-6 jeweils eine positive und bei Adjustierung bestehende Abhängigkeit von den Triglyceriden. Bei den Typ 2 Diabetikern konnte darüber hinaus für die Ruhesekretion von IL-1 β eine positive Abhängigkeit von den Triglyceriden beobachtet werden, welche bei einer Adjustierung für HbA1c nicht mehr nachweisbar war. Des Weiteren konnte bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker für die Stimulationsantwort mit RANTES für GAD sowie bei den Kontrollprobanden für die Stimulationsantwort mit IL-8 für GAD jeweils eine positive und bei Adjustierung bestehende Abhängigkeit vom C-Peptid festgestellt werden.

Für den anthropometrischen Einflussfaktor Alter wurden in dieser Arbeit eine positive Abhängigkeit der Ruhesekretion von IL-6 bei den gesunden Probanden sowie eine positive Abhängigkeit der Ruhesekretion von IL-1 β bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern

aufgezeigt, wobei letztgenannte Abhängigkeit bei einer Adjustierung für die Diabetesdauer hier nicht mehr nachweisbar war. Zusätzlich zeigte sich bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern eine negative Abhängigkeit der Stimulationsantwort mit RANTES für PHA vom Alter, welche infolge einer Adjustierung für die Diabetesdauer nicht mehr nachweisbar war. Bei den übrigen Gruppen konnte für die Ruheseekretion beziehungsweise Stimulationsantwort bei den jeweiligen Zytokinen kein Zusammenhang mit dem Alter festgestellt werden.

Der Anstieg der Ruheseekretion von IL-6 bei den gesunden Probanden beziehungsweise von IL-1 β bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern mit einem höheren Lebensalter der Probanden ist in der Hinsicht interessant, dass beide Zytokine den pro-inflammatorischen Zytokinen zugeordnet werden können und im höheren Lebensalter die Entwicklung einer geringgradigen Inflammation mit einhergehender Funktionsabnahme des Immunsystems angenommen wird [45;225]. In diesem Kontext könnte die hier aufgezeigte erhöhte Ruheseekretion der Immunzellen Ausdruck einer im höheren Lebensalter auftretenden Inflammation sein. Während im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung isolierte Zellen von jungen und alten Probanden in einer Untersuchung von Beharka *et al.* für die Ruheseekretion von IL-6 beziehungsweise in einer Untersuchung von Fagiolo *et al.* für die Ruheseekretion von IL-1 β jeweils keine Unterschiede aufzeigten, finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben hinsichtlich der Zytokinkonzentration von IL-6 und IL-1 β im Blut [226;227]. Es wird sowohl von höheren Zytokinkonzentrationen von IL-6 im Blut bei älteren Probanden als auch von vergleichbaren Zytokinkonzentrationen von IL-6 im Blut zwischen jungen und älteren Probanden berichtet [227-230]. Als Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse für die Zytokinkonzentration von IL-6 im Blut werden unter anderem Unterschiede zwischen den Untersuchungen in Bezug auf das Lebensalter und den Gesundheitszustand der Probanden angegeben [231]. Für das Zytokin IL-1 β wird in Abhängigkeit der angeführten Untersuchung zum einen von einer erhöhten Zytokinkonzentration von IL-1 β im Blut bei älteren Probanden im Vergleich zu jüngeren Probanden berichtet und zum anderen ein Zusammenhang zwischen der Zytokinkonzentration von IL-1 β im Blut und dem Alter zurückgewiesen [232;233].

Unbeachtet der teils widersprüchlichen Aussagen könnte der aufgezeigte positive Zusammenhang zwischen der Ruheseekretion der jeweiligen Zytokine und dem Alter ursächlich sowohl für eine im Alter auftretende geringgradige Inflammation als auch für die teils nachweisbare erhöhte Zytokinkonzentration im Blut sein. Weiter könnte der bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern angezeigte negative Zusammenhang zwischen der Stimulationsantwort von RANTES für PHA Anzeichen einer Funktionsabnahme des Immunsystems im Alter sein. Berücksichtigt werden sollte, dass ein Zusammenhang bei den Zytokinen jeweils nur bei einer

Probandengruppe aufgezeigt werden konnte, die Anzahl der Probanden in jeder Gruppe nur gering war und die bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern aufgezeigten Abhängigkeiten bei einer Adjustierung für die Diabetesdauer nicht mehr nachweisbar waren.

Für den klinisch-chemischen Einflussfaktor Triglyceride konnte eine positive und bei einer Adjustierung für Blutglukose, HbA1c oder C-Peptid bestehende Abhängigkeit der Ruhesekretion von IL-6 bei den gesunden Probanden und Typ 2 Diabetikern aufgezeigt werden. Dieser Trend, wenn auch nicht teststatistisch signifikant, wurde auch anhand des Korrelationskoeffizienten bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern erkennbar. Zusätzlich zeigte sich bei den Typ 2 Diabetikern eine positive Abhängigkeit der Ruhesekretion von IL-1 β von den Triglyceriden, welche bei einer Adjustierung für HbA1c nicht mehr nachweisbar war. Bei den übrigen Gruppen konnte für die Ruhesekretion von IL-1 β kein Zusammenhang mit den Triglyceriden festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Konzentration an Triglyceriden im Blut und der Ruhesekretion von IL-6 und IL-1 β bei den Typ 2 Diabetikern beziehungsweise von IL-6 bei den Kontrollprobanden beobachtet werden. Somit stellt sich nachfolgend die Frage, ob eine erhöhte Konzentration von Triglyceriden im Blut die Zytokinsekretion durch Immunzellen direkt beeinflusst oder aber die Begleiterscheinung einer vermehrten Fettgewebsmasse darstellt und eine damit einhergehende Aktivierung des Immunsystems die Grundlage für die erhöhte Ruhesekretion bildet [218;234]. Eine durch freie Fettsäuren vermittelte Erhöhung der Konzentration an Triglyceriden im Blut infolge einer Expansion des Fettgewebes und die Beobachtung, dass eine Expansion des Fettgewebes mit einer Aktivierung des Immunsystems einhergeht, stützen die letztgenannte Vorstellung. Gleichzeitig könnte eine erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren im Blut selbst als Ursache für die erhöhte Ruhesekretion in Frage kommen. Eine Untersuchung von Simon *et al.* zeigte, dass eine Inkubation von Vollblutproben mit freien Fettsäuren über 24h eine gesteigerte Sekretion von IL-2 und IL-18 bewirkt [173]. Eine Übertragung der Ergebnisse von freien Fettsäuren auf Triglyceride und von den Zytokinen IL-2 und IL-18 auf die hier untersuchten Zytokine IL-1 β und IL-6 sollte allerdings mit Rücksicht auf die nur eingeschränkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Formen von Lipiden beziehungsweise der Zytokine kritisch betrachtet werden. Des Weiteren konnte in einer Untersuchung von Kern *et al.* eine Korrelation zwischen der Konzentration von IL-6 und der Konzentration von freien Fettsäuren im Blut von Probanden beobachtet werden [235]. Für eine direkte Beeinflussung der Zytokinsekretion von Immunzellen durch Triglyceride sprechen die Ergebnisse zweier Untersuchungen von Son *et al.* beziehungsweise Persson *et al.*, bei denen in Verbindung mit einer erhöhten Beladung von

Makrophagen mit Triglyceriden jeweils eine gesteigerte Sekretion von IL-1 β und in letztgenannter Untersuchung zusätzlich eine verminderte Sekretion von IL-6 festgestellt werden konnte [236;237]. Eine Verringerung der Sekretion von IL-6 steht allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit.

Die Abhängigkeit der Ruhesekretion von den Triglyceriden könnte möglicherweise auf eine Form von physiologischem Regulationsmechanismus hinweisen, indem eine Erhöhung der Triglyceride im Blut über die Erhöhung der Zytokinsekretion metabolische Regulationsmechanismen zur Senkung der Konzentration an Lipiden im Blut induziert. Diese Vorstellung unterstützend konnte in einer Untersuchung von Al-Khalili *et al.* am Skelettmuskel eine IL-6 vermittelte Aufnahme von freien Fettsäuren aufgezeigt und in einer anderen Untersuchung im Mausmodell infolge einer IL-6 induzierten gesteigerten Bildung von Lipoproteinen nachfolgend eine Senkung der Konzentration von Triglyceriden im Blut beobachtet werden [238;239]. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass Zytokine eine tragende Rolle in metabolischen Regulationsvorgängen spielen [240].

Während die geringe Probandenanzahl in den einzelnen Gruppen berücksichtigt werden sollte und die Frage einer direkten Beeinflussung der Zytokinsekretion durch Triglyceride nicht eindeutig beantwortet werden kann, ist die Feststellung einer auch infolge einer Adjustierung für verschiedene Einflussfaktoren bestehende Abhängigkeit der IL-6 Ruhesekretion von der Konzentration an Triglyceriden im Blut bei den Typ 2 Diabetikern und Kontrollprobanden auffällig. Zusätzlich sei die bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern diesbezüglich im Rahmen der Korrelationsuntersuchung sichtbare Tendenz als Hinweis auf ein möglicherweise generelleres Phänomen erwähnt.

Für den klinisch-chemischen Einflussfaktor C-Peptid konnte nach GAD Stimulation bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern für die Stimulationsantwort von RANTES sowie bei den Kontrollprobanden für die Stimulationsantwort von IL-8 eine positive und bei einer Adjustierung für Blutglukose, HbA1c oder Triglyceride bestehende Abhängigkeit aufgezeigt werden. Bei den übrigen Gruppen konnte für die Stimulationsantwort von RANTES beziehungsweise IL-8 nach GAD Stimulation jeweils kein Zusammenhang mit dem C-Peptid festgestellt werden.

Die Höhe des C-Peptids, das äquimolar mit Insulin von den β -Zellen ausgeschüttet wird, dient als Marker der endogenen Insulinsekretion [6;241]. Der positive Zusammenhang zwischen der Sekretion von RANTES nach GAD Stimulation und dem C-Peptid deutet darauf hin, dass der Grad der Zerstörung der β -Zellen mit der Stärke der Immunreaktion zusammenhängt. Je mehr C-Peptid vorhanden ist, desto mehr RANTES wird nach Stimulation mit GAD sezere-

niert beziehungsweise je mehr funktionierende β -Zellen noch da sind, desto stärker ist die Immunreaktion. Die GAD-reaktiven Immunzellen werden bei noch vorhandenen β -Zellen stärker aktiviert. Allerdings sollte dabei berücksichtigt werden, dass der Abfall des C-Peptids im Krankheitsverlauf des Typ 1 Diabetes quantitativ eine individuelle Variation aufweist und bei klinischer Manifestation zwischen 80 und 90% der β -Zellen bereits zerstört sind [4;25;242]. Des Weiteren zeigte eine Untersuchung von Pham *et al.*, dass bei Typ 1 Diabetikern eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von C-Peptid und der Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF- α im Serum besteht [243]. In der Arbeit von Pham *et al.* wurden die Ergebnisse dahingehend interpretiert, dass eine anhand des C-Peptids feststellbare bessere Funktionsfähigkeit der β -Zellen mit einer stärkeren inflammatorischen Aktivität verbunden ist und diese Aktivität des Immunsystems durch residuale β -Zellen aufrecht erhalten wird.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Untersuchung könnte die bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern aufgezeigte erhöhte Reaktivität der Immunzellen für GAD in Form der gesteigerten Sekretion von RANTES bei höherem C-Peptid Ausdruck einer stärkeren inflammatorischen Aktivität des Immunsystems sein, welche durch residuale β -Zellen aufrecht erhalten wird. Die Anzahl an residualen β -Zellen könnte demnach das Ausmaß der inflammatorischen Aktivität des Immunsystems bestimmen und diese könnte bei gesteigerter Reaktivität die β -Zellzerstörung vorantreiben. Eine zusätzlich bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern nachweisbare positive Korrelation zwischen der Stimulationsantwort von RANTES für LPS und der Konzentration von C-Peptid im Blut der Probanden stützt die Vorstellung einer anhand eines höheren C-Peptids angezeigten gesteigerten Aktivität des Immunsystems, wengleich mit LPS im Vergleich zum Inselantigen GAD ein nicht Typ 1 Diabetes-assoziiertes Stimulus vorliegt [241;244].

4.2 Leukozytenstimulation

4.2.1 Vergleich der Gruppen nach Leukozytenstimulation

Hinsichtlich der ersten Fragestellung, ob die Antigenstimulation von isolierten Immunzellen zu unterschiedlichen Konzentrationen an Zytokinen in den verschiedenen Gruppen führt, war nur in wenigen Vergleichen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar. Bei einer Adjustierung für bestimmte Einflussfaktoren konnten Veränderungen bezüglich der teststatistisch angezeigten Unterschiede beobachtet werden, wobei keine Korrektur für multiples Testen angewendet wurde. Für die Antigene GAD, HSP60, p277 und

pIA-2 konnte korrespondierend zu den Ergebnissen der Vollblutstimulation im Wesentlichen keine stimulatorische Wirkung aufgezeigt werden.

Beim Zytokin MCP-1 konnte bei den LADA Diabetikern für die Stimulationen mit PI eine im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern und Typ 2 Diabetikern sowie für die Stimulation mit pIA-2 eine im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern statistisch signifikant geringere Stimulationsantwort festgestellt werden.

Die Zytokinkonzentration von MCP-1 im Zellüberstand war nach Stimulation mit PI bei den LADA Diabetikern deutlich niedriger als bei den Typ 1 Diabetikern und Typ 2 Diabetikern. Im Vergleich zu den Kontrollprobanden zeigte sich ein numerisch um ein Vielfaches niedrigerer Wert, wobei der Unterschied nicht als statistisch signifikant angezeigt wurde.

Die im Vergleich zu den Typ 1 Diabetikern beziehungsweise Typ 2 Diabetikern verminderte Stimulationsantwort der LADA Diabetiker für die Stimulation mit PI ist im Besonderen in Hinsicht auf den angezeigten Unterschied zwischen den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern interessant. Die in der Literatur beschriebene immunologische Ähnlichkeit zwischen dem Typ 1 Diabetes und dem LADA würde eher für eine zwischen den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern vergleichbare Stimulationsantwort sprechen [5]. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass der Typ 1 Diabetiker bei Diagnose sogleich Insulinbedürftig ist, der LADA Diabetiker aber nach Diagnose mindestens 3-6 Monate ohne Insulin gut eingestellt ist, was darauf hindeutet, dass die endogene Insulinsekretion und die β -Zellmasse beim LADA Patienten besser und länger erhalten ist, was eventuell durch eine verminderte immunologische Autoreaktivität bei LADA erklärbar wäre [5;245].

In funktioneller Hinsicht bewirkt das zu den CC-Chemokinen zählende MCP-1 bei Inflammation eine Rekrutierung von Monozyten, Gedächtnis-T-Zellen und dendritischen Zellen [246;247]. Eine Untersuchungen auf MCP-1 im Serum bei Diabetikern zeigte keinen Unterschied von LADA und Typ 1 Diabetes [245]. Bei prädiabetischen Personen mit multiplen Typ 1 Diabetes-assoziierten Antikörpern wiesen allerdings die Personen mit multiplen Antikörpern im Vergleich mit Personen ohne Antikörper die niedrigsten MCP-1-Spiegel im Serum auf [138]. Des Weiteren nahmen bei neu diagnostizierten Typ 1 Diabetikern die MCP-1-Serumspiegel 6 und 12 Monate nach Diabetesdiagnose ab, sodass eine Assoziation von MCP-1 und Krankheitsstadium bereits gezeigt wurde [248]. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass im für den Typ 1 Diabetes eingesetztem Tiermodell der NOD Maus die pankreatische MCP-1 Expression auf Inseln über die Generation von tolerogenen CD11c- und CD11b-positiven dendritischen Zellen einen Diabetes hemmen konnte [246].

Nach Adjustierung für anthropometrische Einflussfaktoren fiel der Unterschied zwischen Typ 1 Diabetes und LADA in den hier vorgestellten Daten weg, allerdings blieb er beim Vergleich

von LADA und Typ 2 Diabetes erhalten. Welche Rolle der MCP-1-Sekretion nach PI-Stimulation zugesprochen werden kann, bedarf weiterer mechanistischer Experimente.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen der Leukozytenstimulation konnte im Rahmen der Vollblutstimulation kein Unterschied zwischen den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern für die Stimulation mit LPS und PHA festgestellt werden. Dabei sind die bei der Vollblutstimulation verwendeten Stimulantien PHA und LPS und der hier bei der Leukozytenstimulation verwendete Stimulus PI in der Form vergleichbar, dass beide in Bezug auf die Typ 1 Diabetes-assoziierten Antigene unspezifische Stimulantien darstellen und jeweils die Funktion einer Positivkontrolle übernehmen [113;126;249]. In Bezug auf vergleichbare Ergebnisse in der Literatur kann eine Untersuchung von Strom *et al.* angeführt werden, bei der anhand des ELISPOT-Verfahrens die Stimulationsantworten der Immunzellen von Typ 1 Diabetikern, LADA Diabetikern, Typ 2 Diabetikern und Kontrollprobanden miteinander verglichen wurden [174]. Die hier untersuchten Zellüberstände wurden während des ELISPOT-Verfahrens im Rahmen jener Untersuchung gewonnen beziehungsweise nach Stimulation der Immunzellen von diesen isoliert, weshalb sowohl die Inkubationszeit als auch die Konzentration der Stimulantien vergleichbar sind. Das Probandenkollektiv der vorliegenden Arbeit für die Leukozytenstimulation stellte dabei ein Teilkollektiv der oben genannten Untersuchung dar. In der Untersuchung von Strom *et al.* konnte für die Sekretion von IL-13 und IFN- γ nach Stimulation mit PI kein Unterschied zwischen den Typ 1 Diabetikern, LADA Diabetikern, Typ 2 Diabetikern und Kontrollprobanden festgestellt werden [174]. Darüber hinaus war für die Stimulationen mit HSP60, p277, GAD und pIA-2 kein Unterschied zwischen den oben genannten Gruppen nachweisbar. Bedingt durch die Messung unterschiedlicher Zytokine erscheint ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den vorliegenden Ergebnissen problematisch, wengleich sowohl dem Zytokin IFN- γ als auch dem Zytokin MCP-1 eine pro-inflammatorische Wirkung zugeschrieben wird [70].

Unabhängig von der Konzentration von MCP-1 im Blut könnte die bei den LADA Diabetikern geringere Stimulationsantwort der Immunzellen auf einen additionalen Stimulus wie PI korrespondierend zu den Beobachtungen bei der Vollblutstimulation auf eine geringgradige Grundaktivierung des Immunsystems hinweisen. Eine solche geringgradige Grundaktivierung könnte Ausdruck einer aktuell ablaufenden autoimmunen Zerstörung der β -Zellen bei den LADA Diabetikern sein. Von Bedeutung erscheint dabei, dass MCP-1 funktionell die Aktivierung und Proliferation von Leukozyten reguliert und ihm in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes eine mitwirkende Rolle bei der Infiltration der Inseln zugeschrieben wird [103;250]. Berücksichtigt werden muss bezüglich des hervorgehobenen Unterschieds zwischen den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern, dass der Unterschied zwischen beiden Gruppen bei

einer Adjustierung sowohl für die anthropometrischen als auch klinisch-chemischen Einflussfaktoren nicht mehr nachweisbar war.

Des Weiteren wurde für das Zytokin MCP-1 für die Stimulation mit pIA-2 infolge einer Adjustierung für die klinisch-chemischen Einflussfaktoren ein Unterschied zwischen den LADA Diabetikern mit einem geringeren Median und den Typ 2 Diabetikern mit einem im Vergleich höheren Median angezeigt.

Die Stimulationsantwort der LADA Diabetiker für pIA-2 war im Vergleich zu allen weiteren Gruppen numerisch geringer ausgeprägt, wobei teststatistisch nur im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern ein Unterschied angezeigt wurde. Im Gegensatz zur Stimulation mit PI stellt der Stimulus pIA-2 ein Typ 1 Diabetes-assoziiertes Antigen dar [241]. Den Ausführungen für die Stimulation mit PI entsprechend könnte die geringere Stimulationsantwort der Immunzellen auf einen additionalen Stimulus wie pIA-2 auf eine geringgradige Grundaktivierung des Immunsystems im Rahmen einer ablaufenden autoimmunen Zerstörung der β -Zellen bei den LADA Diabetikern hinweisen. Im Hinblick auf vergleichbare Ergebnisse in der Literatur konnte in der Untersuchung von Strom *et al.* für die Stimulationsantwort von Immunzellen auf pIA-2 in Form einer Sekretion von IL-13 und IFN- γ kein Unterschied zwischen Typ 1 Diabetikern, LADA Diabetikern, Typ 2 Diabetikern und gesunden Probanden aufgezeigt werden, wobei eine Übertragung auf das Zytokin MCP-1 nur bedingt möglich ist [174].

4.2.2 Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und anthropometrischen oder klinisch-chemischen Einflussfaktoren bei Leukozytenstimulation

Für die erste Fragestellung sollte zusätzlich untersucht werden, ob ein Zusammenhang beziehungsweise eine Abhängigkeit zwischen der Zytokinsekretion in den Zellüberständen nach Leukozytenstimulation und bestimmten anthropometrischen sowie klinisch-chemischen Einflussfaktoren besteht.

Es konnten nur in einer geringen Anzahl bei den einzelnen Gruppen Zusammenhänge in Form von Abhängigkeiten zwischen der Zytokinsekretion und bestimmten Einflussfaktoren beobachtet und dabei keine alle Gruppen umfassenden Gesetzmäßigkeiten festgestellt werden.

Die explorative und multiple Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und bestimmten anthropometrischen sowie klinisch-chemischen Einflussfaktoren erfolgte dabei für die Stimulationsantwort eines Zytokins, bei der vorangehend Gruppenunterschiede aufgezeigt worden waren. Es konnten teststatistisch bei 64 Korrelationsuntersuchungen insgesamt 7 Assoziationen und nachfolgend bei 7 Regressionsuntersuchungen insgesamt 5 Abhängigkeiten festgestellt werden, wobei 2 dieser Abhängigkeiten auch bei einer Adjustierung

für jeweils verschiedene Einflussfaktoren bestehen blieben. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die Korrelationsuntersuchung anhand der Berechnung des *Spearman*-Korrelationskoeffizienten monotone Assoziationen überprüft, während die Regressionsuntersuchung im Rahmen der angewandten linearen Regressionsmodelle nur lineare Abhängigkeiten überprüft [224].

Bei den anthropometrischen Einflussfaktoren zeigte sich für die Stimulationsantwort mit MCP-1 für PI bei der Gruppe der Typ 1 Diabetiker eine positive Abhängigkeit von der Diabetesdauer und bei der Gruppe der LADA Diabetiker eine negative Abhängigkeit vom Geschlecht. Bei den klinisch-chemischen Einflussfaktoren konnte für die Stimulationsantwort mit MCP-1 für PI bei den Typ 1 Diabetikern eine negative Abhängigkeit vom HbA1c festgestellt werden, welche bei einer Adjustierung für das C-Peptid nicht mehr nachweisbar war. Des Weiteren zeigte sich bei der Gruppe der LADA Diabetiker jeweils eine positive Abhängigkeit von der Blutglukose zum einen für die Stimulationsantwort mit MCP-1 für PI, die infolge einer Adjustierung für HbA1c nicht mehr nachweisbar war, und zum anderen für die Stimulationsantwort mit MCP-1 für pIA-2, die infolge einer Adjustierung für Triglyceride nicht mehr nachweisbar war.

Für den anthropometrischen Einflussfaktor Diabetesdauer konnte eine positive Abhängigkeit der Stimulationsantwort von MCP-1 für PI bei den Typ 1 Diabetikern aufgezeigt werden. Bei den Gruppen der LADA Diabetiker und Typ 2 Diabetiker konnte für die Stimulationsantwort von MCP-1 für PI kein Zusammenhang mit der Diabetesdauer festgestellt werden.

Der nachweisbare Zusammenhang zwischen der Erkrankungsdauer und der Reaktivität der Immunzellen bei Typ 1 Diabetikern könnte auf eine Steigerung der Empfindlichkeit der Immunzellen für eine Stimulation mit PI beziehungsweise eine Verringerung der für eine Stimulationsantwort notwendigen Stimulusmenge hinweisen. Eine Untersuchung von Standifer *et al.* zeigte, dass bei Probanden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Typ 1 Diabetes in der präklinischen Phase im Verlauf eine Aviditätssteigerung der Immunzellen für das Typ 1 Diabetes-assoziierte Antigen GAD beobachtet werden konnte [251]. Bei Probanden mit klinisch manifestem Typ 1 Diabetes konnte dieser Vorgang nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse der Untersuchung können dabei nur als einen Hinweis auf die prinzipielle Möglichkeit einer vorliegenden Aviditätssteigerung der Immunzellen für ein Stimulus gewertet werden, indem zum einen in der hier vorliegenden Untersuchung der Zusammenhang bei Probanden mit klinisch manifestem Typ 1 Diabetes aufgezeigt wurde und zum anderen eine Übertragung der Ergebnisse für das Typ 1 Diabetes-assoziierte Antigen GAD auf den unspezifischen Stimulus PI nicht möglich ist. Darüber hinaus spricht der in einer Untersuchung von

Jamali *et al.* aufgezeigte Anstieg der Konzentration von MCP-1 im Blut mit einer längeren Diabetesdauer bei Typ 1 Diabetikern eher gegen eine ursächliche negative Rückkopplung zwischen der Konzentration von MCP-1 im Blut und der stimulierten Sekretion von MCP-1 durch Immunzellen [252].

Andere Untersuchungen bei neu diagnostizierten Typ 1 Diabetikern zeigten, dass im Serum gemessenes MCP-1 von der Diagnose bis zu den Zeitpunkten 6 und 12 Monate abnimmt, so dass die Datenlage hier uneinheitlich bezüglich Patientengruppe, experimentelles Design und Diabetesdauer ist [248].

Für den anthropometrischen Einflussfaktor Geschlecht konnte eine negative Abhängigkeit der Stimulationsantwort von MCP-1 für PI bei den LADA Diabetikern aufgezeigt werden, indem die Ausprägung des weiblichen Geschlechtes im Zusammenhang mit einer geringeren Zytokinsekretion stand. Bei den übrigen Gruppen konnte für die Stimulationsantwort von MCP-1 für PI kein Zusammenhang mit dem Geschlecht festgestellt werden.

Der Zusammenhang zwischen dem weiblichen Geschlecht und einer geringeren Reaktivität der Immunzellen in Form einer verminderten Sekretion von MCP-1 nach Stimulation mit PI bei den LADA Diabetikern könnte ursächlich in Form einer Interaktion zwischen dem Immunsystem und Geschlechtshormonen erklärt werden. In der Literatur wird von einer Unterdrückung der T-Zell-abhängigen Immunreaktionen durch weibliche Geschlechtshormone berichtet [253]. In diesem Kontext könnte eine erhöhte Konzentration von weiblichen Geschlechtshormonen im Blut der weiblichen Probanden die Verbindung zwischen der Ausprägung des weiblichen Geschlechtes und der verminderten Stimulationsantwort darstellen. Allerdings wird in der Literatur gleichzeitig hinsichtlich einer Beeinflussung des Immunsystems durch Geschlechtshormone von einer sowohl auf zellulärer als auch humoraler Ebene stärkeren Immunreaktion beim weiblichen Geschlecht berichtet, wobei konkrete Aussagen für die Wirkung auf die Sekretion einzelner Zytokine fehlen beziehungsweise widersprüchlich sind [254;255]. Beispielhaft kann eine Untersuchung von Verthelyi *et al.* angeführt werden, in der eine positive Korrelation zwischen der Anzahl IL-4 sezernierender Immunzellen nach Stimulation mit PHA und der Konzentration von weiblichen Geschlechtshormonen nachweisbar war [256].

Dieses Ergebnis und die Annahme einer stärkeren Immunreaktion beim weiblichen Geschlecht sprechen allerdings gegen die hier aufgezeigte verringerte Stimulationsantwort der Immunzellen von weiblichen Probanden beziehungsweise können nicht als Erklärung für diese herangezogen werden.

Für den klinisch-chemischen Einflussfaktor Blutglukose konnte jeweils eine positive Abhängigkeit der Stimulationsantwort von MCP-1 für PI beziehungsweise pIA-2 bei den LADA Diabetikern aufgezeigt werden, wobei erstgenannte bei einer Adjustierung für HbA1c und letztgenannte bei einer Adjustierung für Triglyceride nicht mehr nachweisbar waren. Mit Ausnahme der Typ 2 Diabetiker, bei denen für die Stimulationsantwort von MCP-1 für PI eine positive Korrelation mit der Blutglukose festgestellt werden konnte, waren bei den übrigen Gruppen jeweils für beide Stimulationsantworten keine Zusammenhänge nachweisbar. Für HbA1c war eine negative Abhängigkeit der Stimulationsantwort von MCP-1 für PI bei den Typ 1 Diabetikern feststellbar, welche bei einer Adjustierung für C-Peptid nicht mehr angezeigt wurde. Während bei den LADA Diabetikern für die Stimulationsantwort von MCP-1 für PI eine positive Korrelation mit dem HbA1c angezeigt wurde, war bei den Gruppen der Typ 2 Diabetiker und Kontrollprobanden jeweils kein Zusammenhang zwischen der Stimulationsantwort von MCP-1 für PI und HbA1c sichtbar.

Der Zusammenhang zwischen der Konzentration an Glukose im Blut der Probanden und der Stimulationsantwort der Immunzellen für PI und pIA-2 in Form einer Sekretion von MCP-1 bei den LADA Diabetikern und die angezeigte Assoziation zwischen der Blutglukose und der Stimulationsantwort von MCP-1 auf PI bei den Typ 2 Diabetikern deutet auf eine mögliche Beeinflussung der Immunzellen durch die Blutglukose hin. In der Literatur finden sich für einen Zusammenhang zwischen der stimulierten Zytokinsekretion und der Konzentration an Glukose teils widersprüchliche Angaben, wobei eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Untersuchungen nur bedingt gegeben ist. In einer Untersuchung von Jain *et al.* konnte bei isolierten und mit LPS stimulierten Monozyten eine mit höheren Konzentrationen an Glukose steigende Sekretion von MCP-1 beobachtet werden, während in einer Untersuchung von Wijnsman *et al.* bei einer Stimulation von Immunzellen im Vollblut mit LPS eine negative Assoziation zwischen der Blutglukose und der Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α aufgezeigt wurde [257;258]. Bei letztgenannter Untersuchung sollte das hohe Mindestalter der Probanden von 85 Jahren in der Studie berücksichtigt werden. Des Weiteren wurde in einer Untersuchung von Stechova *et al.* bei der Stimulation von isolierten Immunzellen mit PHA, GAD und pIA-2 ein Zusammenhang zwischen der Konzentration an Glukose und der Zytokinsekretion beobachtet, in dem für eine erhöhte Konzentration an Glukose bei kurzfristiger Einwirkung über 2h anhand der Sekretion von MCP-1 eine stimulierende Wirkung und bei langfristiger Einwirkung über 72h anhand der Sekretion von IFN- γ eine hemmende Wirkung nachgewiesen werden konnte [259]. Die Beobachtungen zusammenfassend würde die Einwirkdauer über eine entweder hemmende oder stimulierende Wirkung einer erhöhten Konzentration an Glukose auf die Zytokinsekretion von Immunzellen entscheiden. Unterschiedliche

Versuchsbedingungen, abweichende Stimulantien sowie nicht vergleichbare Zytokine erschweren allerdings eine Übertragung der angeführten Beobachtungen auf die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit.

Für den Zusammenhang zwischen der Stimulationsantwort von MCP-1 für PI und HbA1c bei den Typ 1 Diabetikern scheint interessant, dass in der oben genannten Untersuchung von Wijnsman *et al.* für die Stimulation von Immunzellen im Vollblut mit LPS im Gegensatz zur Blutglukose kein Zusammenhang zwischen der Zytokinsekretion und dem HbA1c festgestellt werden konnte [257].

Der oben dargestellte hemmende Einfluss einer erhöhten Konzentration an Glukose auf die Zytokinsekretion von Immunzellen bei längerer Einwirkdauer könnte ursächlich für den Zusammenhang zwischen einem höheren HbA1c-Wert und einer geringeren Stimulationsantwort von MCP-1 für PI bei den Typ 1 Diabetikern in Frage kommen, indem der HbA1c-Wert als Maß für die durchschnittliche Blutglukosekonzentration der vergangenen drei Monate bei erhöhtem Wert eher die langfristige Einwirkdauer einer erhöhten Konzentration an Glukose anzeigt [260].

4.2.3 Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion nach Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum

Hinsichtlich der dritten Fragestellung, ob ein Zusammenhang zwischen der Zytokinsekretion in den Zellüberständen nach Leukozytenstimulation und der Zytokinkonzentration im Serum der jeweiligen Probanden besteht, konnten im Wesentlichen keine Zusammenhänge aufgezeigt werden. Für einzelne Gruppen konnten in geringer Anzahl Zusammenhänge in Form von Assoziationen beziehungsweise Abhängigkeiten beobachtet werden.

Es wurden teststatistisch bei 60 Korrelationsuntersuchungen insgesamt 3 Assoziationen und nachfolgend bei 3 Regressionsuntersuchungen insgesamt 1 Abhängigkeit festgestellt. Von Bedeutung ist auch hier wieder, dass die Korrelationsuntersuchung anhand der Berechnung des *Spearman*-Korrelationskoeffizienten monotone Assoziationen überprüft, während die Regressionsuntersuchung im Rahmen der angewandten linearen Regressionsmodelle nur lineare Abhängigkeiten überprüft [224].

Für die Gruppe der Typ 2 Diabetiker konnte für die Stimulationsantwort mit MCP-1 für GAD eine negative Assoziation mit beziehungsweise eine negative Abhängigkeit von der Konzentration von MCP-1 im Serum aufgezeigt werden, wobei die Abhängigkeit bei einer Adjustierung für das Geschlecht nicht mehr nachweisbar war. Für die Gruppe der Kontrollprobanden zeigte sich bei den Zytokinen IL-6 und TNF- α jeweils eine positive Assoziation

zwischen der Stimulationsantwort für GAD und der Konzentration des jeweiligen Zytokins im Serum.

Der bei den Typ 2 Diabetikern angezeigte Zusammenhang zwischen der Stimulationsantwort mit MCP-1 für GAD und der Konzentration von MCP-1 im Serum in Form einer negativen Assoziation und Abhängigkeit könnte auf eine negative Rückkopplung in der Form hinweisen, dass eine erhöhte Konzentration von MCP-1 im Serum bei einer nachfolgenden Stimulation der Immunzellen mit GAD eine geringere Zytokinsekretion von MCP-1 bewirkt. Mit Rücksicht darauf, dass die Immunzellen während der Versuchsdurchführung mehrmalige Waschvorgänge durchlaufen und von den Zytokinen im Serum getrennt stimuliert werden, könnte eine mögliche negative Rückkopplung *in vivo* erfolgen und *in vitro* nachwirken. Unklar bleibt in diesem Kontext die Frage, weshalb diese negative Assoziation beziehungsweise negative Abhängigkeit nur bei der Stimulation mit GAD angezeigt wird. Mit Rücksicht darauf, dass es sich bei GAD um ein Typ 1 Diabetes-assoziiertes Antigen handelt, erscheint insgesamt ein Nachweis eines Zusammenhangs zwischen der Stimulationsantwort für GAD und der Konzentration des jeweiligen Zytokins im Serum nur bei den Typ 2 Diabetikern respektive Kontrollprobanden und nicht bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern unerwartet.

4.3 Limitationen

Die vorliegende Arbeit weist sowohl methodisch als auch instrumentell hinsichtlich der technischen Umsetzung dieses Versuchsansatzes verschiedene Limitationen auf, infolgedessen eine Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Studienkollektiv auf die Gesamtbevölkerung beeinträchtigt und die Aussagekraft der Erkenntnisse in Hinblick auf eine Allgemeingültigkeit deutlich begrenzt wird. Im Nachfolgenden sollen verschiedene Gesichtspunkte angesprochen werden.

Für das Studienkollektiv stand nur eine begrenzte Anzahl an Probanden zur Verfügung, wobei insbesondere bei der Vollblutstimulation die relativ geringe Anzahl an Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern und bei der Leukozytenstimulation die Anzahl an Kontrollprobanden ins Gewicht fallen. Aufgrund der geringen Probandenanzahl wurden im Rahmen der Vollblutstimulation bei der Untersuchung auf Zusammenhänge die Gruppen der Typ 1 Diabetiker und LADA Diabetiker zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst.

Sowohl bei der Vollblutstimulation als auch Leukozytenstimulation zeigten sich teils Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich bestimmter anthropometrischer und klinisch-

chemischer Einflussfaktoren. Bei der Untersuchung auf Gruppenunterschiede und Zusammenhänge wurde diesem Umstand in Form einer Adjustierung für ausgewählte anthropometrische und klinisch-chemische Einflussfaktoren Rechnung getragen.

Für das Untersuchungsmaterial in Form von peripheren Immunzellen, die mittels venöser Blutabnahme gewonnen wurden, muss berücksichtigt werden, dass den direkt an der Entzündungsreaktion innerhalb der Pankreasinseln beteiligten infiltrierenden T-Zellen eine größere Relevanz beziehungsweise Bedeutung als den peripher im Blut zirkulierenden T-Zellen zugeschrieben wird [196]. Allgemein stellen zum einen die Pankreasinseln als morphologische Einheit und zum anderen das periphere Blut mit einem korpuskulären Anteil in Form von Zellen und einem humoralen Anteil in Form von löslichen Immunmediatoren die für eine Untersuchung zur Verfügung stehenden Schnittstellen dar [171]. Während die Langerhans-Inseln entweder nur im Tiermodell oder bei Organspendern einer immunologisch detaillierten Untersuchung unterzogen werden können, ist das periphere Blut mit seinen Bestandteilen mittels Venenpunktion und nachfolgender Blutabnahme leicht zugänglich, weshalb hier peripher im Blut zirkulierende Immunzellen als Untersuchungsmaterial verwendet wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Immunzellen direkt nach der Blutabnahme stimuliert und erst nachfolgend bei Minustemperaturen gelagert, um Einschränkungen hinsichtlich der Stimulation nach Lagerung des Probandenmaterials zu vermeiden. Zum Beispiel erwies sich in einer Studie für die Durchführung von *in vitro* Stimulationen hinsichtlich eines Stimulationseffektes ungefrorenes Blut im Vergleich zu gefrorenem Blut als geeigneter [261]. Darüber hinaus fiel die Antigen-reaktive Antwort von vorher gefrorenen Zellen im Vergleich zu vorher nicht gefrorenen Zellen geringer aus [262]. Unter Berücksichtigung der organisatorischen Abläufe mit einer Rekrutierung der Probanden über einen längeren Zeitraum war eine Lagerung des Probandenmaterials bei Minustemperaturen nach Stimulation nicht vermeidbar und brachte den Vorteil mit, dass infolge einer Versuchsdurchführung mit dem gesamten Probenmaterial in einem kurzen Zeitraum die Variabilität zwischen mehreren Messungen vermindert werden konnte.

Unter Abwägung der jeweiligen Vorteile und Nachteile erfolgte in vorausgehenden Versuchen eine Festlegung der angewandten Probenverdünnungen und der Inkubationszeiten. Während beim Verdünnungsverhältnis hinsichtlich eines detektierbaren Effektes ein Kompromiss zwischen notwendiger und zur Verfügung stehender Substanzmenge gefunden werden musste, beinhaltete die Kompromissfindung bei der Inkubationszeit eine Abwägung zwischen der für einen detektierbaren Effekt notwendigen Zeit und dem mit einer längeren Inkubationszeit steigenden Risiko einer Kontamination. Die Festlegung der Inkubationszeit von 24h im Rahmen der Vollblutstimulation erfolgte dabei auf Grundlage der Erkenntnisse,

dass eine Verlängerung der Inkubationszeit den Ablauf hämolytischer Prozesse begünstigt und in der Literatur bei einer Vollblutstimulation kein Unterschied hinsichtlich der Zytokinsekretion zwischen einer Inkubationszeit von 24h beziehungsweise 48h aufgezeigt werden konnte [263;264].

Beim Verbrauchsmaterial konnte aufgrund von bestimmten Verpackungseinheiten sowie einer jeweils benötigten Menge die alleinige Verwendung einer Charge nicht bewerkstelligt werden. Damit einhergehende Abweichungen zwischen den einzelnen Chargen wurden hier durch eine Anwendung von Kontrollproben kontrolliert.

Beim Untersuchungsverfahren in Form des *multiplex-bead-array-assay*-Verfahrens wirkt sich die gleichzeitige beziehungsweise gemeinsame Messung mehrerer Substanzen in einem Versuchsansatz insofern nachteilig aus, als dass die Komplexität von Kreuzreaktionen gesteigert wird und es nicht möglich ist, für alle nachzuweisenden Substanzen gleichzeitig die optimalen Bedingungen zu finden [176]. Dieser Umstand hat zur Konsequenz, dass einige Zytokin-konzentrationen nicht bestimmbar waren und somit das entsprechende Zytokin nicht ausgewertet werden konnte. Zusätzlich wurden im Gegensatz zur Verwendung von Fertigsets die einzelnen *bead*-Körper separat mit für jeweils ein einzelnes Zytokin spezifische Antikörper gekoppelt, infolgedessen eine geringere Messgenauigkeit beobachtet werden konnte.

In diesem Kontext sollte bei der Auswertung der Messergebnisse berücksichtigt werden, dass bei der Vollblutstimulation die Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α stärker erhöhte Werte für die *inter-assay*-Variabilität aufzeigten, während bei der Leukozytenstimulation mit Ausnahme des Zytokins IP10 sämtliche Zytokine stärker erhöhte Werte für die *inter-assay*-Variabilität aufzeigten.

Grundlegend muss der hier vorliegende Untersuchungsansatz hinsichtlich einer Informationsgewinnung bezüglich der ätiopathogenetischen Rolle des Immunsystems bei der Diabetes-erkrankung kritisch betrachtet werden. Obgleich mehrerer Fragestellungen und der simultanen Messung mehrerer Zytokine können in dieser Form nur begrenzte Abschnitte des Gesamtprozesses untersucht und somit hinsichtlich des Gesamtkontextes nur in einem begrenzten Maße Erkenntnisse gewonnen werden. Weiter scheint vor dem Hintergrund der Komplexität des Immunsystems mit zahlreichen Komponenten und vielfältigen Wechselwirkungen eine Aussage über die Beteiligung einzelner Komponenten generell nur eingeschränkt möglich.

4.4 Schlussfolgerungen

Die hier vorliegende Arbeit verfolgte die Zielsetzung, mit einer Untersuchung der Antigenstimulierten Zytokinsekretion im Vollblut und in Zellüberständen bei Typ 1 Diabetikern,

LADA Diabetikern, Typ 2 Diabetikern und Kontrollprobanden mehr über die Rolle immunologischer Vorgänge beziehungsweise speziell einzelner Antigene und Zytokine in der Pathogenese der Diabeteserkrankung zu erfahren. Dabei lassen sich grundsätzlich folgende Folgerungen zusammenfassen.

Eine allgemeine Funktionsfähigkeit der Vollblutstimulation mit einem Vitalitätserhalt der Immunzellen konnte anhand einer starken stimulatorischen Wirkung der Stimulation mit LPS bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IP10 sowie der Stimulation mit PHA beim Zytokin IP10 aufgezeigt werden. Davon abweichend zeigten die mit dem Typ 1 Diabetes assoziierten Antigene sowohl bei der Vollblutstimulation als auch bei der Stimulation isolierter Immunzellen im Rahmen der Leukozytenstimulation keine stimulatorische Wirkung auf, wobei zwischen einer tatsächlich nicht vorhandenen stimulatorischen Wirkung der Antigene und einer diesbezüglich fehlenden Sensitivität der Untersuchungsansätze nicht unterschieden werden konnte.

Sowohl bei der Vollblutstimulation als auch bei der Leukozytenstimulation konnten in Anbetracht der Gesamtzahl an untersuchten Zytokinen im Wesentlichen keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, wobei die geringe Probandenanzahl in den einzelnen Gruppen berücksichtigt werden sollte.

Vereinzelt zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen, indem innerhalb der Vollblutstimulation die Diabetiker bei den Zytokinen IL-1 β und IL-6 sowie tendenziell beim Zytokin RANTES eine im Vergleich zu den gesunden Probanden erhöhte Ruhesekretion aufwiesen. Im Vergleich zu den Typ 1 und LADA Diabetikern konnte bei den Typ 2 Diabetikern für die Zytokine IL-1 β und IL-6 jeweils eine geringere Ruhesekretion beobachtet werden. Für die Stimulationsantwort auf LPS zeigten die Typ 2 Diabetiker innerhalb aller Diabetiker die höchste Sekretion von IL-6 sowie tendenziell die Diabetiker insgesamt im Vergleich zu den gesunden Probanden eine geringere Sekretion von RANTES auf. Diese Beobachtungen für die Zytokine der angeborenen Komponente des Immunsystems könnten auf eine geringgradige und unspezifische Grundaktivierung des Immunsystems mit einer abgeschwächten Immunantwort auf Stimulation im Rahmen der Diabeteserkrankung hinweisen. Ob dem sichtbaren Ungleichgewicht der Ruhesekretion beziehungsweise der Zytokinantwort bei den Diabetikern eine ursächliche Rolle für die unterschiedlichen Formen der Diabeteserkrankung zuzuordnen ist, konnte anhand des hier vorliegenden Untersuchungsansatzes nicht beantwortet werden.

Innerhalb der Leukozytenstimulation zeigten die LADA Diabetiker bei einer Stimulation mit PI eine im Vergleich zu den Typ 1 und Typ 2 Diabetikern geringere Sekretion von MCP-1. In diesem Kontext könnte die beim LADA obgleich einer immunologischen Ähnlichkeit mit

dem Typ 1 Diabetes nicht unmittelbar nach Diagnose bestehende Insulinabhängigkeit auf eine verminderte Autoreaktivität der Immunzellen mit einer länger erhaltenen β -Zellmasse beziehungsweise Insulinsekretion hindeuten.

Es konnten in Anbetracht der Gesamtzahl der Untersuchungen insgesamt nur vereinzelt Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und bestimmten anthropometrischen und klinisch-chemischen Einflussfaktoren und diesbezüglich keine alle Gruppen umfassenden Gesetzmäßigkeiten aufgezeigt werden, wobei im Rahmen des explorativen Ansatzes keine Korrektur für eine multiple Anwendung der teststatistischen Untersuchungsverfahren erfolgte und auch hier die geringe Probandenanzahl in den einzelnen Gruppen berücksichtigt werden sollte.

Im Hinblick auf eine Interaktion zwischen immunologischen Vorgängen und klinisch-chemischen Faktoren konnte innerhalb der Vollblutstimulation ein positiver Zusammenhang zwischen der Ruhesekretion von IL-6 und der Konzentration von Triglyceriden im Blut aufgezeigt werden. Bei den Typ 2 Diabetikern und gesunden Probanden zeigte sich jeweils eine auch unter Adjustierung bestehende Abhängigkeit der IL-6 Ruhesekretion von der Konzentration von Triglyceriden im Blut und bei den Typ 1 Diabetikern und LADA Diabetikern konnte eine tendenzielle Assoziation zwischen der Ruhesekretion von IL-6 und der Konzentration von Triglyceriden im Blut beobachtet werden. Eine Differenzierung zwischen einer direkten Beeinflussung der Immunzellen durch Triglyceride im Blut oder dem im Rahmen einer gesteigerten Fettgewebmasse gleichzeitigem Vorliegen einer vermehrten Inflammation und einer erhöhten Konzentration an Triglyceriden im Blut konnte anhand des vorliegenden Untersuchungsansatzes nicht erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit konnten im Rahmen der angewandten Untersuchungsansätze nur wenige Unterschiede zwischen den Diabetikern untereinander beziehungsweise den Diabetikern und gesunden Probanden aufgezeigt werden. Unter Außerachtlassung einer möglicherweise nicht ausreichenden Sensitivität des Untersuchungsansatzes unterschieden sich die Immunzellen der untersuchten Gruppen zumindest hinsichtlich einer Stimulation *in vitro* im Wesentlichen nicht beziehungsweise ergab sich weiterführend im Rahmen des hier angewandten Untersuchungsansatzes auf der Ebene der Zytokinsekretion nach Stimulation *in vitro* keine Erklärung für die unterschiedliche Ausprägung der untersuchten Diabetesformen. Die unter Berücksichtigung der Gesamtanzahl an Untersuchungen nur vereinzelt feststellbaren Zusammenhänge zwischen der Zytokinsekretion und bestimmten Einflussfaktoren sind jeweils als Hinweise auf eine möglicherweise bestehende Interaktion zwischen der Zytokinsekretion von Immunzellen und bestimmten Einflussfaktoren zu verstehen und sollten mit einem größeren Studienkollektiv überprüft werden.

5 Literaturverzeichnis

- [1] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **1997**; 20: 1183-1197
- [2] Mandrup-Poulsen T: Diabetes. *British Medical Journal* **1998**; 316: 1221-1225
- [3] Alberti KGMM, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine* **1998**; 15: 539-553
- [4] Herold G: *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold Eigenverlag, **2008**. S658-685
- [5] Ola TO, Gigante A, Leslie RDG: Latent autoimmune diabetes of adults (LADA). *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2006**; 16: 163-167
- [6] Brophy S, Davies H, Mannan S, Brunt H, Williams R: Interventions for latent autoimmune diabetes (LADA) in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2011**; 9
- [7] Hawa MI, Thivolet C, Mauricio D, Alemanno I, Cipponeri E, Collier D, Hunter S, Buzzetti R, De Leiva A, Pozzilli P, et al: Metabolic syndrome and autoimmune diabetes: action LADA 3. *Diabetes Care* **2009**; 32: 160-164
- [8] Hawa MI, Kolb H, Schloot N, Beyan H, Paschou SA, Buzzetti R, Mauricio D, De Leiva A, Yderstraede K, Beck-Neilsen H, et al: Adult-Onset Autoimmune Diabetes in Europe Is Prevalent With a Broad Clinical Phenotype Action LADA 7. *Diabetes Care* **2013**; 36: 908-913
- [9] Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, et al: Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2002**; 55: 65-85
- [10] Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J: IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2011**; 94: 311-321
- [11] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2010**; 87: 4-14
- [12] Tamayo T, Rathmann W: Update diabetology 2012: Epidemiology and diagnostics. *Diabetologie* **2013**; 9: 365-372
- [13] IDF: *Diabetes Atlas 5th Edition 2012 Update*. Brüssel: International Diabetes Federation, **2012**
- [14] Daneman D: Type 1 diabetes. *Lancet* **2006**; 367: 847-858
- [15] Atkinson MA, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* **2001**; 358: 221-229
- [16] Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes: recent developments. *British Medical Journal* **2004**; 328: 750-754
- [17] Akerblom HK, Vaarala O, Hyoty H, Ilonen J, Knip M: Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *American Journal of Medical Genetics* **2002**; 115: 18-29
- [18] Pociot F, McDermott MF: Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes and Immunity* **2002**; 3: 235-249
- [19] Todd JA: From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *Bioessays* **1999**; 21: 164-174
- [20] Salvetti M, Ristori G, Bompreszi R, Pozzilli P, Leslie RDG: Twins: mirrors of the immune system. *Immunology Today* **2000**; 21: 342-347
- [21] Mauricio D, Mandrup-Poulsen T: Apoptosis and the pathogenesis of IDDM - A question of life and death. *Diabetes* **1998**; 47: 1537-1543
- [22] Barker JM, Barriga KJ, Yu LP, Miao DM, Erlich HA, Norris JM, Eisenbarth GS, Rewers M: Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2004**; 89: 3896-3902
- [23] Maclaren N, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, Clare-Salzer M, She JX, Malone J, Crockett S, et al: Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2 beta predict immune-mediated (type 1) diabetes in relatives. *Journal of Autoimmunity* **1999**; 12: 279-287
- [24] Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H, Winkler C, Pfluger M, Illig T, Bonifacio E, et al: Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* **2009**; 52: 1881-1888
- [25] Horton V, Stratton I, Bottazzo GF, Shattock M, Mackay I, Zimmet P, Manley S, Holman R, Turner R: Genetic heterogeneity of autoimmune diabetes: age of presentation in adults is influenced by HLA DRB1 and DQB1 genotypes (UKPDS 43). *Diabetologia* **1999**; 42: 608-616
- [26] Nolan CJ, Damm P, Prentki M: Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* **2011**; 378: 169-181
- [27] Mayer-Davis EJ, Dabelea D, Lamichhane AP, D'Agostino RB, Liese AD, Thomas J, McKeown RE, Hamman RF: Breast-feeding and type 2 diabetes in the youth of three ethnic groups - The SEARCH for Diabetes in Youth Case-Control Study. *Diabetes Care* **2008**; 31: 470-475
- [28] Casals-Casas C, Desvergne B: Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annual*

- Review of Physiology **2011**; 73: 135-162
- [29] Wajchenberg BL: Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* **2000**; 21: 697-738
- [30] Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP: Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**; 9: 367-377
- [31] DeFronzo RA: From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes* **2009**; 58: 773-795
- [32] Schmidt R, Lang F, Thews G: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 29.Auflage. Berlin: Springer Verlag, **2005**. S477-482, S538-550
- [33] Löffler G, Petrides P: *Biochemie & Pathobiochemie*. 7.Auflage. Berlin: Springer Verlag, **2002**. S210-215, S813-835, S837-864, S1121-1158
- [34] Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **2001**; 414: 813-820.
- [35] Zinman B, Kahn SE, Haffner SM, O'Neill MC, Heise MA, Freed MI: Phenotypic characteristics of GAD antibody-positive recently diagnosed patients with type 2 diabetes in North America and Europe. *Diabetes* **2004**; 53: 3193-3200
- [36] Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J: Metabolic syndrome - a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic Medicine* **2006**; 23: 469-480
- [37] Kerner W, Bruckel J: Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **2014**; 122: 384-386
- [38] Bohm BO, Dreyer M, Fritsche A, Fuchtenbusch M, Golz S, Martin S: Therapy of Type-1-Diabetes Abstract 1st Edition. *Diabetologie und Stoffwechsel* **2013**; 8: S133-S143
- [39] Landgraf R, Kellerer M, Fach E, Gallwitz B, Hamann A, Joost HG, Klein HH, Müller-Wieland D, Nauck MA, Reuter HM, et al: Practical Recommendations DDG/DGIM Therapy of Type-2-Diabetes. *Diabetologie und Stoffwechsel* **2013**; 8: S146-S158
- [40] Böcker W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie*. 3.Auflage. Amsterdam: Elsevier Urban&Fischer, **2004**. S112-145, S1102-1105
- [41] Köhler W, Eggers H, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G: *Medizinische Mikrobiologie*. 8.Auflage. München: Urban&Fischer, **2001**. S17-59
- [42] Murphy K: *Janeway's Immunobiology*. 8th Edition. London: Taylor & Francis Ltd., **2011**. S37-73
- [43] Axtories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9.Auflage. Amsterdam: Elsevier Urban&Fischer, **2004**. S617-637
- [44] Donnelly RP, Young HA, Rosenberg AS: An Overview of Cytokines and Cytokine Antagonists as Therapeutic Agents. *Cytokine Therapies: Novel Approaches for Clinical Indications* **2009**; 1182: 1-13
- [45] Banerjee M, Saxena M: Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. *Clinica Chimica Acta* **2012**; 413: 1163-1170
- [46] Kelso A: Cytokines and their receptors: An overview. *Therapeutic Drug Monitoring* **2000**; 22: 40-43
- [47] Murphy K, Travers P, Walport M: *Janeway Immunologie* (aus dem Englischen übersetzt von Lothar Seidler und Ingrid Hauber-Siller). 7.Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, **2009**. S1007-1015
- [48] Janeway CA jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ: *Immunologie* (aus dem Englischen übersetzt von Kurt Beginnen, Lothar Seidler und Ingrid Hauber-Siller). 5.Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, **2002**. S725-728
- [49] Nicod LP: Cytokines - Overview. *Thorax* **1993**; 48: 660-667
- [50] Gemsa D, Kalden JR, Resch K: *Immunologie Grundlagen-Klinik-Praxis*. 4.Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, **1997**. S45-67
- [51] Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ: Recombinant Human Interferon-Inducible Protein-10 Is A Chemoattractant for Human Monocytes and T-Lymphocytes and Promotes T-Cell Adhesion to Endothelial-Cells. *Journal of Experimental Medicine* **1993**; 177: 1809-1814
- [52] Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th Edition. New York: Garland Science, **2001**. S620-626
- [53] Alcami A, Smith GL: A Soluble Receptor for Interleukin-1-Beta Encoded by Vaccinia Virus - A Novel Mechanism of Virus Modulation of the Host Response to Infection. *Cell* **1992**; 71: 153-167
- [54] Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP: Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* **1999**; 104: 723-742
- [55] Kuno K, Matsushima K: The Il-1 Receptor Signaling Pathway. *Journal of Leukocyte Biology* **1994**; 56: 542-547
- [56] Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, Dower SK: Cloning the Interleukin-1 Receptor from Human T-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**; 86: 8946-8950
- [57] Mandrup-Poulsen T, Zumsteg U, Reimers J, Pociot F, Morch L, Helqvist S, Dinarello CA, Nerup J: Involvement of Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonist in Pancreatic Beta-Cell Destruction in Insulin-

- Dependent Diabetes-Mellitus. *Cytokine* **1993**; 5: 185-191
- [58] Arend WP, Malyak M, Smith MF, Whisenand TD, Slack JL, Sims JE, Giri JG, Dower SK: Binding of Il-1-Alpha, Il-1-Beta, and Il-1 Receptor Antagonist by Soluble Il-1 Receptors and Levels of Soluble Il-1 Receptors in Synovial-Fluids. *Journal of Immunology* **1994**; 153: 4766-4774
- [59] Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **1996**; 87: 2095-2147
- [60] Sporri B, Wiesmann UN, Ochsenbein RM, Loetscher M, Waelti ER, Lottaz D, Bickel M: Soluble IL-1 receptor type I binds to human dermal fibroblasts and induces calcium flux. *Febs Letters* **1998**; 434: 283-288
- [61] Kroemer G, Hirsch F, Gonzalez-Garcia A, Martinez C: Differential involvement of Th1 and Th2 cytokines in autoimmune diseases. *Autoimmunity* **1996**; 24: 25-33
- [62] Guest CB, Park MJ, Johnson DR, Freund GG: The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Frontiers in Bioscience* **2008**; 13: 5187-5194
- [63] Bohm I, Bauer R: Th1-cells, Th2-cells and atopic dermatitis. *Hautarzt* **1997**; 48: 223-227
- [64] Maher JJ: Cytokines: Overview. *Seminars in Liver Disease* **1999**; 19: 109-115
- [65] Decarli M, Delios MM, Zancuoghi G, Romagnani S, Delprete G: Human Th1 and Th2 Cells - Functional-Properties, Regulation of Development and Role in Autoimmunity. *Autoimmunity* **1994**; 18: 301-308
- [66] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL: Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochemistry and Biophysics* **2007**; 48: 159-163
- [67] Feghali CA, Wright TM: Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* **1997**; 2: d12-d26
- [68] Brenner DR, Scherer D, Muir K, Schildkraut J, Boffetta P, Spitz MR, Le Marchand L, Chan AT, Goode EL, Ulrich CM, et al: A Review of the Application of Inflammatory Biomarkers in Epidemiologic Cancer Research. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2014**; 23: 1729-1751
- [69] Herder C, Brunner EJ, Rathmann W, Strassburger K, Tabak AG, Schloot NC, Witte DR: Elevated Levels of the Anti-Inflammatory Interleukin-1 Receptor Antagonist Precede the Onset of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2009**; 32: 421-423
- [70] Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ: Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **2014**; 1843: 2563-2582
- [71] Etna MP, Giacomini E, Severa M, Coccia EM: Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. *Seminars in Immunology* **2014**; 26: 543-551
- [72] Argiles JM, Lopez-soriano J, Lopez-soriano FJ: Cytokines and Diabetes - the Final Step - Involvement of Tnf-Alpha in Both Type-I and Type-II Diabetes-Mellitus. *Hormone and Metabolic Research* **1994**; 26: 447-449
- [73] Chatzigeorgiou A, Harokopos V, Mylona-Karagianni C, Tsouvalas E, Aidinis V, Kamper E: The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. *Annals of Medicine* **2010**; 42: 426-438
- [74] Dinarello CA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T: Role of IL-1 beta in type 2 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity* **2010**; 17: 314-321
- [75] Netea MG, Hancu N, Blok WL, Grigorescu-Sido P, Popa L, Popa V, van der Meer JWM: Interleukin 1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1 receptor antagonist in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus: Comparison to long-standing diabetes and healthy individuals. *Cytokine* **1997**; 9: 284-287
- [76] Aribi M, Moulessehoul S, Kendouci-Tani M, Benabadi AB, Hichami A, Khan NA: Relationship between interleukin-1 beta and lipids in type 1 diabetic patients. *Medical Science Monitor* **2007**; 13: CR372-378
- [77] Ehses JA, Boni-Schnetzler M, Faulenbach M, Donath MY: Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. *Biochemical Society Transactions* **2008**; 36: 340-342
- [78] Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY: Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* **2007**; 356: 1517-1526
- [79] Hulme MA, Wasserfall CH, Atkinson MA, Brusko TM: Central Role for Interleukin-2 in Type 1 Diabetes. *Diabetes* **2012**; 61: 14-22
- [80] Baeyens A, Perol L, Fourcade G, Cagnard N, Carpentier W, Woytschak J, Boyman O, Hartemann A, Piaggio E: Limitations of IL-2 and Rapamycin in Immunotherapy of Type 1 Diabetes. *Diabetes* **2013**; 62: 3120-3131
- [81] Hartemann A, Bourron O: Interleukin-2 and type 1 diabetes: New therapeutic perspectives. *Diabetes & Metabolism* **2012**; 38: 387-391
- [82] Ploix C, Bergerot I, Fabien N, Perche S, Moulin V, Thivolet C: Protection against autoimmune diabetes with oral insulin is associated with the presence of IL-4 type 2 T-cells in the pancreas and pancreatic lymph nodes. *Diabetes* **1998**; 47: 39-44
- [83] Mi QS, Ly D, Zucker P, McGarry M, Delovitch TL: Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type 1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells. *Diabetes* **2004**; 53: 1303-1310
- [84] Mueller R, Bradley LM, Krahl T, Sarvetnick N: Mechanism underlying counterregulation of autoimmune

- diabetes by IL-4. *Immunity* **1997**; 7: 411-418
- [85] Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, Delovitch TL: IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *Journal of Immunology* **1997**; 159: 4686-4692
- [86] Creusot R, Chang P, Yaghoubi S, Healey D, Tcherepanova I, Nicolette C, Fathman CG: A Short Pulse of IL-4 Delivered Locally by mRNA Electroporated DCs is Sufficient to Prevent or Treat Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Clinical Immunology* **2009**; 131: S553
- [87] Dicosmo BF, Picarella D, Flavell RA: Local Production of Human IL-6 Promotes Insulinitis But Retards the Onset of Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus in Nonobese Diabetic Mice. *International Immunology* **1994**; 6: 1829-1837
- [88] Mirza S, Hossain M, Mathews C, Martinez P, Pino P, Gay JL, Rentfro A, McCormick JB, Fisher-Hoch SP: Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: A cross-sectional study. *Cytokine* **2012**; 57: 136-142
- [89] Alexandraki KI, Piperi C, Ziakas PD, Apostolopoulos NV, Makrilakis K, Syriou V, Diamanti-Kandarakis E, Kaltsas G, Kalofoutis A: Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: Associations with low-grade systemic inflammation. *Journal of Clinical Immunology* **2008**; 28: 314-321
- [90] Wasserfall C, Schwartz RF, Simon G, Binns SA, Brusko T, Stalvey M, Clare-Salzler M, Song S, Campbell-Thompson M, Flotte T, et al: A dichotomous role for interleukin-10 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes* **2005**; 54: A24
- [91] Arif S, Estorninho M, Peakman M, Vives-Pi M, Planas R, Borrell RP, Moore F, Bouckennooghe T, Eizirik D: The Role of the IL-17 Pathway in Human Type 1 Diabetes. *Clinical Immunology* **2010**; 135: S37
- [92] Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C: Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *European Journal of Immunology* **2009**; 39: 216-224
- [93] Araya AV, Pavez V, Perez C, Gonzalez F, Colombo A, Aguirre A, Schiattino I, Aguillon JC: Ex vivo lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6 and PGE(2) secretion in whole blood from Type 1 diabetes mellitus patients with or without aggressive periodontitis. *European Cytokine Network* **2003**; 14: 128-133
- [94] Moller DE: Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2000**; 11: 212-217
- [95] Mandrup-Poulsen T: beta-cell apoptosis - Stimuli and signaling. *Diabetes* **2001**; 50: S58-63
- [96] Mandrup-Poulsen T: Beta cell death and protection. *Ann N Y Acad Sci* **2003**; 1005: 32-42
- [97] Lee IF, Qin H, Priatel JJ, Tan R: Critical role for IFN-gamma in natural killer cell-mediated protection from diabetes. *European Journal of Immunology* **2008**; 38: 82-89
- [98] Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, Martin L, Mcintyre B, Gregory A, Parslow T, Stewart T: Loss of Pancreatic-Islet Tolerance Induced by Beta-Cell Expression of Interferon-Gamma. *Nature* **1990**; 346: 844-847
- [99] Lo HC, Lin SC, Wang YM: The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus. *Clinical Biochemistry* **2004**; 37: 666-672
- [100] Van Sickle BJ, Simmons J, Hall R, Raines M, Ness K, Spagnoli A: Increased circulating IL-8 is associated with reduced IGF-1 and related to poor metabolic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Cytokine* **2009**; 48: 290-294
- [101] Christen U, von Herrath MG: IP-10 and type 1 diabetes: A question of time and location. *Autoimmunity* **2004**; 37: 273-282
- [102] Schulthess FT, Paroni F, Sauter NS, Shu L, Ribaux P, Haataja L, Strieter RM, Oberholzer J, King CC, Maedler K: CXCL10 Impairs beta Cell Function and Viability in Diabetes through TLR4 Signaling. *Cell Metabolism* **2009**; 9: 125-139
- [103] Chen MC, Proost P, Gysemans C, Mathieu C, Eizirik DL: Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells. *Diabetologia* **2001**; 44: 325-332
- [104] Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S: Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes. *Clinical and Experimental Immunology* **2000**; 121: 437-443
- [105] Zhernakova A, Alizadeh BZ, Eerligh P, Hanifi-Moghaddam P, Schloot NC, Diosdado B, Wijmenga C, Roep BO, Koeleman BPC: Genetic variants of RANTES are associated with serum RANTES level and protection for type 1 diabetes. *Genes and Immunity* **2006**; 7: 544-549
- [106] Kim DK, Park MK, Park EJ, Lee HJ: TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) prevents the development of type 1 diabetes by modulation of RANTES. *Diabetes* **2005**; 54: A309
- [107] Habibi J, Backus EA, Huesing JE: Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Knight. *Journal of Insect Physiology* **2000**; 46: 611-619
- [108] Leavitt RD, Felsted RL, Bachur NR: Biological and Biochemical Properties of Phaseolus-Vulgaris Isolectins. *Journal of Biological Chemistry* **1977**; 252: 2961-2966
- [109] Chrispeels MJ, Raikhel NV: Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. *Plant Cell* **1991**; 3:

- [110] Hernandez DE, Leavitt RD: Mitogenic and Mitogenically Defective Phytohemagglutinin Isolectins Stimulate T-Cell Growth-Factor (Interleukin-2) Production and Response in Fresh and Cultured Human T-Lymphocytes. *Cellular Immunology* **1984**; 86: 101-108
- [111] Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N: What Should be Called A Lectin. *Nature* **1980**; 285: 66
- [112] Gyorffy Z, Duda E, Vizier C: Interactions between LPS moieties and macrophage pattern recognition receptors. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2013**; 152: 28-36
- [113] Guha M, Mackman N: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* **2001**; 13: 85-94
- [114] Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJK, Kaufman DL, Wagner-Mcpherson CB, Evans GA, Tobin AJ: 2 Human Glutamate Decarboxylases, 65-Kda Gad and 67-Kda Gad, Are Each Encoded by A Single Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**; 89: 2115-2119
- [115] Karlsen AE, Hagopian WA, Grubin CE, Dube S, Disteché CM, Adler DA, Barmeier H, Mathewes S, Grant FJ, Foster D, et al: Cloning and Primary Structure of A Human Islet Isoform of Glutamic-Acid Decarboxylase from Chromosome-10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**; 88: 8337-8341
- [116] Sorenson RL, Garry DG, Brelje TC: Structural and Functional Considerations of Gaba in Islets of Langerhans - Beta-Cells and Nerves. *Diabetes* **1991**; 40: 1365-1374
- [117] Kim J, Richter W, Aanstoot HJ, Shi YG, Fu Q, Rajotte R, Warnock G, Baekkeskov S: Differential Expression of Gad₆₅ and Gad₆₇ in Human, Rat, and Mouse Pancreatic-Islets. *Diabetes* **1993**; 42: 1799-1808
- [118] Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richterlesen H, Camilli PD: Identification of the 64K Autoantigen in Insulin-Dependent Diabetes As the Gaba-Synthesizing Enzyme Glutamic-Acid Decarboxylase. *Nature* **1990**; 347: 151-156
- [119] Ludvigsson J, Faresjo M, Hjorth M, Axelsson S, Cheramy M, Pihl M, Vaarala O, Forsander G, Ivarsson S, Johansson C, et al: GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *New England Journal of Medicine* **2008**; 359: 1909-1920
- [120] Elias D, Cohen IR: The hsp60 peptide p277 arrests the autoimmune diabetes induced by the toxin Streptozotocin. *Diabetes* **1996**; 45: 1168-1172
- [121] Nussbaum G, Zanin-Zhorov A, Quintana F, Lider O, Cohen IR: Peptide p277 of HSP60 signals T cells: inhibition of inflammatory chemotaxis. *International Immunology* **2006**; 18: 1413-1419
- [122] Schloot NC, Cohen LR: DiaPep277 (R) and immune intervention for treatment of type 1 diabetes. *Clinical Immunology* **2013**; 149: 307-316
- [123] Elias D, Cohen IR: Peptide Therapy for Diabetes in Nod Mice. *Lancet* **1994**; 343: 704-706
- [124] Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR: beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* **2001**; 358: 1749-1753
- [125] Horvath L, Cervenak L, Oroszlan M, Prohaszka Z, Uray K, Hudecz F, Baranyi E, Madacsy L, Singh M, Romics L, et al: Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type I diabetes mellitus. *Immunology Letters* **2002**; 80: 155-162
- [126] Jia YY, Gao P, Chen HZ, Wan YZ, Zhang R, Zhang ZQ, Yang RF, Wang X, Xu J, Liu DP: SIRT1 suppresses PMA and ionomycin-induced ICAM-1 expression in endothelial cells. *Science China-Life Sciences* **2013**; 56: 19-25
- [127] Gao M, Jin WJ, Qian YN, Ji LL, Feng GB, Sun J: Effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist on T helper cell differentiation induced by phorbol-myristate-acetate and ionomycin. *Cytokine* **2011**; 56: 458-465
- [128] Bommireddy R, Saxena V, Ormsby I, Yin MY, Boivin GP, Babcock GF, Singh RR, Doetschman T: TGF-beta 1 regulates lymphocyte homeostasis by preventing activation and subsequent apoptosis of peripheral lymphocytes. *Journal of Immunology* **2003**; 170: 4612-4622
- [129] Ding R, Tang JS, Gao H, Li T, Zhou H, Liu L, Yao XS: New methymycin derivatives of *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439 and their inhibitory effects on human T cell proliferation mediated by PMA/ionomycin. *Archives of Pharmacal Research* **2012**; 35: 1567-1572
- [130] Mukherjee S, Maiti PK, Nandi D: Role of CD80, CD86, and CTLA4 on mouse CD4(+) T lymphocytes in enhancing cell-cycle progression and survival after activation with PMA and ionomycin. *Journal of Leukocyte Biology* **2002**; 72: 921-931
- [131] Quintana FJ, Cohen IR: The HSP60 immune system network. *Trends in Immunology* **2011**; 32: 89-95
- [132] Fink AL: Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* **1999**; 79: 425-449
- [133] Pockley AG, Muthanal M, Calderwood SK: The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **2008**; 33: 71-79
- [134] Wallin RPA, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG: Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends in Immunology* **2002**; 23: 130-135
- [135] Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb W: Human 60-kDa heat-shock protein: A danger

- signal to the innate immune system. *Journal of Immunology* **1999**; 162: 3212-3219
- [136] Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA: Cutting edge: Heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *Journal of Immunology* **2000**; 164: 13-17
- [137] Hawkes CJ, Schloot NC, Marks J, Willemsen SJM, Drijfhout JW, Mayer EK, Christie MR, Roep BO: T-cell lines reactive to an immunodominant epitope of the tyrosine phosphatase-like autoantigen IA-2 in type 1 diabetes. *Diabetes* **2000**; 49: 356-366
- [138] Hanifi-Moghaddam P, Schloot NC, Kappler S, Seissler J, Kolb H: An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes. *Diabetes* **2003**; 52: 1137-1142
- [139] Stayoussef M, Benmansour J, Al Jenaidi FA, Said HB, Rayana CB, Mahjoub T, Almawi WY: Glutamic Acid Decarboxylase 65 and Islet Cell Antigen 512/IA-2 Autoantibodies in Relation to Human Leukocyte Antigen Class II DR and DQ Alleles and Haplotypes in Type 1 Diabetes Mellitus. *Clinical and Vaccine Immunology* **2011**; 18: 990-993
- [140] Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL: Molecular-Cloning and Identification of A Receptor-Type Protein-Tyrosine-Phosphatase, Ia-2, from Human Insulinoma. *Dna and Cell Biology* **1994**; 13: 505-514
- [141] Xie JP, Zhang BW, Lan MS, Notkins AL: Genomic structure and promoter sequence of the insulin-dependent diabetes mellitus autoantigen, IA-2 (PTPRN). *Genomics* **1998**; 54: 338-343
- [142] Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoowarren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PMM: Islet-Cell Antigen-512 Is A Diabetes-Specific Islet Autoantigen Related to Protein-Tyrosine Phosphatases. *Journal of Immunology* **1994**; 152: 3183-3188
- [143] Harashima S, Clarke A, Christie MR, Notkins AL: The dense core transmembrane vesicle protein IA-2 is a regulator of vesicle number and insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**; 102: 8704-8709
- [144] Lampasona V, Bearzatto M, Genovese S, Bosi E, Ferrari M, Bonifacio E: Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. *Journal of Immunology* **1996**; 157: 2707-2711
- [145] Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Andersen HU, Pociot F, Reimers JI, Cuartero BG, Karlsten AE, Bierre U, Lorenzen T: On the Pathogenesis of Iddm. *Diabetologia* **1994**; 37: S82-89
- [146] Donath MY, Schumann DM, Faulenbach M, Ellingsgaard H, Perren A, Ehes JA: Islet Inflammation in Type 2 Diabetes From metabolic stress to therapy. *Diabetes Care* **2008**; 31: S161-164
- [147] Kolb H, Mandrup-Poulsen T: An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia* **2005**; 48: 1038-1050
- [148] Atkinson MA, Maclaren NK: Mechanisms of Disease - the Pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. *New England Journal of Medicine* **1994**; 331: 1428-1436
- [149] Dogan Y, Akarsu S, Ustundag B, Yilmaz E, Gurgoze MK: Serum IL-1 beta, IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators of Inflammation* **2006**; 1: 1-6
- [150] Mandrup-Poulsen T: The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* **1996**; 39: 1005-1029
- [151] Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO: Brief report - Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-cell deficiency. *New England Journal of Medicine* **2001**; 345: 1036-1040
- [152] Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M, et al: Mononuclear Cell Infiltration and Its Relation to the Expression of Major Histocompatibility Complex Antigens and Adhesion Molecules in Pancreas Biopsy Specimens from Newly-Diagnosed Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus Patients. *Journal of Clinical Investigation* **1993**; 92: 2313-2322
- [153] Moriwaki M, Itoh N, Miyagawa J, Yamamoto K, Imagawa A, Yamagata K, Iwahashi H, Nakajima H, Namba M, Nagata S, et al: Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* **1999**; 42: 1332-1340
- [154] Like AA, Kislauskis E, Williams RM, Rossini AA: Neonatal Thymectomy Prevents Spontaneous Diabetes-Mellitus in the Bb/W Rat. *Science* **1982**; 216: 644-646
- [155] Healey D, Ozegbe P, Arden S, Chandler P, Hutton J, Cooke A: In-Vivo Activity and In-Vitro Specificity of Cd4(+) Th1 and Th2 Cells Derived from the Spleens of Diabetic Nod Mice. *Journal of Clinical Investigation* **1995**; 95: 2979-2985
- [156] Thivolet C, Bendelac A, Bedossa P, Bach JF, Carnaud C: Cd8+ T-Cell Homing to the Pancreas in the Nonobese Diabetic Mouse Is Cd4+ T-Cell-Dependent. *Journal of Immunology* **1991**; 146: 85-88
- [157] Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, Mcdevitt HO: Immune-Response to Glutamic-Acid Decarboxylase Correlates with Insulinitis in Nonobese Diabetic Mice. *Nature* **1993**; 366: 72-75
- [158] Kahn SE: The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* **2003**; 46: 3-19
- [159] Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV: Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Gene Expression of Serum Adipokines That Predict Type 2 Diabetes. *Obesity* **2010**; 18: 884-889
- [160] Sartipy P, Loskutoff DJ: Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**; 100: 7265-7270

- [161] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa KI, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, et al: MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* **2006**; 116: 1494-1505
- [162] Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* **1997**; 389: 610-614
- [163] Pickup J, Chusney G, Burt D, Mattock M: NIDDM as a disease of the innate immune system: Association of acute-phase reactants and interleukin-6 with NIDDM, syndrome X and microalbuminuria. *Diabetes* **1997**; 46: 1391
- [164] Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliari L, Ceriello A, Giugliano D: Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans - Role of oxidative stress. *Circulation* **2002**; 106: 2067-2072
- [165] Pham MN, Hawa MI, Pflieger C, Roden M, Scherthaner G, Pozzilli P, Buzzetti R, Scherbaum W, Seissler J, Kolb H, et al: Pro- and anti-inflammatory cytokines in latent autoimmune diabetes in adults, type 1 and type 2 diabetes patients: Action LADA 4. *Diabetologia* **2011**; 54: 1630-1638
- [166] Boni-Schnetzler M, Ehses JA, Faulenbach A, Donath MY: Insulinitis in type 2 diabetes. *Diabetes Obesity & Metabolism* **2008**; 10: 201-204
- [167] Brooks-Worrell B, Palmer JP: Immunology in the Clinic Review Series; focus on metabolic diseases: development of islet autoimmune disease in type 2 diabetes patients: potential sequelae of chronic inflammation. *Clinical and Experimental Immunology* **2012**; 167: 40-46
- [168] Brooks-Worrell B, Narla R, Palmer JP: Islet autoimmunity in phenotypic type 2 diabetes patients. *Diabetes Obesity & Metabolism* **2013**; 15: 137-140
- [169] Brooks-Worrell B, Palmer JP: Is Diabetes Mellitus a Continuous Spectrum? *Clinical Chemistry* **2011**; 57: 158-161
- [170] Sarikonda G, Sachithanatham S, Pettus J, Rodriguez-Calvo T, Phatak S, Edelman S, von Herrath M: Higher proinflammatory cytokine production and spontaneous activation in some type 1 and type 2 diabetic subjects. *Clinical Immunology* **2014**; 155: 27-29
- [171] Schloot NC, Roep BO: Islet antigen-specific T cell clones in autoimmune diabetes: From mice to men. *Diabetes-Metabolism Reviews* **1997**; 13: 127-138
- [172] Corkum CP, Ings DP, Burgess C, Karwowska S, Kroll W, Michalak TI: Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT (TM)) and standard density gradient. *Bmc Immunology* **2015**; 16
- [173] Simon MC, Bilan S, Nowotny B, Dickhaus T, Burkart V, Schloot NC: Fatty acids modulate cytokine and chemokine secretion of stimulated human whole blood cultures in diabetes. *Clin Exp Immunol* **2013**; 172: 383-393
- [174] Strom A, Menart B, Simon MC, Pham MN, Kolb H, Roden M, Pozzilli P, Leslie RDG, Schloot NC: Cellular interferon-gamma and interleukin-13 immune reactivity in type 1, type 2 and latent autoimmune diabetes: Action LADA 6. *Cytokine* **2012**; 58: 148-151
- [175] Meierhoff G, Ott PA, Lehmann PV, Schloot NC: Cytokine detection by ELISPOT: relevance for immunological studies in type 1 diabetes. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* **2002**; 18: 367-380
- [176] Elshal MF, McCoy JP: Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods* **2006**; 38: 317-323
- [177] Carson RT, Vignali DAA: Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *Journal of Immunological Methods* **1999**; 227: 41-52
- [178] Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, Bishop JE, Varro R: Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem* **1999**; 45: 1693-1694
- [179] Kellar KL, Iannone MA: Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Experimental Hematology* **2002**; 30: 1227-1237
- [180] Camilla C, Mely L, Magnan A, Casano B, Prato S, Debono S, Montero F, Defoort JP, Martin M, Fert V: Flow cytometric microsphere-based immunoassay: Analysis of secreted cytokines in whole-blood samples from asthmatics. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **2001**; 8: 776-784
- [181] Baud M, Mercier M, Chatelain F: Transforming signals into quantitative values and mathematical treatment of data. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **1991**; 205: 120-130
- [182] Davis D, Zhang A: Principles of Curve Fitting for Multiplex Sandwich Immunoassays. Bulletin 2861. Hercules: Bio-Rad Laboratories, **2007**. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2861.pdf, letzter Zugriff am 01.02.2017
- [183] Kellar KL, Douglass JP: Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays for human cytokines. *Journal of Immunological Methods* **2003**; 279: 277-285
- [184] Gottschalk PG, Dunn JR: The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Anal Biochem* **2005**; 343: 54-65
- [185] Kellar KL, Kalwar RR, Dubois KA, Crouse D, Chafin WD, Kane BE: Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry* **2001**; 45: 27-36

- [186] Levinson SS, Miller JJ: Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clinica Chimica Acta* **2002**; 325: 1-15
- [187] Boscato LM, Stuart MC: Heterophilic Antibodies - A Problem for All Immunoassays. *Clinical Chemistry* **1988**; 34: 27-33
- [188] Pflieger C, Schloot N, ter Veld F: Effect of serum content and diluent selection on assay sensitivity and signal intensity in multiplex bead-based immunoassays. *Journal of Immunological Methods* **2008**; 329: 214-218
- [189] Hanifi-Moghaddam, P: Immune Mediators in Type 1 Diabetes Mellitus. unv. Dissertation, Düsseldorf **2013**
- [190] Armbruster DA, Pry T: Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* **2008**; 29 Suppl 1: S49-52
- [191] Hosmer D, Lemeshow D, Sturdivant R: Applied Logistic Regression. 3rd Edition. Hoboken: John Wiley & Sons, **2013**. S1-33
- [192] Brooks-Worrell B, Barnes J, Warsen A, Palmer J: Inflammatory and Regulatory Markers in the Peripheral Blood of Type 2 Diabetes Patients Developing Islet Autoimmunity. *Clinical Immunology* **2009**; 131: S121
- [193] Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Bello I, Cilio CM, Wong FS, Schloot NC: Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clinical and Experimental Immunology* **2011**; 163: 33-49
- [194] Roep BO, Peakman M: Antigen Targets of Type 1 Diabetes Autoimmunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2012**; 2: a007781
- [195] Fukui M, Nakamura N, Nakano K, Kondo M: Cellular immune response to GAD in type 1 diabetes with residual beta-cell function. *Diabetes Care* **1999**; 22: 1758-1759
- [196] Roep BO: T-cell responses to autoantigens in IDDM - The search for the Holy Grail. *Diabetes* **1996**; 45: 1147-1156
- [197] Khare SD, Krco CJ, Griffiths MM, Luthra HS, David CS: Oral-Administration of An Immunodominant Human Collagen Peptide Modulates Collagen-Induced Arthritis. *Journal of Immunology* **1995**; 155: 3653-3659
- [198] Gaur A, Wiers B, Liu A, Rothbard J, Fathman CG: Amelioration of Autoimmune Encephalomyelitis by Myelin Basic-Protein Synthetic Peptide Induced Anergy. *Science* **1992**; 258: 1491-1494
- [199] Wu Y, Wang YL, Zhan J: Effects of remifentanyl and fentanyl on LPS-induced cytokine release in human whole blood in vitro. *Molecular Biology Reports* **2009**; 36: 1113-1117
- [200] De Bont N, Netea MG, Rovers C, Smilde T, Hijmans A, Demacker PNM, Van der Meer JWM, Stalenhoef AFH: LPS-induced release of IL-1 beta, IL-1Ra, IL-6, and TNF-alpha in whole blood from patients with familial hypercholesterolemia: No effect of cholesterol-lowering treatment. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **2006**; 26: 101-107
- [201] Balistreri CR, Caruso C, Listi F, Colonna-Romano G, Lio D, Candore G: LPS-mediated production of pro/anti-inflammatory cytokines and eicosanoids in whole blood samples: Biological effects of +896A/G TLR4 polymorphism in a Sicilian population of healthy subjects. *Mechanisms of Ageing and Development* **2011**; 132: 86-92
- [202] Johnson K, Aarden L, Choi Y, DeGroot E, Creasey A: The proinflammatory cytokine response to coagulation and endotoxin in whole blood. *Blood* **1996**; 87: 5051-5060
- [203] Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, et al: Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clinical and Experimental Immunology* **1998**; 113: 401-406
- [204] Duffy D, Rouilly V, Libri V, Hasan M, Beitz B, David M, Urrutia A, Bisiaux A, Labrie ST, Dubois A, et al: Functional analysis via standardized whole-blood stimulation systems defines the boundaries of a healthy immune response to complex stimuli. *Immunity* **2014**; 40: 436-450
- [205] Gabriel P, Cakman I, Rink L: Overproduction of monokines by leukocytes after stimulation with lipopolysaccharide in the elderly. *Experimental Gerontology* **2002**; 37: 235-247
- [206] Juneja R, Hirsch IB, Naik RG, Brooks-Worrell BM, Greenbaum CJ, Palmer JP: Islet cell antibodies and glutamic acid decarboxylase antibodies, but not the clinical phenotype, help to identify type 1(1/2) diabetes in patients presenting with type 2 diabetes. *Metabolism-Clinical and Experimental* **2001**; 50: 1008-1013
- [207] Krischer JP, Cuthbertson DD, Yu LP, Orban T, Maclaren N, Jackson R, Winter WE, Schatz DA, Palmer JP, Eisenbarth GS: Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2003**; 88: 103-108
- [208] Huurman VAL, van der Meide PE, Duinkerken G, Willemsen S, Cohen IR, Elias D, Roep BO: Immunological efficacy of heat shock protein 60 peptide DiaPep277 (TM) therapy in clinical type I diabetes. *Clinical and Experimental Immunology* **2008**; 152: 488-497
- [209] Koniaras C, Heath WR, Lew AM: T cell unresponsiveness in vitro can be due to activation in vivo.

- International Immunology **1998**; 10: 365-369
- [210] Boettler T, Pagni PP, Jaffe R, Cheng Y, Zerhouni P, von Herrath M: The clinical and immunological significance of GAD-specific autoantibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Journal of Autoimmunity* **2013**; 44: 40-48
- [211] Biancotto A, Wank A, Perl S, Cook W, Olnes MJ, Dagur PK, Fuchs JC, Langweiler M, Wang E, McCoy JP: Baseline levels and temporal stability of 27 multiplexed serum cytokine concentrations in healthy subjects. *PLoS One* **2013**; 8(12): e76091
- [212] Li Y, Browne RW, Bonner MR, Deng F, Tian L, Mu L: Positive relationship between total antioxidant status and chemokines observed in adults. *Oxid Med Cell Longev* **2014**; 2014: 693680
- [213] Maier R, Weger M, Haller-Schober EM, El Shabrawi Y, Wedrich A, Theisl A, Aigner R, Barth A, Haas A: Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients. *Mol Vis* **2008**; 14: 637-643
- [214] Falcone M, Sarvetnick N: The effect of local production of cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clinical Immunology* **1999**; 90: 2-9
- [215] Wucherpfennig KW, Eisenbarth GS: Type I diabetes. *Nature Immunology* **2001**; 2: 767-768
- [216] Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AFH: 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* **2003**; 52: 812-817
- [217] Ohno Y, Aoki N, Nishimura A: In-Vitro Production of Interleukin-1, Interleukin-6, and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha in Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **1993**; 77: 1072-1077
- [218] Jung UJ, Choi MS: Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**; 15: 6184-6223
- [219] Glund S, Krook A: Role of interleukin-6 signalling in glucose and lipid metabolism. *Acta Physiologica* **2008**; 192: 37-48
- [220] Belardelli F, Ferrantini M: Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* **2002**; 23(4): 201-208
- [221] Lacy P, Stow JL: Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* **2011**; 118(1): 9-18
- [222] Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A: Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci* **2014**; 126(9): 593-612
- [223] Foss-Freitas MC, Foss NT, Donadi EA, Foss MC: In vitro TNF-alpha and IL-6 production by adherent peripheral blood mononuclear cells obtained from type 1 and type 2 diabetic patients evaluated according to the metabolic control. *Ann N Y Acad Sci* **2006**; 1079: 177-180
- [224] Puth MT, Neuhauser M, Ruxton GD: Effective use of Spearman's and Kendall's correlation coefficients for association between two measured traits. *Animal Behaviour* **2015**; 102: 77-84
- [225] Castelo-Branco C, Soveral I: The immune system and aging: a review. *Gynecol Endocrinol* **2014**; 30(1): 16-22
- [226] Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R: Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* **1993**; 23(9): 2375-2378
- [227] Beharka AA, Meydani M, Wu DY, Leka LS, Meydani A, Meydani SN: Interleukin-6 production does not increase with age. *Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences* **2001**; 56: B81-B88
- [228] Gleib DA, Goldman N, Lin YH, Weinstein M: Age-Related Changes in Biomarkers: Longitudinal Data from a Population-Based Sample. *Res Aging* **2011**; 33(3): 312-326
- [229] Hager K, Machein U, Krieger S, Platt D, Seefried G, Bauer J: Interleukin-6 and Selected Plasma-Proteins in Healthy-Persons of Different Ages. *Neurobiology of Aging* **1994**; 15: 771-772
- [230] Wei J, Xu HM, Davies JL, Hemmings GP: Increase of Plasma Il-6 Concentration with Age in Healthy-Subjects. *Life Sciences* **1992**; 51: 1953-1956
- [231] Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H: Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* **2004**; 39(5): 687-699
- [232] Di Iorio A, Ferrucci L, Sparvieri E, Cherubini A, Volpato S, Corsi A, Bonafe M, Franceschi C, Abate G, Paganelli R: Serum IL-1beta levels in health and disease: a population-based study. 'The InCHIANTI study'. *Cytokine* **2003**; 22(6): 198-205
- [233] Krishnan VV, Ravindran R, Wun T, Luciw PA, Khan IH, Janatpour K: Multiplexed measurements of immunomodulator levels in peripheral blood of healthy subjects: Effects of analytical variables based on anticoagulants, age, and gender. *Cytometry B Clin Cytom* **2014**; 86(6): 426-435
- [234] Ferrante AW Jr: The immune cells in adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* **2013**; 15(03): 34-38
- [235] Kern PA, Ranganathan S, Li CL, Wood L, Ranganathan G: Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology-*

- Endocrinology and Metabolism **2001**; 280: E745-E751
- [236] Son SJ, Rhee KJ, Lim J, Kim TU, Kim TJ, Kim YS: Triglyceride-induced macrophage cell death is triggered by caspase-1. *Biol Pharm Bull* **2013**; 36(1): 108-113
- [237] Persson J, Nilsson J, Lindholm MW: Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages. *Lipids Health Dis* **2006**; 5:17
- [238] Al Khalili L, Bouzakri K, Glund S, Lonnqvist F, Koistinen HA, Krook A: Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Molecular Endocrinology* **2006**; 20: 3364-3375
- [239] Hashizume M, Yoshida H, Koike N, Suzuki M, Mihara M: Overproduced interleukin 6 decreases blood lipid levels via upregulation of very-low-density lipoprotein receptor. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2010**; 69: 741-746
- [240] Coppack SW: Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* **2001**; 60(3): 349-356
- [241] Simon MC, Pham MN, Schloot NC: Biomarkers and type 1 diabetes. *Diabetologia* **2012**; 8: 11-17
- [242] Ludvigsson J, Carlsson A, Deli A, Forsander G, Ivarsson SA, Kockum I, Lindblad B, Marcus C, Lernmark A, Samuelsson U: Decline of C-peptide during the first year after diagnosis of Type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2013**; 100: 203-209
- [243] Pham MN, Kolb H, Battelino T, Ludvigsson J, Pozzilli P, Zivehe F, Roden M, Mandrup-Poulsen T, Schloot NC: Fasting and meal-stimulated residual beta cell function is positively associated with serum concentrations of proinflammatory cytokines and negatively associated with anti-inflammatory and regulatory cytokines in patients with longer term type 1 diabetes. *Diabetologia* **2013**; 56(6): 1356-1563
- [244] Eggesbo JB, Hjermann I, Lund PK, Joo GB, Ovstebo R, Kierulf P: Lps-Induced Release of Il-1-Beta, Il-6, Il-8, Tnf-Alpha and Scd14 in Whole-Blood and PbmC from Persons with High Or Low-Levels of Hdl-Lipoprotein. *Cytokine* **1994**; 6: 521-529
- [245] Pham MN, Hawa MI, Roden M, Scherthaner G, Pozzilli P, Buzzetti R, Scherbaum WA, Seissler J, Hunter S, Leslie RDG, et al: Increased serum concentrations of adhesion molecules but not of chemokines in patients with Type 2 diabetes compared with patients with Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adult age: Action LADA 5. *Diabetic Medicine* **2012**; 29: 470-478
- [246] Kriegel MA, Rathinam C, Flavell RA: Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c+ CD11b+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **2012**; 109(9): 3457-3462
- [247] Gu L, Tseng SC, Rollins BJ: Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol* **1999**; 72: 7-29
- [248] Pflieger C, Mortensen HB, Hansen L, Herder C, Roep BO, Hoey H, Aanstoot HJ, Kocova M, Schloot NC: Association of IL-1ra and adiponectin with C-peptide and remission in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **2008**; 57(4): 929-937
- [249] Hu YX, Gu YJ, Cui Q, Fu HR, Sheng LX, Wu KN, Liu LZ, Fu S, Yu XH, Huang H: Phytohemagglutinin-activated human T cells induce lethal graft-versus-host disease in cyclophosphamide and anti-CD122 conditioned NOD/SCID mice. *Annals of Hematology* **2012**; 91: 1803-1812
- [250] Conti P, DiGioacchino MD: MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy and Asthma Proceedings* **2001**; 22: 133-137
- [251] Standifer NE, Burwell EA, Gersuk VH, Greenbaum CJ, Nepom GT: Changes in autoreactive T cell avidity during type 1 diabetes development. *Clinical Immunology* **2009**; 132: 312-320
- [252] Jamali Z, Nazari M, Khoramdelazad H, Hakimizadeh E, Mahmoodi M, Karimabad MN, Hassanshahi G, Rezaeian M, Balaei P, Darakhshan S, et al: Expression of CC chemokines CCL2, CCL5, and CCL11 is associated with duration of disease and complications in type-1 diabetes: a study on Iranian diabetic patients. *Clin Lab* **2013**; 59: 993-1001
- [253] Da Silva JAP: Sex hormones and glucocorticoids: Interactions with the immune system. *Neuroendocrine Immune Basis of the Rheumatic Diseases* **1999**; 876: 102-118
- [254] Bouman A, Heineman MJ, Faas MM: Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* **2005**; 11(4): 411-423
- [255] Verthelyi D: Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* **2001**; 1(6): 983-993
- [256] Verthelyi D, Klinman DM: Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology* **2000**; 100(3): 384-390
- [257] Wijsman CA, Mooijaart SP, Westendorp RG, Maier AB: Responsiveness of the innate immune system and glucose concentrations in the oldest old. *Age* **2012**; 34(4): 983-986
- [258] Jain SK, Rains JL, Croad JL: High glucose and ketosis (acetoacetate) increases, and chromium niacinate decreases, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion and oxidative stress in U937 monocytes. *Antioxid Redox Signal* **2007**; 9(10): 1581-1590
- [259] Stechova K, Spalova I, Durilova M, Bartaskova D, Cerny M, Cerna M, Pithova P, Chudoba D, Stavikova V, Ulmannova T, et al: Influence of maternal hyperglycaemia on cord blood mononuclear cells in response to diabetes-associated autoantigens. *Scand J Immunol* **2009**; 70(2): 149-158
- [260] Syed IA: Glycated haemoglobin; past, present, and future are we ready for the change. *J Pak Med Assoc* **2011**; 61(4): 383-388

- [261] Chen JW, Bruns AH, Donnelly HK, Wunderink RG: Comparative in vitro stimulation with lipopolysaccharide to study TNF alpha gene expression in fresh whole blood, fresh and frozen peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Immunological Methods* **2010**; 357: 33-37
- [262] Brooks-Worrell B, Tree T, Mannering SI, Durinovic-Bello I, James E, Gottlieb P, Wong S, Zhou Z, Yang L, Cilio CM, et al: Comparison of cryopreservation methods on T-cell responses to islet and control antigens from type 1 diabetic patients and controls. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* **2011**; 27: 737-745
- [263] Petrovsky N, Harrison LC: Cytokine-Based Human Whole-Blood Assay for the Detection of Antigen-Reactive T-Cells. *Journal of Immunological Methods* **1995**; 186: 37-46
- [264] Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D: Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sciences* **2000**; 67: 291-300

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. N. Schloot für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Bereitstellung der Arbeitsmittel und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Hervorheben möchte ich die immer vorhandene Bereitschaft für konstruktive Diskussionen und die jederzeitige Verfügbarkeit bei Fragen. Des Weiteren danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. M. Roden als Direktor des Instituts für klinische Diabetologie und wissenschaftlichen Geschäftsführer des Deutschen Diabetes-Zentrums für die Möglichkeit der Promotion am Deutschen Diabetes-Zentrum.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Minh Pham und Dr. Christian Pfleger für die praktische Einarbeitung und gute Anleitung während der Laborarbeit sowie bei Dr. Alexander Strom für die jederzeitige Verfügbarkeit als Ansprechpartner bei Fragestellungen bedanken. Für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die praktische Unterstützung möchte ich Dr. Barbara Menart, Ruth Rütter und Rita Schreiner und für die Bereitstellung einzelner Labormaterialien die AG Herder danken.

Für die beratende Unterstützung bei der statistischen Auswertung gilt mein Dank Herrn Dr. K. Strassburger vom Institut für Biometrie und Epidemiologie am Deutschen Diabetes-Zentrum.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

05.02.2017, Mark Ooms

Unterschrift

